

The Improved Antigen-binding Activity of Biosimilar Remicade ScFv Antibodies by Fusion of the Leucine Zipper Domain

Jin-Kyoo Kim* and Tae Hwan Kim

Division of Biohealth Science, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received September 18, 2020 / Revised September 29, 2020 / Accepted September 29, 2020

Remicade is a therapeutic biosimilar natural antibody in which the mouse variable domain has been linked to the human constant domain. It is a chimeric monoclonal antibody specific to tumor necrosis factor- α (TNF- α) and has been developed for the treatment of rheumatoid arthritis. To investigate the biological activity of the Remicade antibody, we carried out a bioinformatics study using a protein data bank to characterize the TNF- α antigen binding mechanism of the Remicade natural antibody. Because the production of the Remicade antibody is often limited by genetic instability of the natural antibody-producing cell, we generated a Remicade single-chain variable domain fragment antibody (Remicade) in which a heavy chain variable domain (VH) is joined with a light chain variable domain (VL) by a polypeptide linker. Furthermore, Remicade was fused to a leucine zipper (RemicadeScZip) for higher production and higher antigen-binding activity than Remicade. The Remicade and Remicade ScZip were expressed in *Escherichia coli* and purified by a Ni²⁺-NTA-agarose column. As expected, the purified proteins had migrated as 28.80 kDa and 33.96 kDa in sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide electrophoresis. The TNF- α antigen binding activity of Remicade was not observed by ELISA and western blot. In contrast, RemicadeScZip showed antigen-binding activity. Additional bio-layer interferometry analysis confirmed the antigen-binding activity of RemicadeScZip, suggesting that the leucine zipper stabilized the folding of RemicadeScZip in a denatured condition and improved the TNF- α antigen-binding activity.

Key words : Bio-layer interferometry, leucine zipper, remicade, remicadescZip, single-chain variable domain fragment

서 론

우리 몸을 방어하는 면역 중에서 체액성 면역(humoral immunity)을 담당하는 자연항체(natural antibody)는 중 사슬(heavy chain) 2개와 경 사슬(light chain) 2개가 서로 결합되어 Y 형태의 구조를 가지면서 항원에 특이적으로 결합하는 당단백질(glycoprotein)이다. 항체는 중 사슬과 경 사슬 부위 중에서 항원과 결합하는 부위를 가변부위(variable domain)라 하며 중 사슬 가변부위를 VH (heavy chain variable domain)로, 경 사슬 가변부위를 VL (light chain variable domain)로 표시한다. 또한 중 사슬과 경 사슬부위에는 항원과 직접적으로 결합하지 않으나 항체의 전체적인 구조의 안정화에 관여하는 정상부위(constant domain)가 존재하며 특히 중 사슬의 정상부위(Fc)는 독립적인 작용기(effector)기능을 갖는다. 즉 자

연항체는 VH와 VL의 항원결합기능과 Fc의 작용기(예, 보체 활성화, 대식세포 및 자연살해세포의 활성화)기능을 동시에 갖는 단백질이다. 항체는 항원과 특이적으로 결합하므로 연구 목적의 다양한 생물실험기술들(예, ELISA 및 western blot)에 활용되고 있을 뿐만 아니라 의학적으로도 특히 암, 자가면역 질환 등의 난치병 치료제로 개발되고 있다. 즉 항체의약품은 표적치료제로 개발되어 질병을 일으키는 특정 항원과 결합하여 치료효과를 증대시킬 수 있으며 비특이적 결합으로 인한 부작용을 최소화시킬 수 있는 장점이 있다. 현재까지 개발된 항체의약품 중에서 종양괴사인자- α (TNF- α)항원에 특이적으로 결합하여 류미티스성 관절염을 치료하는 항체가 가장 대표적인 항체의약품이다[2, 4, 29]. 그 중에서 레미케이드(Remicade)는 휴미라(Humira)에 이어 전 세계 매출 2위를 차지하는 항체치료제이다[3]. 레미케이드는 IgG1 종류의 항체로 생쥐의 가변부위와 인간의 정상부위를 갖는 카이메릭(chimeric)항체이며[25] 수용성 TNF- α 와 세포표면에 존재하는 TNF- α trimer에 특이적으로 결합하여 TNF- α 에 의해 발생하는 염증을 억제하는 효과를 나타낸다. TNF- α 는 혈관내피세포(endothelial cell) 및 섬유아세포(fibroblast)표면에 발현된 TNF 수용체와 결합하면 흡착분자(adhesion molecules)와 케모카인(chemokine)의 발현을 유도하고 그 결과 T 세포, 대식세포(macrophage), 호중구(neutrophil) 및 자연살해세포(natural

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3485, Fax : +82-55-213-3480

E-mail : jkkim@changwon.ac.kr

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.

killer cell)등을 관절이나 연골조직에 모이게 하여 염증을 일으키게 된다[23].

레미케이드는 2015년과 2018년에 유럽특허 및 미국특허가 만료되어 바이오시밀러(biosimilar) 항체로 생산되기 시작하였는데 바이오시밀러 항체란 생물의 세포나 조직 등을 이용해 생산한 오리지널 항체와 같은 약효를 나타내도록 제조된 복제 항체를 말한다. 그러므로 이미 약효가 검증되고 특허권이 만료되어 국내외적으로 바이오시밀러 레미케이드 항체 생산에 주력하고 있다. 그러나 레미케이드는 진핵세포를 숙주로 하여 생산된 자연항체이므로 숙주세포의 배양조건, 시간 및 안정적인 항체생산 등에 기술적인 어려움이 있어 항체생산량이 제한되며 오랜 시간 배양하는 경우 유전자의 불안정성으로 인해 항체의 생산 및 기능이 상실 또는 감소되는 현상이 나타난다 [30]. 또한 인체 내에 존재하는 많은 세포(예, 면역세포, 상피세포)들이 표면에 항체의 Fc와 결합하는 Fc 수용체(receptor)를 발현하여 불필요한 비특이적 결합을 유도할 수 있으므로 Fc가 제거된 single-chain variable domain fragment (ScFv) 항체단편을 제조하기도 하였다. 즉 ScFv항체단편은 항체유전자 조작 기술을 이용해 항체의 VH와 VL 유전자만을 클로닝하고 이 두 유전자를 링커 펩타이드(linker peptide)로 연결하여 제조된 재조합 항체단편이다[1, 9, 14, 24, 28]. 그러므로 ScFv 항체단편은 항원결합력은 그대로 유지하면서 Fc와 Fc receptor간의 비특이적 결합을 제거할 수 있으며 자연항체(150 kDa)보다 분자량(25 kDa)이 작아 표적 세포 또는 표적 조직 침투성을 향상시켜 표적치료효과를 극대화 할 수 있다.

