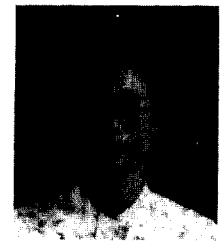
항체공학(Antibody Engineering)



한국과학기술연구원 유전공학연구소 **홍 효 정**

쥐의 단일클론항체는 기초연구에 뿐만 아니라 질병의 진단시약으로서도 광범위하게 유용되어 왔다. 반면, 쥐의 단일클론항체를 인체에 임상적으로 사용하는 것은 인체에 면역반응을 유발시킨다는 근본적인 문제점 때문에 어려운 일이라 인식되어 왔다. 그러나, 최근 2~3년간 유전자 기술과 단백질공학적인 방법에 의하여 쥐의 단일클론항체를 인간화시키거나 항체절편의 생산을 시도하게 되어, 단일클론항체의 임상적인 이용에 대한 가능성이 긍정적으로 진단되고 있다. 본 난에서는 항체의 구조와 기능을 간략히 살펴보고, 최근 항체의 단백질공학에 대한 경향과 방법 및 engineered 항체의 특성들에 관하여 논의하고자 한다.

1. 항체의 구조와 기능

항체는 성숙된 B세포에서 생산되고 분비되며, 각각 두 개의 면역글로블린 Heavy(H) 사슬과 Light (L) 사슬로 구성되어 있다(그림 1). 그리고, H사슬과 L사슬은 disulfide bond로 묶여져 있다. H와 L사슬들은 아미노산서열의 보존정도에 따라 Variable(V) 영역과 Constant(C) 영역으로 구분될 수 있다. V영역은 다시 아미노산서열의 변화가 매우 심한 hypervariable 영역들과, 이 부분들 사이사이에 비교적 아미노산서열이 보존되어 있는 framework 영역들로 세분된다. H와 L사슬의 V영역내에는 hypervariable 영역이 각각 세군데 존재하고, 이들은 고리(loop)형태로서 항체의 표면에 노출되어 있으며 항원에 결합하는 부위로서의 기능을 갖기 때문에 complementary determining region들(CDRs 1, 2, 3)이라 명명되기도 한다(그림 1). H사슬의 C영역은 아미노산서열과 effector 기능의 차이에 따라 8종류의 isotype들이 존재하고, 각 isotype의 H사슬을 갖는 사람항체를 각각 IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA라 명명한다. L사슬의 C영역에는 Kappa(K)와 Lambda(λ)의 두 isotype이 존재하고, 이들의 기능적 차이는 거의 없는 것으로 인식되고 있다.

항체는 Y나 T 모양으로 되어 있고, 단백질분해효소인 papain에 의하여 서로 다른 기능을 가진 Fab (antigen-binding) 영역과 Fc영역으로 분리될 수 있다. 항체의 양팔 끝이 항원과 결합하는 부위이고 (Fab), 줄기를 이루는 부분이 항원은 제거하기 위한 effector 기능을 작동시키는 부위이다(Fc)(그림 1). effector 기능의 수행은 CDC와 ADCC의 두 가지 방법에 의하여 이루어진다. 즉, 항체가, 침입하는 생물의 세포표면에서 항원과 결합한 후 complement cascade를 활성화시킴으로써 세포를 용해시키거나 (complement dependent cytolysis, CDC), 항원에 결합하고 있는 항체의 Fc영역에 macrophage나 neutrophil과 같은 effector 세포들이 이것의 표면에 존재하는 Fc 수용체의 결합을 매개로 세포의 표면 항원에 결합하여 phagocytosis에 의하여 세포를 죽이게 된다(antibody-dependent cell-mediate cytolysis). 이 항체의 effector 기능은 isotype의 종류에 따라 다르다. 사람의 γ1 isotype은 CDC나 ADCC에서 가장 효과적임이 증명되었고(1, 2), 따라서 병원균이나 암세포에 대한 치료를 위해서는 가장 적절하다. 역으로, 활성이 없는 사람의 γ4 isotype을 진단의 영상화나 면역반응에 의한 손상을 막기 위한 데에는 유용할 것 같다(3).

