

Tetravalent Bispecific 항체 분자인 Di-diabody의 제조 및 표적 단백질에 대한 항염증 영향

정선기****† · 류창선*† · 김선규** · 마진열*** · 김상겸*#

*충남대학교 약학대학, 형질전환복제돼지센터, **한화케미칼 중앙연구소,

***한국한의학연구원 신한방제제연구센터

(Received September 10, 2010; Revised November 17, 2010; Accepted November 22, 2010)

Production of Di-diabody, a Tetravalent Bispecific Antibody Molecule and its Anti-inflammatory Effects on the Target Proteins

Sun Ki Jung****†, Chang Seon Ryu*†, Sun Kyu Kim**, Jin Yeol Ma*** and Sang Kyum Kim*#

*College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

**Hanwha Chemical R&D Center, Daejeon 305-804, Korea

***Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstract — TNF- α and VCAM-1 play a pivotal role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and the development of drugs targeting these molecules has extended the therapeutical approaches to rheumatoid arthritis patients. Bispecific antibodies combine the antigen-binding sites of two antibodies within a single molecule and thus they are able to bind to two different epitopes simultaneously. A specific bispecific antibody format termed “Di-diabody” was made for the efficient approach to anti-inflammation. In this study, the DNA vector construct of Di-diabody was built up against two antigens, VCAM-1 and TNF- α . For evaluating this Di-diabody as a bispecific antibody on the efficacy of anti-inflammation, the proteins were analyzed according to each antigen binding affinity and cell based assay related separate molecules. The 7H/Humira Di-diabody produced in this study interacted with its ligands, VCAM-1 and TNF- α , respectively. Also, this antibody exhibited the similar functional activities as compared to 7H-IgG in respect to inhibition of hVCAM-1-induced cell adhesion and Humira-IgG in respect to inhibition of TNF- α induced cytotoxicity. Further study to elucidate the pharmacological significance of the Di-diabody is warranted using experimental animals.

Keywords □ rheumatoid arthritis, TNF-alpha, VCAM-1, bispecific antibody, Di-diabody

류마티스 관절염은 가장 빈번히 발생하는 만성 염증성 관절 질환의 하나로 전세계 인구의 0.5~1%에서 발병되며 관절의 염증과 파괴에 기인한 관절 통증과 팽창, 경직을 수반한다. 결국 신체를 물리적 불능 상태로 만들어 중국에는 사망에 이르게 할 수 있다. 관절염은 자가면역질환의 일종으로 발병 원인은 완전히 규명되지 않았지만 T 세포를 포함한 면역 세포들이 관절 주위의 조직세포들을 외부 물질로 인식, 공격하여 염증을 일으킴으로써 발병되는 것으로 알려져 있다. 염증 반응은 혈관에서의 면역세포들이 염증 주위로 이동 및 침투에 의해 발생하게 되며 면역세포의 표면에서 발현되는 다양한 분자들과 관절 주위의 내피세포

에서 발현되는 분자 간의 결합에 의해 일어나게 된다. 또한 대표적인 염증 매개 인자인 TNF(tumor necrosis factor)는 단핵구(monocyte)와 대식세포(macrophage) 등에서 발현되는 다양한 역할을 가진 사이토카인(cytokine)으로 조직의 손상을 일으키는 IL-1(interleukin-1)과 GM-CSF(Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, 과립구 대식세포 콜로니 자극인자)의 발현을 증가시켜 관절염을 포함한 대부분의 염증에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.¹⁻³⁾

혈관계에서 백혈구(leukocyte)는 염증 반응에 중요한 역할을 하며 내피세포와 여러 단계에서 상호작용을 한다. 상호작용은 순차적으로 random contact, rolling, arrest, transmigration 등을 포함하며 이를 통해 백혈구는 내피세포를 통과한다.⁴⁾ 이러한 모든 과정은 백혈구와 내피세포의 세포접착 분자(cell adhesion molecules, CAMs)의 여러 조합에 의해 수행된다. Integrin,

†본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

†These authors equally contributed to this work.

selectin, ICAM(Intercellular adhesion molecule), VCAM (Vascular cell adhesion molecule) 등의 많은 세포접착분자가 이러한 과정에 관여한다. 이들 단백질은 기능적으로 백혈구와 내피세포와의 상호작용에 관여하는 selectin류, 접착고정에 관여하는 integrin류와 ICAM, VCAM 등의 면역글로블린 등으로 분류된다. 이들 단백질에 의한 세포접착은 면역작용, 염증 발생 뿐만 아니라 혈액의 응고 등 많은 생리반응에 주요한 역할을 하고 있다.⁵⁾

