

# Disialoganglioside GD2의 Anti-idiotypic Antibody (Ab2)에 의해 유도된 Anti-anti-idiotypic Antibodies (Ab3)의 특성

관동대학교 의과대학 미생물학교실

박윤선

## Characterization of Anti-anti-idiotypic Antibodies (Ab3) Induced by Immunization of Anti-idiotypic Antibodies (Ab2) Mimicking Disialoganglioside GD2

Yoon-Sun Park

Department of Microbiology, Kwandong University College of Medicine, Gangneung, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Disialoganglioside GD2 is a tumor-associated antigen that is over-expressed on tumor cells of neuroectodermal origin, such as melanoma and neuroblastoma. Anti-idiotypic antibodies that mimic GD2 may induce more effective immune responses than GD2 antigen itself, because they are protein antigens and are known to be able to break immune tolerance. In this study, to explore the potential of anti-idiotypic antibodies as tumor vaccines, the ability of anti-idiotypic antibodies (Ab2) to induce anti-anti-idiotypic antibodies (Ab3) that bind to the original antigen GD2 was investigated. **Methods:** Six monoclonal anti-idiotypic antibodies (1A8, 1G5, 2B6, 3A4, 3D6, 3H9) to monoclonal antibody M2058, which is a monoclonal antibody to GD2, were produced in mice. Three (1A8, 3A4, 3H9) of them were selected based on their ability to inhibit the binding of Ab1 to D142.34 (murine melanoma cell expressing GD2). These 3 different Ab2 were injected into rabbits, and rabbit Ab3 induced by each of them were characterized. **Results:** Ab3-containing sera from two rabbits immunized with 1A8, 3A4, or 3H9 bound significantly ( $P < 0.05$ ) to D142.34 but not to B78.96 (GD2-negative cell), and bound significantly ( $P < 0.05$ ) to isolated GD2 but not to GD1a. Ab3-containing sera from two rabbits immunized with 3A4 or 3H9 inhibited significantly ( $P < 0.05$ ) the binding of Ab1 M2058 to D142.34, and inhibited significantly ( $P < 0.05$ ) the binding of Ab1 M2058 to the Ab2. **Conclusion:** These results suggest that anti-idiotypic antibodies 3A4 and 3H9 have a potential to be used as vaccines against tumors expressing GD2 by inducing GD2-specific antibodies (Ab3). (*Immune Network* 2003;3(2):118-125)

**Key Words:** Anti-idiotypic antibody, anti-anti-idiotypic antibody, GD2

### 서 론

종양에 대한 면역요법은 크게 수동면역요법과 능동면역요법으로 나눌 수 있으며, 면역의 효과와 지속성면에서 능동면역이 수동면역에 비해 더 우수한 것으로 알려

져 있다. 그러나 종양세포 또는 종양항원을 백신으로 사용하는 능동면역의 문제점은, 대부분의 종양항원이 면역반응을 유발하기 위해 충분한 면역원성을 가지고 있지 않다는 점이다(1). 종양세포가 발현하고 있는 종양연관항원(Tumor-associated antigens)은 종양세포뿐만 아니라 종양세포와 동일한 기원의 정상조직에서도 발현되므로, 종양연관항원과 반응하는 림프구는 소실되거나 기능을 잃어버리는 면역관용이 발생한다(2,3). 또한 정상조직에서는 발현되지 않고 종양세포에서만 발현되는 종양특이항원(Tumor-specific antigens)의 경우에도 원종양유

책임저자 : 박윤선, 관동대학교 의과대학 미생물학교실  
☎ 210-701, 강원도 강릉시 내곡동 522번지  
Tel: 82-33-649-7462, Fax: 82-33-641-1074  
E-mail: pyskth@kwandong.ac.kr

본 연구는 2001학년도 관동대학교 교원해외연수 연구비에 의하여 이루어졌음.

전자(protooncogene)의 돌연변이에 의한 종양항원은 항원성이 매우 미약하여 면역반응을 거의 유발하지 못하는 것으로 알려져 있다. 따라서 종양에 대한 면역요법에서 가장 중요한 과제는 종양항원에 대한 면역관용을 극복할 수 있는 종양백신을 개발하는 것이다.

면역원성이 낮은 종양항원에 대한 면역반응을 유발하기 위해 시도되고 있는 방법으로는, 항원에 KLH (Key-hole limpet hemocyanin)와 같은 고분자의 운반체(carrier)를 결합시키는 방법(4,5), 항원과 함께 아췌반트(adjuvant)를 사용하는 방법(6,7), 항원과 유사한 항원성을 갖는 anti-idiotypic antibody (8,9)를 사용하는 방법 등이 있다. 이 중 anti-idiotypic antibody는 본래의 항원에 대한 항체(Ab1)의 idioype에 대한 항체(Ab2)로서 Jerne 등이 처음으로 그 개념을 도입되었다(10). Idiotypic network의 개념은, 항원에 대한 항체(Ab1)가 생성되면 그 항체의 idiotope들에 대한 항체(Ab2)들이 유발되고, 그중 Ab1의 항원결합부위에 결합하는 Ab2는 본래의 항원과 항원성이 유사한 internal image를 갖고 있으므로, 이러한 Ab2에 의해서 유발되는 Ab3는 Ab1과 유사한 paratope을 통해 본래의 항원에 작용함으로써 면역반응이 조절된다는 내용의 가설이다. 이 가설은, 종양항원의 internal image를 갖는 anti-idiotypic antibody가 종양항원과 유사한 항원성을 보이므로 종양항원을 대신하여 종양백신으로 사용될 수 있다는 것을 의미한다.

Anti-idiotypic antibody를 본래의 항원 대신 사용하는 가장 큰 이유는, 본래의 항원이 정상 조직에서도 발현되는 종양연관항원(TAA)일 경우 면역관용으로 인해 면역반응이 유발되지 않으나, anti-idiotypic antibody는 면역관용을 깨뜨리고 면역반응을 유발할 수 있기 때문이다(11,12). 종양항원 자체와 비교한 anti-idiotypic antibody의 또 다른 장점은 단일클론항체이므로 이것의 대량 생산이 용이하다는 점이며, 특히 disialoganglioside GD2와 같이 종양항원의 성분이 당질(carbohydrate)인 경우에는 단백질 성분의 anti-idiotypic antibody가 당질항원을 대신함으로써 더욱 효과적인 면역반응을 유발할 수 있는 가능성이 있다는 점이다.