2. 항체의 임상적 이용

상기한 바와 같은 항체의 구조와 기능에 대한 연구는 주로 myeloma 환자의 혈액으로부터 단일

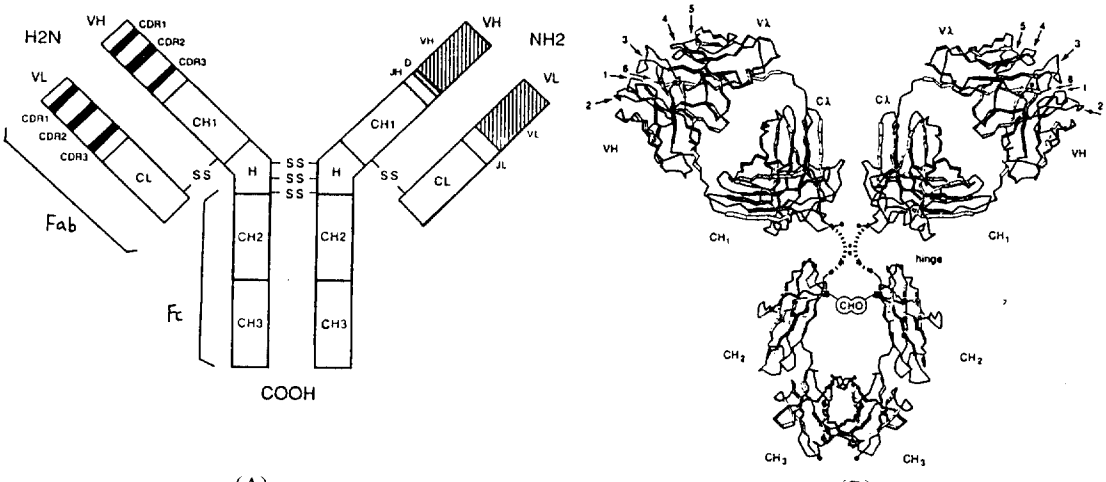


그림 1. IgG의 구조. (A) V_L, V_H, C_L, C_{H1}, H(Hinge), C_{H2}, C_{H3}의 각 영역을 상자로 표시하였다. V_H 영역내에는 V_H-D-J_H가 재조합되어 있고, V_L 영역내에는 V_L-J_L이 재조합되어 있다(오른쪽 팔에 표시됨). 또한 V_H와 V_L 영역내에는 CDRs(1, 2, 3)가 존재하고 이 부분들이 항원결합부위를 형성한다(왼쪽 팔에 표시됨). C_L과 C_{H1}의 말단부위에 interstrand disulfide bond의 위치를 도시하였고 Fab와 Fc 부분도 표시하였다. (B) 양팔의 숫자는 CDR 부분의 고리(loop)를 가르키는 것이다(참고자료 40으로부터 발췌한 것임).

특이성을 갖는 항체를 분리함으로써 가능하였지만, 주 단점은 이 항체의 특이성을 모른다는 점이다. 그러나, 1975년 Köhler와 Milstein에 의하여 특정 항원에 대한 생쥐단일클론항체를 생산할 수 있는 생쥐 하이브리도마(hybridoma) 기술이 개발된 이래(4), 임의의 단백질, 탄수화물, 핵산, hapten 항원에 대한 단일클론항체가 생산되어 광범위하게 기초연구뿐만 아니라 임상적인 응용에도 시도되어 왔다. 생쥐 단일클론항체는 임상적으로 진단을 위한 immunoassay와 affinity chromatography에 의한 치료제의 분리정제 등에 상당히 성공적으로 이용되고 있다. 그러나 *in vivo*에 진단과 치료를 목적으로 사용하기에는 몇가지의 근본적인 문제점들이 존재한다. 즉, 생쥐 단일클론항체를 인체에 주사하였을 때, 항체의 Fab와 Fc에 대한 인체의 면역반응을 유발시키므로, 그 효과가 감소하고 또한 부작용을 초래하는 경우가 많다(5, 6). 따라서, 항체를 임상적으로 이용하기 위해서는 사람의 단일클론항체를 생산하여야 한다.

