

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C12N 5/00

(45) 공고일자 1991년10월19일
(11) 공고번호 91-008637

(21) 출원번호	특1984-0003916	(65) 공개번호	특1985-0001282
(22) 출원일자	1984년07월06일	(43) 공개일자	1985년03월16일
(30) 우선권 주장	122579 1983년07월06일 일본(JP)		
(71) 출원인	야마사 쇼오유 가부시끼가이샤	하마구찌 미찌오	
	일본국 지바켄 켄오시시 아라오이쵸오 2쵸오메 10반지노 1		
(72) 발명자	야자끼 요시오		
	일본국 도오쿄오도 분쿄오꾸 고이시까와 4쵸오메 20반 5고오 805		
	스기 마사히토		
	일본국 지바켄 켄오시시 사까에쵸오 2쵸오메 2반지노 2		
(74) 대리인	장용식		

심사관 : 김성완 (책자공보 제2531호)

(54) 심근 미오신 중사슬에 대한 단일클론항체

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

심근 미오신 중사슬에 대한 단일클론항체

[도면의 간단한 설명]

제1도 내지 제6도는 본 발명 항체로 염색된 인심방근 또는 심실근의 절단표본을 형광현미경으로 찍은 사진이다.

제1도는 CMA-19 세포주에 의하여 생성된 항체로 염색된 정상인 심방근,

제2도는 동일한 정상인 심실근을 나타내고,

제3도는 HMC-14 세포주에 의하여 생성된 항체로 염색된 정상인 심실근,

제4도는 동일한 정상인 심방근을 나타낸다.

제5도는 HMC-14 세포주에 의하여 생성된 항체로 염색된 심장판막중 환자의 심방근을 나타내고,

제6도는 CMA-19 세포주에 의하여 생성된 항체로 조직 염색된 심장판막중 환자의 심방근을 나타내는 데 여기서 밝은부분이 염색된 부분을 나타낸다.

제7도는 본 발명 항체의 사용으로 조직염색됨에 따라 심방압과 심방근중의 V_3 미오신 아이소자임(B형)의 비율간의 관계를 나타내는 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]

이 발명은 심근 미오신 중사슬의 아이소자임에 대하여 특이성이 있는 신규한 단일클론 항체에 관한 것이다.

근년에, 높은 특이성을 갖는 항체를 많은 양 얻기 위한 방법으로서, 항체-생성세포를 골수종(myeloma) 세포로 융합하고, 이와 같이 융합되어 얻어진 히브리도마를 배양함으로써 단일클론 항체를 생산하는 히브리도마 제조법이 공지되어 왔으며[Milstein et al, Nature, Vol.256,P.495(1975)] 많은 수의 단일클론 항체가 이러한 방법에 의하여 얻어졌다.

근(筋)연구분야에 있어서 근 단백질에 대한 항체가 오랫동안 이용되었다. 근은 횡문근과 평활근의 둘로 크게 구분된다. 횡문근은 심근과 골격근으로 더 구분되는데 골격근은 속근과 지근으로 더 구분

된다.

이들은 근육의 주성분인 미오신 분자의 면역성의 차이로부터 면역화학적으로 구별이 될 수 있음이 보고되어 있다.

[Masaki et al; J.Bio.Chem.Vol.76, p441(1974)].

최근에 심근에 관해서도 두 아이소자임 즉, 하나는 높은 ATPase 활성을 갖는 V_1 (α 형)이고 다른 하나는 낮은 ATPase 활성을 갖는 V_3 (β 형)인데 [Yazaki et al : Circulation Research, Vol.35 p.15(1974) ; Houet al : J.Mol.Cell.Cardiol.Vol.10, p.1053(1978)], 이 둘의 존재가 명백해졌다. 일반적으로 말하면 사람, 소, 개등과 같은 동물에 있어서 심방근은 주로 V_1 (α 형)을 포함하고 반면에 심실근은 실질적으로 V_3 (β 형)을 포함한다. 따라서, α 형 또는 β 형 미오신에 특이한 단일클론 항체를 제조하는 것이 가능하다면 심방근과 심실근은 비오틴-아비단계와 같은 방법에 의하여 염색분류할 수 있다. 또한, 이들 항체는 방사성동위원소로 라벨될 수 있고 심근경색의 부위별 진단에 사용될 수 있다.