본 연구에서는, 당질의 종양연관항원인 disialoganglioside GD2에 대한 anti-idiotypic antibody가 GD2 발현 종양에 대한 백신으로 사용되기 위한 가장 기본적인 전체 조건으로서, anti-idiotypic antibody (Ab2)의 면역에 의해 생성된 anti-anti-idiotypic antibody (Ab3)가 본래의 항원인 GD2에 작용할 수 있는지를 알아보고자 하였다. 이를 위해 GD2의 internal image를 갖는 anti-idiotypic antibody (Ab2)들을 생산한 다음, 각각의 anti-idiotypic antibody들을 토끼에게 주사하여, 이들에 의해 유도된 항체(Ab3)의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**항원 및 항체.** 항원 GD2에 대한 anti-anti-idiotypic antibody (Ab3)가 GD2에 결합하는지를 확인하기 위한 시험에서 disialoganglioside GD2 (Sigma, St Louis, MO)와 음성대조항원인 disialoganglioside GD1a (Sigma, St Louis, MO)가 사용되었다. Anti-idiotypic antibody의 생산을 위해 면역에 사용된 M2058은 disialoganglioside GD2에 대한 단일클론항체로서 Wistar 연구소(Philadelphia, PA)로부터 공여받아 사용하였다.

**실험동물 및 세포주.** Anti-idiotypic antibodies의 생산을 위해서는 6주령의 Balb/c 마우스를 사용하였으며, anti-anti-idiotypic antibodies는 New Zealand White rabbit을 이용하여 생산하였다. 실험에 사용된 세포주는 transfection에 의해 disialoganglioside GD2를 발현시킨 D142.34 세포와 이것의 모세포인 B78.96 (Murine melanoma cell line)이며, 10% fetal calf serum이 첨가된 RPMI 배지에서 배양하였다.

**Ab2 생산을 위한 마우스면역.** GD2에 대한 단일클론항체인 M2058에 대한 항체 (Ab2)를 얻기 위해, KLH에 결합된 M2058 항체를 Balb/c 마우스에 접종하였다. 초기 접종 시에는 complete Freund's adjuvant (CFA)를 사용하여 마우스당 20 $\mu$ g을 피하접종하였으며, 두번째 접종부터는 incomplete Freund's adjuvant (IFA)와 섞어 2주 간격으로 모두 여섯번 피하접종하였다. 마우스 혈청 검사(아래 1차 선별시험)에서 Ab2 양성으로 판정된 마우스는 정맥을 통해 20 $\mu$ g을 추가접종한 다음, 3일 후에 비장을 분리하여 세포융합에 사용하였다.

**Anti-idiotypic antibodies (Ab2)의 생산.** M2058에 대한 항체 (Ab2)가 양성으로 확인된 마우스의 비장세포를 분리하여 Sp2/0 myeloma cell과 융합하였다. 세포융합에는 polyethylene glycol-1500 (Boehringer-Mannheim, Ingelheim, Germany)을 사용하였으며, Ab2를 생산하는 hybridoma는 radioimmunoassay (아래 1차 선별시험)에 의해 선별되었다. Ab1과 결합하는 Ab2중에서 Ab1의 항원결합부위에 결합하는 anti-idiotypic antibody는 항원항체결합억제시험(아래 2차 선별시험)을 통해 선별하였다.

**Ab1에 결합하는 Ab2의 선별시험(1차 선별시험).** M2058 (Ab1)로 면역시킨 마우스의 혈청과 hybridoma 배양상층액을 Ab1과 반응시킴으로써, Ab2의 생성 여부를 검색하였다. Microtiter plate의 well을 M2058 F (ab')<sub>2</sub>로 coating한 다음, 마우스의 혈청 또는 hybridoma 배양상층액을 넣어 반응시켰다. Ab1에 결합된 Ab2는 <sup>125</sup>I-labelled goat anti-mouse Fc에 의해 검출하였다.

**Ab1의 항원결합부위에 결합하는 Ab2의 선별시험 (2차 선별시험).** Ab2를 생산하는 hybridoma들 중에서 GD2 항원의 internal image로 작용할 수 있는 Ab2를 찾기 위

해, Ab2에 의한 Ab1과 항원의 결합억제시험을 시행하였다. Microtiter plate에 GD2 발현 세포인 D142.34를 well당  $10^5$ 개씩 넣어 12시간 배양하였다. 다른 plate에는  $^{125}$ I-labelled M2058과 hybridoma 배양상층액을 넣어 4°C에서 12시간 배양하였다. 이것을 위의 세포배양 plate에 옮기고, 세포에 결합된  $^{125}$ I-labelled M2058의 양을 측정하였다. D142.34와  $^{125}$ I-labelled M2058의 결합을 억제하는 Ab2를 생산하는 클론만을 선택하여 다음 실험에 사용하였다.

**Ab3 생산을 위한 토끼면역.** Ab2에 대한 항체인 Ab3를 얻기 위해 토끼의 피하로 300 $\mu$ g의 Ab2를 초기 접종하고, 2차 접종부터는 100 $\mu$ g을 2주 간격으로 모두 4회 피하접종하였다. 대조군 토끼에게는 normal mouse IgG를 주사하였다.

**Ab3의 항원결합시험.** Ab2의 면역으로 생성된 Ab3가 본래의 항원 (GD2)에 결합하는지 확인하기 위해, GD2 발현 세포와 GD2 분자를 항원으로 사용하여 각각에 대해서 radioimmunoassay를 시행하였다. GD2 발현 세포인 D142.34와 GD2 음성대조세포인 B78.96를 microtiter plate의 well당  $10^5$ 개씩 넣고 12시간 배양한 다음, 10배 계단 희석된 토끼의 혈청을 넣어 반응시키고, well당 30,000 cpm의  $^{125}$ I-labelled goat anti-rabbit IgG를 첨가하여 세포에 결합된 항체의 양을 측정하였다. Ganglioside 분자에 대한 Ab3의 결합시험에서는 GD2 또는 GD1a를 ethanol에 녹여 well당 5 $\mu$ g씩 coating한 다음, 위와 동일한 방법으로 GD2에 결합된 Ab3의 양을 측정하였다.

