Biomedical Science Letters 2020, 26(3): 136~148
https://doi.org/10.15616/BSL.2020.26.3.136
eISSN : 2288-7415

■ Review ■

Current Status of the Research and Development of Bispecific Antibodies

Sun-Il Kwon[†,*]

Department of Biomedical Laboratory Science, Deagu Health Science University, Daegu 41453, Korea

A bispecific antibody (BsAb) is an artificial protein containing two kinds of specific antigen binding sites. BsAb can connect target cells to functional cells or molecules, and thus stimulate a directed immune response. Last several decades a wide variety of bsAb formats and production technologies have been developed. BsAbs are constructed either chemically or biologically, exploiting techniques like cell fusion and recombinant DNA technologies. There are over 100 different formats of bsAb so far developed, but they could be classified into the two main categories such as Fc-based (with a Fc region) bsAbs and fragment-based (without a Fc region) bsAbs. BsAb has a broad application prospect in tumor immunotherapy and drug delivery. Here, we present a brief introduction to the structure of antibody, pharmacological mechanisms of antibodies and the trend in the production technologies of therapeutic antibodies. In addition, we address a review on the current status of various bsAb format development and their production technologies together with global situation in the clinical studies of bsAb.

Key Words: Antibody, Anticancer, Bispecific, bsAb, Format, Immunotherapy

이중항체 의약품의 연구개발 동향

1. 서론

항체치료제는 세계 상위 10대 바이오 의약품 중 7개를 차지하며 바이오 의약품이 대세가 된 의약품 시장을 주도하고 있다(Kim and Lee, 2020). 항체치료제는 면역항암제에서 출발하여 다양한 분야로 적용범위가 확대되고 있다. 이러한 항체치료제를 기능적으로 개선하고 적용범위를 넓히기 위하여 바이오 제약업계에서는 항체의 구조를 바꾸고 수식하는 다양한 시도를 하고 있다. 지금까지 등장한 여러 가지 개선 방향 중에서 이중항체가 그 잠재력으로 관심을 끌고 있다.

이중항체는 서로 특이성이 다른 두 가지 항체를 하나의 분자 내에 조합하여 만든다. 이중항체는 두 가지의 항원 특이성으로 인하여 두 가지 항원에 동시에 결합한다. 두 종류의 항원과 결합하여 타겟의 폭이 넓어지고 표적 기능도 향상된다. 항체의 한쪽 팔의 특이성은 암세포나 바이러스를 표적으로 하고 다른 팔의 특이성은 작용세포나 전달할 약물과 결합하게 한다. 목표로 하는 암세포와 결합하고 동시에 T 세포와 같은 작용세포와 결합해 둘을 물리적으로 접근시켜서 작용세포가 암세포를 선택적으로 공격하도록 도와준다. 이중항체는 면역항암제의 낮은 반응률(response rate)를 극복할 수 있는 병용치료제로서도 잠재력이 높다. 다른 경우는 두 가지 타겟을 사용함으로써 단일항체보다 더 강한 특이성으로 결합시켜 치료효과를 높인다(Husain and Ellerman, 2018).

세계적으로 많은 제약/바이오텍 회사들이 이중항체를 연구하여 현재 100가지 이상의 이중항체 형식(format)이 개발되고 있다. 이 중 1/4 이상이 플랫폼 기술로 발전하

Received: August 20, 2020 / Revised: September 13, 2020 / Accepted: September 14, 2020
*Professor.
†Corresponding author: Sun-Il Kwon. Department of Biomedical Laboratory Science, Deagu Health Science University, Youngsong-ro 15 (Taejeon-dong), Buk-ku, Daegu 41453, Korea.
Tel: +82-53-320-1302, Fax: +82-53-320-1450, e-mail: psikwon@dhc.ac.kr
©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

여 새로운 치료제를 개발하기 위하여 상업화되고 있다(Labrijn et al., 2019). 국내에서도 여러 바이오/제약 기업과 연구소가 이중항체 의약품의 연구개발에 참여하고 있다. 본고에서는 이중항체 치료제에 대한 최신 개발 현황과 기술 동향을 조망해보고자 한다.

2. 바이오 의약품 시장 현황

세계 의약품 시장에서 바이오 의약품이 차지하는 비중은 2010년 18%에서 2018년 28%로 성장하였으며, 2024년에는 32%를 차지할 것으로 전망된다(EvaluatePharma World Review, 2019). 항체치료제는 바이오 의약품 시장을 주도하고 있어서 현재 세계 바이오 의약품 시장에서 판매되는 상위 10개 바이오 의약품 중에서 7개가 단클론항체 기반 제품이다. 항체치료제 세계 시장 규모는 2018년에 미화로 1,152억 달러이며, 2025년에는 약 3,000억 달러에 이를 것으로 추산된다(Kim and Lee, 2020; Lu et al., 2020). 이중항체는 항체치료제 시장의 한 분야로 이제 성장을 시작하였다. 이중항체의 시장 규모는 2017년에서 2030년까지 연평균 34%로 성장하여, 2017년 미화 1.8억 달러에서 2030년에는 93억 달러가 될 것으로 전망된다(2019 Pharmaceutical Industry DATABOOK Statistic Information, 2019; Sung, 2019).

2018년 기준으로 국내 바이오 의약품의 시장 규모는 2조 2,308억원으로 전체 의약품 시장에서 9.6%를 점유한다. 아직 국내 기업들 중에는 항체치료제로 신약 허가를 받은 사례는 없고 주로 수입에 의존하고 있다. 그러나 특허가 만료된 항체치료제에 대한 바이오시밀러에 분야에서는 국내업체가 세계적으로 강세를 보인다. 우리나라의 제약바이오 기업은 그 동안 글로벌 경쟁력을 높여왔고, 정부도 바이오헬스 산업에 대한 혁신정책을 적극적으로 추진하고 있어서 앞으로 바이오제약 산업이 크게 성장할 것으로 기대된다(2019 Pharmaceutical Industry DATABOOK Statistic Information, 2019; Sung, 2019).

3. 항체치료제 개발 현황

처음으로 시판 허가된 항체치료제는 1986년 미국에서 허가된 OrthoBiotech사의 Orthoclone OKT3™으로 신장이식 거부반응이 주 적응증이다. 이후 다양한 항체치료제가 개발되어 각종 암에 더하여 관절염, 노인성 황반변성, 당뇨병성 망막병증과 같은 안질환, 알츠하이머나 파킨슨증과 같은 퇴행성질환, 그리고 진단과 치료용 백신의 용도로 허가되었다. 미국 FDA에 시판 승인을 받은 항체치료제의 숫자를 살펴보면, 1990년~2000년 5개, 2001년~2010년 17개, 2011년~2015년 17개, 2016년~2019년 38개로 가파르게 늘고 있다(Kim and Lee, 2020). 이중항체 의약품의 경우 지금까지 3개의 품목이 미국 FDA와 유럽 EMA로부터 시판 승인을 받았다. 2009년도에 Removab™(악성 복수 치료제, Neopharm Biotech)가, 2016년도에 Blincyto™(급성림프구성 백혈병 치료제, Amgen)가, 2017년도에 Hemlibra™(A형 혈우병 치료제, Roche)가 각각 시판 승인을 받았다.

4. 항체의 약리작용

항체는 여러 가지 기전으로 약리작용을 발휘하여 치료제로서 효능을 발휘한다. 항체는 바이러스, 박테리아, 원생동물 등 외부침입자나 독성 물질, 암세포 등 비정상세포나 비자기세포를 다음 작용을 통해 퇴치한다(Seo et al., 2015).

4-1. 침투 봉쇄

항체는 세균이나 바이러스와 같은 외부침입자의 표면에 결합하여 이들이 표면특성으로 숙주세포와 결합하는 것을 차단하여 세포 내 침투를 막는다.

4-2. 중화반응

독소 특이적인 항체가 세균 분비 독소와 결합하면 독소가 중화되어 독소작용이 차단된다.

4-3. 세포사멸(apoptosis) 촉진

결합인자(binding factor)와의 작용으로 세포사멸 기전을 활성화하거나 암세포의 성장과 생존을 촉진하는 신호전달경로를 억제하여 종양세포의 사멸을 유도한다(Hanahan and Weinberg, 2011).