ScFv 항체 단편의 발현은 일반적으로 대장균을 사용하므로 유전자 조작이 용이하여 다양한 ScFv 변이체를 쉽게 생산할 수 있다. 특히 ScFv는 구조상 1개의 항원결합부위를 갖는 단량체(monomer)이므로 2개의 항원결합부위를 갖는 자연항체보다 항원결합력이 낮으므로 유전자조작을 통해 dimer, trimer 및 tetramer등 중합체(multimer)를 형성하는 도메인을 ScFv에 융합시켜 항원결합력을 증가시키는 방법이 보고되었다[7, 19, 27]. 예를 들면 효모의 GCN4 전사인자의 leucine zipper (ScZip)를 ScFv에 융합시켜 dimeric ScFv를 개발하여 항원결합력을 증가시켰는데[17] ScZip도메인은 parallel coiled-coil helix형태로 소수성과 친수성을 동시에 갖는 양극성(amphipathic)을 나타내어 대장균 및 효모등과 같은 이형발현체제(heterologous expression systems)에서 발현이 쉽지 않은 단백질들의 발현율을 개선시키고 dimer형성을 유도하여 항원결합력을 증가시키는 도메인으로 보고되어졌다[5, 10, 26].

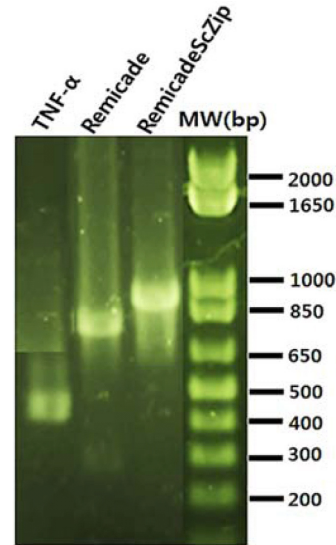


Fig. 1. DNA gel analysis of TNF- α , Remicade and RemicadeScZip. TNF- α genes amplified by PCR was cloned into pET-22b expression vector by *Sfi* I-*Not* I digestion. Remicade and RemicadeScZip ScFv genes amplified by PCR were cloned into pUC 119 expression vector by *Sfi* I-*Not* I digestion.

본 연구에서는 첫째, 생물정보학 연구를 통해 레미케이드 VH 및 VL 유전자의 germline gene family를 결정하고 TNF- α 항원과 레미케이드 항체 결합복합체의 결합기작(binding mechanism)을 분석하였다. 둘째, 유전자 조작기술을 이용하여 레미케이드 ScFv (Remicade) 및 RemicadeScZip 유전자를 대장균에서 발현하여 두 ScFv항체단편의 발현과 항원결합력을 측정하였으며 특히 항원결합력을 Kd값으로 수치화하여 두 ScFv 항체간에 결합력을 비교분석 하였다.

재료 및 방법

TNF- α 및 레미케이드 ScFv 발현 벡터 구축

중양피사인자-알파(TNF- α) 항원, 레미케이드 ScFv (Remicade) 항체 및 ScZip가 융합된 융합항체(RemicadeScZip)는 NCBI gene bank (<https://www.ncbi.nlm.nih>)와 IMGT database (<http://www.imgt.org>)를 활용하여 합성(Bionix, Korea)된 유전자를 주형으로 하여 특이적 프라이머(Supplementary Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 수행하여 유전자를 증폭하였고 유전자증폭을

Table 1. Biochemical properties of TNF- α , Remicade and RemicadeScZip

	Gene size (bp)	Amino acid number	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point (pI)
TNF- α	498	166	18.38	7.29
Remicade	789	263	28.80	6.21
RemicadeScZip	927	309	33.96	6.64

위한 증합효소로는 GoTaq 효소(Promega, U.S.A.)를 이용하였으며 *Sfi* I-*Not* I 제한효소(New England Biolabs, U.S.A.)를 이용하여 pET-22b 또는 pUC119 발현벡터로 클로닝 하였다[16, 22]. 발현벡터로 클로닝 되어진 각각의 유전자들은 DNA sequencing [32]을 통해 염기배열과 그로부터 추론된 아미노산 배열을 재확인하였다(Fig. 2).

레미케이드 항체 VH 및 VL 분석

IMGT database를 이용하여 레미케이드의 VH 및 VL 유전자가 유래되어진 germline V, D, J segment origin을 결정하였고 Chothia에 의해 보고되어진 방법[6]을 활용하는 web site (<http://www.bioinf.org.uk>)를 이용하여 항원과 직접 결합하는 레미케이드 HCDR 1, 2, 3과 LCDR 1, 2, 3의 아미노산배열

(Fig. 2C)에 의해 결정되는 loop의 3차구조 class를 결정하였다 (Supplementary Table 2).