클라크(W.A.Clark)등은 닭 또는 토끼 심근미오신으로 생쥐와 쥐를 면역하고 심근미오신 중사슬과 반응한 단일클론 항체를 얻었다[Biochem.Biophys.Res.Comm.Vol.95,P.1680(1980)]

그들은 얻어진 것들중 하나의 주(株)가 닭심근에 특이적이고 인심근과는 반응하지 않음을 보고하였다. 다른 두주는 닭, 토끼 및 쥐의 심근과 반응하고 또한 인심근과도 반응하나 그들은 또한 골격근과도 반응하므로 그렇기 때문에 심근에 특이적이지 않다.

이들 항체는 β 형에 대하여 α 형의 인심근 미오신을 식별하지 못하며, 그 역도 마찬가지이다.

또한, 클라크등은 닭심근 미오신 또는 토끼 심근 미오신으로 쥐를 면역하고 심근 미오신중사슬 V_1 형과 심근 미오신 중사슬 V_3 형에 대한 단일 클론항체를 얻었다. [(J.Biol.Chem., Vol.257,p.5449(1982))].

그러나, 이들 항체는 그의 아이소자임들 사이에 교차반응성도 또한 나타냄을 보여주며 인심근미오신에 대한 그들의 특이성에 대해서는 아무 것도 나타나 있는 바가 없다.

본 발명을 요약하면 다음과 같다. 본 발명은 상기한 바와 같은 기술적 배경 하에 달성되었고 심근 미오신 중 사슬의 아이소자임에 대하여 특이성이 있는 단일클론항체를 제공한다.

좀더 상세히는, 본 발명은 심근미오신 중 사슬 α 형에 특이성을 가지나 심근미오신 중사슬 β 형을 인식하지 않는 단일 클론항체와 또한 심근미오신 중사슬 β 형에 특이성을 가지나 심근미오신 중사슬 α 형을 인식하지 않는 단일클론항체를 제공한다.

본 발명 항체는 상기한 바와 같이 심근에 관계된 생화학적 및 병리학적 연구에 중요한 시약으로서 유용하다.

또한, 본 발명 항체는 테크니툼 -99m, 인듐등과 같은 방사성동위원소로 라벨 될 수 있고 면역검출(immunodetection)에 적용될 수 있는데, 그것은 환자에게 투여 후 전신감마선 티그래피에 의하여 측정되어, 이로써 심근경색의 부위별 진단이 가능하게 된다. 특히, 심실근 경색과 합병되기도 하는 심방근 경색의 진단에 유용하다.

본 발명 항체로 면역측정(immunoassay)을 수행함으로써 심근 경색의 동안에 혈중의 미오신 중사슬의 누출을 검출하는 것이 또한 가능한 것으로 생각된다. 따라서 발명항체는 심근경색의 예후에도 유용하게 된다. 이제본 발명을 상세히 설명하겠다. 본 발명 항체는 심근 미오신의 아이소자임을 인식할 수 있는 특징을 갖는 기술상 공지되어 있는 항체와는 구별이 될 수 있다.

본 발명 항체의 그 이상의 유용한 특징은 인심근 미오신의 아이소자임을 식별할 수 있는 것, 특히 한가지 아이소자임에 특이성을 갖고 다른 것은 식별하지 않는 것이다.

본 발명항체는 그 제조방법 또는 제조형태에 있어서 특별히 제한되어 있지 않는데, 목적에 따라 적당히 선택될 수 있다. 본 발명 항체를 생성하는 하이브리도마는 일반적으로 실행되는 세포융합법을 적용함으로써 얻어질 수 있다. 이제이 세포 융합 법을 설명하기로 한다.

(1) 항체 생성세포의 제조

항체 생성세포의 제조는 인심방미오신(α 형), 인 심실미오신(β 형) 또는 소, 말 또는 돼지로부터 제조된 인심근 미오신 α 형 또는 β 형에 면역화학적으로 동등한 심근미오신으로 생쥐, 쥐, 토끼, 양, 말, 소 등과 같은 이종동물을 면역하고 비(脾)세포, 흉선세포, 임파절세포 및/또는 말초혈세포로부터 항체생성 세포를 취함으로써 수행된다.

(2) 골수종 세포의 제조

골수종 세포로서 생쥐, 쥐, 토끼와 같은 여러 가지 동물 및 사람으로부터의 세포주가 사용될 수 있다. 사용되는 세포주는 바람직하게는 약제저항성이어야 하며 선택배지내에서는 생존하지 않으나 융합후에 생존하여야 한다. 가장 통상적으로 사용되는 세포주는 8-아자구아닌 저항성 세포주인데, 하이포 크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제내에서 결손 하여 하이포크산틴-아미노프테린-디미딘(HAT)배지 내에서 성장될 수 없다. 세포주는 또한 "비분비성"형태인 것이 바람직하다.