4-4. 항체의존성 포식작용(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)

항체가 세균이나 바이러스 표면에 결합하여 대식세포, 호중구 등의 식세포 작용을 도와준다. 이를 항체의존성 포식작용이라고 한다(Gül and van Egmond, 2015). 식세포들은 그들의 표면에 항체분자의 Fc (Fragment, crystallizable) 부위와 결합하는 Fc 수용체를 가지고 있어 항체로 코팅되어 옵소닌화된 세균, 바이러스, 암세포 등을 특이적으로 인식하여 잡아먹는다.

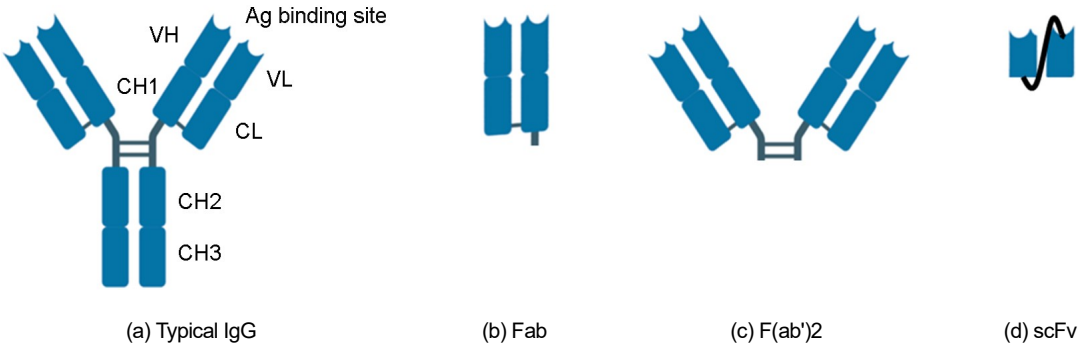

Fig. 1. Schematic representations of antibody and its derivatives. (a) typical IgG, (b) antibody binding fragment (Fab), (c) F(ab')2, and (d) single-chain variable fragment (scFv). VH (variable heavy chain), CH (constant heavy chain), VL (variable light chain), CL (constant light chain).

4-5. 보체의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC)

항체가 세균이나 암세포의 표면에 결합하면 보체계(complement system)가 활성화되어 결합된 세균이나 암세포를 파괴한다. 항체의 Fc 부위에는 보체분자 결합부위가 있는데 이 부위에 보체 C1q가 결합되면 보체계 연쇄반응을 일어나고 세균이나 암세포 표면에 구멍(pore)이 뚫려서 파괴된다(Mamidi et al., 2017).

4-6. 항체의존성 세포매개 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)

NK 세포와 다른 백혈구들은 Fc 수용체를 통하여 항체로 덮인 세포와 결합하여 이 세포들을 죽인다. 항체가 결합된 암세포나 바이러스에 감염된 세포 표면에 NK 세포가 Fc 수용체를 통해 항체를 인식하게 되면 활성화되어 perforin과 granzyme같은 단백질을 분비하여 세포사멸을 유도한다(Ochoa et al., 2017).

항체의 항암치료작용은 주로 ADCP, CDC, ADCC 등의 기전으로 이루어진다.

5. 항체와 단편항체의 구조

항체의 Y자의 양쪽 끝의 N-말단에서 중쇄의 가변 지역(VH)은 경쇄의 가변 지역(VL)과 합쳐져서 항체의 항원결합부위(VHVL)를 형성한다. 한 항체의 좌우 항원결합부위는 서로 동일하다. Y자의 아래쪽 중쇄의 C 부위는 서로 합쳐져 Fc (crystallizable fragment) 지역을 형성한다(Fig. 1-(a)).

IgG를 papain으로 잘라보면 두 가지 조각으로 나누어지는데 항원과 결합할 수 있는 조각이 Fab (antibody binding fragment)이고 (Fig. 1-(b)), 항원과 결합하지 못하는 조각이 Fc이다. IgG를 pepsin으로 절단하면 F(ab')2라는 항원결합조각이 생긴다(Fig. 1-(c)).

항원결합부위(VHVL)는 다양성을 부여하여 항원결합특이성을 결정한다. 가변부위에는 변이가 심한 고변이 지역이 있는데 중쇄와 경쇄에 각각 3개씩 존재한다. 이 고변이 지역은 직접적으로 항원과 결합하는 부위인 상보성결정지역(complementarity determining region, CDR)이다. 불변부위인 Fc 부분은 보체의 활성과 같은 면역반응을 유도한다. 재조합 항체에서는 항원특이성을 결정하는 scFv (single-chain variable fragment)나 Fab 형태를 주로 이용한다. Whole IgG가 필요할 경우 Fc 부위만을 scFv나 Fab 유전자 조각에 재조합하여 발현 정제하여 사용한다. 재조합 항체에서 scFv나 Fab가 자주 사용되는 것은 크기가 작아서 박테리아에서도 발현이 상대적으로 쉽다는 이유이다.

scFv는 중쇄와 경쇄의 가변부위만을 잘라내어(GGGS)n과 같은 링커를 붙여서 직열로 연결한 것으로 하나의 발현단위에서 발현이 가능하며 미니항체라고도 부른다. scFv의 크기는 약 25 KDa 정도이다(Fig. 1-(d)).

sdAb (single-domain antibody)은 기능적으로 항원과 결합하는 가장 작은 항체이다. 중쇄의 가변부위(VH)만 있고 경쇄가 아예 없다. 재조합 항체의 제조에 유용하다. sdAb는 nanobody라고도 불리며 크기가 12~15 KDa 정도이다.

Diabody는 두 개의 결합부위(bivalent)와 두 개의 결합특이성(bispecific)을 가진 가장 작은 항체이다. scFv 두 개를 서로 반대방향으로 향하도록 하여 비공유적인 이합체(dimer)를 형성시켜서 만든다. 경우에 따라서 공유결합을 시키기도 한다(Fig. 2-(c)). scFv의 각기 다른 가변부위의 수를 3개나 4개로 늘여서 같은 방식으로 이합체를 만들

면 결합부위와 결합특이성이 3개나 4개를 가지는 triabody나 tetrabody로도 만들 수 있다.

6. 치료용 항체 제조기술 동향

항체치료제는 처음에 마우스 하이브리도마 융합기술을 이용하여 생산하였다. 마우스를 기원으로 한 항체는 반감기가 짧고, 항마우스항체 면역반응을 유발하고, 효능이 낮으며, 알레르기 반응을 유발하는 등의 문제가 있었다. 그리하여 인간의 항체에 더욱 가까운 단일항체를 제조함으로써 면역원성을 줄이고 효과를 높이는 방향으로 개발되었다. 항체치료제 제조기술은 마우스항체(murine mAb), 키메라항체(chimeric mAb), 인간화항체(humanized mAb), 완전인간항체(fully human mAb) 순으로 발전하였다. 현재 치료제로 개발되고 있는 항체치료제들은 대다수가 인간화항체 혹은 완전인간항체들이다(Kim and Lee, 2020).

6-1. 마우스항체

순수한 한 가지 항체를 분리하는 어려움은 항체치료제 개발에서 오랫동안 장벽이 되어 왔다. 하이브리도마 융합기술을 이용한 단클론항체 제조기술이 등장하면서 이 문제가 해결되었다(Kohler and Milstein, 1975). 단클론항체 제조기술에서는 표적항원을 마우스에 주입하여 특정 항체를 생산하는 B 세포를 만든다. 이 B 세포를 미엘로마 세포와 융합시킨 후 HAT 배지에서 선별하여 하이브리도마를 만든다. 표적항원에 특이적인 항체를 생산하는 세포는 항원 반응성을 ELISA로 확인하여 선별한다. 인공적인 배양액 속에서 세포를 증식을 시켜서 순수한 하나의 항체, 즉 단클론항체를 대량으로 생산한다. 사람에 사용된 최초의 항체치료제는 1985년 시판 허가된 Orthoclone OKT3™ (muromonab-CD3)인데 마우스 세포를 기반으로 하여 만든 단클론항체이다. 이러한 마우스 기원 단일항체는 항체의 Fc 영역이 사람의 보체와 Fc 수용체에 잘 결합하지 않는다. 사람에서 일어나는 항체의 Fc와 관련된 ADCP, CDC, ADCC 효과를 기대하기 어렵다. 또한 환자에게서 면역반응을 유발하여 항체가 중화되어버리는 문제점이 있다. 마우스 기원의 항체는 효능이 떨어지고, 치명적인 알레르기 반응을 일으키기도 했다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 인간의 항체와 조금 더 유사하게 만든 것이 키메라항체다(Cha, 2011; Seo et al., 2015; Strohl, 2018).