TNF-α 항원-레미케이드 항체의 결합특성 분석

Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>)에서 TNF-α 항원과 레미케이드 항체 결합복합체(binding complex)의 입체결정구조를(PDB ID: 4G3Y)를 검색하여 Discovery Studio 4.0 visualizer (Accelrys, U.S.A.) 프로그램을 이용하여 레미케이드의 항원결합부위를 조사하였다(Supplementary Fig. 1). 즉 TNF-α 항원과 직접 접촉하는 중 사슬 초 가변부위(heavy chain complementarity determining region: HCDR1, 2, 3)와 경 사슬 초 가변부위(light chain complementarity determining region: LCDR 1, 2, 3) 를 구성하는 아미노산 잔기들을

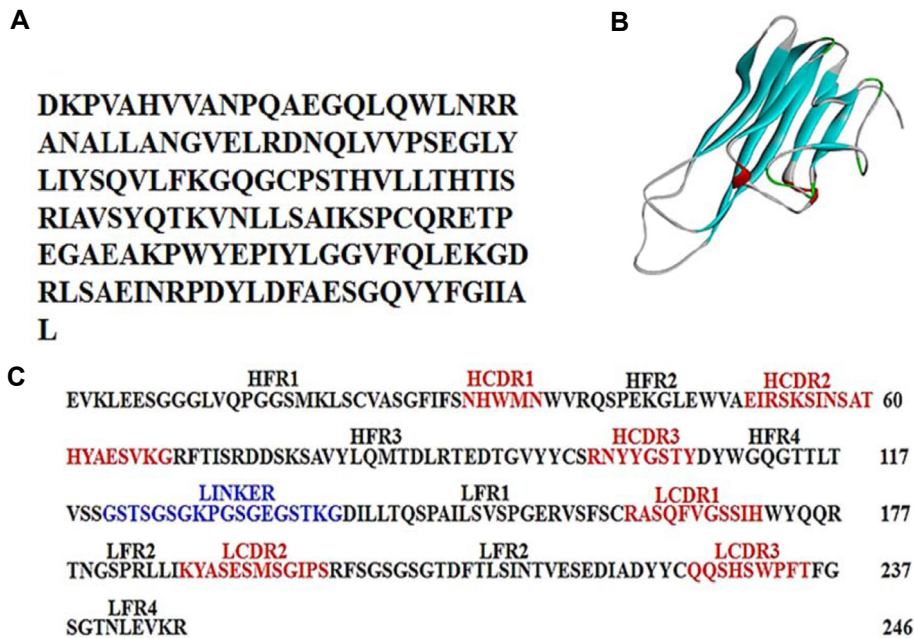


Fig. 2. Amino acid sequences of TNF-α and Remicade ScFv antibody. The amino acid sequences and tertiary structure of TNF-α were shown in panel A and panel B in which secondary structures are colored as different colors (coil: grey, sheet: blue and helix: red). Panel C showed amino acid sequences of Remicade ScFv in which single chain Fv contains heavy chain variable region (VH) and light chain variable region (VL) which are connected by polypeptide linker. Each variable region is classified into four framework region (FR) and three complementarity determining region (CDR). The antigen binding sites in ScFv are completely formed by three heavy chain CDRs (HCDR1, HCDR2 and HCDR3) and three light chain CDRs (LCDR1, LCDR2 and LCDR3).

Table 2. TNF-α Binding site Analysis of VH and VL sequences of Remicade ScFv

	VH			VL			Total
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	
Hydrogen bond	0	3	0	0	1	6	10
Salt bridge	0	0	3	0	0	0	3
Electrostatic interaction	0	0	0	0	1	2	3
Hydrophobic interaction	0	2	1	0	0	0	3
Total	0	5	4	0	2	8	19

결정하고 그 아미노산 잔기들이 관여하는 결합종류 및 개수 등을 분석하여 TNF- α 항원에 결합하는 레미케이드 HCDR 및 LCDR 중 어느 CDR이 항원-항체결합에 더 중요한지를 분석하였다(Table 2).

TNF- α 항원과 Remicade 및 RemicadeScZip 발현 및 정제

TNF- α 항원 및 레미케이드 ScFv 항체 단백질 발현을 위해 본 실험실에서는 세 종류의 유전자가 클로닝된 발현 벡터들을 대장균 BL21star (DE3) (Invitrogen, U.S.A.)에 형질전환 하였다. 형질 전환된 BL21star (DE3)를 사용하여 이전 논문에서 보고된 방법으로 발현을 시도하였다[8, 11, 12, 21, 22]. 즉 형질 전환된 대장균을 100 μ g/ml의 ampicillin과 0.2 mM IPTG (Sigma-Aldrich, U.S.A.)가 포함된2XTY 액체배지를 사용하여 25 $^{\circ}$ C에서 5시간 동안 진탕 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현된 단백질을 포함하는 세포침전물(cell pellet)을 삼투현상(osmosis)을 유도하는 TES완충용액(200 mM Tris pH 7.4 + 500 mM Sucrose + 0.1 mM EDTA pH 8.0)으로 처리한 다음 다시 cell pellet을 초음파 완충용액(50 mM Tris pH 7.5 + 250 mM NaCl)에 녹인 다음 초음파 파쇄하여 발현세포들을 완전 용해(lysis)시켰다. TNF- α 항원과 레미케이드 항체의 생물정보학 분석결과 모두 소수성이 매우 높은 단백질로 추정되어 용해된 세포에 8 M Urea를 추가로 처리하여 수용화(solubilization)를 시도하였다. 수용화된 단백질 샘플을 Ni⁺-NTA- agarose column (Incospin, Korea)에 결합시켜 세척한 후 250 mM imidazole을 처리하여 칼럼에 결합된 단백질을 용출시켜 정제하였다. 정제된 단백질들은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동하고 Coomassie 용액으로 염색하여 발현유무를 확인하였다. 또한 Bradford protein assay (Thermo Fischer Scientific, U.S.A.)를 이용해 정제된 단백질들의 농도를 결정하였다. 한편 발현된 단백질들의 수용성(solubility)을 조사하기 위해 TNF- α , Remicade 및 RemicadeScZip의 유전자배열을 vectorNTI 프로그램(Invitrogen, U.S.A.)에 입력시켜 아미노산 배열을 추론하여 각 단백질들의 분자량 및 등전점(isoelectric point: pI)을 결정하였다(Table 1).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