**Ab3에 의한 항원항체결합억제시험.** 토끼의 혈청 내에 있는 Ab3가 Ab1과 GD2항원과의 결합을 억제하는지 알아보기 위해, GD2 발현 세포인 D142.34를 5배 계단희석한 토끼의 혈청과 반응시킨 다음, 세 차례 세척하고 1.5  $\mu$ g/ml의 M2058 (Ab1)을 각각의 well에 첨가하여 배양하였다. 다시 세 차례 세척한 다음 well당 30,000 cpm의  $^{125}$ I-labelled goat anti-mouse IgG를 넣어 세포에 결합된 Ab1의 양을 측정하였다. Ab3에 의한 Ab1과 Ab2의 결합억제는 idiotope assay에 의해 시험하였다. Microtiter plate를 well당 0.1 $\mu$ g의 M2058로 coating하고, 다른 plate를 이용하여  $^{125}$ I-labelled Ab2와 5배 계단희석된 토끼의 혈청들을 각각 섞어 4°C에서 12시간 배양하였다. 위의 배양액을 Ab1이 coating된 plate에 옮기고 세 차례 세척한 다음, Ab1에 결합된 Ab2의 양을 측정하였다. 위의 두 시험에서 Ab3가 결합을 억제하는 정도는 buffer만 넣었을 때의 값을 기준으로 환산하여 계산하였다.

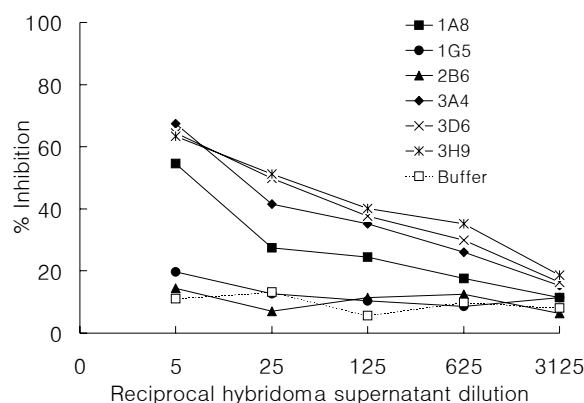
**통계 분석.** 실험군과 대조군의 통계학적 차이는 t-test에 의해서 분석하였으며, P value가 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

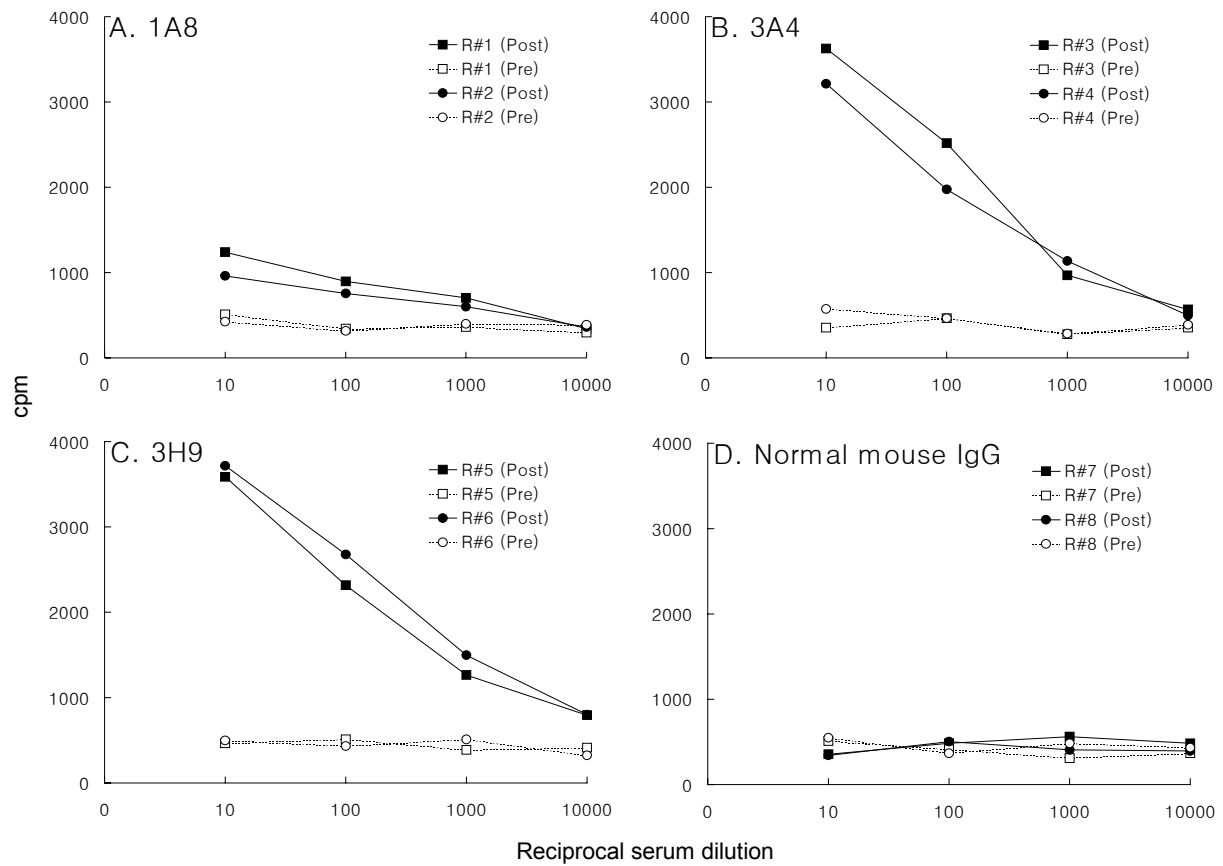
**Anti-idiotypic antibodies (Ab2)의 생산 및 특성.** Disialoganglioside GD2에 대한 단일클론 항체인 M2058 (Ab1)로 면역시킨 마우스의 비장세포를 이용한 세포융합 결과, M2058에 대한 항체(Ab2)를 생산하는 6개의 hybridoma (1A8, 1G5, 2B6, 3A4, 3D6, 3H9)를 얻었다. 이들을 대상으로 GD2 발현 세포(D142.34)와 Ab1 (M2058)과의 결합억제시험을 시행하여 Ab1의 항원결합부위에 결합하는 anti-idiotypic antibody를 선별하였다(Fig. 1). 시험에 사용된 항체 중 1 : 5로 희석된 hybridoma 배양액에서 항원과 Ab1의 결합을 50% 이상 억제한 것은 1A8, 3A4, 3D6 및 3H9이었으며, 이 중 3D6 클론은 subcloning 도중 항체 생산 기능을 소실하여 더 이상 사용되지 못하였다.