6-2. 키메라항체

키메라항체는 항원결합부위 경쇄와 중쇄인 Fab는 마우스 기원이고 Fc 부분은 인간 기원으로 하이브리드이다. 키메라항체를 제조하기 위해서는 마우스의 VH, VL 부위 유전자를 확보해야 한다. 표적항원을 주입한 마우스의 비장세포의 mRNA로 cDNA를 합성하고 PCR을 하여 VH 유전자와 VL 유전자를 각각 얻는다. 이를 phagemid와 같은 vector에 클로닝하여 라이브러리를 확보한다. 클로닝된 유전자는 VH-VL-gene3 구조이다. helper phage와 함께 대장균에서 발현시키면 VH-VL-gene3 산물이 single peptide로 bacteriophage 표면단백질로 노출된다. 이는 자연스럽게 folding 되어 항체분자의 항원결합부위와 유사한 형태를 취하여 scFv가 된다. 표적항원과 결합력이 좋은 scFv를 선별하기 위해서 항원과 phage 입자를 결합시킨 후 결합력이 좋은 입자만 골라 모아서 대장균에서 증식시키고 이를 다시 항원과 결합시켜보는 과정을 반복하는 panning 작업을 한다. 이를 거듭하면 표적항원에 친화력이 우수한 scFv를 발현시키는 유전자를 확보하게 된다. 이런 일련의 기술을 파아지 디스플레이(phage display)라고 한다.

파아지 디스플레이를 이용한 인간항체 라이브러리 제조기술은 특정 항체의 탐색에 매우 유용하다. 파아지 디스플레이 기술은 1985년 George P. Smith에 의해 처음 소개되었으며(Smith, 1985), 이 공로로 그는 2018년에 노벨화학상을 수상했다.

이렇게 준비된 마우스 유래 VH, VL을 사람 유래 CH, CL 유전자와 재조합하여 키메라 유전자를 만들고 이를 CHO cell과 같은 생산 세포주에 주입하여 발현시켜서 최종적으로 키메라항체를 만든다. 키메라항체는 "_ximab"라는 어미를 붙인다. 제품 승인을 받은 키메라항체로는 Jassen의 Remicade™ (infliximab)와 Roche의 Rituxan™ (rituximab) 등이 있다(Seo et al., 2015).

키메라항체는 마우스항체에서 항원 인식에 결정적인 역할을 하는 중쇄와 경쇄의 가변부위만을 남기고 나머지 부위는 모두 인간항체의 대응부위로 대체하여 34% 정도의 마우스 유래 염기서열을 가진다. 면역원성을 줄여서 부작용이 줄어들기는 하였지만 체내에 반복적으로 투여할 경우 발생하는 항마우스항체 생성(human anti-murine antibody, HAMA)은 무시할 수준이 아니어서 항체 개선에 대한 요구는 여전하였다(Strohl, 2018; Kim and Lee, 2020).

6-3. 인간화항체(hunmanized antibody)

항원 항체 결합의 특이성을 결정하는 데에는 항체의 가변부위 내의 특정서열인 상보성결정부위(complementarity-determining regions, CDRs) 영역이 특히 중요하다. 마우스

항체로부터 특정 항원에 결합하는 CDRs만을 옮겨서 인간항체에 이식한 항체치료제가 인간화항체다. 인간화하는 가장 일반적인 방법으로는 CDR 이식(CDR-grafting)으로 동물항체의 CDR을 인간항체 frame으로 이식시킨다. 키메라항체는 항원결합부위인 VH, VL이 모두 마우스 유래인 반면, 인간화항체는 VH, VL에서 CDR 부위만 마우스 유래하였다. 인간화항체는 90% 가까이 인간 유래 염기서열을 보유한다. 인간화항체에는 "_zumab"이라는 어미를 붙인다. 인간화항체로 시판 승인된 제품으로는 Roche의 Herceptin™ (trastuzumab)과 Avastin™ (bevacizumab)이 대표적이다. 인간화항체의 단점으로 항원 친화력의 약화가 지적되는데 연구를 통하여 개선이 이루어지고 있다(Seo et al., 2015).

인간화항체에서는 마우스항체나 키메라항체 치료제에 비하여 HAMA 생성이 줄어들어 다수의 항체치료제가 이 방법으로 개발되어 미국 FDA의 시판 승인을 받았다. 그러나 인간화항체도 역시 마우스 유래 서열을 일부분 보유하고 있기 때문에 HAMA 문제가 근원적으로 해결되지는 않아서 100% 인간의 염기서열로 구성된 인간항체의 제조하는 기술로 이행하게 되었다(Almagro and Fransson, 2008; Kim and Lee, 2020).

6-4. 완전인간항체(human antibody)

완전인간항체는 동물 유래 부분이 전혀 없는 항체이다. 면역원성을 극소화시킬 수 있는 장점이 있어 현재 항체치료제 연구의 주류가 되고 있다. 완전인간항체는 이전의 다른 항체들보다 친화력이 높고, 인간 유전자로부터 만들어진 항체임으로 ADCP, CDC, ADCC와 같은 효과도 기대할 수 있다. 보통 완전인간항체에는 "_umab"이라는 어미가 붙는다.

완전인간항체를 만드는 방법에는 여러 가지가 있는데 완전인간항체 개발 플랫폼 기술로는 파아지 디스플레이, 리보솜 디스플레이(ribosome display), 형질전환 마우스, 그리고 인체 유래 단일 B 세포 기술 등이 있다. 이 중에서 가장 오래 연구되고 사용빈도가 높은 것은 파아지 디스플레이 기술이다(Waldmann, 2019).

6-4-1. 파아지 디스플레이

이 방법은 앞에서 키메라항체를 제조할 때 사용된 파아지 디스플레이 방법과 유사한 과정이다. 완전인간항체를 만들 때 차이점으로는 항체생성 mRNA를 얻기 위해서 마우스 세포 대신 사람의 말초혈액 림프구를 사용한다. 이 방법으로 시판 승인을 받은 완전인간항체 제품으로는 AbVie의 Humira™ (adalimumab)가 있다.

파아지 디스플레이법으로 완전인간 항체치료제 후보물질을 도출해내기 위한 과정을 보면 먼저 인간의 항체 단편인 scFv를 파아지 표면에 발현시킨 파아지 라이브러리를 구축해야 한다. 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell)로부터 고순도의 mRNA를 얻어, 이를 역전사 시켜서 cDNA를 확보한 후, PCR을 통해 항원을 인식하는 주요 부위인 중쇄와 경쇄의 가변부위(VH 및 VL)를 증폭하여, 파아지미드(phagemid)에 삽입함으로써 이 파아지 라이브러리를 확보한다. 이렇게 준비한 파아지 라이브러리는 다양성의 측면에서 대략 10^8~10^{10} 수준의 각기 다른 scFv를 발현한다. 이 라이브러리로 항체 후보 물질 선별하는 과정인 biopanning을 수행하여 질병유발 항원에 대응하는 항체를 도출한다. 파아지 디스플레이 기술의 단점으로는 transformation 과정의 번거로움, 제한된 라이브러리 크기(약 10^{10} 이하), 세포 기반 선별과정에서 잠재적인 후보 소실, 친화력이 너무 강한 경우 파아지 용출(phage elution)의 곤란 등이 지적된다(Frenzel et al., 2016).

파아지 라이브러리의 대안으로 개발된 것이 리보솜 디스플레이(ribosome display), 효모 디스플레이(yeast display), RNA 디스플레이(RNA display), DNA 디스플레이(DNA display) 등이다. 그러나 아직까지 이들 기술로 생산된 완전인간항체가 미국 FDA 시판 승인을 받은 기록은 없다(Kim and Lee, 2020).

6-4-2. 리보솜 디스플레이

리보솜 디스플레이법(Hanes and Plückthun, 1997)은 파아지 디스플레이의 문제를 극복할 수 있는 완전인간항체 생산방법이다. 리보솜 디스플레이법에서 항체생성 mRNA로부터 dsDNA 라이브러리를 얻어 plasmid vector에 삽입시키는 과정은 파아지 디스플레이법과 동일하다. 그러나 항체의 발현은 파지 시스템을 사용하지 않고 시험관 내 전사와 시험관 내 번역 시스템을 사용한다. PCR로 발현시키고자 하는 부분을 증폭한 후 시험관 내 전사로 mRNA를 만든 다음 전사된 mRNA로 시험관 내 번역으로 단백질, 즉 scFv을 발현시킨다. 이때 사용된 mRNA 주형은 종결코돈을 인위적으로 제거하여 제작되었다. 이에 따라 번역이 끝나도 단백질 분자는 리보솜에 그대로 붙어 있어서 단백질-mRNA-ribosome 복합체를 형성한다. 표적항원과 결합시키는 선별작업은 파아지 대신에 이 복합체와 이루어진다. 항체와 결합된 선별된 단백질-mRNA-ribosome

복합체를 모아서 여기에서 mRNA를 분리해내고, 다시 항원에 특이성이 높은 항체 유전자를 가진 dsDNA 라이브러리를 제조한다. 이 panning 작업을 반복하면 표적항원에 특이적인 항체를 발현하는 유전자를 획득할 수 있다(Rothe et al., 2006).