TNF- α 항원을 PBS에 녹여 냉장온도(4 $^{\circ}$ C)에서 maxi-sorp ELISA plate (Nunc, Denmark)에 밤새 고정(immobilized)시키고 고정된 plate는 PBS-T (PBS + 0.1% tween)를 세척용 완충용액으로 사용하고, PBS-TS (PBS + 0.1% tween + 2% skim milk)를 blocking용 완충용액으로 사용하였다. Blocking 완충용액에 두 레미케이드 ScFv 항체(Remicade 및 RemicadeScZip)를 1차항체로 처리하여 항원-항체반응을 시도하였고, PBS-TS로 세척한 후 horseradish peroxidase (HRPO)가 연결된 an-

ti-FLAG 항체(Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 2차항체로 처리하였으며 최종적으로 PBS-TS로 세척을 반복하여 비특이적 결합을 제거하였다. ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 발색기질로 사용하였으며ELISA plate reader (Biochrome, U.K.)로 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하여 항원결합력을 측정하였다.

Western blot

TNF- α 항원을 전기영동 방법으로 SDS-PAGE하고 nitro-cellulose membrane (Millipore, U.S.A.)에 흡착시켰다. 흡착된 membrane은 PBS-TS로 2시간 동안 상온에서 blocking한 다음 PBS-T로 세척하였다. 세척된 membrane은 Remicade 및 RemicadeScZip가 첨가된 PBS-TS를 1차 항체로 사용하여 항원-항체반응을 시키고 PBS-T로 세척하여 결합되지 않은 1차 항체를 제거시킨 다음 2차 항체로 horseradish peroxidase (HRPO)가 연결된 anti-FLAG 항체(Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 첨가하여 반응시킨 후 PBS-T로 세척하였다. 발색기질로 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 사용하여 Remicade 및 RemicadeScZip의 TNF- α 항원에 대한 결합력을 결정하였다.

Remicade 및 RemicadeScZip의 결합 kinetics 결정

두 종류 레미케이드 ScFv 항체(Remicade 및 RemicadeScZip)의 TNF- α 에 대한 결합 kinetic curve를 결정하기 위해 bio-layer interferometry (BLI) 기술을 이용한 BLItz (ForteBio, U.S.A.) 장치를 사용하였다. 즉 정제된 TNF- α 를 10 μ g/ml로 PBS에 녹여 Anti-Penta-HIS (HIS1K) biosensor (ForteBio, U.S.A.)에 부착시키고 PBS로 세척하고 비특이적 결합을 최소화하기 위해 biosensor 표면을 균일화시켜 baseline을 안정화시켰다. Imidazole 완충용액을 제거하기 위해 Remicade 및 RemicadeScZip을 PBS로 투석하고 0.1 mg/ml의 농도로 맞춘 다음 HIS1K biosensor에 부착된 TNF- α 에 결합을 시도하였다. 이때 항원-항체결합을 촉진하기 위해 1,000 rpm으로 진탕 반응을 시도하였다. 발생된 항원-항체결합은 분광학적으로 실시간 탐지(real time)되어 일정한 형태의 kinetic curve를 나타내게 되고 이를 근거로 BLItz Pro 1.2 software (ForteBio, U.S.A.)를 사용하여 결합속도상수(k_{on})와 해리속도상수(k_{off})를 측정하고 최종적으로 항원-항체반응의 결합력을 나타내는 해리평형상수(K_d)를 측정하였다.

결 과

TNF- α 항원 및 레미케이드 ScFv의 발현 벡터 구축

특이적인 프라이머(Supplementary Table 1)를 이용하여 항원으로 사용될 TNF- α 와 Remicade 및 RemicadeScZip ScFv

항체 유전자를 증합효소연쇄반응을 시도한 결과 각각 471 bp, 789 bp, 927 bp 로 증폭되었으며(Table 1, Fig. 1) 증폭된 PCR산물(Fig. 1)을 *Sfi* I-*Not* I 제한효소로 절단하여 TNF- α 는 pET-22b 발현 벡터로 클로닝 하였고(Fig. 3A) Remicade 및 RemicadeScZip은 pUC119 발현 벡터로 클로닝 하였다(Fig. 3B). 특히 RemicadeScZip와 같은 융합항체 발현 벡터는 ScZip 유전자를 pUC 119 발현 벡터의 3' 말단에 첨가시켜 Remicade ScFv 항체 유전자를 *Sfi*I-*Not*I에 의해 클로닝되면 자동적으로 ScZip이 융합된 RemicadeScZip 항체발현벡터가 구축되도록 고안되었다(Fig. 3B). TNF- α 발현에 사용된 pET-22b 발현 벡터는 T7 promoter를 사용하여 TNF- α 의 발현율을 높이도록 하였으며 Remicade 및 RemicadeScZip 발현에 사용된 pUC119 발현벡터는 *lacZ* promoter를 사용하여 전사(transcription)를 유도하였다. 두 발현벡터는 공통적으로 IPTG를 사용하여 발현을 촉진하였으며 아미노말단에 *pelB* leader를 삽입하여 발현된 단백질이 대장균의 막 주변 공간(periplasmic space)으로 이동 하게하여 수용성 단백질 형태의 분비를 촉진하게 하였다(Fig. 3). 또한 단백질의 카르복시말단에는 공통적으로 헥사히스티딘(HHHHHH) 을 삽입하여 Ni⁺-NTA-agarose affinity chromatography를 이용하여 정제할 수 있도록 제작하였다(Fig. 3) 단백질 발현에 사용된 대장균 BL21sta (DE3)는 첫째, 자체적으로 갖고 있는 *lacZ* promoter외에 유전자조작을 통해 bacteriophage T7 RNA polymerase 유전자를 대장균의 염색체에 삽입시켜 IPTG에 의해 1차적으로 T7 RNA polymerase가 발현되고 연쇄적으로 pET-22b에 삽입된 T7 promoter를 활성화시켜 전사를 촉진하며 둘째, RNA분해효소 즉 RNaseE 유전자 결핍으로 외부단백질 발현 시 분해를 억제하여 전사된

mRNA 의 안정성을 높일 수 있으며 셋째, 단백질분해효소인 lon 및 외막(OmpT) proteases의 유전자를 mutation시켜 외부 단백질의 분해를 억제하여 발현을 극대화시킬 수 있으므로 본 연구에서 발현용 대장균으로 사용하였다.