**Anti-anti-idiotypic antibodies (Ab3)의 생산 및 특성.** M2058 (Ab1)에 대한 항체(Ab2) 중 이것의 항원결합부위에 결합하는 항체만이 GD2 항원의 internal image로 작용하여, GD2 항원에 직접 작용할 수 있는 항체(Ab3)를 생산할 수 있으므로, 위의 anti-idiotypic antibodies중 Ab1의 항원결합부위에 결합하는 1A8, 3A4 및 3H9을 토끼에게 주사하여 토끼의 혈청 내에 생성된 Ab3의 특성을 조사하였다.

각각의 anti-idiotypic antibody 면역에 의해 생성된 Ab3가 본래의 항원인 GD2에 결합하는지 확인하기 위해, GD2 발현 세포인 D142.34에 Ab3가 결합하는 정도를 측정하였다(Fig. 2). 항체 1A8으로 면역시킨 토끼의 혈청이 가장 적은 양으로 D142.34 세포에 결합하였으나(Fig. 2A), 항체 1A8, 3A4, 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청 모



**Figure 1.** Inhibition of binding of M2058 (Ab1) to D142.34 (murine melanoma cell line expressing GD2) by anti-idiotypic antibodies. Inhibition of binding of Ab1 to D142.34 by hybridoma supernatant containing each anti-idiotypic antibody was determined by RIA. Percent specific inhibition was calculated relative to buffer controls.



**Figure 2.** Binding to D142.34 of Ab3 induced by immunization of Ab2 1A8 (A), 3A4 (B), 3H9 (C) or normal mouse IgG (D). Two rabbits were immunized with each antibody. Sera were obtained from the rabbits before immunization (Pre) and 14 days after the last immunization (Post). Sera were tested for binding to D142.34 in RIA. R# means the number of each rabbit immunized with each antibody.

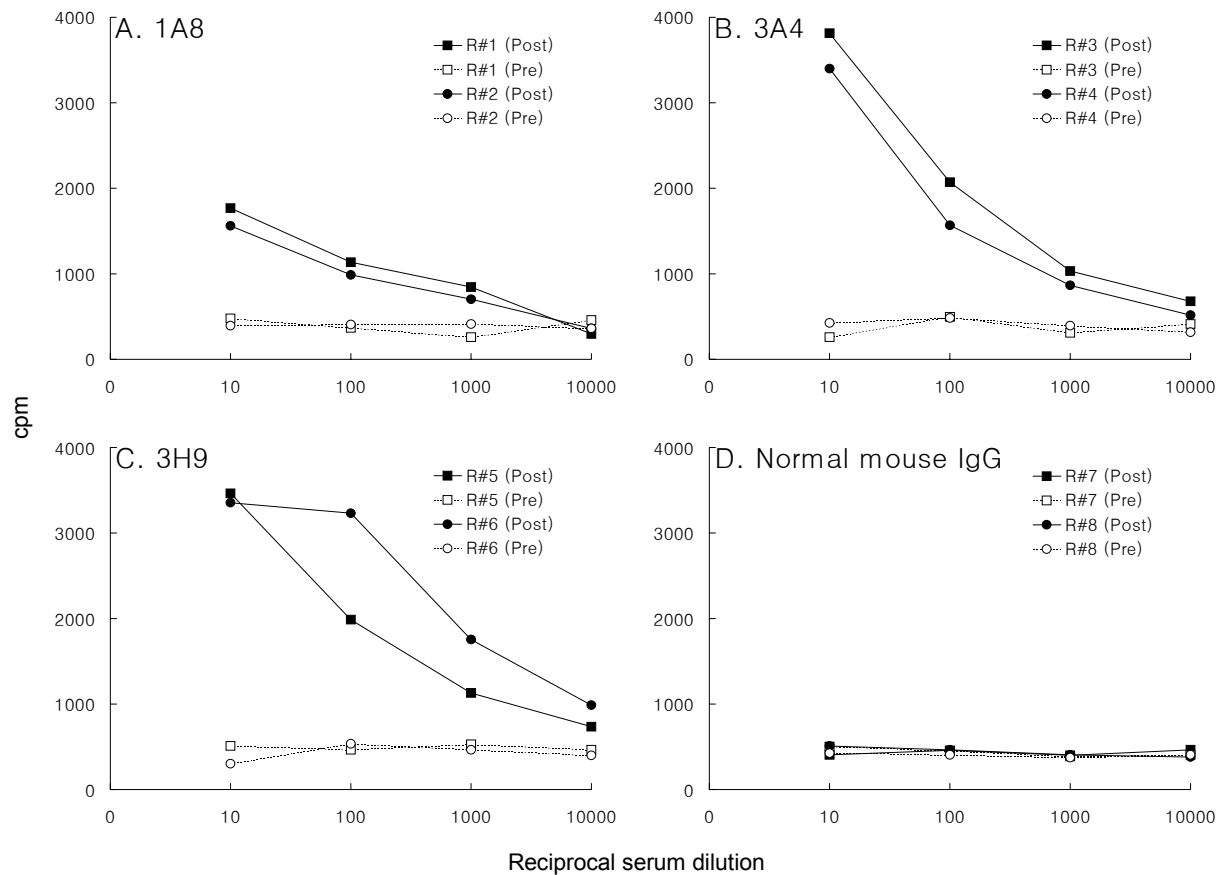
두가 음성대조군들에 비해서 통계적으로 의미있는 차이를 보이며 D142.34 세포에 결합하였다. 음성대조군으로는 각각의 항체(Ab2)로 면역시키기 전의 동일한 토끼의 혈청(면역 전 혈청)과 normal mouse IgG (대조군 혈청)로 면역시킨 토끼의 혈청을 사용하였으며, 항체 1A8, 3A4, 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청(1 : 10 희석부터 1 : 1,000 희석까지) 모두가 면역 전 혈청( $P < 0.05$ )과 대조군 혈청( $P < 0.05$ )에 비해서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. D142.34 세포 대신 GD2 음성세포인 B78.96을 사용했을 경우에는, 항체 1A8, 3A4, 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청 모두가 B78.96 세포에 결합하지 않았다(그림 생략).