6-4-3. 형질전환 마우스

이 기술은 앞에서 설명한 마우스항체를 만드는 기술을 그대로 이용하는 것인데 사람의 항체 유전자를 이식한 형질전환 마우스를 사용한다. 이 방법에서는 마우스의 항체생성 관련 생식세포 유전자를 불활성화 시키고 대신에 인간의 항체생성 관련 생식세포 유전자로 치환하여 제작한 형질전환 마우스를 활용한다. 사람의 항체 유전자가 마우스에 이식되었으므로 최종적인 산물은 완전인간항체가 된다. 질병유발 항원을 마우스에 주입하여 항체를 생산하면, 형질전환 마우스 내에서 자연스런 항체 성숙과정(antibody maturation)이 일어나 항원에 친화력이 높은 항체를 얻는다. Amgen의 Vectibix™ (panitumumab), Janssen의 Simponi™ (golimumab) 등 다수의 제품이 이 방법으로 개발되었다(Cha, 2011; Seo et al., 2015; Rodgers and Chou, 2016; Kim and Lee, 2020).

6-4-4. 인체 유래 단일 B 세포(human single B cell) 활용법

파아지 디스플레이나 형질전환 마우스 방법은 주어진 질병유발 항원에 대한 면역반응을 유도하고 생성된 대응항체를 선별하는 과정이 복잡하고 시간이 많이 소요된다. 항체 확보의 시간과 비용을 단축하기 위하여 인체 유래 단일 B 세포를 활용한 완전인간항체 제조기술이 개발되었다. 이 기술은 복잡한 선별과정 대신 세포자동해석분리장치(fluorescence-activated cell sorter, FACS)를 활용하여 말초혈액단핵세포나 골수 유래 B 세포로부터 질병유발 항원에 결합하는 단일 B 세포를 바로 분리한다. 빠르고 효율적인 방법이어서 감염질환에 대응하여 신속하게 항체치료제를 개발해야 할 경우 유용하다. 현재 이 방법으로 개발된 몇 가지 바이러스 치료제가 임상시험 진행 중이다. 아직까지 미국 FDA에서 시판 승인을 받은 사례는 없다(Kim and Lee, 2020).

7. 이중항체

7-1. 항체의 개량

지금까지 항체치료제는 주로 암이나 자가면역질환 등을 타겟으로 개발되었다. 현재 항체치료제의 효능과 안정성을 향상시키기 위하여 다양한 항체공학적 기술이 개발되고 있다. 개량항체의 예를 들면; i) 흡수율을 향상시키기 위하여 항원결합부위만 사용하는 항체 조각(antibody fragment) 제품, ii) 항체에 치료약물을 결합시킨 항체-약물 결합체(ADC, antibody drug conjugate), iii) 하나의 분자에 두 가지 항원에 대한 결합능력을 부여한 이중항체(bispecifc antibody, bs) 등이다. 본고에서는 이 중 잠재력이 뛰어난 것으로 평가되고, 세계적으로 연구개발 자원이 집중되고 있는 이중항체에 대하여 논의해보고자 한다.

7-2. 이중항체의 개념과 등장

이중항체는 1960년에 처음 제안되어 그 동안 발전되어 왔다(Nisonoff et al., 1960). 이중항체는 각기 다른 특이성을 가진 두 가지 항체를 하나의 분자 내에 조합하여 만든다. 이중항체는 두 가지 항원에 동시에 결합한다. 암치료제의 경우를 보면 이중항체는 암항원에 특이적으로 결합하는 부위와 T 세포, NK 세포, 수지상세포, 과립세포, 대식세포 등의 면역효능세포와 결합하는 부위를 동시에 가진다. 이중항체는 면역효능세포를 암세포로 유인하여 면역효능세포가 이중항체에 동시에 결합된 암세포를 파괴하도록 한다.

이중항체에서는 두 가지 항체를 어떻게 조합하고, 구조를 어떻게 설계하는가에 따라 치료 대상 범위를 확대하고 치료효과를 증진시킬 수 있으며 생체조직 침투율도 향상시킬 수 있다. 이중항체는 단백질이기 때문에 단백질 자체로서 구조적인 특징도 중요한 고려요소이다. 이중항체는 단백질로서 체내에서 안정된 구조를 유지하고, 대량생산이 용이하며, 생체 내 침투가 쉬운 저분자 구조로 설계하는 것이 좋다(Cha, 2011).

초창기에는 항체 생산의 어려움과, 낮은 임상효과, 부작용 등으로 인하여 실용화에 어려움이 많았으나, 면역효능세포에 대한 이해가 높아지고, 항체를 생산하는 항체공학기술이 발전하면서 이중항체 신약 개발이 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 승인된 이중항체 의약품으로는 Removab™, Blincyto™, Hemlibra™로 총 3종이며 다수의 이중항체 후보가 임상적으로 연구되고 있다.

8. 이중항체의 제조방법과 형식(format)

8-1. 이중항체 형식의 분류

지난 수십년 간 이중항체와 그 유도체 연구개발 과정을 거치면서 이중항체는 여러 가지 형식(format)이 나왔다.

최신 리뷰에 의하면 현재 100가지가 넘는 형식의 이중항체가 개발되고 있다(Brinkmann and Kontermann, 2017; Wang et al., 2019; Shim 2020; Zhang et al., 2020). 이렇게 다양한 형식의 이중항체는 여러 가지 기준으로 분류할 수 있겠지만 크게 두 가지로 대별할 수 있다. 현재 개발되고 있는 이중항체 제품은 크게 2가지 형식, 즉 IgG 유사 형식과 비IgG 유사 형식으로 분류된다. IgG 유사 형식은 전체 크기 IgG 형의 이중항체로 Fc를 공통적 기반으로 가진다(이하 Fc 기반이중항체(Fc-based bsAbs)). 비IgG 유사 형식은 scFv 등의 가변부위 단편을 기반으로 하며 Fc 단편이 없는 구조의 이중항체이다(이하 단편기반이중항체(fragment-based bsAbs)). 단편기반이중항체는 두 개 혹은 그 이상의 항체 단편으로 구성되는데, scFv나 Fab나 sdAb와 같은 단편들이 펩티드 링커(peptide linker)나 이황화결합, 도메인 간 비공유결합 상호작용으로 결합된다. Fc 기반이중항체는 동종이합체(homodimer) 혹은 이종이합체(heterodimer) Fc 도메인을 가지는데 여기에 scFv나 Fab나 sdAb나 펩티드 링커로 결합된다. 항원결합부위가 펩티드의 N-말단이나 C-말단에 결합될 수도 있어서 이중항체 디자인에서 구조적인 다양성을 증가시킨다(Wang et al., 2019; Shim 2020).

8-2. 이중항체 제조방법의 발전

이중항체의 제조방법으로는 쿼드로마(quadroma), 화학적 결합 및 유전자 재조합적 방법이 사용된다. 초기에는 주로 하이브리도마 융합기술이나 화학적 교차결합으로 이중항체를 제작하였는데 순수한 동질의 이중특이성 항체를 대량으로 얻는 데는 어려움이 많았다. 유전공학적 기술이 도입되면서 항체공학기술이 발전하여 생산이 비교적 용이해졌다.

초기에 사용된 쿼드로마 기술에서는 이중항체를 얻기 위하여 두 개의 각기 다른 단클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 체세포융합으로 하나로 합친다. 이 융합세포주 내에서 2가지의 Ig 중쇄와 2가지의 Ig 경쇄가 무작위로 결합하여 쌍을 이루어 다양한 항체가 나온다. 이 무작위결합 혼합물에서 원하는 조합의 한 가지 이중항체를 순수 분리한다.