레미케이드 VH 및 VL 유전자 분석

레미케이드 항체 VH와 VL의 origin germline gene segment를 IMGT database 를 이용하여 추정된 결과 VH 유전자는 생쥐 germline VH 유전자중에서 V segment는 IGHV6-6*02, D segment는 IGHD1-1*01, J segment는 IGHJ2*01 등과 가장 염기배열의 상동성(sequence homology)이 높았다. 한편 VL 유전자는 생쥐 germline VL 유전자중에서 V segment는 IGV5-48*01, J segment는 IGKJ4*01 등과 가장 sequence homology가 높았다(Supplementary Table 2). 본 결과는 레미케이드 항체는 항원과 결합하는 가변부위가 생쥐에서 유래되었음을 확인해주었다. CDR loop 3차구조 역시 Chothia group에서 보고한 방법에 의해 canonical loop class를 분류해보면[6, 15]. 레미케이드 VH의 CDR 1과 2 는 각각 class 1, class 4으로 분류되었고 VL의 CDR1, 2, 3는 class 2, 1, 1으로 각각 결정되었다(Supplementary Table 2). 그러나 VH의 HCDR3는 V, D, J segment들의 recombination에 의해 VH를 구성하는 부위로 유전자변이가 활발하게 일어나는 지역이므로 CDR중에서도 가장 가변성이 높아(high variability) canonical loop class를 특정할 수 없었다(Supplementary Table 2).

TNF- α 항원-레미케이드 항체의 결합특성 분석

Protein data bank (PDB)로부터 검색된TNF- α 항원과 레미

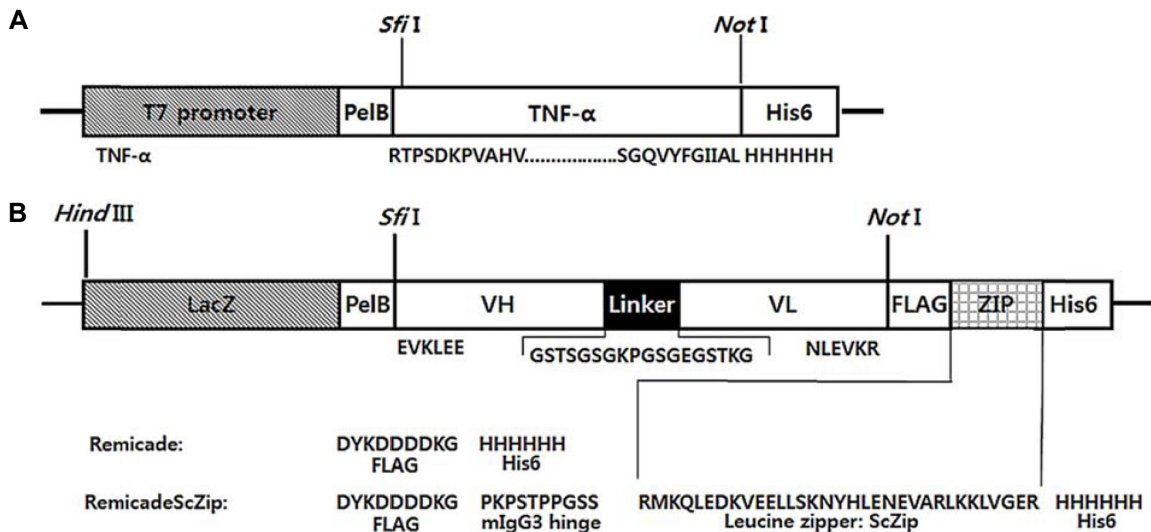


Fig. 3. Plasmid construction of Remicade and RemicadeScZip. TNF- α gene was constructed into pET-22b expression vector containing a T7 promoter, 5'-*PelB* leader and 3' hexahistidine (His6) tag by insertion of each genes using PCR and restriction enzyme digestion (panel A). Remicade and RemicadeScZip genes were constructed in pUC 119 expression vector containing a *lacZ* promoter, 5'-*PelB* leader sequence, 3' hexahistidine (His6) tag. In addition, it includes FLAG tag and leucine zipper domain (ScZip) (panel B).

케이드 항체 complex 의 3차 구조(PDB ID: 3WD5)를 형상화하여 TNF- α 항원에 직접 결합하는 레미케이드 HCDR과 LCDR의 아미노산 잔기들을 결정하고 그 아미노산들이 관여하는 결합종류 및 결합개수 등 결합메커니즘을 분석하였다 (Supplementary Fig. 1, Table 2). 레미케이드의 3개의 HCDR loop중에서 HCDR1은 항원결합에 관여하지 않았으며 HCDR2와 HCDR3가 결합에 관여하였으며 관여하는 결합의 종류로는 수소 결합, 염 다리(salt bridge) 및 소수성 결합이 확인되었다. 한편 레미케이드 VL의 경우 LCDR1 역시 TNF- α 항원에 결합하지 않았고 LCDR2 및 LCDR3가 TNF- α 항원에 결합하였으며 VL의 항원 결합의 종류는 수소 결합과 정전기적 결합이었으며 특히 LCDR3가 LCDR2보다 항원과 더 많이 결합함을 확인할 수 있었다(Table 2).

TNF- α 항원과 Remicade 및 RemicadeScZip 발현 및 정제

정제된 단백질들을 SDS-PAGE를 한 결과 모두 수용성 단백질로 발현 및 정제됨을 확인하였다. 한편 분자량을 계산하여 결정된 결과 TNF- α 는 18.38 kDa, Remicade는 28.80 kDa, RemicadeScZip는 ScZip이 융합되어있으므로 33.96 kDa으로 분석되었다(Fig. 4). 그런데Table 1에 의하면 TNF- α , Remicade 및 RemicadeScZip의 pI는 모두 7에 가까운 7.29, 6.21 및 6.64로 측정되어 소수성이 강하여 solubility를 높이기 위해 초음파 파쇄 이후 Urea를 추가로 처리하여야만 정제 가능하였다.

