(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
C07K 16/18

(45) 공고일자 2005년01월15일
(11) 등록번호 10-0457445
(24) 등록일자 2004년11월06일

(21) 출원번호 10-1998-0012023
(22) 출원일자 1998년04월06일

(65) 공개번호 10-1998-0081116
(43) 공개일자 1998년11월25일

(30) 우선권주장 97-88538 1997년04월07일 일본(JP)

(73) 특허권자
토키와카가쿠코교 카부시키가이샤
일본국 토쿄토 토시마쿠 카미이케부쿠로 4쪼메 16-22

이시다 유이치
일본국 사이타마켕 키타카츠시카군 와시미야마찌오오아자히가시오오와1947 웨스트하이츠 8-205

(72) 발명자
무라카미 카즈오
일본국 이바라키켕 츠쿠바시 칸논다이 1-37-16

나카무라 유키오
일본국 기후켕 기후시 닛코쪼 4-16-4

스즈키 후미아키
일본국 기후켕 기수히 탄지마 6-4-12

이시다 유이치
일본국 사이타마켕 키타카츠시카군 와시미야마찌오오아자히가시오오와1947 웨스트하이츠 8-205

하타노 야스히코
일본국 사이타마켕 토코로자와시 코토부키쪼 6-9 렌가칸 108-305

(74) 대리인
신중훈
임옥순

심사관 : 조영균

(54) 신규한 항체, 이것을 함유하는 레닌활성물질 및 이것을 이용한 프로레닌 측정방법

요약

본 발명에 의하면, 인체프로레닌 프로프라그먼트의 N말단펩티드중 제 1번째의 로이신잔기로부터 제 15번째의 아르기닌잔기까지의 15개의 아미노산잔기로 이루어진 펩티드를 특이적으로 인식함으로써 프로레닌을 활성화시키는 단리·정제된 인체프로레닌 프로프라그먼트 N말단펩티드항체 및 이것과 인체프로레닌과의 결합체가 제공된다. 또, 상기 항체는 프로레닌측정시약으로서 사용될 수 있으며, 즉, 상기 인체프로레닌 프로프라그먼트 N말단펩티드항체는 혈중의 인체프로레닌측정용 시약으로서 유용하다.

대표도

도 6

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 인체프로레닌과 pf의 N말단펩티드항체 IgG를 반응시킨 때의 IgG농도와 인체프로레닌양과의 관계를 표시한 그래프
도 2는 인체프로레닌과 pf의 N말단펩티드항체와의 반응에 있어서의 pf의 N말단펩티드항체의 저해작용을 표시한 그래프
도 3은 pf의 N말단펩티드항체 IgG와 프로레닌과의 결합체의 활성화능의 용량의존성을 표시한 그래프
도 4는 pf의 N말단펩티드항체 IgG의 프로레닌결합능과 겔여과크로마토그래피에서의 용출분획과의 관계를 표시한 그래프
도 5는 프로레닌과 pf의 N말단펩티드항체와의 분자량을 추정하기 위한 비교그래프
도 6은 트립신활성화법과 본 발명의 측정시약을 이용한 방법과의 상관성을 표시한 그래프
도 7은 프로레닌농도와 Ang I생산량과의 관계를 표시한 그래프
도 8은 농도의 함수로서 3종류의 인체프로레닌에 대한 본 발명의 측정시약의 효소활성을 표시한 그래프

