



Minireview on Recent Antibody-Related NMR Studies

Jinhwa Jang, Ji-Hun Kim*

College of Pharmacy, Chungbuk National University Cheongju, Chungbuk 28160, Republic of Korea

Received Dec 10, 2020; Revised Dec 17, 2020; Accepted Dec 17, 2020

Abstract In a relatively short period, monoclonal antibodies have made dramatic success as therapeutics for various diseases such as cancers and autoimmune diseases and become an important development items for many pharmaceutical companies. In order to develop antibody drug, it is important to investigate the structural characteristics of both antibody and antigen. NMR studies on antibody are extremely challenging due to big huddles such as a big size of protein and isotope labeling, nevertheless, several studies have been reported in 10 years. Here, we analyzed 95 papers dealing with antibody-related NMR studies reported in recent 10 years. We categorized papers into 3 types: 1) structural characterization of antibody, 2) structural characterization of antigen using antibody, 3) amyloidosis caused by fragment of antibody. This work would shed new light on antibody-related NMR studies.

Keywords Nuclear magnetic resonance, antibody, higher order structure, saturation transfer difference, epitope

서론

항체는 항원과 특이적인 반응을 통하여 항체-항원 반응을 일으키는 물질이다. 혈액에는 혈소판과 같은 정상 항체와 외부 물질에 대하여 방어 기전으로 작용하는 면역 항체가 있다. 면역 항체는 구조에 따라 IgG, IgA, IgM, IgD,

IgE 등 5개의 항체 종류로 나뉜다. 타겟 단백질과 강한 결합을 하는 항체의 특성을 이용하여 자가면역 질환 및 암을 억제할 수 있는 IgG 타입의 항체를 개발하여 치료용으로 사용하고 있다. 현재 많은 제약회사에서 일반적인 IgG 타입의 항체 이외에도 유전자재조합 기술을 활용하여 항체 절편, 이중 특이적 항체, 약물 접합 항체 등 다양한 특성을 지닌 항체의 약품을 개발하고 있다. 1986년 Muromonab이 최초로 항체 의약품으로 FDA 승인을 받은 이후 항체 의약품의 시장은 점점 커져왔다.¹ 세계 시장에서 치료용 단일클론 항체의 시장가치가 2018년도에 대략 1150억 달러였으며 2025년에는 3000억 달러에 이를 것이라 예측할 정도로 시장 가치가 거대하며 항체 연구가 활발히 진행되고 있다.²

현재 약물로 개발되고 있는 항체의 작용기전은 일반적으로 다음 4가지로 나눌 수 있다: 1) 세포 신호 전달에 중요한 역할을 하는 타겟 단백질과 리간드의 결합을 방해하는 길항제 (antagonist) 2) 세포 신호 전달하게 하는 작용제 (agonist) 3) 항체 의존성 세포독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 4) 보체 의존성 세포독성 (complement dependent cytotoxicity, CDC). 신호전달의 길항제와 작용제로서의 역할은 항체와 타겟 단백질과의 결합력이 타겟 단백질과 리간드의 결합력보다 우수하기 때문에 나타나

* Address correspondence to: **Ji-Hun Kim**, College of Pharmacy, Chungbuk National University Cheongju, Chungbuk 28160, Republic of Korea, Tel: 82-43-249-1343; E-mail: nmrjhkim@cbnu.ac.kr

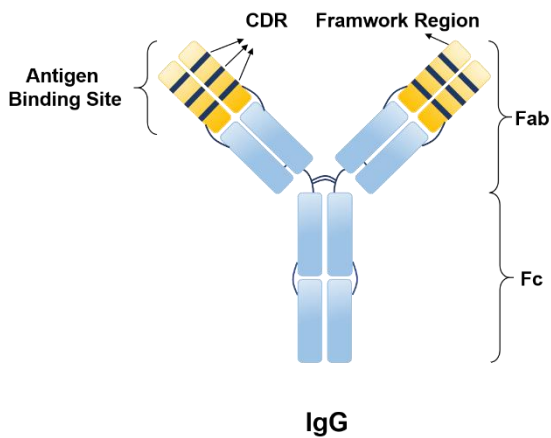


그림 1 IgG 항체의 부위별 명칭

며, 항체 의존성 세포독성과 보체 의존성 세포독성은 항체가 자연살해세포(Natural killer cell, NK cell), 보체 등과 결합함으로써 타겟 단백질이 발현된 세포를 사멸시키는 기전을 가진다.³