Ab3의 GD2 분자에 대한 직접적인 결합을 측정하는 시험에서도, 항체 1A8, 3A4, 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청(1 : 10 희석부터 1 : 1,000 희석까지) 모두에서 면역 전 혈청( $P < 0.05$ )과 대조군 혈청( $P < 0.05$ )에 비해서 통계적으로 의미있는 양의 항체가 GD2 항원에 결합하였다(Fig. 3). 그러나 위의 GD2 발현 세포와의 결합시험에서와 마찬가지로, 항체 1A8으로 면역시킨 토끼의 혈청이 항체 3A4 또는 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청에 비해

각 혈청 희석액에서 GD2 항원에 결합한 항체의 양이 더 적었다. 음성대조항원으로 사용한 GD1a와는 항체 1A8, 3A4, 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청 모두가 결합하지 않았다(그림 생략).

Ab3에 의한 Ab1 (M2058)과 GD2 발현 세포와의 결합 억제제를 측정하는 결과, 항체 3A4 또는 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청(1 : 5 희석부터 1 : 625 희석까지)이 각각의 면역 전 혈청( $P > 0.05$ ) 또는 대조군 혈청( $P > 0.05$ )과 비교하여 의미있는 결합억제를 보여주었다(Fig. 4). 항체 1A8으로 면역시킨 토끼의 혈청은 1 : 5 희석액과 1 : 25 희석액에서 Ab1과 GD2 발현 세포와의 결합을 약간 억제하였으나, 면역 전 혈청( $P > 0.05$ ) 또는 대조군 혈청( $P > 0.05$ )과 비교하였을 때 통계적으로 의미있는 차이는 없었다.

Ab3에 의한 Ab1과 Ab2의 결합억제시험에서도 항체 3A4 또는 3H9으로 면역시킨 토끼의 혈청(1 : 5 희석부터 1 : 625 희석까지)은 각각의 면역 전 혈청( $P < 0.05$ )과 대조군 혈청( $P < 0.05$ )에 비해서 Ab1과 Ab2의 결합을 효과적으로 억제하였으나, 항체 1A8으로 면역시킨 토끼의



**Figure 3.** Binding to GD2 antigen of Ab3 induced by immunization of Ab2 1A8 (A), 3A4 (B), 3H9 (C) or normal mouse IgG (D). Two rabbits were immunized with each antibody. Sera were obtained from the rabbits before immunization (Pre) and 14 days after the last immunization (Post). Sera were tested for binding to GD2 antigen in RIA. R# means the number of each rabbit immunized with each antibody.

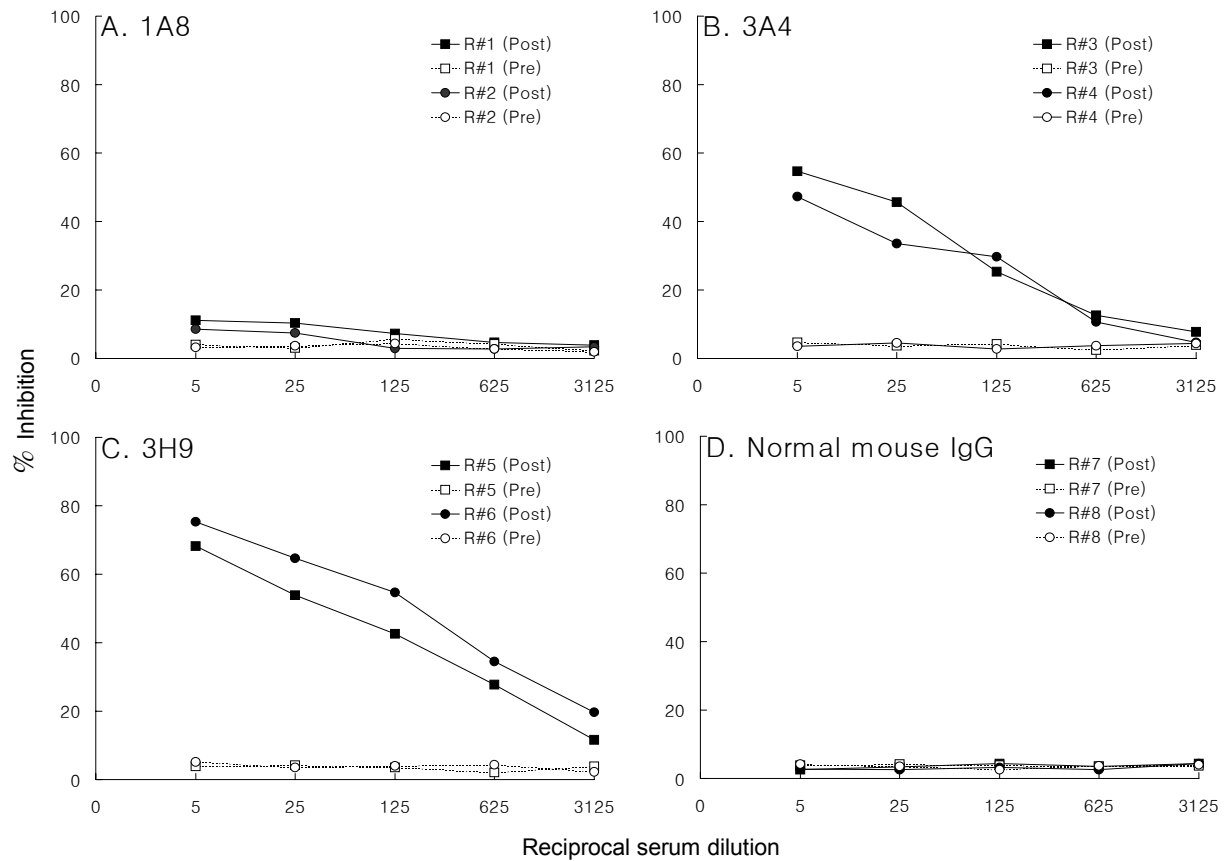
혈청은 면역 전 혈청( $P > 0.05$ ) 또는 대조군 혈청( $P > 0.05$ )에서의 값과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