류마티스 관절염에 대한 항체 치료제는 약물의 표적에 따라 TNF- α 등의 사이토카인을 억제하는 항체, B 세포와 T 세포의 면역세포를 조절하는 항체로 분류될 수 있다. 이 중 TNF- α 의 활성을 억제하는 항체 치료제가 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 항 TNF- α 항체로 치료 되지 않는 환자가 임상적으로 보고되고 있으며, 이러한 환자에게 면역세포의 활성을 조절하는 항체를 투여하여 치료효과를 증대시키는 방법이 주목 받고 있다.⁶⁻⁸⁾ 그러므로 류마티스 관절염에서 하나의 표적만을 저해하는 치료 방법보다는 다른 약리기전을 가지는 복수의 표적을 동시에 조절하는 것이 좋은 관절염 치료제의 개발을 위한 하나의 전략이 될 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 첫째, 염증성 질환의 병인 기전에서 TNF- α 의 수용체에 대한 TNF- α 의 작용을 억제하는 약리 기전, 둘째, 백혈구 등의 면역세포가 VCAM-1과 작용함으로써 내피세포를 통과하여 염증 부위로 이동하는 것을 억제하는 약리 기전을 이용하여 관절염 치료제용 항체를 제작하고, 이에 대한 항염증 활성을 측정하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위하여 이중의 항원 결합 부위를 하나의 항체로 결합시킨 것으로, 두 개의 항원에 대하여 결합할 수 있게 만든 항체 포맷인 bispecific 항체를 제작하였다. 이는 두 개의 다른 표적 또는 epitope을 동시에 약물 표적화하여 항체의 생물학적 활성을 증진시키는 방법으로, 증가된 치료 효과를 기대할 수 있다.⁹⁻¹²⁾ 이러한 bispecific 항체의 포맷 중에서, 동물세포에서 발현될 수 있고 항원 결합력과 생물학적 활성이 우수하다고 보고된 Di-diabody를 항체 포맷으로 선정하였다. Di-diabody는 2003년 Imclone사의 Zhu 연구팀에 의해 유전자 재조합 기술을 이용하여 개발되었으며¹³⁾ 이 항체포맷은 항원 결합력과 생물학적 활성의 측면에서 divalent bispecific diabody 보다 더 효과적인 것으로 보고되었다.¹⁴⁾ 이에 본 연구에서는 TNF- α 와 VCAM-1을 동시에 억제할 수 있는 bispecific 항체인 Di-diabody를 유전자 재조합 기술을 사용하여 제작하고, 항염증 영향 평가를 통해 치료용 항체 의약품의 가능성에 대해 연구하였다.

실험방법

시약

일반 시약들은 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입하였으며 분자

생물학 및 세포생물학에 사용되는 시약들은 AbCam(Cambridge, UK), Amresco(Solon, OH), Beckon Dickinson BioScience (Flankin Lakes, NJ), Invitrogen(Carlsbad, CA), New England Biolabs(Beverly, MA)와, Promega(Madison, WI), R&D Systems(Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. 본 연구에는 다음의 항체와 재조합 단백질이 사용되었다. Anti-myc mAb (Invitrogen, P/N 46-0709), human VCAM-1/Fc(R&D Systems, 862-VC), human VCAM-1(R&D systems, 809-VR), human TNF- α (Abcam, ab9642), human IgG kappa(Sigma, I5154), anti-human Fc-HRP(Thermo Scientific, 31413), BD Pharmingen mouse anti-human CD106(BD Bioscience, 555645) 등은 항원의 결합 활성 및 *in vitro* 효능 활성을 측정하는 데 사용하였다.

세포배양

단백질 생산을 위해 CHO 동물세포주를 배양하였다(ATCC, Manassas, VA). Chinese Hamster Ovary Cell(CHO)은 단백질 생산세포주로 가장 많이 활용된다. CHO-S 세포주는 CHO-K1을 부유배양 적응시킨 것으로 CD-CHO(Invitrogen, Carlsbad, CA) 배지에 8 mM L-glutamine(Invitrogen, Carlsbad, CA)과 100X hyperxanthine(HT, Invitrogen, Carlsbad, CA), 100X anti-anti (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 첨가하여 부유 배양하였다. *In vitro* 효능 활성에 사용된 세포주는 L929와 U937이었다(ATCC, Manassas, VA). L929는 murine fibroblast 세포로 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Invitrogen Carlsbad, CA) 배지에 10% FBS와 100X anti-anti를 첨가하여 부착 배양하였다. U937은 백혈구 세포의 일종으로(human promonocytic leukocyte), RPMI 1640 배지에 10% FBS를 첨가하여 부유된 상태로 부착 배양하였다.