항체는 중쇄(heavy chain, 50 kDa) 단백질 2개와 경쇄(light chain, 25 kDa) 단백질 2개로 이루어진 약 150 kDa 크기의 매우 안정된 구조의 단백질이다. 일반적인 IgG 형태의 전장(full-length) 항체의 구조를 그림 1에 나타냈다. 항체는 항원과 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위가 항체 말단에 존재하며, 항원 결합부위는 6개의 loop로 이루어진 complementarity determining region (CDR)와 나머지 부위인 framework 지역으로 나눌 수 있다. 이 부분은 타겟 단백질과 강하게 결합함으로써 길항제 및 작용제의 역할을 하는데 중요하다. 나머지 말단에는 fragment crystallizable(Fc)가 존재하며, 이 부위를 통하여 항체 의존성 세포독성 및 보체 의존성 세포독성의 작용을 나타낸다.

최근 항원-항체 결합력만을 이용하여 세포 신호에 관여하여 치료효과를 나타낼 수 있도록 하는 항체 절편 개발도 활발하다. 가변영역인 VH, VL과 불변영역인 CH1, CL1으로 이루어진 Fab(50 kDa), 가변영역을

펩타이드로 연결한 scFv(25 kDa) 및 낙타의 가변 중쇄 영역만으로 이루어진 소형항체에서 유래한 nanobody(15 kDa)가 있다. 이러한 항체 절편은 IgG보다 크기가 작기 때문에 조직 내 침투성에 유리하고 박테리아에서 생산이 가능하다는 장점이 있어 생체 진단 및 치료용 항체로 개발되고 있다.⁴

현재 연구 개발되고 있는 다양한 항체 치료제는 표적 단백질에 특이적으로 결합하기 때문에 예상치 못한 작용 기전이 적고 체내 안정성이 높아야 하며 표적 항원의 발현을 억제해 증화작용을 할 수 있어야 한다.⁵ 그러기 위해서는 우선 항체와 결합하는 항원의 부위(에피토프)와 항원과 결합하는 항체의 부위(파라토프)를 정확하게 알 수 있는 구조적 정보가 필요하다. 또한 항체는 안정성이 우수한 고차구조(higher order structure, HOS)로 이루어진 단백질이므로 항체의 구조 특성 분석도 중요하다.⁶ 최근 들어 항체의 경쇄나 중쇄들이 아밀로이드증을 야기한다는 보고와 함께 기전연구가 되고 있다. 항체와 같이 거대한 단백질의 구조적 특성 연구를 위해서 X선 회절법이 많이 이용되고 있으나 NMR을 이용한 항체 구조 연구 또한 보고되고 있다.^{7,8}

이 논문에서는 1) NMR을 활용한 항체 관련 논문 현황 2) 항체의 구조 및 특성 분석 3) 항체를 활용한 항원의 구조 특성 분석 4) 항체에서 유래한 아밀로이드증 연구에 대하여 살펴보고자 한다.

항체 관련 NMR 연구 현황

항체 관련된 NMR 연구는 pubmed에서 검색하였다. 최근 10년간 총 95편의 논문이 발표되었으며 2015년 이후로 10 여편가량의 논문이 꾸준히 발표되고 있다(그림2). 논문의 내용을 항체 구조 특성 분석, 항체를 이용한 항원의 분석, 항체에서 유래한 아밀로이드증으로 구분하여 살펴보면 항체 구조 특성분석은 55편, 항체를 이용한 항원의 분석은 34편, 항체에서 유래한 아밀로이드증에 관한 내용으로 6