이 정제과정이 어려워서 해결책으로 유전자 조작으로 제작한 knobs-into-holes (KiH) 기술이 개발되었다. 이 기술에서는 돌연변이를 유도하여 하나의 Ig 중사슬의 CH3 도메인에는 구멍 구조를 만들고, 또 다른 Ig 중사슬의 CH3 도메인에는 손잡이 구조를 만들어서 두 개의 Ig 중사슬이 이형이합체를 형성하도록 유도한다. 이 기술을 사용하면 원하는 이중특이성 항체의 비중을 많이 높일 수 있다. 그러나 이 경우에도 세포 내에서 각기 다른 두 개의 경쇄가 무작위로 결합하여 원치 않는 중쇄/경쇄 조합이 만들어 진다(Cha, 2011). 이 문제를 피하기 위하여 개발된 것이 앞에서 설명된 scFv이다. scFv를 기반으로 하는 이중항체는 아래의 설명처럼 다양한 형식으로 발전하였다.

현재 이중항체의 디자인과 생산에는 파아지 디스플레이 선별기술, 항체링커공학, 쿼드로마 기술, KiH 기술, 공통 경쇄 기술, Cross MAb 기술, 단백질공학 기술 등이 사용된다(Wang et al., 2019).

8-3. 이중항체 형식

이중항체의 형식 분류에서 언급한 단편기반이중항체와 Fc 기반이중항체의 설계와 제조방법 그리고 치료제로서의 잠재력에 대하여 살펴보겠다.

8-3-1. 단편기반이중항체(fragment-based bsAbs)

단편기반이중항체는 항체의 가변부위만으로 구성되었으며 이중항체 형식에서 다수를 차지한다. 일반적으로 Fc 기반이중항체보다 크기가 작아서 청소(clearance)가 빠르며 생체에서 조직 침투율이 높다. 단편기반이중항체는 두 개 이상의 항체 단편이 펩티드 링커로 연결된 다양한 분자 구조(molecular configuration)를 가지며 구조에 따라 다른 물리화학적 특성, 생물학적 활성을 가진다. 다양한 단편기반이중항체 중 tandem scFvs, dual affinity retargeting (DART) protein, tandem diabodies (TandAbs) 3종류가 현재 전임상과 임상시험 단계에서 연구되고 있다(Shim, 2020).

8-3-1-1. Tandem scFvs

Tandem scFvs는 2개의 scFvs (Fig. 2-(a))가 링커로 연결되어 일렬로(tandem) 배열된 형태이다(Fig. 2-(b)). Tandem scFvs의 예는 최초로 허가된 단편기반이중항체 치료제인 Blinatumomab (Blincyto^{TM})이다. Blinatumomab은 bispecific T-cell engager (BiTE)로 VL_{CD19}-$(GGGGS)_3$-VH_{CD19}-(GGGGS)-VH_{CD3}-$(GGGGS)_3$-VL_{CD3} 구조를 가지며, T 세포의 CD3와 B 세포 계열 림프구의 CD19에 동시에 결합한다. Blinatumomab은 T 세포를 표적세포와 연결시키고 CD3로 T 세포를 활성화시킴으로써, 악성 B 세포 백혈병과 림프종양을 일으키는 CD19 발현 B 세포를 죽이게 된다(Wu et al., 2015).

scFv나 Fab와 같은 전통적인 항체 단편은 대장균으로부터 생산될 수 있으나 scFvs/BiTE 같은 경우에는 복잡한

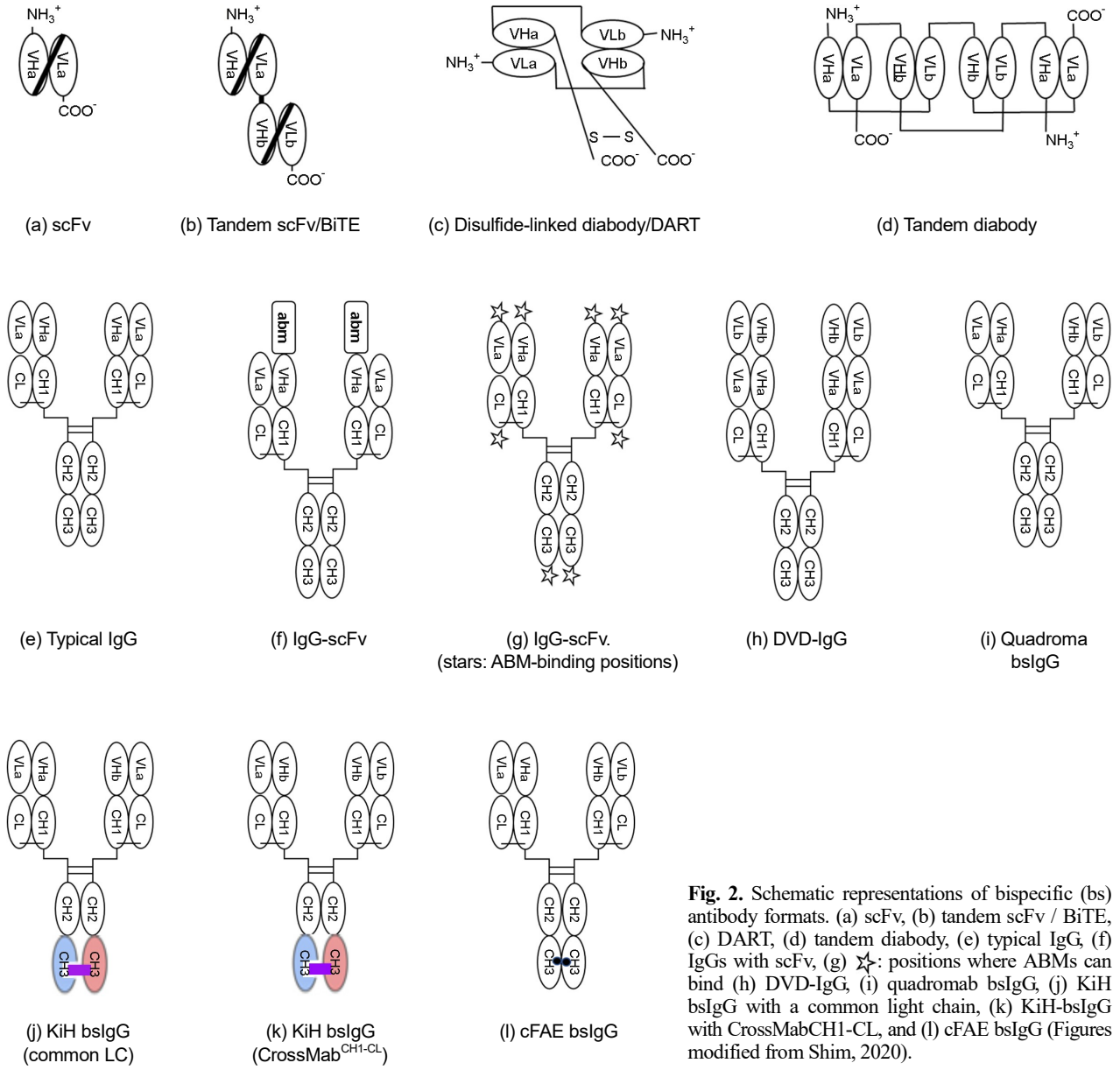

Fig. 2. Schematic representations of bispecific (bs) antibody formats. (a) scFv, (b) tandem scFv / BiTE, (c) DART, (d) tandem diabody, (e) typical IgG, (f) IgGs with scFv, (g) ☆: positions where ABMs can bind (h) DVD-IgG, (i) quadromab bsIgG, (j) KiH bsIgG with a common light chain, (k) KiH-bsIgG with CrossMabCH1-CL, and (l) cFAE bsIgG (Figures modified from Shim, 2020).

구조와 이황화결합 때문에 주로 포유동물세포에서 생산된다. Tandem scFvs/BiTE는 크기가 작고(~60 kDa) Fc가 결여되어서 생체 내에서 비교적 빠르게 청소된다. 현재 약 10종 이상의 BiTE 분자가 현재 초기임상시험 단계에 있다(Shim, 2020).