Remicade 및 RemicadeScZip의 항원결합력 측정

Remicade와 RemicadeScZip의 항원결합력을 측정하기 위해 ELISA를 수행한 결과 Remicade는 TNF- α 항원에 매우 낮은 결합력을 나타내었으나 RemicadeScZip은 TNF- α 항원에 결합력을 나타내었다(Fig. 5A). 한편 Western blot에서는 1차

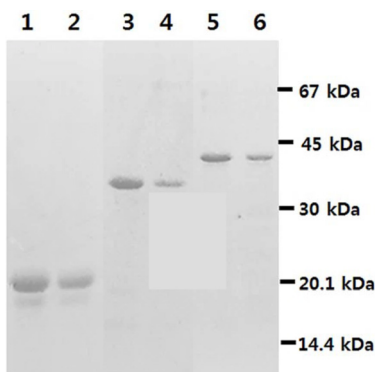


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of TNF- α , Remicade and Remicade ScZip expressed in *E. coli*. The TNF- α (lanes 1~2), Remicade (lanes 3~4) and RemicadeScZip (lane 5~6) expressed in *E. coli* were purified in Ni²⁺-NTA-agarose column. The purified proteins were analyzed in 15% polyacrylamide gel under heated reducing condition.

항체로 사용된 RemicadeScZip은 TNF- α 항원에 결합하였으나 Remicade를 1차항체로 사용한 경우 2차 항체인 anti-FLAG antibody에 부착된 horseradish peroxidase가 발색을 나타내지 않았다. 즉 Remicade는 TNF- α 항원에 대한 결합력이 거의 없었으나 ScZip이 융합된 RemicadeScZip은 결합력을 나타내어 ELISA 데이터와 일치하는 결과를 나타내었다(Fig. 5B).

Remicade 및 RemicadeScZip의 binding kinetics 결정

Remicade 및 RemicadeScZip의 TNF- α 항원에 대한 binding kinetics 분석을 위해 BLI를 수행하여 얻은 kinetic curves를 분석한 결과 RemicadeScZip은 HIS1K biosensor에 고정된 TNF- α 항원에 결합력을 나타내었으나 Remicade는 대조군인 PBS와 거의 유사하게 biosensor에 결합하지 않았다(Fig. 6). 측정된 kinetic curves에 의해 Remicade 및 RemicadeScZip의 결합속도상수(k_{on})를 결정한 결과 각각 4.33×10^6 과 5.12×10^7 로 측정되었으며 해리속도상수(k_{off})값에서는 각각 6.62×10^{-1} 과 1.15×10^{-2} 으로 측정되었다. 이 결과에 의해 종합적인 결합력을 의미하는 해리평형상수(Kd)값은 각각 1.53×10^{-2} 과 2.26×10^{-5} 로 측정되어 RemicadeScZip이 Remicade보다 TNF- α 항원에 대한 결합력이 677배 높게 결합력을 유지하고 있음을 확인하였다(Table 3).

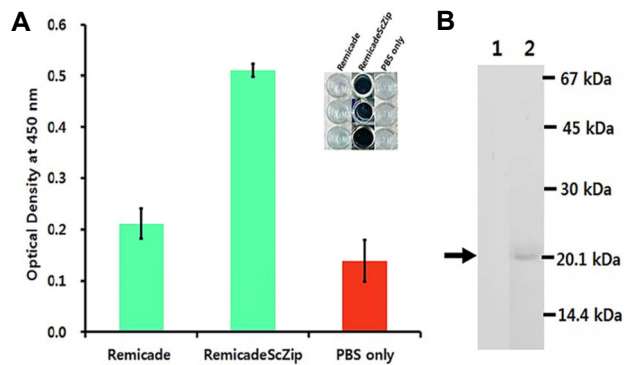


Fig. 5. ELISA analysis and Westernblot to determine TNF- α antigen binding activity of Remicade and RemicadeScZip. The TNF- α antigen expressed in *E. coli* was coated onto either 96-well plate for ELISA or transferred onto nitrocellulose membrane for western blot. In ELISA (panel A), each ScFv and PBS were added as a primary antibody. Color development with ABTS substrate was added out using anti-FLAG antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRPO) as a secondary antibody. PBS was used as a negative control. In westernblot (panel B), Remicade (lane 1) and RemicadeScZip (lane 2) were added as a primary antibody into nitrocellulose membrane blotted with TNF- α antigen. Color development with DAB substrate was carried out using anti-FLAG antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRPO) as a secondary antibody.

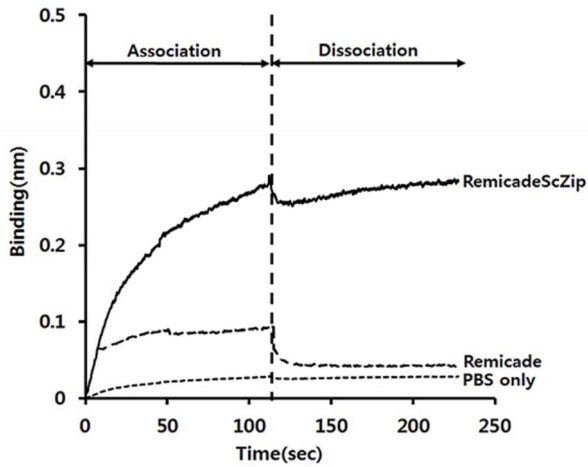


Fig. 6. Binding constant (Kd) determination of Remicade and RemicadeScZip bound to TNF-alpha antigen by BLI (BLI). TNF-alpha antigen (10 µg/ml) was captured by His1K biosensor until saturation and followed by association of Remicade and RemicadeScZip ScFv and dissociation. After collection of interaction curve, The k_{on} and k_{off} values were obtained by fitting to achieve the fitting parameter $R^2 > 0.97$ and The final K_d value was determined.