이러한 세포주의 전형적인 예들은 생쥐 골수종 MOPC-21세포주로부터 유도된 $P_3/x63-Ag\ 8U_1(P_3U_1)$, $P_3/x63-Ag/8\ 6\cdot5\cdot3(x63\cdot5\cdot3)$, $P_3/NS1-1-Ag\ 4-1(NS-1)$, Sp210-Ag14(SP2)이다. 쥐 골수종 210 RCY 3Ag $1\cdot2\cdot3(Y3\ Ag\ 1\cdot2\cdot3)$ 및 인 골수종 U-266-AR₁, 그리고 GM 1500도 또한 유용하다.

(3) 세포융합

세포융합은 이글(Eagle)의 최소기본배지(MEM)와 RPMI 1640과 같은 동물세포 배양용 배지내에서 10^7 내지 10^8 개의 골수종세포를 항체생성세포와 1 : 4 내지 1 : 10 혼합비율로 혼합함으로써 수행된다.

융합보조제로서, 1,000내지 6,000의 평균분자량을 갖는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알콜, 바이엇, 또는 기타를 사용하는 것이 가능하다.

(4) 선택배지내의 히브리도마의 선별

세포융합과정 후 세포로부터의 히브리도마의 선별은 선택배지내의 선택적인 성장에 의하여 행할 수 있다. 예를 들면 세포를 예를 들어서 15%의 소 태아혈청을 함유하는 RPMI 1640배지로 적당히 희석하고 미소 적정판(microtiter plate)에 약 10^5 - 10^6 세포/웰(well) 정도로 덮고, 선택배지(예로써, HAT 배지)를 각 웰에 가하는데 각 단계에 이어서 선택배지의 적당한 교환을 한다. 예를 들면, 8-아자구아닌 저항성 세포주가 골수종 세포로서 사용되고 선택배지로서 HAT배지가 사용될 때 미융합 세포들은 배양 후 약 10일째에 사멸할 것이며 항체생성세포는 체외에서 오랜 기간 성장할 수 없다. 따라서, 10일 내지 14일째 날에 성장된 세포는 모두 히브리도마이다.

(5) 항-심근 미오신 중사슬 α 항체 및 항-심근 미오신 중사슬 β 항체를 생성하는 히브리도마의 검색.

항-심근 미오신 중사슬 α 항체 및 항-심근 미오신 중사슬 β 항체를 생성하는 히브리도마의 검색은 효소면역측정법(Enzyme Linked Immunosorbant Assay)에 따라서 수행하였는데, 이것은 이후부터 "ELISA"라 칭하였다.

좀 더 상세히는, 소 심방근 미오신과 같은 심근 미오신 중사슬 α 형 또는 인 심실근 미오신과 같은 심근 미오신 중사슬 β 형을 미리 인산염 완충 생리식염수(PBS) 또는 탄산수소나트륨(pH 8.0)과 같은 완충액 내에 10-100 μ g/ml로 용해시킨다.

각 50 μ l의 묽을 ELISA용 폴리비닐클로라이드(PVC)판과 같은 유연한 판(9웰)에 가하였다. 그리고 그 판을 4°C에서 하룻밤 방치한다.

다음에, 항원을 따르고 PBS로 세정한 후, 1% 소혈청 알부민(BSA)을 함유하는 PBS를 첨가하고 혼합물을 실온에서 한 시간동안 방치하여 항원이 결합되지 않는 부위를 BSA로 블로킹한다. 각 웰의 상등액으로부터 50 μ l의 묽을 첨가하고 실온에서 한 시간동안 방치하고 PBS로 세 번 세정한다. 다음에 비오틴 항-쥐 면역글로부린 혈청(제2항체)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 한 시간동안 방치한다. PBS로 세 번 세정한 후 아비딘 D-효소작물을 첨가하고 혼합물을 실온에서 15분간 방치한다. PBS로 네 번 세정한 후 효소용 기질을 첨가하여 광학밀도를 측정한다.

항원에 특이한 단일클론 항체를 포함하는 웰은 위에 기술한 바와 같은 방법에 따라 쉽게 판별될 수 있어서, 이로써 히브리도마의 검색이 수행될 수 있다.