그러나, 사람 단일클론항체를 하이브리도마기술로서 생산한다는 것은 어려움이 많다(7). 예를들면, 사람 B세포의 fusion partner로서 mouse myeloma를 사용하면 사람의 염색체가 소실되고 hybrid가 불안정하게 된다는 점, 또한 사람 B세포의 일차적 공급원인 peripheral blood lymphocyte (PBL)에는 면역반응에 관여하는 antigen reactive B세포, antigen presenting cell, T helper cell이 별로 없고 오히려 cytotoxic T세포나 suppressor T세포가 많이 존재한다는 점, 그리고, 사람 B세포를 Epstein-Barr virus(EBV)에 의하여 immortalization시킬 수 있는 효율이 낮을 뿐더러, immortalization시켰다 하더라도 세포수가 불안정하고 항체 생산 수준이 낮다는 점 등이다. 더구나, 사람을 해로운 화학약품이나 병원성 바이러스 혹은 암세포로 면역접종시킬 수 없다는 점도 문제가 된다. 위의 문제점들을 극복하기 위한 해결방안으로서, 최근에는 사람의 PBL로부터 enrich시킨 B세포에 항원을 *in vitro* immunization을 시켜 EBV로 변형시킨다던가(8, 9), 사람 림프구를 severe combined immunodeficient(SCID) mouse에 이식시킨 후 이 SCID mouse에 특정항원을 면역접종시켜서(10, 11), 특정 항원에 대해 친화도가 높은 사람 단일클론항체의 생산을 시도하고 있다.

3. 쥐 단일클론항체의 단백질공학

현재까지는 사람의 단일클론항체 생산방법이 확립되어 있지 않은 상태이므로, 한 가지 방법은 항원에 대해 친화도가 높으며 쉽게 생산이 가능한 쥐이

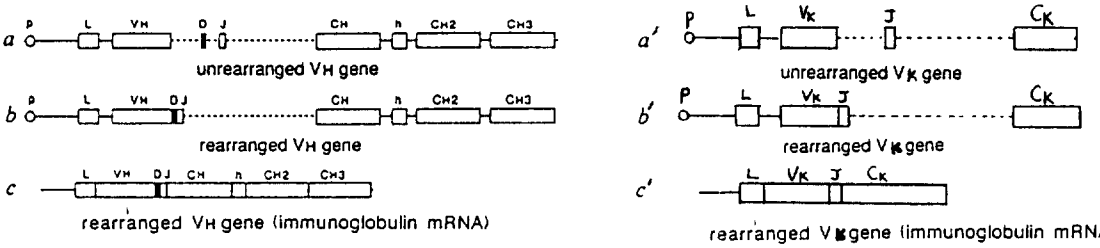


그림 2. 항체유전자의 구조. (A) Heavy 사슬 유전자 (B) Light 사슬 유전자. 항체의 각 domain에 해당하는 부분들이 서로 다른 exon에 의하여 암호되고, 이들은 B세포의 분화과정 중에 DNA 재배열을 통하여 모여진 후, 전사에 의하여 mRNA가 합성된다(P, promoter; L, Leader; V_K, V_H, variable 영역; D, Diversity region; J, Joining region).