## 고찰

Disialoganglioside GD2는 melanoma, neuroblastoma, small cell lung carcinoma와 같은 신경외배엽(neuroectoderm) 기원의 종양에서 발현이 증가되어 있는 종양연관 항원이다(13). 이들 종양연관항원이 알려진 이래로 GD2에 대한 단일클론항체를 이용한 수동면역요법이 melanoma와 neuroblastoma 환자를 대상으로 시도되어 항종양 효과를 나타냈으며(14,15), 마우스에서는 GD2에 대한 단일클론항체가 종양전이를 억제하기도 하였다(16,17). 그러나 수동면역의 특성상 지속적인 면역반응을 유발하지 못하므로, 보다 더 효과적이고 지속적인 면역반응을 유발하기 위한 능동면역요법이 요구되었다. GD2의 항원성을 높이기 위한 방법으로서 GD2에 KLH를 결합시키고, QS-21과 같은 강력한 아드ju반트와 함께 GD2가 백신

으로 사용된 연구에서, GD2에 대한 낮은 농도의 IgM 항체만이 생산되어 면역반응 유발에 있어서 당질항원의 한계성을 보여주었다(18-20). 당질항원에 의해 IgG 항체의 생산이 유도된 경우에도, 생산된 항체의 항원에 대한 친화도가 낮아 효과적인 항종양 작용을 나타내지 못하였다(21,22). 더구나 당질항원은 주로 항체매개면역반응만을 유발하며, 항종양 작용에 있어서 중요한 역할을 수행하는 세포매개면역반응은 거의 유발하지 못하는 것으로 알려져 있다.

효과적인 종양백신으로 사용되기 위해서는, 상호보완적이며 상승효과를 보이는 항체매개면역반응과 세포매개면역반응을 모두 유발할 수 있어야 하며, 이를 위해서는 당질 성분의 항원보다는 단백질 성분의 항원이 더 적합할 것이다. 당질항원과 유사한 항원성을 갖고 있으며, 이것을 대신하여 더 효과적인 면역반응을 유발할 수 있는 가능성이 있는 단백질항원이 바로 anti-idiotypic antibody이다. 그러나 GD2와 같은 당질항원에 대한 anti-idiotypic antibody가 GD2를 대신하여 백신으로 사용되기 위해서는

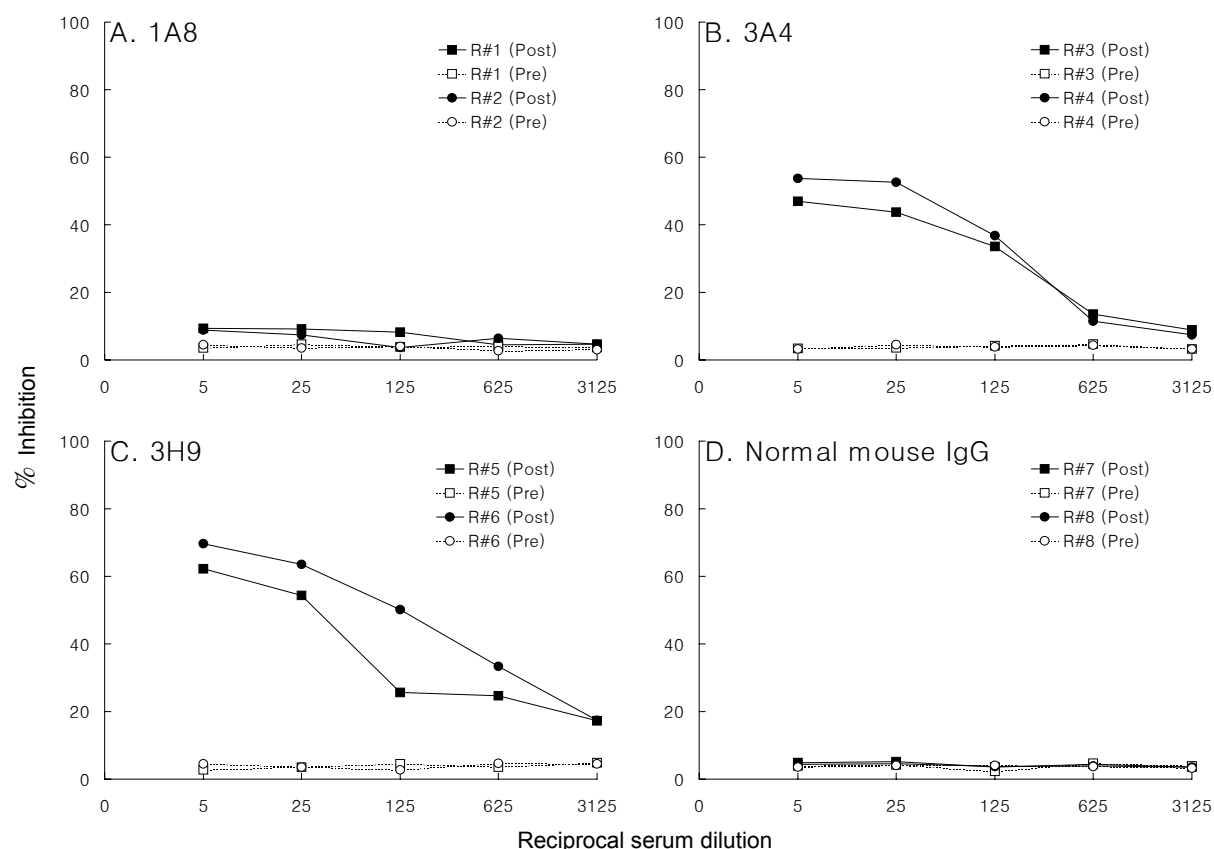


**Figure 4.** Inhibition of binding of M2058 (Ab1) to D142.34 by Ab3 induced by immunization of Ab2 1A8 (A), 3A4 (B), 3H9 (C) or normal mouse IgG (D). Two rabbits were immunized with each antibody. Sera were obtained from the rabbits before immunization (Pre) and 14 days after the last immunization (Post). Inhibition of binding of Ab1 to D142.34 by the Ab3-containing sera was detected by  $^{125}$ I-labelled goat anti-mouse IgG in RIA. Percent specific inhibition was calculated relative to buffer controls. R# means the number of each rabbit immunized with each antibody.