(6) 클로닝

각 웰내에 둘 또는 그 이상의 히브리도마가 포함될 가능성이 있다. 그러므로 클로닝은 단일 클론 항체-생성 히브리도마를 얻기 위하여 예를 들어서, 한계 희석법에 따라서 행한다.

(7) 항체의 생성

가장 순수한 단일클론항체는 10내지 15% 소태아혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 또는 무혈청배지와 같은 동물세포배양용 배지 내에서 상기 단일클론항체를 생성하는 히브리도마를 배양하고 상등액으로부터 항체를 얻음으로써 얻을 수 있다.

세포배양 방법 및 조건들에 대하여는, 동물세포 배양방법에 재래적으로 사용된 것들을 알맞게 적용할 수 있다.

한편, 많은 양으로 항체를 생산하기 위한 방법으로서, 프리스탄(2, 6, 10, 14-테트라메틸펜타데칸)과 같은 광물유를 히브리도마의 친(親)골수종이 유래된 동계동물에 복강내 투여를 한후, 히브리도마를 그안에서 많은 양으로 증식되도록 복강내 주사를 하는 방법을 사용하는 것이 가능하다. 히브리도마는 10-18일 이내에 복수종양으로 성장하고 혈청과 복수액내에 고농도로(약 1내지 20mg/ml) 항체를 생성하게 된다.

정제가 필요할때는, DEAE셀룰로오스 이온 교환 컬럼크로마토그래피, 심근 미오신이 결합되거나 한 세파로우스 4B를 사용하는 어피니티 컬럼 크로마토그래피, 또는 분자체(gel filtration)컬럼 크로마토그래피와 같은 방법에 의하여 황산암모늄 분별(fractionation)후에 정제를 수행할 수 있다.

지금까지 얻어진 본 발명 항체를 생산하기 위한 바람직한 히브리도마의 예들은 심근 미오신 중사슬 α 형에 특이성이 있는 세포주를 생성하는 항체로서 히브리도마 CMA-19세포주, 그리고 심근 미오신 중사슬 β 형에 특이성이 있는 항체생성주로서 히브리도마 HMC-14세포주, HMC-48세포주 및 HMC-50세포주이다.

본 발명의 바람직한 구체예의 설명으로서, 이들 히브리도마의 제조방법과 본 발명 항체의 특성을 이하에 상세히 기술하기로 한다.

1. 히브리도마 취득

소심방근 미오신(1mg/ml) 또는 인 심실근 미오신(1mg/ml)을 생리식염수에 용해시키고 완전 프룬드 어주번트(complete freund's adjuvant)와 1 : 1의 비율로 혼합하여 에멀션을 제조하였다. 에멀션을 BALB/C 생쥐(암컷, 6주일생)에 2주마다 여러 번(50 μ g/마리) 복강 내 투여를 하였고 최종적으로 30 μ g

의 소심방근 미오신 또는 인 심실근 미오신을 복강 내에 투여 하였다.

최종면역 3일 후, 생쥐로부터 비(脾)세포를 취해서 MEM으로 세정하였다. 생쥐 골수종세포 P₃U₁을 MEM으로 세정하고 비 세포와 10 : 1의 비율로 혼합하였다. 원심 분리 후 50% PEG 100° MEM용액 1ml를 이와 같이 얻은 펠릿 또는 케익에 점차적으로 가하여 세포융합을 행하였다. 또한, MEM용액을 점차적으로 가하여 최종 량 10ml를 얻었다.

다시 원심분리를 행하였고 펠릿을 15% 소태 아혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지내에 P₃U₁으로서 1×10^5 세포/0.1ml로 현탁시켰으며 0.1ml/웰 내의 96-웰 마이크로판상에 분주하였다.

1일 후, HAT배지의 각 0.1ml의 몫을 가하였고 그후 3-4일마다 배지의 반을 신선한 HAT 배지로 갈아 주었다. 약 7일째에 몇몇 웰내에서 히브리도마의 성장이 식별되었다.

상등액 각각 50 μ l의 몫들을 소심방근 미오신(α 형) 또는 인 심실근 미오신(β 형으로 사전에 코우팅된 96-웰 유연판에 가하였다.