단일클론항체를 유전자조작에 의하여 인간화시키는 것이다. 이것은 면역글로불린 유전자들의 구조적 단위가 항체의 구조적 및 기능적 단위와 일치하여 배열되어 있기 때문에 가능하다(그림 2). 즉, 면역글로블린의 H사슬과 L사슬 유전달은 V영역과 C영역을 암호하는 유전자가 nitron에 의해 분리되어 있고, C영역 자체도 C_{H1}, Hinge, C_{H2}, C_{H3}의 각 영역을 암호하는 유전자절편이 intron을 사이에 두고 떨어져 있다. 따라서 각 domain을 다른 종류로 치환시키거나 임의의 항체를 제조하기에 용이하다. 그림 3에는 여러 가지 형태의 engineered antibody들과 항체절편의 예들이 도식화되어 있다.

(1) chimeric 항체

Engineered antibody 중에서 가장 간단한 형태는, 항원과의 결합부위인 V영역은 쥐의 것을 쓰고, effector 기능을 나타내는 C영역은 사람의 것으로 대치시켜서 만든 chimeric 항체이다(12). 이것은 임상시험에서 쥐 단일클론항체보다 항체의 면역성을 감소시킴이 밝혀졌지만(13), 쥐의 V영역이 여전히 존재하므로 인체내에서 면역반응을 상당히 유발시킨다(6).

(2) 인간화된 항체

좀더 확실히 인간화시키는 방법은 사람 항체에 쥐의 CDR 부분들만 이식시켜서 인간화된 항체(humanized antibody)를 제조하는 것이다(2, 14, 15, 16). 이것은 V영역내에서 항원과 결합하는 부위인 CDR들이 고리를 이루고 있고, 고리들 밑에서 고리를 지지하고 있는 framework 부분들이 β-sheat를 형성하고 있기 때문에(17), 고리만 쥐의 것을 남겨두고 β-sheet는 사람의 것으로 대체시키면, 항원에 대한 결합특이성과 친화도를 보유하면서 인체내에서는 면역반응을 유발하지 않을 것이라는 개념이 밑받침되어 있다. 실제로 이것은 암 치료에서 그 효과가 입증이 되었다(18). 그러나 한 가지 문제는 고리들과 framework의 인접부위의 아미노산잔기들이 원래 항체와는 다르므로, 이들의 상호작용이 3차구조를 변형시켜서 항원결합에 대한 특이성과 친화도에 영향을 미친다는 것이다.

따라서 design한 항체의 구조를 modeling하고, 고리와 β-sheet의 인접부위의 아미노산잔기들을 *in vitro* mutagenesis 방법에 의하여 원래의 쥐 항체의 것으로 치환시키면, 친화도를 최적화할 수 있을 것이라 전망되고 있다(2, 19).

(3) Novel antibody

또한, antibody engineering에 의하여 항체의 C영역 대신 novel effector 기능을 갖는 다른 유전자와 (예를 들면 독소나 효소) 연결시켜 새로운 항체를 제조하거나(20, 21), 역으로 항체의 C영역에 항체가 아닌 다른 단백질(예를 들면 CD4를 Fc에 연결시킴)을 융합시킬 수도 있다(22). 뿐만 아니라, 서로 다른 특이성을 갖는 2종류의 hybridoma를 융합시켜 만든 hybrid hybridoma로부터 두 가지 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 bispecific antibody를 생산할 수도 있다(예를 들면 tumor의 target cell과 toxin 또는 Tc cell)(23, 24).

(4) 항체절편

그외에도, 항원결합능력을 보유하는 항체절편들도 (Mr 12-50 kd) 제조할 수 있다. 즉, Fab, Fv, single chain Fv, single V_H domain antibody 등이 그 예이다(그림 3). 분자량이 적은 항체절편을 항체 전