는, anti-idiotypic antibody에 의해 유도된 면역반응이 본래의 당질항원과 작용을 할 수 있어야 한다는 전제조건을 반드시 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 GD2에 대한 anti-idiotypic antibody를 생산하고, 이들 중 GD2의 internal image를 갖고 있다고 여겨지는 anti-idiotypic antibody (Ab2)를 선별한 다음, 이들(Ab2)에 의해 유도된 항체(Ab3)들이 본래의 항원(GD2)에 결합하는 정도를 측정하고, Ab3가 Ab1과 본래의 항원과의 결합 또는 Ab1과 Ab2의 결합을 억제하는 정도를 조사하였다.

GD2에 대한 anti-idiotypic antibody중 1A8, 3A4, 3D6, 및 3H9 항체는 M2058과 D142.34의 결합을 억제함으로써, 이들 항체가 M2058의 항원결합부위 내의 idiotope (Idiotopes inside the antigen combining site)들에 대한 항체임을 시사하였다(Fig. 1). 항체 1G5와 2B6는 1차 선별시험에서 M2058과 결합하였으나, 2차 선별시험에서는 M2058과 D142.34와의 결합을 억제하지 못하였으므로, 이들은 M2058의 항원결합부위 외부에 있는 idiotope (Idiotopes outside the antigen combining site)들에 대한 항

체로 추정된다. Anti-idiotypic antibody 1A8, 3A4, 3H9의 면역에 의해 생성된 각각의 anti-anti-idiotypic antibody (Ab3)는 GD2 발현 세포인 D142.34 (Fig. 2) 및 GD2 항원 분자(Fig. 3)에 직접 결합함으로써, anti-idiotypic antibody 1A8, 3A4, 3H9가 GD2에 특이성을 갖는 항체의 생산을 유도할 수 있음을 보여주었다. 또한 항체 3A4 또는 3H9의 면역에 의해서 생성된 Ab3는 M2058 (Ab1)과 D142.34와의 결합(Fig. 4) 및 M2058 (Ab1)과 Ab2와의 결합(Fig. 5)을 각각 경쟁적으로 억제하였으므로, Ab3와 M2058 (Ab1)이 GD2 항원의 동일한 epitope에 결합하며, 이들이 Ab2와 결합할 때에도 Ab2의 동일한 idiotope에 결합한다는 것을 확인할 수 있었다. 항체 1A8인 경우에는, 생성된 Ab3의 친화도가 높지 않거나, M2058과 다른 idiotope에 결합하는 항체일 것으로 추정된다. 이상의 실험 결과는, GD2에 대한 anti-idiotypic antibody 3A4 및 3H9이, M2058 (Ab1)과 같은 GD2 항원의 epitope에 결합하는 anti-anti-idiotypic antibodies의 생산을 유도함으로써, GD2 발현 종양들에 대해서 작용할 수 있는 항체매개



**Figure 5.** Inhibition of binding of M2058 (Ab1) to Ab2 by Ab3 induced by immunization of Ab2 1A8 (A), 3A4 (B), 3H9 (C) or normal mouse IgG (D). Two rabbits were immunized with each antibody. Sera were obtained from the rabbits before immunization (Pre) and 14 days after the last immunization (Post). Inhibition of binding of  $^{125}$ I-labelled Ab2 to Ab1 M2058 was determined by RIA. Percent specific inhibition was calculated relative to buffer controls. R# means the number of each rabbit immunized with each antibody.

면역반응을 유발할 수 있다는 것을 보여주었다.

종양에 대한 항체매개면역반응은 세포매개면역반응과 함께 종양제거에 중요한 역할을 수행할 수 있다. 종양 항원에 대한 항체는 보체를 활성화시켜 종양세포독작용을 나타내거나, 식세포들에 의한 식작용 및 행동세포들에 의한 항체의존세포매개세포독성(ADCC)을 매개함으로써 항종양 효과를 나타낸다. 특히 주요조직적합복합체(MHC)가 발현되지 않거나 발현이 감소되어 있는 경우에는 종양항원에 대한 항체가 더욱 중요한 의미를 갖는다(23,24). 항체가 매개하는 면역반응이 이미 성장한 종양덩어리를 제거할 수는 없으나, 혈류나 림프관을 통한 종양세포의 전이를 효과적으로 억제하였다(25-27).

Anti-idiotypic antibody가 종양연관항원에 대한 면역관용을 극복할 수 있는 기전에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않으나, anti-idiotypic antibody가 일반적인 외인성 단백질처럼 작용할 것이라는 가설(28)이 합리성을 갖는다. 즉 외부에서 투여된 anti-idiotypic antibody가 항원전달세포에 의해 처리되어 T세포에게 전달

됨으로써, CD4 보조 T세포가 매개하는 일련의 면역반응을 유발할 가능성이 높다. 본 연구에서 anti-idiotypic antibody가 GD2에 결합할 수 있는 항체를 생산한 기전은 크게 두 가지로 해석될 수 있다. 첫째는 질적인 면으로서, GD2는 정상조직에서도 소량 발현될 수 있는 종양연관항원이므로 이에 대한 B세포 클론들이 이미 소실되어 있는 반면, anti-idiotypic antibody와 반응할 수 있는 클론들은 존재하고 있으므로, 이들에 대해서 생성된 항체가 GD2 항원과 교차반응(cross-reaction)을 나타내는 것이라고 볼 수 있다. 둘째는 양적인 면으로서, 당질항원인 GD2에 비해서 단백질항원인 anti-idiotypic antibody가 항원전달세포에 의해 T세포에게 전달됨으로써, B세포 뿐만 아니라 T세포까지 활성화시켜 더 많은 양의 항체를 생산한 것으로 생각된다.