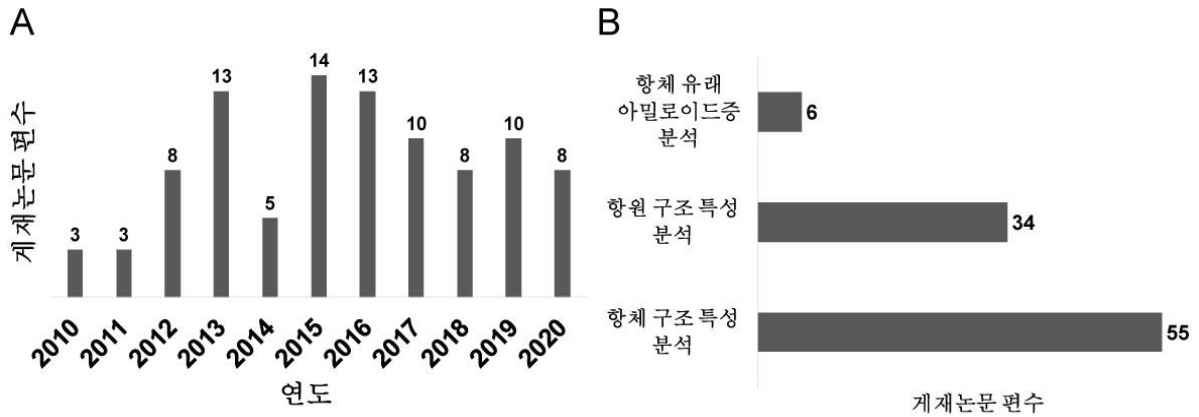


그림 2 최근 10년간 항체관련 NMR 논문

편의 논문이 발표되었으며 항체 구조 분석이 가장 많은 비중을 차지하고 있었다.

항체구조 특성분석

NMR을 이용한 항체의 구조 특성 분석은 항체의 구조적 물성을 분석함으로써 항체의 생물학적 기능을 이해하고 항체의약품의 품질 보증을 할 수 있음을 보여주고 있다. 대표적으로 다음과 같은 연구가 보고되었다.

항체의 Fc 지역 구조 연구- Kato 연구팀은 ¹³C와 ¹⁵N이 도입된 마우스 유래의 IgG-Fc 항체를 제작하여 backbone assignment를 시도하였다.⁹ 그 결과로 그림 3에서 보듯이 C_α (99%), C_β (84%), CO (80%), HN (99%), and N (99%) (Proline의 N은 제외)의 assignment를 성공적으로 마칠 수 있었다.⁹ 다음으로 제작된 IgG-Fc를 혈장 안에 넣어 NMR을 측정하는 *in-serum* NMR을 시도하였다. 성공적으로 IgG-Fc 항체 절편의 NMR 분석을 마칠 수 있었으며, X-ray 결정구조를 활용하여 *in-serum*에서 면역반응으로 인한 IgG의 인식 부위를 규명할 수 있었다. 이 연구를 통하여 저자는 *in-serum*에서 항체의 특성 연구가 가능하며, 다클론 항체의 외부물질 인식 메커니즘을 이해하는 데 도움을 줄 수 있다고 설명한다.¹⁰ Liu팀도 IgG의 Fc 지역을 NMR로 특성 연구를 진행하였다. pH에 따라서 변하는

HSQC스펙트럼을 분석하여 Fc 지역의 un-folding과 aggregation에 주로 관여하는 부위를 원자 레벨에서 밝혔다. 이를 통하여 Fc의 aggregation 기전을 설명하고자 하였다.¹¹

항체의 품질보증 연구- 단일클론 항체의 바이오의약품의 시장성이 성장함에 따라 항체의 품질보증을 정확히 해야 할 필요성이 대두하였다. 항체는 higher order structure (HOS)로 이루어진 안정한 구조이므로 NMR을 이용한 HOS 분석을 통하여 항체의약품의 품질을 검증하고자 하는 실험들이 보고되었다. Schnier팀은 단백질의 지문영역을 1D로 측정하여 스펙트럼의 모양을 분석하는 protein fingerprint by line shape enhancement (PROFILE)를 이용하여 항체의 HOS를 분석하는 방법을 보여주었다.⁶ 이 논문에서 저자는 거대한 단백질의 경우 지문영역의 분석을 위해서 2D보다는 1D NMR이 더 효과적일 수 있다는 것을 제시하였다.⁶ Keire팀은 NMR 튜브 안에서 효소를 직접 넣어 항체를 절단시키고 추가적인 분리 없이 NMR 측정하여 그 패턴을 principal component analysis (PCA) 통계 분석하여 항체 의약품의 품질을 살펴볼 수 있는 방법을 제시하였다.^{12,13} Marino 팀은 항체의 물성 연구를 위하여 범용적으로 사용되는 NISTmAB (Humanized IgG1 k 인간화