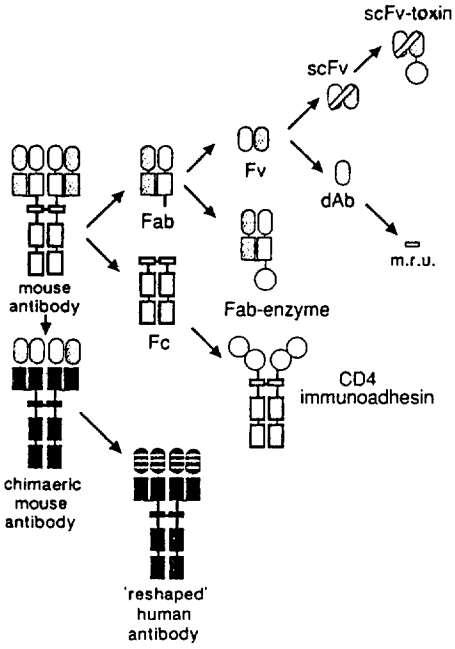


그림 3. Engineered antibodies와 fragments(ref. 40).
ScFV: Single chain Fv.
dAb: Single V_H domain antibody
m.r.u:minimal recognition units

체보다 더 좋은 조직침투성 갖으며(25), 혈액에서 소멸속도도 더 빠르므로(26), 이것을 방사성 동위원소와 결합시키면 생체진단(예를들면 tumor imaging)에 유용하리라 전망된다. 또한 항원결합부위의 X-ray crystallographic 연구 등의 기초연구에서도 완전한 항체보다는 Fab나 Fv의 사용으로 전환하고 있다(27, 28). 또 한 가지, 이 항체절편의 생산은 배양세포주에서는(21, 29) 물론 박테리아에서도(30-33) 가능하기 때문에, 항체절편은 앞으로 광범위하게 사용된 것으로 전망된다. 그러나, Fv와 같은 항체절편은 V_H와 V_L 사이에 disulfide bornd가 존재하지 않기 때문에 두 영역이 조립되지 않을 가능성이 높으므로, 두 영역 사이에 친수성의 peptide를 연결시켜 주어 single-chain Fv 절편을 만든다던가(34, 35), 두 영역 사이에 disulfide bond를 넣어주어야 하는(36) engineering을 더 요구한다.

4. New antibody engineering

전통적인 방법의 antibody engineering은 이미 알려진 특이성을 갖는 하이브리도마 세포주로부터 재배열된 V_H와 V_L 유전자를 클로닝한 후, 유전자 조작에 의하여 항체를 변형시키는 것이었다. 그러나, 요즈음 활발히 시도하고 있는 새로운 방법의 항체공학은 universal primer들을 사용한 polymerase chain reaction(PCR)을 통하여 V_H와 V_L DNA를 증폭시켜 V 유전자들을 구출해내고, primer들내에 제한효소 염기서열을 삽입시켜 발현벡터에 붙인 후, 직접 배양세포주에나(37) 박테리아에다(32, 38) 발현시킴으로서 V유전자를 클로닝하는 방법이다. 이것은 간단하기로는 하이브리도마로부터(37) 또는 불안정한 하이브리도마 세포융합이나(예를들면 쥐-사람 하이브리도마) 단일 하이브리도마세포로부터(39), 심지어 단일 B세포로부터도 단일클론항체를 생산하는 세포주를 유도해 낼 수 있는 새로운 방법이다. 반면, 면역접종을 받은 쥐로부터 분획하지 않은 전체 B세포로부터 PCR에 의하여 V_H와 V_L 유전자들을 구출해 낸 후 무작위적으로 조합시켜 λ 파아지에 붙인 후, 박테리아에서 발현된 Fab 항체 절편들을 검색하는 방법도 있다(38). 이 방법의 단점은 고친화도를 갖는 원래 항체의 V_H, V_L 쌍을 잃어버릴 수도 있다는 점이다. 왜냐하면, 오직 1000개의 다른 V_H와 V_L 유전자들로 조합된 library이라 원래의 항체를 얻기 위하여서는 $10^6 \sim 5 \times 10^6$ 클론들을 검색해야 되기 때문이다. 그러므로, 항원에 대한 친화도가 높은 원래의 항체 쌍을 얻기 위해서는, 소수의 antigen-selected B세포로부터 시작하며 강력한 검색방법을 사용하여야 할 것 같다.