8-3-1-2. DART

DART는 다른 단편기반이중항체로서 scFv 두 개가 이황결합으로 연결된 diabody이다(Fig. 2-(c)). 보통 diabody는 scFv 두 개가 비공유적으로 결합되어 있으나 DART에서는 이황화결합으로 결합되어 있다. DART에서는 VH-linker-VL 구조를 가진 두 개의 폴리펩티드가 이형이합체를 형성하는데 양 반대편 끝의 C-말단에 시스테인을 각각 가지고 있어서 이황화결합을 형성한다. 보통 DART를 만들기 위해서는 VLA-linker-VHB-tail과 VLB-linker-VHA-tail과 같은 두 개의 폴리펩티드 체인 구조를 숙주세포에서 공동 발현(co-expression)시킨다. 이때 불필요한 동형이합체를 없애기 위해 각 C-말단에 이형이합체 형성을 유도하는 염기서열을 넣어 고순도의 이형이합체를 얻는다. 이후 친화성 크로마토그래피나 크기배제 크로마토그래피로 순수 DART 단백질을 정제하여 얻는다. DART는 공유

결합이 된 diabody이기 때문에 안정성이 매우 좋다. 다수의 DART 분자가 현재 임상시험 중에 있다(Shi et al., 2019; Shim, 2020).

8-3-1-3. Tandem diabodies (TandAbs; 일렬 diabody)

TandAbs는 VH_A-VL_B-VH_B-VL_A와 같은 동일한 구조의 폴리펩티드 2개가 서로 거꾸로 방향으로 가면서 비공유결합을 하여 머리에서 꼬리까지 동종이합체(head-to-tail homodimer)를 형성한 것이다(Fig. 2-(d)). BiTEs와 DART는 각 target에 하나씩의 결합자리를 가지고 있는데 반하여 Tandem diabodies는 각 target마다 2개씩의 결합자리를 가지고 있다. 이에 따라 강해진 친화력(avidity) 효과에 의해 항체와의 친화력(affinity)이 더욱 공고해진다(Kipriyanov et al., 1999). 양쪽의 링커는 원치 않는 폴리펩티드 자신의 내부 상호결합을 방지하기 위한 목적이고, 중간 링커는 구조적인 유연성을 부여하고 항원과의 결합을 용이하게 하기 위함이다. TandAbs는 대장균이나 포유동물세포에서 생산된다(Kipriyanov et al., 1999; Reusch et al., 2015). TandAbs는 상온이나 냉장 보존에서 비교적 안정적이다. 다수의 TandAbs가 현재 임상시험 중이다(Shim, 2020).

8-3-2. Fc 기반이중항체(Fc-based bsAbs)

Fc 부위는 결정화되는 단편이며, 항원-항체 결합에는 관여하지 않지만 항원을 파괴하는 후반의 과정에 사용된다. Fab 영역은 항원을 인식하여 결합하는 반면 Fc 영역은 여러 가지 면역세포에 존재하는 다양한 수용체와 결합한다. 이는 후속적인 면역반응을 일으키는데 앞에서 언급한 ADCC와 CDC 기전으로 항원을 제거한다. Fc 영역은 항체의 안정성에도 영향을 주어서의 CH2와 CH3 interface는 모든 세포에 존재하는 FcRn (Fc neonatal receptor)와 작용하여 항체의 반감기를 올려준다. 따라서 긴 반감기와 큰 사이즈가 문제가 되지 않는 경우라면 Fc를 포함하는 항체를 만드는 것이 치료목적으로 더 나을 수도 있다.

Fc 기반이중항체로는 좌우 대칭형 구조와 비대칭형 구조가 있다. 대칭형은 주로 IgG 폴리펩티드의 N-말단이나 C-말단에 Fv나 scFv 부분을 추가하여 이중항체를 만들어서 전형적인 IgG (Fig, 2-(e))보다 더 커지게 된다(Fig. 2-(f)~(h)). 반면에 비대칭형은 두 개의 가공된 Fc의 이형이합체로 만들어서 전형적인 IgG와 모양과 크기가 유사하며, 두 개의 팔이 각기 다른 항원을 인식하는 이중항체이다(Fig. 2-(i)~(l)) (Ha et al., 2016; Shim, 2020).

8-3-2-1. 대칭형 Fc 기반이중항체(symetric Fc-based bsAbs)

대칭형 Fc 기반이중항체에서는 두 번째의 항원특이성을 가진 가변부위(Fv)가 IgG의 경쇄나 중쇄의 N-말단이나 C-말단에 대칭으로 융합된다. 주로 scFv가 항원결합부위(antigen-binding moiety, ABM)로서 추가되어서 IgG-scFv를 만든다(Fig. 2-(f)). 전형적인 IgG (Fig. 2-(e))와 비교하면 scFv 2개가 추가로 붙어 있다. scFv는 경쇄와 중쇄의 각 N-말단과 C-말단의 4자리에 대칭으로 부착할 수 있다(Fig. 2-(g)). scFv 자리를 대신하여 다른 ABM으로 domain antibodies나 alternative binding scaffold molecules이 사용되기도 한다.

전통적인 IgG에 ABM을 붙이는 작업은 첨가된 Fv나 부착부위에 따라 항체분자 자체의 생리화학적인 특성을 바꾸게 된다. 따라서 이중항체의 디자인에서 링커의 길이, 서열, 주 Fv나 부착용 scFv의 선택과 최적화 과정이 중요하다(DiMasi et al., 2019).

scFv를 붙이는 대신 VH와 VL을 IgG의 각기 다른 말단에 도입하여 추가적인 Fv를 형성할 수도 있다. 대표적인 예가 DVD-IgG인데 VH와 VL을 중쇄와 경쇄의 N-말단에 각각 결합하여 각 팔에 연속적인 두 개의 Fv가 있는 이중항체를 만들었다(Fig. 2-(h)) (Wu et al., 2007).

N-말단 원위부에 붙은 Fv에 항체가 결합하면 공간적인 제약으로 인하여 근위부에 있는 Fv가 다른 항체와 결합하는 것을 방해할 수도 있다. 이 문제는 주로 링커를 사용하여 해결한다.

대칭형 Fc 기반이중항체는 디자인 원리가 비교적 간결하고 결합부위가 4개이기 때문에 항체에 강한 결합을 한다. 다수의 대칭형 Fc 기반이중항체 물질이 현재 임상시험 중이다(Shim, 2020).

8-3-2-2. 비대칭형 Fc 기반이중항체(asymetric Fc-based bsAbs)

IgG는 C2형의 대칭("open book geometry", chiral)으로 두 개의 동일한 중쇄와 두 개의 동일한 경쇄를 가진다. 두 중쇄는 힌지 지역에서 이황화결합으로 연결되고 CH3 지역에서 비공유결합적인 상호작용을 한다. 각 경쇄는 CL에서 중쇄의 CH1과 이황화결합으로 연결되고 중쇄와 비공유결합적인 상호작용을 한다. 두 개의 Fab 팔은 동일하기 때문에 항원 결합 부위는 두 개이지만(bivalent) 항원특이성은 한 가지(monospecific)이다.

비대칭형 Fc 기반이중항체는 전형적인 IgG와 분자 구조가 기본적으로 동일하지만, 두 개의 Fab 팔이 Fc 이형이

합체로 서로 달라서 이중특이성(bispecificity)이 부여된다.

초기에 비대칭형 Fc 기반이중항체를 얻기 위해서 두 개의 융합세포를 다시 융합시켜서 쿼드로마를 만들었다(Staerz and Bevan, 1986). 두 가지의 각기 다른 경쇄와 두 가지의 중쇄가 하나의 quadroma 세포에서 만들어져서 무작위로 조합이 되다 보니 원하는 조합의 이중항체는 약 12.5%만 생성되어 이를 정제해내는 것이 어려웠다.

이러한 경쇄와 중쇄의 무작위 조합 문제는 CH3 도메인, 경쇄, Fd 지역(중쇄의 N-말단에서 약 220개의 처음 아미노산 서열이며 Fab 지역에 포함되어 있음) 등을 유전공학적으로 수식하여 해결하였다. CH3 지역을 조작하여 도메인 간에 모양, 표면특성, 전하, 수소결합 혹은 이황화결합으로 손잡이와 구멍과 같은 구조인 KiH 형태로 만들어서 공간적인 상보성을 확보했다(Fig. 2-(j)). KiH 구조는 이형이합체 형성을 강화시켜준다(Ridgway et al., 1996). 이렇게 CH3 도메인에 아미노산을 교체하면서 중쇄의 이형이합체 형성 비율이 90% 이상 올라가는 성과를 얻었다.

중쇄가 이형이합체가 되어도 경쇄의 오결합(mismatch)은 기능이 없는 Fab를 만들어서 이중항체 생산 효율을 떨어뜨린다. 그리하여 공통 경쇄를 사용하는 전략도 사용되었는데 최근에 허가된 혈우병A 치료제인 Hemlibra™ (emicizumab)가 여기에 해당된다.