Di-diabody의 유전자 클로닝

항 인간 VCAM-1과 항 인간 TNF α 의 bispecific 항체를 제작하기 위해 기본 구조로 scFv를 제작한 후, 동물세포에서의 발현 bispecific 항체 제작을 진행하였다. 동물세포에서의 발현 형태로는 diabody가 Fc에 fusion된 형태($V_L A-V_H B-C_H2-C_H3$, $V_L B-V_H A$)인 Di-diabody를 유전자 클로닝하였다. Di-diabody의 주형이 되는 diabody 형태인 $V_H A-V_L B$ 과 $V_H B-V_L A$ 에서 A는 항 VCAM-1 항체인 7H, 11C clone, B는 항 TNF- α 항체인 humira가 되며, 제작된 각각의 scFv 형태를 주형으로 PCR을 수행하여 제작하였다.

Di-diabody 단백질 생산을 위한 동물세포 배양

CHO-S 세포주의 경우, transfection 전날 CD-CHO(Invitrogen, Carlsbad, CA) 배지에 1.5×10^6 cell/ml로 VCD(viable cell density)를 맞춘 CHO-S cell 약 100 ml을 배양하였다. Transfection 당

일 약 $2.5\sim 3\times 10^6$ cell/ml로 자란 세포를 1% DMSO(Sigma, St. Louis, MO)가 들어있는 CD-CHO 배지로 2.1×10^6 cell/ml의 밀도로 준비하였다. 8% CO₂, 37°C, 100 rpm 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 원심분리기를 사용하여 3,000 rpm에서 15분간 세포 분리를 한 다음, RPMI 1640(w/2.5% FBS)(Invitrogen, Carlsbad, CA) 배지 100 ml에 현탁하였다. 500 ml Ellen Meyer-flask에 현탁된 세포를 분주한 다음, DNA/PEI(polyethyleneimine) 혼합액 10 ml를 첨가하였다. 5% CO₂, 37°C, 100 rpm 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. CD-CHO 배지 100 ml를 첨가하고, 8% CO₂, 37°C, 110 rpm 배양기에서 3~4일 동안 배양하였다. DNA/PEI 혼합액을 제조할 시에는 각각의 DNA를 OPTI-MEM I reduced serum media(Invitrogen, Calsbad, CA)에 넣어 희석하는데 PEI(1 mg/ml)을 각 DNA 양의 4배로 넣고 혼합하였다. 상온에서 10분 간 배양한 후 세포에 바로 넣을 수 있도록 준비하였다.

항체의 rPA 정제 및 농축

Assay용 정제시료에 대해서는 AKTA purifier(GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하였으며 recombinant Protein A(rPA) column은 rProtein A FF(Hitrap 5 ml/min, GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 사용하였다. Equilibration buffer(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4)로 평형 조건을 잡은 후 배양액 시료를 loading하고 rPA resin에 Fc fusion protein을 포집하였다. 이후 elution buffer(50 mM Na-Citrate, pH 3.0)로 pH 급감을 주어 포집된 단백질을 용출하여 시료를 얻고 neutralization buffer(1 M Tris-HCl, pH 9.0)로 pH 7.0~8.0으로 중화시켜 목적 단백질을 정제하는 방법을 사용하였다. column 내의 불순물 제거를 위해 elution buffer를 사용하기 전에 washing buffer(50 mM Na-Citrate, pH 5.0)를 사용하였다. 정제된 단백질의 농축은 Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit(Millipore, Billerica, MA)를 사용하였다.

Di-diabody 동물세포 정제 단백질의 항원 결합 ELISA

Di-diabody에는 human Fc가 재조합되어 있으므로 항원 결합 ELISA에는 human Fc를 검출할 수 있는 항체를 사용하였다. 항 VCAM-1 결합에 대해서는 human VCAM-1(w/o hFc, R&D systems, Minneapolis, MN)을 well 당 1.5 µg/ml, 100 µl를 coating하고 4°C에 16시간 배양하였다. 이후 1% BSA(Amresco, Solon, OH)가 있는 PBS(Sigma, St. Louis, MO)로 2시간 blocking한 이후 시료를 well 당 100 µl를 넣은 후 37°C에서 2시간 배양하였다. 검출항체로 HRP-conjugated anti-human Fc mAb(Thermo Scientific, Rockford, IL)을 1:40,000으로 희석하여 well 당 100 ml를 넣고 37°C에서 2시간 배양한 후 TMB(Sigma, St. Louis, MO)로 발색하였다. 항 TNF-α 결합에 대해

서는 recombinant human TNF-α(Abcam, Cambridge, UK)를 1.5 µg/ml, 100 µl를 coating하고 시료를 처리한 후 검출항체로 HRP-conjugated anti-human Fc mAb(Thermo Scientific, Rockford, IL)을 1:40,000으로 희석하여 well 당 100 µl를 넣고 37°C에서 2시간 배양한 후 TMB 로 발색하였다. 매 과정은 PBST(w/0.05% Tween 20)로 5회 washing하였다. 시료는 정제된 단백질을 사용하므로 몰농도를 맞추어 4분의 1로 희석하여 사용하였다.