참고문헌

1. Brüggeman, M. *et al.* (1987) *J. Exp. Med.* **166**, 1351-1361.
2. Riechmann, L. *et al.* (1988) *Nature* **332**, 323-327.
3. van der Zee, J.S., van Swieten, P. and Aalberse, R.C. (1986) *Clin. Exp. Immunol.* **64**, 415-422.
4. Köhler, G. and Milstein, C. (1975) *Nature* **256**, 52-53.
5. Benjamin, R.I. *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* **163**, 1539.
6. Brüggeman, M. *et al.* (1989) *J. Exp. Med.* **170**,

2153.
7. Roder, J. *et al.* (1986) *Meth. Enzymology* **121**, 140-167.
8. Borreback, C.A.K. *et al.* (1988) *PNAS* **85**, 3995-3999.
9. Borreback, C.A.K. (1989) *J. Immunol. Methods* **123**, 157-165.
10. Mosier, D.E. *et al.* (1988) *Nature* **335**, 257.
11. McCune, J.M. *et al.* (1988) *Science* **241**, 1632.
12. Neuberger, M.s. *et al.* (1985) *Nature* **314**, 268-270.
13. LoBuligo, A.F. *et al.* (1989) *PNAS* **86**, 4220-4224.
14. Jones, P.T. *et al.* (1986) *Nature* **321**, 522-524.
15. Verhoeyen, M. *et al.* (1988) *Science* **239**, 1534-1536.
16. Queen, C. *et al.* (1989) *PNAS* **86**, 10029-10033.
17. Kabat, E.A. *et al.* (1987) Sequences of proteins of immunological interest (US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office).
18. Hale, G. *et al.* (1988) *Lancet* **11**, 1394-1399.
19. Chaudhary, S. *et al.* (1987) *Nature* **328**, 731-734.
20. Chaudhary, V. K. *et al.* (1989) *Nature* **339**, 394-393.
21. Neuberger, M.S. *et al.* (1984) *Nature* **312**, 604-608.
22. Byrn, R.A. *et al.* (1990) *Nature* **344**, 667-670.
23. Lanzavecchia, A. and Scheidegger, D.E. (1987) *J. Immunol* **131**,
24. Clark, M. and Waldmann, H.J. Matu. (1987) *Cancer Inst.* **79**, 1393-1400.
25. Sutherland, R. *et al.* (1987) *Cancer Res.* **47**, 1627-1633.
26. Covall. D.G. *et al.* (1986) *Cancer Res.* **46**, 3969-3978.
27. Saul, F.A. *et al.* (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 585-597.
28. Boulot, G. *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 617-619.
29. Riechmann, L. *et al.* (1988) *J. Mol. Biol.* **203**, 825-828.
30. Skerra, A. and Plückthun, A. (1988) *Science* **240**, 1038-1040.
31. Better, M. *et al.* (1988) *Science* **240**, 1041-1043.
32. Ward, E.S. *et al.* (1989) *Nature* **341**, 544-546.
33. Milstein, C. (1990) *Proc. R. Soc. B.* **239**, 1-16.
34. Bird, R.E. *et al.* (1988) *Science* **423**, 423-426.
35. Huston, J.S. *et al.* (1988) *PNAS* **85**, 5877-5883.
36. Glockshuber, R. *et al.* (1990) *Biochemistry* **29**, 1362-1367.
37. Orlandi, R. *et al.* (1989) *PNAS* **86**, 3833-3837.
38. Huse, W.O. *et al.* (1989) *Science* **246**, 1275-1281.
39. Larrick, J.W. *et al.* (1989) *Biotechnology* **7**, 934-938.
40. Winter, G. (1991) *Nature* **349**, 293-299.