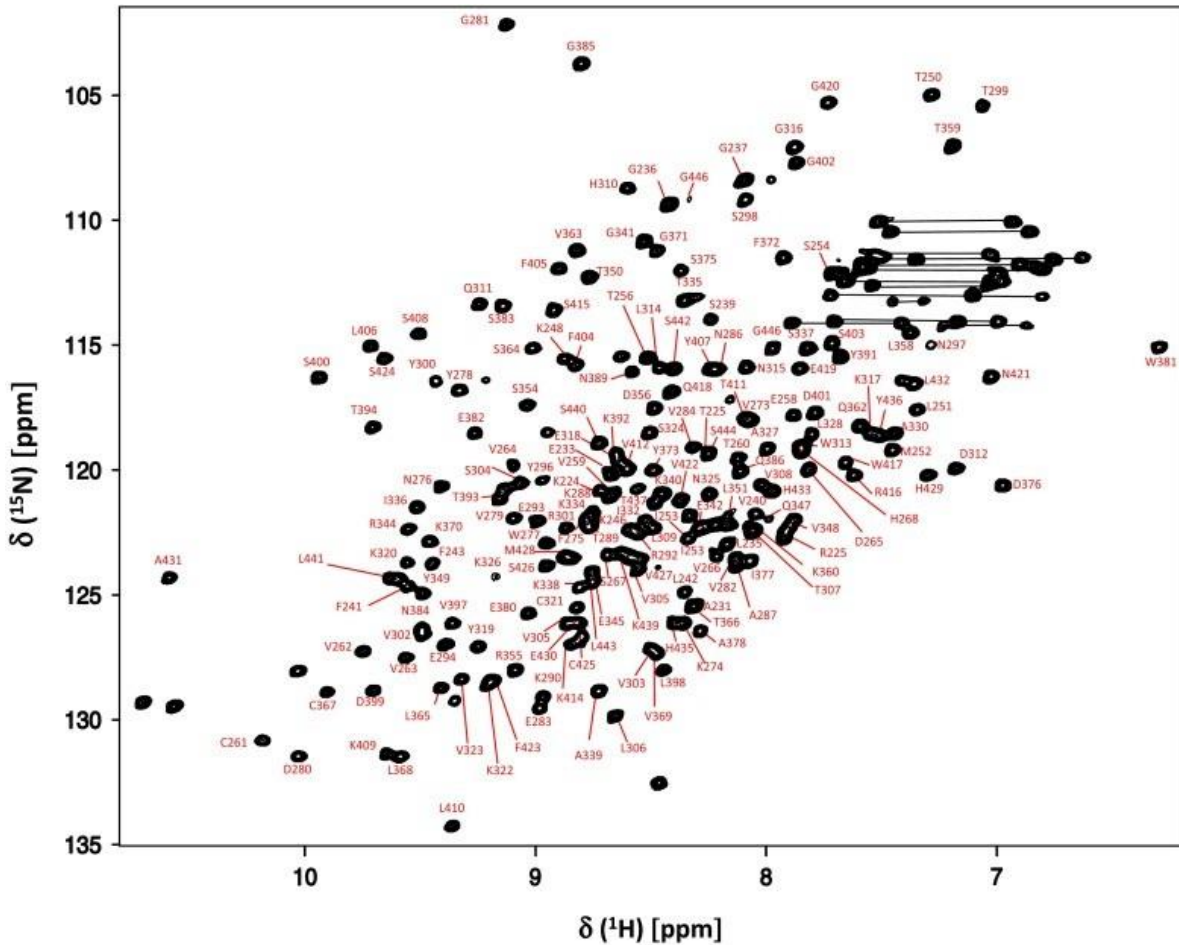


그림 3 IgG-Fc의 ${}^1\text{H}-{}^{15}\text{N}$ 스펙트럼 및 assignment

단일클론 항체) 2D NMR을 활용하여 HOS 특성 분석을 진행하였다.¹⁴ 이 팀은 자연 상태에 존재하는 ${}^{13}\text{C}$ 을 이용하여 gradient-selected ${}^1\text{H}-{}^{13}\text{C}$ HSQC (gsHSQC)를 측정하여 우수한 스펙트럼을 얻을 수 있었으며 그 결과에 대한 PCA 통계분석을 통하여 HOS 변화 양상을 살펴보았다.¹⁴ 이 외에도 항체에 papain 효소를 처리하여 Fab와 Fc 영역으로 나누어 따로 정제하여 ${}^1\text{H}-{}^{15}\text{N}$ 2D NMR을 측정하여 HOS를 분석하는 방법 등이 발표되었다.¹⁵

Pluse program 개발- IgG의 경우 150 kDa 이상의 분자량을 갖는 전장 항체의 경우 correlation time (τ_c)가 길어지면서 NMR 측정 중 시그널이 사라지기 때문에 NMR 측정하여