경쇄 오결합의 다른 해법은 CrossMab 형식이다(Fig. 2-(k)). 비대칭 IgG의 한 Fab 팔의 CH1과 CL을 서로 맞바꾸는 것이다(CrossMabCH1-CL) (Schaefer et al., 2011). CrossMab의 한 예로 Ang-2VEGF CrossMab인 Faricimab은 신생혈관 연령 관련 황반변성(neovascular age-related macular degeneration; nAMD)과 당뇨병성 황반 부종(diabetic macular edema)의 치료를 위해 임상3상 시험을 하고 있다(Shim, 2020).

경쇄 오결합을 최소화하는 다른 방법은 가변부위(VH:VL)와 불변부위(CH1:CL) 도메인의 접합면(interface)의 핵심적인 서열에 돌연변이를 가하여 정전기적, 공간적 상보성을 확보하여 바른 결합을 유도하는 것이다.

비대칭형 Fc 기반이중항체을 얻는 다른 방법은 Fab arm exchange (cFAE) 방법이다. 이 방법에서는 두 개의 단일특이성 IgG를 각각 만든다. 두 개는 각각 CH3 도메인에 돌연변이를 가하여 동종이합체는 불안정하게 하고 상호간 이형이합체가 안정적으로 형성되게 하는 상호 상보성을 부여한다. 이 두 가지의 돌연변이 IgG를 각각 독립적으로 생산 정제한 다음 이 둘을 환원환경에서 이황화결합을 해체하여 반 분자를 만든 다음, 이들 반 분자가 서로 이형이합체로 재구성되어 결합할 수 있도록 한다. 그 다음에 환원제를 제거하여 이형으로 결합된 중쇄와 경쇄 간의 이황화결합이 새로 생성되게 한다(Fig. 2-(l)). 이 방법은 상업적인 서비스로도 제공되는데 수율이 95%에 이르는 매우 효율적인 방법이다(Creative Biolabs homepage, 2020).

끝으로 경쇄 오결합을 막고 비대칭형 Fc 기반이중항체을 얻는 또 다른 방법은 공동배양방법이다. 이 방법에서는 반항체(half-antibody)를 각각의 cell line에서 생산하는데 A와 B 반항체를 만들어서 나중에 이 둘을 결합시키는 방식이다. 이 반항체는 돌연변이를 통하여 KiH 구조를 도입하여 자신과의 결합이 억제되고 A, B 상호 간의 결합만 허용되게 설계되었다. A와 B 반항체를 발현하는 플라스미드를 가진 대장균을 양이 1:1이 되게 공동배양하여 A, B 이형이합체인 이중항체를 생산한다. 이 방법은 간단하고 생산이 용이하여 널리 사용된다(Spiess et al., 2013; Shim, 2020).

9. 이중항체의 글로벌 연구 현황

이중항체의 세계적인 임상시험 현황을 살펴보기 위하여 미국 국립보건원(NIH) 산하 국립의학도서관(National Library of Medicine)에서 운영하는 임상정보 데이터베이스인 ClinicalTrails.gov에서 'bispecific antibody'를 키워드로 검색한 결과 2020년 8월 16일 현재 시점에서 총 104건이 진행되고 있다(ClinicalTrails.gov homepage, 2020).

임상시험의 진행단계 별로 살펴볼 때 임상1상이 73건이며 임상2상이 52건, 임상3상이 2건으로 나타났다. 임상시험 'Topic'의 경우 총 226개의 대상질환(condition)이 검색되는데 10건 이상의 시험(studies)이 이루어지는 질환을 보면 유방암, 위장관계종양, 백혈병, 폐암, 림프암 등이 있다. 지역별로는 미국 56건, 유럽 34건, 동아시아 31건, 캐나다 9건, 호주 8건, 기타지역 5건이다. 총 임상시험 건수의 합이 104건이 넘게 나오는 것은 임상단계나 임상시험 지역, 대상질환이 서로 중복되는 임상시험을 동시에 진행하기 때문으로 추정된다.

10. 이중항체의 국내 연구 현황

ClinicalTrails.gov에서 'bispecific antibody'와 'Korea'를 조합하여 키워드로 검색한 결과 2020년 8월 16일 현재 한국과 관련하여 이중항체 임상시험이 총 10건이 진행되는 것으로 나타났다. 임상시험 단계로는 1상이 8건, 2상이 5건이었다. 임상시험의 대상질환은 위암, 폐암, 식도암, 난소암, 췌장암 등이었다.

국내에서 이중항체 연구에 참여하는 기업은 한미약품, 에이비엘바이오, 파멥신, 종근당, 앱클론, 와이바이오로직스, 유틸렉스 등이다.

한미약품은 이중항체 자체 플랫폼인 펜탐바디(penta amino acid-mutated bispecific antibody)를 개발하였는데, 면역관문인 PD-1과 암세포 항원인 HER-2를 타겟으로 하는 이중항체 IBI315를 포함하여 총 3개의 항암제와 1개의 자가면역질환 치료제를 개발하고 있다. IBI315는 PD-1/HER2 이중항체 중 세계에서 처음으로 임상시험에 진입하였다(Hanmi Pharma homepage, 2020).

에이비엘바이오는 그랩바디(Grabody)라는 이중항체 플랫폼을 개발하여 Grabody-I, Grabody-T, Grabody-B 등으로 면역항암, 퇴행성뇌질환을 타겟으로 하는 이중항체를 전임상 및 임상시험 단계에서 진행 중이다. 또한 4-1BB, CD3, PD-L1, 사이토카인으로 이중항체의 타겟을 확장 중이다. 파이프라인 ABL-101은 암세포의 신생혈관 생성을 억제하며 위암환자를 대상으로 임상1상을 진행 중이다. ABL-301은 한쪽은 혈뇌장벽을 통과하는 항체를, 다른 한쪽은 파킨슨병을 일으키는 알파시누클린 단백질을 차단하는 항체를 가진 이중항체이다(ABLBio homepage, 2020).

파멥신은 dual target antibody 플랫폼 기술인 DIG-body, PIG-body, TIG-body를 보유하고 있다. 이중항체 항암제인 '타니비루맵'을 개발하고 있다(Pharmabcine homepage, 2020).

종근당은 이중항체 항암제 CKD-702로 임상1상 시험을 진행하고 있다. CDK-702는 고형암의 간세포성장인자 수용체(c-MET)와 상피세포성장인자 수용체(EGFR)를 동시에 저해한다(CKD Pharma homepage, 2020).

앱클론은 Yplus라는 항체탐색 기술을 사용하고, AffiMab이라는 이중항체 플랫폼을 사용하여 이중항체신약을 개발하고 있다. 앱클론의 이중항체 치료제 AM105는 대장암, 폐암이 적응증이다(Abclon homepage, 2020).

와이바이오로직스는 인간 B 세포의 cDNA로부터 유래된 naïve cDNA 라이브러리인 Ymax-ABL을 보유하여 항체를 발굴하고 있다. 또한 ALiCE (Antibody Like Cell Engager)라고 불리는 이중항체 플랫폼을 보유하여 7개의 이중항체 치료제 후보 물질을 개발하고 있는데 모두 전임상 단계에 있다(YBiologics homepage, 2020).

유틸렉스도 4-1BB를 표적으로 하는 이중항체 치료제 EU101을 개발 중이다(Eutilex homepage, 2020).

11. 논의

이중항체와 관련된 기술이 빠르게 발전하고 있지만 이중항체 생산에는 해결해 나가야할 여러 가지 이슈들이 있다. 불순물을 줄이고 고품질의 균질한 순수 이중항체를 생산하는 것은 공통적인 과제 중의 하나이다. 이에 따라 고품질의 이중항체 생산하는 공정 기술도 꾸준히 발전하고 있다. 단편기반이중항체인 scFv 형태의 경우에는 항체 타입에 따라 안정성과 조직 침투도에서 차이가 나서 안정성과 침투도를 조절하는 것이 관심주제이다. scFv 이중항체를 생산할 때에는 scFv의 크기, 아미노산 서열, 단백질 구조, 용해도, 안정성, 순수분리공정, 생산 규모 등을 감안하여 목적에 알맞은 제조방법과 호스트를 선택한다.