L929 cytotoxicity assay

시료를 10 nM부터 4분의 일로 배지에 희석하여 96 well plate에 100 µl 분주하였다. 2 ng/ml의 TNF-α를 각 well에 50 µl 넣어 0.5 ng/ml이 되게 하여 실온에서 30분 배양하였다. L929 세포주를 1×10^6 cells/ml 농도로(RPMI 1640 w/10% FBS+1 µg/ml Actinomycin D(Sigma, St. Louis, MO)) 준비하여 50 µl를 분주하였다. 22시간 정도를 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. WST-1(Roche, Switzerland)를 20 µl 첨가하고 2시간 배양한 후 ELISA Reader로(450/690 nm, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 측정하였다.

Antigen-U937 cell adhesion assay

Human VCAM-1 항원을 96 well plate에 2 µg/ml 농도로 분주하고 16시간, 4°C에서 배양하였다. 이를 1% BSA가 녹아있는 PBS 용액으로 2시간 실온에서 blocking하였다. 용액을 제거하고 CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)(Invitrogen, Calsbad, CA)가 라벨된 U937 세포(RPMI media, w/1% FBS) 1×10^5 cell 수를 100 µl 분주하였다. 37°C 15분 동안 암반응 배양하였다. 260 µl의 배지로 나머지를 채우고 5분간 200 g로 plate를 뒤집어서 원심분리하였다. Well의 용액을 제거하고 150 µl의 lysis buffer(0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5)를 첨가하여 15분 간 실온에서 배양하였다. 피펫팅 후 형광분석기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로(485~530nm) 측정하였다. 세포 형광 라벨의 경우 CFSE를 5 µM 농도로 5분 배양하고 1X PBS로 3번 washing한 후 FcR 억제제를 위해 human serum(Sigma, St. Louis, MO)으로 5×10^6 cells/ml 농도로 15분간 blocking하고 배지로 washing하여 형광 표지된 세포를 준비하였다.

실험결과 및 고찰

재조합 Di-diabody 항체의 제작

유전자 재조합 기술을 사용하여 cross-over된 scFv polypeptide chain 하나를 먼저 만들고, 힌지 구역(hinge region)을 IgG의 C_H2-C_H3 domain의 N 말단에 융합시켰다. 또한 다른 한 쪽에 마찬가지로 cross-over된 scFv polypeptide를 C_H2-C_H3 domain에

융합시킨 형태를 제작하여 bispecific diabody-C_H2-C_H3 fusion을 만들었다. 이러한 두 개의 diabody-C_H2-C_H3 fusion의 유전자를 CHO 동물 세포주에서 동시에 발현하게 하여, hinge와 C_H2-C_H3가 결합된 diabody-C_H2-C_H3 이량체를 생성하였다. 제작된 재조합 유전자는 DNA sequencing을 통해 염기서열을 확인하였으며, 동물세포주 transfection 이후 수득한 배양액의 각각의 항원에 대한 결합 활성 ELISA를 통해 항체 단백질이 발현됨을 확인하였다.

정제된 Di-diabody 항체의 항원 결합 활성 확인

CHO-S 배양 후 rPA 정제를 통해 수득된 7H, 11C Di-diabody 항체는 각각의 항원인 hVCAM-1과 hTNF- α 에 대한 항체의 결합력의 차이를 동일 농도에서 ELISA로 확인하였다. 항원에 대한 항체의 affinity 측정은 BiaCore(Biomolecular Interaction Analysis) SPR Technology 등의 방법으로 정확한 값을 측정하는 것이 일반적이거나,¹⁵⁾ 본 연구에서는 항체 농도 별 ELISA에서의 발색 수치를 곡선화하여 상대적인 결합력 차이를 비교하였다.¹⁶⁾