시그널을 관측하는 것은 매우 어렵다. Shima-Tada팀에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 ${}^{15}\text{N}$ 을 직접 측정할 수 있는 cross-correlated relaxation-enhanced polarization transfer (CRINEPT) 측정법을 개발하여 단일클론 항체를 분석하였다(그림4).¹⁶ 항체 보관상태의 온도인 4°C에서 새롭게 개발된 CRINEPT를 이용하여 항체를 측정하였으며 성공적인 결과물을 얻을 수 있었다. 그리고 그 결과를 토대로 항체 품질의 평가 요소 중 하나인 불균일한 galactosylation 상태를 설명할 수 있었다.¹⁶

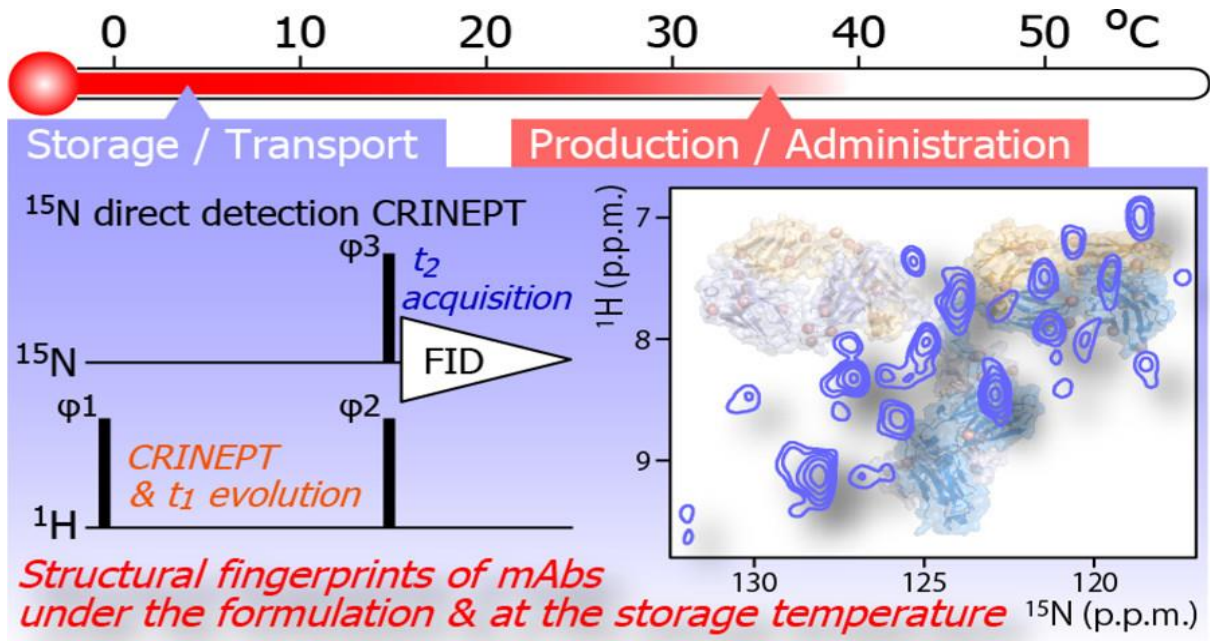


그림 4 ^{15}N 직접 측정 CRINEPT 개요도. 이 그림은 저널의 허락을 받고 게재함.