아비딘 D-효소 컨주게이트로서 아비딘 D-퍼옥시다제(Vector co.제품) 그리고 기질과 발색제로서 과산화수소, 4-아미노안티피린 및 페놀을 상기한 바와 같이 ELISA방법에 따라 사용함으로써, 소심방근 미오신과 반응하나 인심실근 미오신과는 반응하지 않는 상등액(심근미오신 중사슬 X형에 특이성을 갖는 단일 클론항체가 이상등액에 포함되어 있다) 그리고 인심실근 미오신과는 반응하나 소심방근 미오신과는 반응하지 않는 상등액(심근 미오신 중사슬 β 형에 특이성을 갖는 단일클론항체가 이상등액에 포함되어 있다)이 선별되었고 히브리도마는 한계 희석법에 의하여 클로우닝을 행하였다.

그 결과, 심근 미오신 중사슬 α 형에 특이성을 갖는 항체를 생성하는 히브리도마 CMA-19 세포주, 그리고 심근 미오신 중사슬 β 형에 특이성을 갖는 항체를 생성하는 HMC-14세포주, HMC-48세포주 및 HMC-50세포주를 얻었다.

II. 단일클론항체의 생산

히브리도마 CMA-19세포주, HMC-14세포주, HMC-48세포주 및 HMC-50세포주를 15% 소태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 96-웰판, 다음에 25cm² 플라스크로 규모를 늘려 배양하였고 배양상등액을 수집하였다.

이들 상등액의 항-심근 미오신 항체의 역가는 ELISA방법에 의하여 결정하여 제1표에 나타나 있는 결과들을 얻었다. 역가는 코우팅된 항원에 대하여 충분한 양의 항체가 존재하는 시료에 대하여 ELISA 방법에 의하여 얻은 것을 100%로 하여 50%의 흡광도를 주는 원용액으로부터의 항체시료의 희석배율로서 표현된다.

[표 1]

히브리도마 세포주	소심방근미오신에 관한 역가	인심실근 미오신에 관한 역가
CMA-19	25	-
HMC-14	-	125
HMC-48	-	625
HMC-50	-	625

이들 항체는 인 골격근과 실질적으로 교차 반응성이 없음을 나타내었다.

III. 항체의 서브클래스(subclass)의 결정

96-웰 유연 마이크로판을 각 단일클론항체로 코우팅하고 1% BSA함유 PBS로 블로킹한 후, MONOABID EIA KIT(ZYMED Co. 제품)에 의하여 항-IgA항체, 항-IgG₁ 항체, 항-IgG₂ a항체, 항-IgG₂ b항체, 항-IgG₃항체 및 항-IgM항체와의 반응을 관찰하여 각 단일클론항체의 서브클래스를 결정하였다. 또한 L사슬의 항 K항체, 항 λ 항체와의 반응성을 조사하여 형을 결정하였다.

그 결과, CMA-19세포주에 의하여 생성된 항체는 IgG₁/K이고, HMC-14세포에 의하여 생성된 항체는 IgG_{2a}/k 그리고 HMC-48세포주와 HMC-50세포주에 의하여 생성된 항체는 IgG_{2b}/k임을 발견하였다.

IV. 본 발명 항체와의 조직염색

판막이식등을 위한 심장절개수술시 채취한 인 심방근 및 심실근을 Tissue-TEK II에 의하여 고정시킨 후 크리오스타트에 의하여 절단표본을 제조하였다.

이들 절단표본들은 본 발명 항체를 사용하여 비오틴-아비딘계에 따라 염색되었다.

좀더 상세히는, 각 절단표본을 제1항체로서 본 발명항체와 PBS(0.01M, pH 7.2)내에서 37°C에서 40분간 인큐베이트하였다.

다음에, 다시 세정한후, 제2항체로서 비오틴-항-생쥐 IgG 항체(TAGO Co., 사람의 간호모제네이트 및 혈청으로 흡수후 20배 희석하여 사용됨)와 인큐베이션을 동일하게 수행하였다. 또한 다시 세정후, 플루오레세인 이소티오시아네이트 표식(label)된 아비딘(E.Y.Laboratories Co., 사람의 간호모제네이트 및 혈청으로 흡수후 20배 희석하여 사용됨)과도 같은 방법으로 인큐베이트하였다. 이 시료는 세정하고 글리세린으로 밀폐하여 형광염색 표본을 제조하였다.