항원 hVCAM-1에 대한 결합은 7H-IgG에 비해 11C/Humira Di-diabody는 상대적으로 낮았으며 7H/Humira Di-diabody는 7H-IgG와 유사한 항원 결합력을 확인하였다(Fig. 1). 항 VCAM-1 후보 항체인 7H에 대해서는 IgG 형태에서 Di-diabody 항체로 개량되어도 항원에 대한 결합력은 변하지 않고 유사함을 확인하

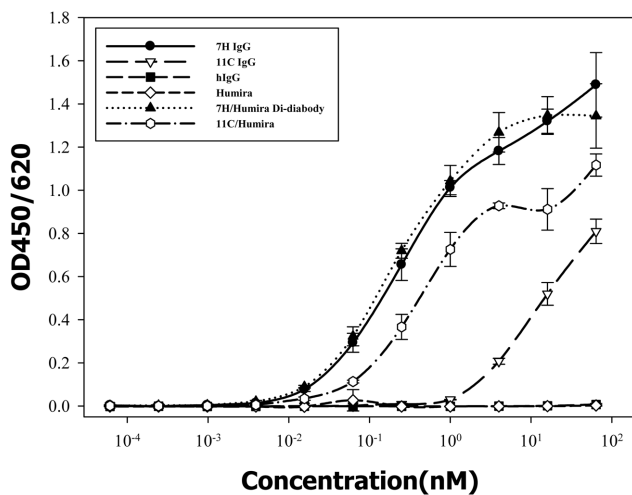


Fig. 1 – rhVCAM-1 binding affinity of purified 7H/Humira Di-diabody and 11C/Humira Di-diabody in CHO-S culture. The purified Di-diabodies and parental IgGs were first incubated with rhVCAM-1 (1 μ g/ml) coated in microplates, followed by incubation with HRP-conjugated anti-hFc antibody. 7H/Humira Di-diabody binds to human VCAM-1 with the similar activity as 7H-IgG parental form. In the case of 11C/Humira Di-diabody, it had low binding activity rather than those of both 7H-IgG and 7H/Humira Di-diabody. Antigen binding activities, ranked in descending order are as follow: 7H-IgG=7H/Humira Di-diabody>11C/Humira Di-diabody>11C-IgG. Data shown represent the mean \pm S.D. of triplicate samples.

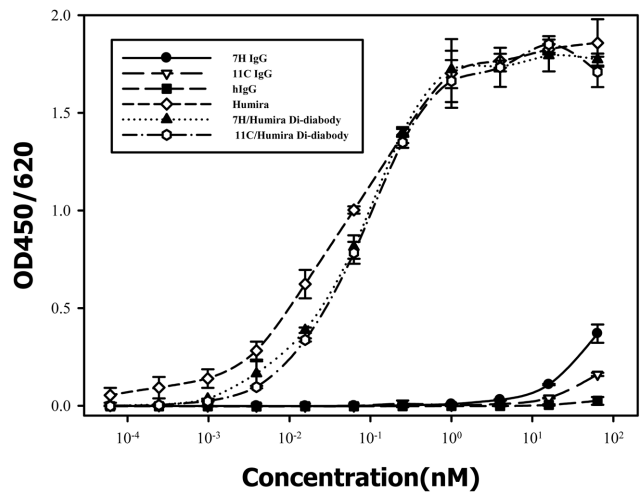


Fig. 2 – rhTNF- α binding affinity of purified 7H/Humira Di-diabody and 11C/Humira Di-diabody in CHO-S culture. The purified Di-diabodies and parental IgGs were first incubated with rhTNF- α (1 mg/ml) coated in microplates, followed by incubation with HRP-conjugated anti-hFc antibody. Both of 7H/Humira Di-diabody and 11C/Humira Di-diabody bind to human TNF- α with the similar activity as Humira-IgG parental form. Data shown represent the mean \pm S.D. of triplicate samples.

였다. 이 결과는 bispecific 분자의 조합을 이중이량체화하여 IgG-like 분자 형태로 분자량을 증가시키면, 약물동력학적인 측면이 개선되어 효능을 IgG와 유사하게 유지할 수 있다는 보고¹⁷⁾와 일치한다. 반면에 minibody 형태에서 항원 결합력은 있으나 세포 접착 저해능이 없는 11C clone의 경우, 특이하게도 Di-diabody 형태가 IgG 형태보다 VCAM-1에 대한 결합 활성이 보다 우수하였다. 이는 11C clone의 경우 Di-diabody 형태로 개량됨으로써 IgG 형태보다 결합 활성이 개선되는 효과를 보였다.