항체를 활용한 항원구조 특성분석

항체와 항원의 결합 기전을 정확히 이해하기 위하여 항원의 에피토프 맵핑이 중요하다. Saturation transfer difference (STD) NMR을 이용하여 항원의 에피토프 연구가 많이 보고되었다. STD-NMR은 저분자 물질의 스펙트럼 변화를 통하여 결합의 여부를 판단할 수 있는 ligand-based NMR 기술 중 하나이다.^{17,18} FBDD (fragment based drug development)에서 단백질과 약하게 결합하는 ligand를 탐색하기 위한 방법으로 많이 사용되고 있다.¹⁹

Falcigno팀에서는 성장인자 중 하나인 Nodal과 항체가 결합하는 에피토프를 규명하기 위하여 Nodal 펩타이드와 항체의 STD-NMR 실험을 진행하였다.²⁰ 이를 통하여 항체와 결합하는 정확한 부위를 규명할 수 있었다. 이 항체는 Nodal과 리셉터와의 결합을 억제하므로 항체와의 결합부위 규명을 통하여 Nodal-리셉터 간의 결합 부위도 규명할 수 있었다.¹⁹ Human natural killer-1 (HNK-1)에 부착 되어있는 carbohydrate는 말초신경재생과 시냅스의 가소성(plasticity)에

관여하며 다발성 신경병증에서 자가항체의 표적이 되어 길랑-바레 증후군이라는 병을 야기하기도 한다. 그렇기 때문에 이 HNK-1의 기능을 이해하고 길랑-바레 증후군 치료를 위해서는 자가항체와 표적이 되는 carbohydrate의 에피토프를 정확히 아는 것이 중요하다.²¹ Nifantiev팀은 HNK-1에 있는 면역원성 carbohydrate와 항체의 결합 연구를 STD-NMR을 통하여 진행하여 정확한 에피토프를 규명할 수 있었다.²⁰ 이 외에도 면역원성을 가지는 다양한 carbohydrate에 대한 에피토프를 STD-NMR을 이용하여 규명하였다.^{22,23}

항체유래 아밀로이드증 분석

최근 항체의 경쇄가 아밀로이드증을 유발하여 신장이나 심장에 손상을 줄 수 있다는 연구 내용이 보고되었다.⁷ Reif팀은 아밀로이드증을 가진 환자의 심장에서 fibril을 직접 뽑아내어 solid state NMR을 통하여 chemical shift의 assignment를 하였으며, 이를 통하여 fibril을 형성하는 핵심 지역을 확인할 수 있었다.^{7,8} 이 논문은 직접적인 항체의 구조 연구는 아니지만 항체에서 유래한 질병 연구의 관점에서

중요도가 있다고 판단된다. 현재 fibril 형성과 질환과의 상관관계가 많이 보고되고 있으며, 항체의약품 또한 사용 빈도가 증가하는 시점에 항체에서 유래한 fibril 형성의 연구는 향후 필요할 것이라 예측된다.

결론

전장 항체는 크기가 150 kDa 에 달하며 절편화된 Fab 도 50 kDa 일 정도로 크기가 커서 NMR 로 분석하는 것이 쉽지 않다. 하지만 최근 10 년간의 항체 관련 NMR 논문을 분석한 결과 Fc 지역의 NMR 분석법이 확립되어 있으며, 1D 와 2D NMR

스펙트럼의 통계 분석을 통하여 항체의 구조 정보를 획득할 수 있음을 알 수 있었다. NMR 의 경우 동위원소 표지가 필요하나 자연 상태에 존재하는 탄소를 활용하여 항체의 구조 분석 또한 가능함을 제시하였다. 치료용 항체 시장이 빠른 속도로 성장함에 따라 항체의약품의 개발, 품질 관리 측면에서 항체의 구조특성 분석의 필요성이 증가할 것이다. 본 논문에서는 항체의 구조 특성 혹은 항체를 활용한 단백질 구조 특성 연구에 NMR 이 활용되고 있음을 기술하였으며, 이를 통하여 항체 및 항체 관련 연구에 NMR 분석법이 더 많이 활용될 수 있기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원(NF-2019R1F1A1057427)과 BK FOUR의 지원을 받아 수행된 연구이다.