Anti-idiotypic antibody를 이용한 종양백신에 대한 대부분의 연구가 단백질성분의 종양항원에 대한 것으로서 주로 면역관용을 극복하는 부분에 역점을 두고 있는 반면, 본 연구에서는 당질성분의 종양항원인 GD2에 대한 Ab2

를 이용함으로써, Ab2에 의해 유발된 항체 Ab3가 본래의 당질항원인 GD2에 작용할 수 있다는 것을 보여주었다. 따라서 본 연구에서 사용된 anti-idiotypic antibody 3A4 및 3H9은, 당질항원 GD2를 발현하는 종양들에 대한 백신으로 사용되기 위한 가능성을 갖는 것으로 기대된다. 또한 GD2에 대한 면역반응을 유발함에 있어서, 본래의 항원 GD2보다 이들 Ab2가 더 우수하다는 것을 입증하기 위해, GD2와 Ab2에 의해 유발된 면역반응을 비교하는 연구가 현재 진행 중에 있으며, 항체매개면역반응뿐만 아니라 세포매개면역반응도 비교분석하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK, Foon KA: The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy. *Curr Opin Mole Ther* 3(1);63-69, 2001
- Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Padoll D, Levitsky H: Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(3); 1178-1183, 1998
- Antonia SJ, Extermann M, Flavel RA: Immunologic non-responsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog* 9;35-41, 1998
- Helling F, Shang Y, Calves M, Oettgen HF, Livingston PO: Increased immunogenicity of GD3 conjugate vaccine: Comparison of various carrier proteins and selection of GD3-KLH for further testing. *Cancer Res* 54;197-203, 1994
- Livingston PO: Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 145;145-166, 1995
- Helling F, Zhang A, Shang A, Adluri S, Calves M, Koganty R, Longenecker BM, Oettgen HF, Livingston PO: GM2-KLH conjugate vaccine: Increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS-21. *Cancer Res* 55;2783-2788, 1995
- Kim SK, Ragupathi G, Musselli C, Choi SJ, Park YS, Livingston PO: Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines. *Vaccine* 18;597-603, 2000
- Herlyn D, Ross AH, Koprowski H: Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. *Science* 232;100-103, 1986
- Maruyama H, Benden A, Li W, Zaloudik J, Koido T, Taupin JL, Acres B, Somasundaram R, Prewett M, Herlyn D: Monoclonal anti-idiotypic antibody functionally mimics the human gastrointestinal carcinoma epitope GA733. *Int J Cancer* 65(4);547-553, 1996
- Jerne NK: Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* 125;373-389, 1974
- Jinnohara T, Tsujisaki M, Sasaki S, Hinoda Y, Taniguchi M, Imai K: Anti-tumor effect of internal image bearing anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to GM3 ganglioside. *Int J Cancer* 76;345-353, 1998
- Herlyn D, Ross AH, Iliopoulos D, Koprowski H: Induction of specific immunity to human colon carcinoma by anti-idiotypic antibodies to monoclonal antibody CO17-1A. *Eur J Immunol* 17;1649-1652, 1987
- Hamilton WB, Helling F, Lloyd KO, Livingston PO: Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer* 53;566-573, 1993
- Irie RF, Morton DL: Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 83;8694-8698, 1986
- Saleh MN, Khazaeli MB, Wheeler RH, Dropcho E, Liu T, Urist M, Miller DM, Lawson S, Dixon P, Russell CH, LoBuglio AF: Phase I trial of the murine monoclonal antibody anti-GD2 antibody 14G9a in metastatic melanoma. *Cancer Res* 52;4342-4347, 1992
- Iliopoulos D, Ernst C, Steplewski Z, Jambrosic J, Rodeck U, Herlyn M, Clark WH, Koprowski H, Herlyn D: Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. *J Natl Cancer Inst* 81;440-444, 1989
- Zhang H, Zhang S, Cheung NK, Ragupathi G, Livingston PO: Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res* 58;2844-2849, 1998
- Tai T, Cahan LD, Tsuchida T, Saxton RE, Irie RF, Morton DL: Immunogenicity of melanoma-associated gangliosides in cancer patients. *Int J Cancer* 35;607-612, 1985
- Portoukalian J, Carrel S, Dore JF, Rumke P: Humoral immune response in disease-free advanced melanoma patients after vaccination with melanoma-associated gangliosides. *Int J Cancer* 49;893-899, 1991
- Livingston PO: Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 145;147-166, 1995
- Kitamura K, Stockert E, Garin CP, Welt S, Lloyd KO, Armour KL, Wallace TP, Harris WJ, Carr FJ, Old LJ: Specificity analysis of blood group Lewis-y (Le<sup>y</sup>) antibodies generated against synthetic and natural Le(y) determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 91;12957-12961, 1994
- Adluri S, Helling F, Ogata S, Zhang S, Itzkowitz SH, Lloyd KO, Livingston PO: Immunogenicity of synthetic TF-KLH and sTn-KLH conjugates in colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 41;185-192, 1995
- McDougall CJ, Ngoi SS, Goldman IS, Godwin T, Felix J, Decross JJ, Rigas B: Reduced expression of HLA class I and II antigens in colon cancer. *Cancer Res* 50;8023-8027, 1990
- Pantal K, Schlimol G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmuller G: Frequent down-regulation of major histocompatibility class antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 51;4712-4715, 1991
- Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H: Monoclonal antihuman tumor antibodies of six isotypes in cytotoxic reactions with human and murine effector cells. *Cell Immunol* 92;105-114, 1985
- Iliopoulos D, Ernst C, Steplewski Z, Jambrosic J, Rodeck U, Herlyn M, Clark H Jr, Koprowski H, Herlyn: Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. *J Natl Cancer Inst* 81;440-444, 1989
- Herlyn D, Iliopoulos D, Jensen P, Parmiter A, Baird J, Hotta H, Ross AH, Jambrosic J, Koprowski H: In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res* 50;2296-2302, 1990
- Wang X, Luo W, Foon KA, Ferrone S: Tumor associated antigen (TAA) mimicry and immunotherapy of malignant diseases from anti-idiotypic antibodies to peptide mimics. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 19;309-326, 2001