또한 공통된 humira의 variable region을 가진 Di-diabody는 7H와 11C가 hVCAM-1 항원에 대한 결합 활성이 다른 것에 반해 항 hTNF- α 에 대한 결합 활성은 유사함을 확인하였다(Fig. 2). 이 결과는 항 TNF 항체인 humira의 경우, IgG에서 Di-diabody로 항체의 형태가 변형되어도 TNF- α 에 대한 결합력이 유지됨을 보인다.

추가적으로 제작된 bispecific 항체인 Di-diabody는 parental 항체인 IgG 형태와 유사한 항원 결합력을 가지며 각각의 항원에 대해 독립적으로 결합력을 가지는 것을 확인하였다.

Anti-TNF- α 세포독성 중화능 분석

L929 cytotoxicity assay는 hTNF- α 와 mouse fibroblast cell line인 L929 cell을 혼합하고 여기에 항체를 농도별로 처리하여 배양 후 L929 세포의 cytotoxicity를 WST-1 처리를 통해 측정하여 항체의 중화능을 조사하였다.¹⁸⁾ 양성 대조군인 Humira-IgG

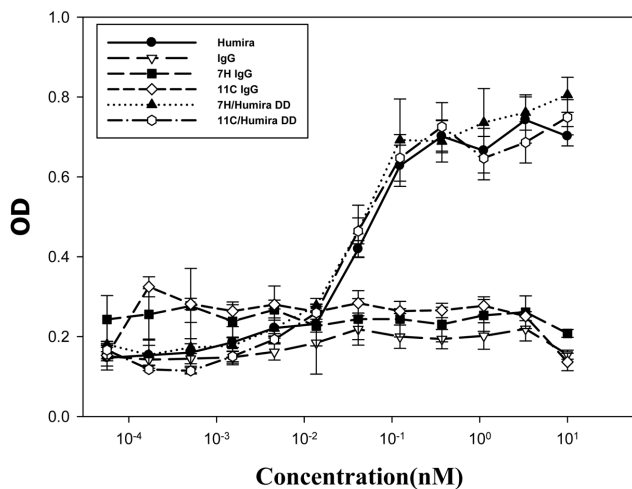


Fig. 3 – Anti-TNF- α cytotoxicity neutralizing effect of bispecific antibodies, 7H/Humira Di-diabody and 11C/Humira Di-diabody. The OD value of 450 nm, which reflected metabolically active cells by WST-1, increased proportionally when L929 cells were exposed to increasing amounts of both Humira and bispecific Di-diabodies. Both 7H/Humira Di-diabody and 11C/Humira Di-diabody showed the similar neutralizing activity in TNF- α induced L929 cytotoxicity as Humira-IgG parental form. DD means Di-diabody. Data shown represent the mean \pm S.D. of triplicate samples.

에 비해 Di-diabody의 경우, 항 VCAM-1의 clone에 상관없이 7H, 11C 모두에서 Humira-IgG와 유사한 hTNF- α 중화능을 확인하였다(Fig. 3). 이는 TNF- α 항원 결합력 측정 ELISA에서와 같이, 다른 항원의 종류에 상관없이 항체 형태가 변형되어도 TNF- α 에 대한 항원 결합력이 유지되어 *in vitro* 활성인 세포독성 중화능에서도 유사한 활성을 가지는 것으로 보인다.

VCAM-1에 대한 세포 접착 저해능 분석

hVCAM-1 항원에 대한 leukocyte인 U937 세포주의 접착 저해능 시험은 96 well plate에 항원인 hVCAM-1을 200 ng/100 μ l/well coating하고 후보 항체를 6, 60, 600 nM 처리한 후 CFSE 형광 표지된 U937 세포를 결합시켰다. 이렇게 접착된 세포를 용해하여 형광분석기로 용출액의 형광을 측정하여 항원과 leukocyte 간의 항체의 접착 저해능을 측정하였다. 이는 내피 세포에서 면역 자극 시 일시적으로 발현되는 VCAM-1에 대한 백혈구의 접착을 세포 간 반응에서 세포 표면의 분자 간 반응으로 변형하여, VCAM-1 항원을 항체가 결합함으로써 백혈구의 VLA-4와의 반응을 저해하는 assay 분석법이다.¹⁹⁾ 양성 대조군으로는 BD Pharmingen mouse anti-human CD106(BD Bioscience, 555645)을 사용하였으며, 이는 VCAM-1에 직접적으로 결합하지 않지만, 백혈구의 VLA-4에 결합하여 세포접착 저해능을 가지는 항체이다.²⁰⁾ 음성 대조군으로 두 항원에 대한 결합부위가 없는 human IgG를 사용하였고 이에 대한 형광 수치를 기준 값인 0%로 하여