References

1. S. L. Smith, *J. Transpl. Coord.* **6**, 109 (1996)
2. R. Lu, Y. Hwang, I. Liu, C. Lee, H. Tsai, H. Li and H. Wu, *J. Biomed. Sci.* **27**, 1 (2020)
3. M. Suzuki, C. Kato and A. Kato, *J. Toxicol. Pathol.* **28**,133 (2015)
4. A. L. Nelson, *mAbs* **2**, 77 (2010)
5. S. Kozłowski and P. Swann, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 707 (2006)
6. L. Poppe, J. B. Jordan, G. Rogers and P. D. Schmier, *Anal. Chem.* **87**, 5539 (2015)
7. T. Pradhan, K. Annamalai, R. Sarkar, U. Hegenbart, S. Schönland, M. Fändrich and B. Reif, *Biomol. NMR Assign.* (2020)
8. T. Pradhan, K. Annamalai, R. Sarkar, S. Huhn, U. Hegenbart, S. Schönland, M. Fändrich and B. Reif, *J. Biol. Chem.* (2020)
9. H. Yagi, Y. Zhang, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, S. Iida, Y. Yamaguchi and K. Kato, *Biomol. NMR assign.* **9**, 257 (2015)
10. S. Yanaka, T. Yamazaki, R. Yogo, M. Noda, S. Uchiyama, H. Yagi and K. Kato, *Molecules* **22**, 1619 (2017)
11. R. F. Latypov, S. Hogan, H. Lau, H. Gadgil and D. Liu, *J. Biol. Chem.* **287**, 1381 (2012)
12. K. Chen, D. S. Long, S. C. Lute, M. J. Levy, K. A. Brorson and D. A. Keire, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **128**, 398 (2016)
13. Y. Chae, W. Kang, S. Kim, J. Joo, J. Han and B. Hong, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **14**, 28 (2010)
14. L. W. Arbogast, F. Delaglio, J. E. Schiel and J. P. Marino, *Anal. Chem.* **89**, 11839 (2017)
15. D. J. Hodgson, H. Ghasriani and Y. Aubin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **163**, 144 (2019)
16. Y. Tokunaga, K. Takeuchi, J. Okude, K. Ori, T. Torizawa and I. Shimada, *J. Med. Chem.* **63**, 5360 (2020)

17. L. W. Arbogast, R. G. Brinson and J. P. Marino, *Anal. Chem.* **87**, 3556 (2015)
18. D. Jeon, M. Jeong, J. Kim, K. Jeong, Y. Ko and Y. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **19**,54 (2015)
19. M. J. Harner, A. O. Frank and S. W. Fesik, *J. Biomol. NMR* **56**, 65 (2013)
20. L. Calvanese, A. Focà, A. Sandomenico, G. Focà, A. Caporale, N. Doti, E. Iaccarino, A. Leonardi, G. D'Auria, M. Ruvo and L. Falcigno, *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 6589 (2017)
21. Y. E. Tsvetkov, M. Burg-Roderfeld, G. Loers, A. Ardá, E. V. Sukhova, E. A. Khatuntseva, A. A. Grachev, A. O. Chizhov, H. Siebert, M. Schachner, J. Jiménez-Barbero and N. E. Nifantiev, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 426 (2012)
22. M. Plum, Y. Michel, K. Wallach, T. Raiber, S. Blank, F. I. Bantleon, A. Diethers, K. Greunke, I. Braren, T. Hackl, B. Meyer and E. Spillner, *J. Biol. Chem.* **286**, 43103 (2011)
23. M. G. Szczepina, D. W. Bleile and B. M. Pinto, *Chemistry* **17**, 11446 (2011)