이들 표본을 형광현미경하에 검사하였다. 그 결과, CMA-19세포주에 의하여 생성된 항체가 사용되었을 때 정상인 심방근내에서 95내지 96%의 세포들이 염색되었다 (제1도 참조). 그러나 10%이하의

심실근 세포들이 염색되었다(제2도 참조). 한편, HMC-14 세포주가 사용되었을 때는 100%의 심실근 세포들이 염색되었으나(제3도), 단지 20내지 30%의 심방근 세포들만이 염색되었다(제4도 참조). (정상인 심방근의 20-30%가 α β 의 형태로 존재한다)

반대로, 판막증 환자의 심방근에서는 심방근내의 HMC-14세포주에 의하여 생성된 항체로 염색된 세포는 증가하였고(제5도 참조) CMA-19세포주에 의하여 생성된 항체로 염색된 부분은 대응하여 감소하였다(제6도 참조)

이 현상은 판막증의 심방근 미오신의 α 형으로부터 β 형으로 아이소자임상의 변화가 일어남을 말한다.

더욱이, 심방압과 심방근내의 V_3 미오신 아이소자임(β 형)의 비율간의 관계는 본 발명항체를 사용하여 조직염색에 의하여 검사하였는데 이것으로 제7도에 나타난 결과가 얻어졌다.

즉, 정상인 심방근에서 심방압은 5mmHg 또는 그 이하이고 β 형 아이소자임의 함량은 10% 또는 그 이하만큼 적다. 한편, 판막증환자에 있어서는 심방압은 10mmHg 또는 그 이상이고 심방근미오신의 아이소자임패턴은 α 형은 감소하고 β 형은 증가한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 인심근 미오신 중사슬 또는 인심근 미오신 중사슬에 면역 화학적으로 동등한 미오신 중사슬로 이루어지는 항원으로 동물을 면역하여 이와 같이 면역된 동물로부터 항체 생성세포를 얻는 단계, (b) 이와 같이 얻은 세포와 골수종 세포를 세포융합시켜, 항체를 생성할 수 있고 증식할 수 있는 히브리도마를 얻는 단계, (c) 이와 같이 얻은 히브리도마를 시험관내에서 또는 체내에서 배양하여 인심근 미오신 중사슬의 아이소자임에 대해 특이성이 있는 단일클론 항체를 얻는 단계들로 이루어지는 것을 특징으로 하는 인심근 미오신 중사슬의 아이소자임에 대해 특이성이 있는 단일클론 항체의 제조방법.

청구항 2

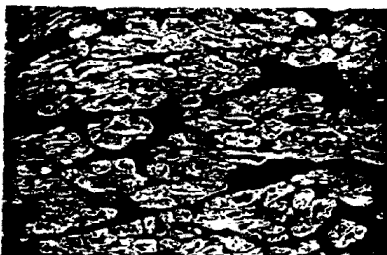
제1항에 있어서, 단일클론 항체는 인심근 미오신 중사슬 α 형에 특이성을 가지나 인심근 미오신 중사슬 β 형은 인식하지 않는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단일클론 항체는 인심근 미오신 중사슬 β 형에 특이성을 가지나 인심근 미오신 중사슬 α 형은 인식하지 않는 것을 특징으로 하는 단일클론 항체의 제조방법.

도면

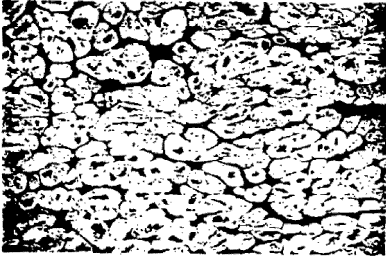
도면1



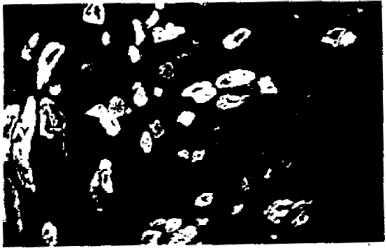
도면2



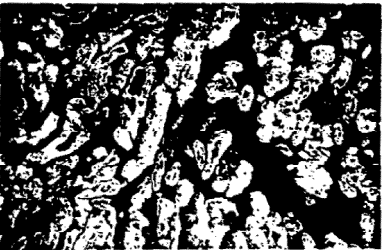
도면3



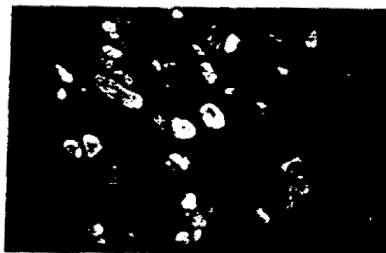
도면4



도면5



도면6



도면7