Table 3. Kinetic binding parameters for the interactions of Remicade and RemicadeScZip with TNF-α determined by Blitz analysis

ScFv variants	k_{on} ($M^{-1}S^{-1}$)	k_{off} (S^{-1})	K_d (M)
Remicade	4.33×10^2	6.62×10^{-1}	1.53×10^{-2}
RemicadeScZip	5.12×10^2	1.15×10^{-2}	2.26×10^{-5}

고찰

본 연구에서 ELISA, western blot 및 BLI를 수행하여 발현된 Remicade 및 RemicadeScZip의 TNF-α 항원에 대한 결합력을 조사한 결과 공통적으로 Remicade는 결합력을 거의 나타내지 않았으나 RemicadeScZip은 결합력을 나타내었다. 이 결과는 Remicade의 경우 소수성이 강하여 정제단계에서 8 M Urea는 변성(denaturation)을 초래하여 접힘(folding)이 최적으로 일어나지 못하므로 항원결합력을 유지하지 못하는 것으로 추정되었다. 그러나 RemicadeScZip은 융합된 leucine zipper (ScZip) 도메인이 변성환경에서 Remicade의 folding을 안정화시켜 상실된 항원결합력을 개선시키는 것으로 추정된다. 특히 RemicadeScZip 개선효과는 BLI 실험에서 구체적으로 확인하였는데 즉 RemicadeScZip은 Remicade에 비해 결합속도 상수(k_{on})값은 11.82배, 해리속도상수(k_{off})값은 57배 증가하였고 이 두 값을 모두 반영한 해리평형상수(K_d)값은 677배 증가함을 나타내었다. 이러한 개선효과는 ScZip 도메인이 분자량이 작고 양극성 나선(amphipathic helices)형태이므로 양극성

을 갖는 세포막을 잘 통과하여 융합된 ScFv가 쉽게 분비될 수 있도록 촉진시키는 것으로 보고되고 있으나[20] RemicadeScZip의 등전점은 6.64(Table 1)로 pH 7.0에서 음전하를 나타내어 ScZip의 양극성에도 불구하고 세포막통과가 어려워 Urea 처리를 하여야만 정제 가능하였다.

ScZip 도메인은 효모의 전사인자인 GCN4로부터 유래되었으며 구조적으로 7개의 소수성 잔기와 친수성 잔기가 반복하여 coiled-coil helices를 형성하여 전하를 갖는 친수성 아미노산 잔기들간에는 정전기적 결합을 형성하고 소수성 잔기들간에는 소수성 결합을 이루어 안정된 dimer를 형성한다[31]. 그러므로 여러 ScFv에 ScZip 을 융합시켜 ScFv 항체의 dimer형성을 유도하여 항원결합력을 증가시키는 방법으로 보고되어 왔다[7, 13, 18, 31]. 특히 이 방법은 원래 낮은 항원결합친화력 (low antigen binding affinity)을 갖는 ScFv의 항원결합력을 CDR의 아미노산을 변화시키지 않고 단 시간 내에 증가시킬 수 있는 장점을 갖는다. 그러나 RemicadeScZip은 변성환경에서 정제되므로 보고되어진 것과 같은 dimer형성을 관찰할 수 없었다. 그러므로 RemicadeScZip의 dimerization을 위해 산화 또는 환원된 glutathione, L-arginine 및 EDTA 등을 포함하는 최적의 refolding buffer를 결정하여 dimerization을 유도할 수 있다면 항원결합력을 더 증가시킬 수 있을 것이다. 한편 RemicadeScZip이 dimer를 형성하지 않았음에도 항원결합력을 나타낸 것은 융합된 ScZip의 양극성에 의해 Remicade의 folding을 부분적으로 안정화시켜 항원결합력을 개선시킨 것으로 추정된다.