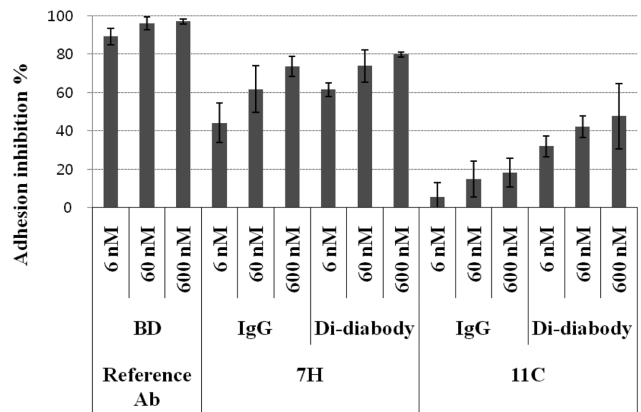


Fig. 4 – Adhesion inhibition of 7H/Humira and 11C/Humira Di-diabody between VCAM-1 and lymphocytes; U937. Adhesion of U937 on an antigen was investigated in 96-well plates pre-coated with rhVCAM-1. Number of adherent cells per well was determined using a fluorescent assay (OD with linear correlation to number of adherent cells labeled by CFSE). 7H/Humira Di-diabody inhibited U937 adhesion against hVCAM-1 at the similar level as a compared to 7H-IgG, not 11C/Humira Di-diabody. BD antibody is used for positive control that binds to VLA4 of U937 in this assay system. Three independent experiments of triplicate samples were done and results are shown as mean \pm S.D.

저해능을 상대적으로 평가하였다. 양성 대조군은 6nM의 낮은 농도에서도 80%의 저해능을 보였다(Fig 4). 7H의 경우, IgG와 Di-diabody가 60 nM 이상에서 60%의 저해능이 있음을 확인하였다. 11C의 경우, 600 nM 농도에서 Di-diabody 포맷은 40%의 저해능을 가지나, IgG 포맷에서는 20%의 저해능이 측정되었다. 특히 하계도, 11C IgG는 모든 농도에서 세포 접착 저해능이 낮으나, Di-diabody 형태로 변경할 시에 600 nM 이상의 고농도에서 세포 접착 저해능이 IgG 형태보다 2배 이상 개선됨을 보였다. 이로서 11C/Humira Di-diabody의 경우, 항체 형태의 변형으로 활성의 개선효과를 보였다. 세포 접착 저해능의 활성은 7H/Humira Di-diabody=7H-IgG>11C/Humira Di-diabody>11C-IgG의 순서로 확인되었다.

결론적으로, 7H/Humira Di-diabody는 7H-IgG과 비교하여 세포접착 저해능이 모든 농도에서 유사하여, 항체 형태가 변형되어도 항 VCAM-1의 *in vitro* 활성인 세포접착 저해능은 유지되었다.

결 론

본 연구의 목적은 TNF- α 와 VCAM-1을 동시에 억제할 수 있는 bispecific 항체를 Di-diabody 유전자 재조합 기술을 사용하여 제작하고, 제작된 항체의 항염증 활성을 평가하는 것이었다. 실험결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 항 VCAM-1과 항 TNF- α 에 대한 Di-diabody 항체를 유전자 재조합 기술로 제작하였다. 이를 위해 scFv 분절항체 포맷을 이용하여, 동물세포 발현을 위한 Di-diabody 유전자를 클로닝하였다. V_HA-V_LB의 cross-over scFv와 V_HB-V_LA-C_H2-C_H3의 cross-over scFv-Fc의 유전자 구조를 제작하였으며, A는 항 VCAM-1을, B는 항 TNF- α 인 humira를 사용하였다. 이러한 유전자 발현은 이중 이량체화되어 세포 내에서 Di-diabody 형태의 bispecific 항체를 형성하였다. 재조합된 유전자는 생산세포주인 CHO-S에 transfection시키고, Di-diabody의 생산을 위하여 배양하였다. 배양액에 분비된 항체는 Protein A affinity column을 사용하여 정제하였다.

2. 정제된 Di-diabody를 사용하여 *in vitro* 효능을 확인하였다. 첫째, 7H/Humira Di-diabody의 VCAM-1과 TNF- α 에 대한 항원 결합력을 ELISA로 측정하였다. 그 결과, 7H/Humira Di-diabody는 parental IgG 항체인 7H-IgG와 Humira-IgG의 항원 결합력과 유사함을 확인하였다. 둘째, VCAM-1과 U937 세포의 결합 저해 활성을 확인하는 *in vitro* 효능 assay에서 7H/Humira Di-diabody는 7H-IgG와 유사한 세포접착 저해능을 나타내었으며, TNF- α 와 TNF- α 수용체 사이의 결합을 억제하는 *in vitro* 중화능 assay에서도 7H/Humira Di-diabody는 Humira-IgG와 유사한 효능을 확인하였다.