전체 IgG의 크기를 갖춘 Fc 기반이중항체를 생산할 경우에는 순수한 이형이합체를 얻는 것이 중요하다. KiH 방법은 이형중쇄끼리 결합시키는 효율적인 방법이다. 공통경쇄 방법을 사용하거나 CrossMab 기술을 사용하는 것도 경쇄와 중쇄결합을 다양하게 하는 방법이다. 공동배양 방법이나 비세포적인 방법도 이중항체를 안정적으로 생산하기 위한 제조 플랫폼으로 부상하고 있다.

이중항체는 차세대 항체치료제로 빠르게 성장하고 있다. 이중항체 구조의 설계와 디자인은 단편기반이중항체와 Fc 기반이중항체의 예에서 본 것처럼 매우 다양한 형태로 발전해 나가고 있다. 더욱이 이중항체는 aptamer, affibody, 합성약물과 같은 작은 분자와 결합하여 적용이 더욱더 확장될 수 있다(Wang et al., 2019).

이중항체는 현재 100가지가 넘는 형식의 다양한 구조로 발전하고 있다. 세계적으로 30가지가 넘는 플랫폼 기술이 보고되었다(Zhang et al., 2020). 그 적용범위도 면역항암 분야에 더하여 감염질환, AIDS, 유전질환, 진단분야 등으로 다양하게 확장해 나가고 있다.

2019년 5월 대한민국 정부는 바이오헬스 산업을 비메모리 반도체, 미래형 자동차와 함께 차세대 주력 산업으로 육성하기 위한 '바이오헬스 산업 혁신전략' 발표였다. 2030년까지 바이오헬스 산업을 5대 주력 수출 산업으로 육성하여, 세계 시장 점유율을 2019년 현재 약 2%에서 6% 수준으로 비약적으로 끌어올리겠다는 계획이다. 국내 산업 경쟁력이 글로벌 수준으로 도약할 수 있도록 기술개발부터 인허가, 생산, 시장출시 단계까지 산업 전주기의 혁신 생태계가 조성될 수 있도록 정부 차원에서 지원을 강화한다는 포석이다(2019 Pharmaceutical Industry DATABOOK Statistic Information, 2019; Sung, 2019). 그 동안 항체치료제 개발 역량을 비축해온 우리나라 바이오 제약업계의 지속적인 노력과 정부의 지원이 합쳐져서 하루빨리 우리나라에서 세계적인 블록버스터급 이중항체 신약이

탄생하기를 기대한다.

ACKNOWLEDGEMENT

None.

CONFLICT OF INTEREST

The author certifies that I have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

REFERENCES

2019 Pharmaceutical Industry DATABOOK Statistic Information, 2019. KPBMA (Korea Pharmaceutical and Bio-Pharma Manufacturers Association). Korea.

Abclon. homepage. 2020. http://www.abclon.com/the/therapeutic_-antibody02.asp

ABLBio. homepage. 2020. https://www.ablbio.com/kr/company/pipeline01

Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies. Front Biosci. 2008. 13: 1619-1633.

Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. MAbs. 2017. 9: 182-212.

Cha SH. Trend in the development of therapeutic antibodies II. Bispecific antibody. Jun 2011. The News Letters of the Korea Association of Biochemistry and Molecular Biology. Korea.

CKD Pharma. homepage. 2020. http://www.ckdpharm.com/research/project.do

ClinicalTrails,gov. homepage. 2020. https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home

Creative Biolabs. homepage. 2020 Aug. https://www.creative-biolabs.com/bsab/

DiMasi N, Fleming R, Wu H, Gao C. Molecular engineering strategies and methods for the expression and purification of IgG1-based bispecific bivalent antibodies. Methods. 2019. 154: 77-86.

Eutilex. homepage. 2020. http://www.eutilex.com/sub3/sub1.php

EvaluatePharma World Preview 2019, Outlook to 2024. June 04, 2019. https://www.evaluate.com/thought-leadership/pharma/evaluatepharma-world-preview-2019-outlook-2024

Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. MAbs. 2016. 8: 1177-1194.

Gül N, van Egmond M. Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages: A potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. Cancer Res. 2015. 75: 5008-5013.

Ha JH, Kim JE, Kim YS. Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform Technology: From Design to Applications in Therapeutic Antibodies and Proteins. Front Immunol. 2016. 7: article 394.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011. 144: 646-674.

Hanes J, Plückthun A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997. 94: 4937-4942.

Hanmi Pharma. homepage. 2020. http://www.hanmi.co.kr/hanmi/handler/Rnd-Pentambody

Husain B. Ellerman D. Expanding the boundaries of biotherapeutics with bispecific antibodies. BioDrugs. 2018. 32: 441-464.

Kim SW, Lee EK. Trend in the global antibody medicine market and technology development. Bioeconomy Report. Korea Bioeconomy Research Center. Korea Biomedicine Industry Association. Jun 26 2020. Korea

Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Schuhmacher J, Cochlovius B, Von Der Lieth CW, Matys E, Little M. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. J Mol Boil. 1999. 293: 41-56.

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975. 256: 495-497.

Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PWHI. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. Nat Rev Drug Discov. 2019. 18: 585-608.

Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. J Biomed Sci. 2020. 27: 1-30.

Mamidi S, Höne S, Kirschfink M. The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. Immunobiology. 2017. 222: 45-54.

Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. Science. 1960. 132: 1770-1771.

Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inogés S, Melero I, Berraondo P. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. Immunol Cell Biol. 2017. 95: 347-355.

Pharmabcine. homepage. 2020. http://www.pharmabcine.com/sub02/sub02.php

Reusch U, Duell J, Ellwanger K, Herbrecht C, Knackmuss SH,

Fucek I, Eser M, McAleese F, Molkenthin V, Le Gall F, et al. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, eciently recruits T cells for the potent lysis of CD19+tumor cells. MAbs. 2015. 7: 584-604.

Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng. Des. Sel. 1996. 9: 617-621.

Rodgers KR, Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. Biotechnol Adv. 2016. 34: 1149-1158.

Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. Expert Opin Biol Ther. 2006. 6: 177-187.

Seo KW, Seo SK, Ryu SL, Uhm JH, Baek JH, Kim BC, Lee BY. Trend in the development of antibody medicine. Specialty data collection in recombinant medicine Book 6. Dec. 2015. Advanced Therapy Products Research Team. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Korea Mistry of Food Drug Safety. Korea.

Schaefer W, Regula JT, Bähner M, Schanzer J, Croasdale R, Dürr H, Gassner C, Georges G, Kettenberger H, Imhof-Jung S, et al. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 2011. 108: 11187-11192.

Shi M, Su RJ, Parmar KP, Chaudhry R, Sun K, Rao J, Chen M. CD123: A Novel Biomarker for Diagnosis and Treatment of Leukemia. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2019. 19: 195-204.

Shim H. Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. Biomolecules. 2020. 10: 360.

Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 1985. 228: 1315-1317.

Spiess C, Merchant M, Huang A, Zheng Z, Yang NY, Peng J, Ellerman D, Shatz W, Reilly D, Yansura DG, Scheer JM. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. Nat Biotechnol. 2013. 31: 753-758.

Staerz UD, Bevan MJ. Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity. Proc Natl Acad Sci USA. 1986. 83: 1453-1457.

Strohl WR. Current progress in innovative engineered antibodies. Protein Cell. 2018. 9: 86-120.

Sung DW. Trend and prospect in global biomedicine industry. Industry and Economy Team. Overseas Economy Research Center. The Export Import Bank of Korea. 2019. vol. 2019-Issue-20. Korea.

Waldmann H. Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. Methods Mol Biol. 2019. 1904: 1-10.

Wang Q, Chen Y, Park J, Liu X, Hu Y, Wang T, McFarland K, Betenbaugh MJ. Design and Production of Bispecific Antibodies. Antibodies (Basel). 2019. 8: 43.

Wu X, Sereno AJ, Huang F, Lewis SM, Lieu RL, Weldon C, Torres C, Fine C, Batt MA, Fitchett JR, Glasebrook AL, Kuhlman B, Demarest SJ. Fab-based bispecific antibody formats with robust biophysical properties and biological activity. MAbs. 2015. 7: 470-482.

Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, et al. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. Nat Biotechnol. 2007. 25: 1290-1297.

YBiologics. Homepage. 2020. http://www.ybiologics.com/kor/pipeline/index.php?gubun=3

Zhang J, Yi J, Zhou P. Development of bispecific antibodies in China: overview and prospect. Antibody Therapeutics. 2020. 3: 126-145

https://doi.org/10.15616/BSL.2020.26.3.136
Cite this article as: Kwon SI. Current Status of the Research and Development of Bispecific Antibodies. Biomedical Science Letters. 2020. 26: 136-148.