결론적으로 바이오시밀러 레미케이드 자연항체를 ScZip이 융합된 ScFv 항체단편으로 대장균에서 발현 하였으므로 유전자 조작이 용이하다. 따라서 기존의 항체치료제 또는 개발되고 있는 항체치료제들에 이러한 항체공학기술을 적용하면 항원결합력을 쉽게 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 2개 이상의 다른 항원을 동시에 결합하는 이가 특이성 항체(bispecific antibody)를 개발 하거나, 효소와 같은 고유한 기능을 갖는 단백질 또는 도메인이 융합된 다기능성 항체(multifunctional antibody)등 다양한 목적의 항체를 개발할 수 있으므로 현재의 바이오시밀러 항체보다 기능이 향상된 바이오베터 항체 (biobetter antibody) 개발이 가능할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2019~2020년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. and Whitlow, M. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.
- Bondeson, J. and Maini, R. 2001. Tumour necrosis factor as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases: the clinical experience with infliximab (REMICADE). *Int. J. Clin. Pract.* **55**, 211-216.
- Bong, K. T. and Lee, H. 2020. Analysis and estimation for market share of biologics based on google trends big data. *J. Soc. Korea Ind. Syst. Eng.* **43**, 14-24.
- Carmona, L., Gómez Reino, J. J., Rodríguez-Valverde, V., Montero, D., Pascual-Gómez, E., Mola, E. M., Carreño, L., Figueroa, M. and Group, B. 2005. Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum.* **52**, 1766-1772.
- Chang, H. C., Bao, Z. Z., Yao, Y., Tse, A., Goyarts, E. C., Madsen, M., Kawasaki, E., Brauer, P. P., Sacchetti, J. C. and Nathenson, S. G. 1994. A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11408-11412.
- Chothia, C. and Lesk, A. M. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **196**, 901-917.
- De Kruif, J. and Logtenberg, T. 1996. Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. *J. Biol. Chem.* **271**, 7630-7634.
- Han, S. H. and Kim, J. K. 2016. The development of anti-DR4 single-chain Fv (ScFv) antibody fused to *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Kor. J. Microbiol.* **52**, 10-17.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E. and Crea, R. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5879-5883.
- Kalandadze, A., Galleno, M., Foncerrada, L., Strominger, J. L. and Wucherpfennig, K. W. 1996. Expression of recombinant HLA-DR2 molecules replacement of the hydrophobic transmembrane region by a leucine zipper dimerization motif allows the assembly and secretion of soluble DR $\alpha\beta$ heterodimers. *J. Biol. Chem.* **271**, 20156-20162.
- Kim, C. H., Han, S. H., Kim, H. M., Han, J. Y., Lim, M. W. and Kim, J. K. 2015. The development of murine recombinant single-chain variable domain fragment (ScFv) specific to acute non-lymphocytic leukemia (ANLL) cell line HL60. *Kor. J. Microbiol.* **51**, 115-125.
- Kim, S.W., Wu, S. and Kim, J. K. 2018. The development of anti-DR4 single-chain Fv (ScFv) antibody fused to Streptavidin. *Kor. J. Microbiol.* **54**, 330-342.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.
- Li, K., Zettlitz, K. A., Lipianskaya, J., Zhou, Y., Marks, J. D., Mallick, P., Reiter, R. E. and Wu, A. M. 2015. A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting. *Protein Eng. Des. Sel.* **28**, 307-315.
- Martin, A. C. and Thornton, J. M. 1996. Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *J. Mol. Biol.* **263**, 800-815.
- Min, W., Kim, J. K., Lillehoj, H. S., Sohn, E. J., Han, J. Y., Song, K. D. and Lillehoj, E. P. 2001. Characterization of recombinant scFv antibody reactive with an apical antigen of *Eimeria acervulina*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 949-955.
- O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. and Alber, T. 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-544.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R. and Kim, P. S. 1989. Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**, 538-542.
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knüpfel, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D. and Plückerthun, A. 1993. Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology* **11**, 1271-1277.
- Pack, P. and Plueckthun, A. 1992. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**, 1579-1584.
- Park, D. W., Kim, E. D., Kim, S. H., Han, J. Y. and Kim, J. K. 2011. The development of imerized Chicken Recombinant Single-chain Fv (ScFv) antibody using Leucine Zipper Motif. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 328-334.
- Park, K. J., Park, D. W., Kim, C. H., Han, B. K., Park, T. S., Han, J. Y., Lillehoj, H. S. and Kim, J. K. 2005. Development and characterization of a recombinant chicken single-chain Fv antibody detecting *Eimeria acervulina* sporozoite antigen. *Biotechnol. Lett.* **27**, 289-295.
- Rau, R. 2002. Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, ii70-ii73.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Jung, S. H., Pastan, I. and Lee, B. 1995. Disulfide stabilization of antibody Fv: computer predictions and experimental evaluation. *Protein Eng.* **8**, 1323-1331.
- Risley, S., Thomas, M. A. and Bray, V. 2004. Rheumatoid arthritis, new standards of care: nursing implications of infliximab. *J. Orthop. Nurs.* **8**, 41-49.
- Scott, C. A., Garcia, K. C., Carbone, F. R., Wilson, I. A. and Teyton, L. 1996. Role of chain pairing for the production of functional soluble IA major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **183**, 2087-2095.
- Shiraishi, T., Suzuyama, K., Okamoto, H., Mineta, T., Tabuchi, K., Nakayama, K., Shimizu, Y., Tohma, J., Ogihara, T., Naba, H., Mochizuki, H. and Nagata, S. 2004. Increased cytotoxicity of soluble Fas ligand by fusing isoleucine zipper

- motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 197-202.
28. Skerra, A. and Pluckthun, A. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
29. Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. and Tak, P. P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **117**, 244-279.
30. Verma, R., Boleti, E. and George, A. 1998. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods* **216**, 165-181.
31. Vinson, C., Acharya, A. and Taparowsky, E. J. 2006. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. Gene Struct. Exp.* **1759**, 4-12.
32. Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J. and Ansorge, W. 1988. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett.* **233**, 432-436.

초록 : Leucine zipper도메인의 융합에 의한 바이오시밀러 레미케이드 Single-chain Fv 항체의 항원 결합력 개선

김진규* · 김태환

(창원대학교 자연과학대학 생명보건학부)

생쥐의 가변부위가 인간의 정상부위에 연결되어 제조된 바이오시밀러 자연항체치료제인 레미케이드는 암괴사 인자-알파(TNF- α)에 특이적인 항체로써 카이메릭 단일클론항체이며 류마티스 관절염치료를 위해 개발되었다. 바이오시밀러 레미케이드 항체의 생물학적 기능을 연구하기 위해 우리는 단백질 데이터 은행을 이용한 생물정보학 분석을 수행하여 레미케이드 자연항체와 암괴사인자-알파 항원간의 결합기작특징을 분석하였다. 자연항체를 생산하는 세포의 유전적 불안정성 때문에 레미케이드 항체생산이 제한되므로 우리는 중 사슬 가변부위를 다중펩타이드 링커에 의해 경 사슬 가변부위에 연결된 레미케이드 ScFv항체(Remicade)를 제조하였다. 더욱이 더 높은 생산과 더 높은 항원결합력을 위해 레미케이드 ScFv를 leucine zipper에 융합시켰다. Remicade와 RemicadeScZip ScFv는 대장균에서 발현되었고 Ni²⁺-NTA-아가로스 컬럼으로 정제하였다. 정제된 단백질들은 예상한대로 sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide electrophoresis에서 28.80 kDa과 33.96 kDa을 나타내었다. Remicade는 ELISA, western blot에서 TNF- α 항원에 대한 결합력이 관찰되지 않았으나 RemicadeScZip은 항원결합력을 나타내었다. 추가적인 BLI분석으로 RemicadeScZip의 TNF- α 항원에 대한 결합력을 재확인시켜주었으며 이 결과는 Leucine zipper가 레미케이드 ScFv의 접합을 안정화시키고 TNF- α 항원에 대한 결합력을 개선시켰음을 제시해주고 있다.