이러한 결과를 통하여, 7H/Humira Di-diabody는 각각의 항원 모두에 대해, 항원 결합력과 세포 수준에서의 효능이 parental 항체와 동등함을 확인하였다. 따라서, 이들 두 항원에 대한 bispecific 항체인 Di-diabody를 이용하여 향후 *in vivo*에서의 관절염 동물 모델에 대한 활성 연구를 더 진행하고자 한다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 형질전환복제체지 ERC 프로그램(grant R11-2002-100-00000-0)과 교육과학기술부 지원 한국학의학연구원 기관 고유사업 K10050의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

- Senolt, L., Vencovský, J., Pavelka, K., Ospelt, C. and Gay, S. : Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **9**, 102 (2009).
- Puppo, E., Murdaca, G., Ghio, M. and Indiveri, F. : Emerging biologic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **4**, 537 (2005).
- Caporali, R., Pallavicini, F. B., Filippini, M., Gorla, R., Marchesoni, A., Favalli, E. G., Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F. and Montecucco, C. : Treatment of rheumatoid arthritis with anti-TNF-alpha agents: a reappraisal. *Autoimmun. Rev.* **8**, 274 (2009).
- Blankenberg, S., Barbaux, S. and Tiret, L. : Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **170**, 191 (2003).
- Ulbrich, H., Eriksson, E. E. and Lindbom, L. : Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as target for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 640 (2003)
- Finckh A., Ciurea A., Brulhart L., Kyburz D., Möller, B., Dehler, S., Revaz, S., Dudler, J. and Gabay, C. : B cell depletion may be more effective than switching to an alternative anti-tumor necrosis factor agent in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to anti-tumor necrosis factor agents. *Arthritis. Rheum.* **56**, 1417 (2007).
- Genovese, M.C., Kaine, J. L., Lowenstein, M. B., Del Giudice, J., Baldassare, A., Schechtman J., Fudman E., Kohen M., Gujrathi S., Trapp R. G., Sweiss N. J., Spaniolo G. and Dummer, W. : Ocrelizumab, a humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* **58**, 2652 (2008).
- Robak, T. : Ofatumumab, a human monoclonal antibody for lymphoid malignancies and autoimmune disorders. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**, 294 (2008).
- Fanger, M. W. and Guyre, P. M. : Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity. *Trends Biotechnol.* **9**, 375 (1991).
- Cao, Y. and Suresh, M. R. : Bispecific antibodies as novel bioconjugates. *Bioconjug. Chem.* **9**, 635 (1998).
- van Spirel, A. B., van Ojik, H. H. and van de Winkel, J. G. J. : Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. *Immunol. Today* **21**, 391 (2000).
- Cao, Y. and Lam, L. : Bispecific antibody conjugates in therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 171 (2003).
- Lu, D., Jimenez, X., Zhang, H., Atkins, A., Brennan, L., Balderes, P., Bohlen, P., Witte, L. and Zhu, Z. : Di-diabody: a novel tetravalent bispecific antibody molecule by design. *J. Immunol. Methods* **279**, 219 (2003).
- Lu, D., Zhang, H., Koo, H., Tonra, J., Balderes, P., Prewett, M., Corcoran, E., Mangalampalli, V., Bassi, R., Anselma, D., Patel, D., Kang, X., Ludwig, D. L., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Witte, L. and Zhu, Z. : A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 19665 (2005).
- Pattnaik, P. : Surface plasmon resonance: applications in understanding receptors-ligand interaction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **126**, 79 (2005).
- Goldberg, M. E. and Djavadi-Ohanian, L. : Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 278 (1993).

- 17) Marvin, J. S. and Zhu, Z. : Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies. *Acta. Pharmacol. Sin.* **26**, 649 (2005).
- 18) Cowin, A. J., Hatzirodos, N., Rigden, J., Fitridge, R. and Belford, D. A. : Etanercept decreases tumor necrosis factor- α activity in chronic wound fluid. *Wound Repair Regen.* **14**, 421 (2006).
- 19) May, M. J., Wheeler-Jones, C. P. and Pearson, J. D. : Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1761 (1996).
- 20) Mareckova, H., Havrdova, E., Krasulova, E., Vankova, Z., Koberová, M., Sterzl, I. : Natalizumab in the treatment of patients with multiple sclerosis: first experience. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1110**, 465 (2007).