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인체프로레닌과 결합하여 면역복합물을 형성할 수 있는 신규한 인체프로레닌의 프로프라그먼트(profragment; 이하 'pf'라 표기함)의 N말단펩티드항체, 이 항체가 인체프로레닌과 결합해서 형성된 레닌활성물질 및 이것을 이용한 측정시약에 의한 측정방법에 관한 것이다.
프로레닌은, 주로 신장에 있어서, 완숙형 레닌의 전구체로서, 즉 완숙형 레닌에 43개의 아미노산잔기로 이루어진 프로프라그먼트가 결합한 것으로서 생산되는 효소활성을 지니지 않는 물질이며, 당뇨병환자가 혈관장해증을 합병증으로 일으키면, 그 중증도에 따라서 혈중의 인체프로레닌의 농도가 상승하고, 병세가 완화되면 이 농도는 저하하므로, 혈중의 인체프로레닌의 농도는 당뇨병성 혈관장해의 마커로서 제안되고 있다(The New England Journal of Medicine, 제 312권, 제 1412-1417페이지 (1985년), Memoirs of Tokyo Women's Medical College, 제 60권, 제 342-350페이지(1990년) 및 Clinical Investigator, 제 71권, 제 3 6페이지(1993년)참조).
이것과 관련해서, 인체혈장속의 프로레닌농도를 측정하는 방법이 이제까지 몇가지 제안되어 있으나, 인체혈장속에는 효소단백질로서의 완숙형 레닌과 완숙형 레닌의 전구체로서의 효소학적으로 불활성인 인체프로레닌이 존재하므로, 혈장속의 인체프로레닌을 미리 저온하에서 산에 의해 부분적으로 활성화하고, 트립신을 이용해서 완숙형 레닌으로 변환한 후 총레닌량을 효소학적 방법으로 총레닌활성량으로서 혹은 면역학적 방법으로 총활성레닌량으로서 구하고, 별도로 레닌활성량을 효소학적 방법 또는 활성레닌량을 면역학적 방법으로 구하여, 이것을 상기에서 얻어진 총레닌활성량 또는 총활성레닌량으로부터 빼서 얻어진 차로서 인체프로레닌의 양을 산출한다고 하는 간접적인 방법을 행해야만 했다.
또, 여기서 완숙형 레닌이란, 프로레닌으로부터의 프로프라그먼트부가 프로세싱효소에 의해 분리된 후 얻어진 구조체로, 효소활성부위가 개방되어 있으므로 레닌활성을 표시할 수 있는 것을 의미한다. 또, 상기 레닌활성이란 효소단백질인 완숙형 레닌의 본질적 기능으로서의 효소활성능, 즉 레닌기질(앤지오텐시노겐)에 선택적으로 작용해서 앤지오텐신 I(Ang I)을 산출하는 성능이다.
그런데, 최근 불활성인 인체프로레닌이 저분자 레닌저해제와 결합하는 효과를 이용해서 상기 프로레닌을 개방형 구조로 변환하는 방법이 발견된 결과, 레닌활성부위근방을 특이적으로 인식할 수 있는 모노클로날항체를 이용한 면역학적 방법에 의해 총활성레닌량을 측정하는 것이 가능해지고, 또 레닌저해제를 첨가하지 않고 활성레닌량을 구하여, 총활성레닌량과 상기에서 구한 활성레닌량과의 차로부터 인체레닌량을 산출하는 방법이 개발되었다(Clinical Chemistry, 제 42권, 제 1051 1063페이지(1996년)참조). 이 방법은, 종래의 트립신활성 효소학적 방법 또는 트립신활성화법에 의한 레닌활성측정법에 비해서, 트립신에 의한 인체프로레닌 및 완숙형 레닌의 과도적인 분해를 억제할 수 있는 점에서 이점이 있고, 또 트립신활 성화법과의 상관도 양호하지만, 혈중의 프로레닌 역가(titer)가 상승하는 당뇨병의 경우에서는 상기 얻어진 레닌활성값이 진정한 레닌활성값보다도 양의 방향으로 기울어진다고 하는 결점이 있다. 또한, 이 방법에 있어서는, 총레닌활성량과 레닌활성량을 그때마다 측정해야만 하므로 번잡함을 수반한다.
그밖에, 직접법으로서, 인체프로레닌의 pf의 C말단부, 즉 29 43번째의 아미노산잔기를 항원으로서 인식할 수 있는

모노클로날항체와 이 모노클로날항체와 완숙형 레닌의 양자를 인식할 수 있는 레닌모노클로날항체를 이용하는 면역학적 측정법도 알려져 있다(Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 제 75권, 제 617 623페이지(1992년)참조).
이 방법은, 트립신활성화법과 매우 좋은 상관성을 나타내는 외에, 건강한 사람으로부터 채혈한 혈중의 프로레닌 역가의 측정에도 이용할 수 있을 정도로 높은 감도를 가진다고 하는 장점이 있으나, 측정에 의해 얻어진 값이 트립신활성화법에 의해 얻어진 값에 비해서 마이너스쪽으로 기울어서 약 80%로 낮은 값을 표시하는 경향이 있고, 특히 인체프로레닌역가가 높은 환자에 있어서 이 경향이 현저해지는 외에, 레닌모노클로날항체의 인식부위가 불명확하다고 하는 결점을 지니고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은, 이와 같은 종래의 트립신활성화법, 레닌저해제를 이용하는 활성총레닌활성측정에 의한 간접적인 인체프로레닌측정법 및 인체프로레닌의 pf의 C말단부를 항원으로서 인식할 수 있는 항체를 이용하는 직접 면역측정법이 가진 결점을 극복함으로써, 당뇨병성 혈관장해의 발생을 정확하고 간단하게 검지할 수 있는 프로레닌측정시약을 제공하는 것을 주목적으로 한다.
즉, 본 발명은 인체프로레닌 프로프라그먼트의 N말단펩티드중 제 1번째의 로이신잔기로부터 제 15번째의 아르기닌잔기까지의 15개의 아미노산잔기로 이루어진 펩티드를 항원으로서 특이적으로 인식함으로써 프로레닌을 활성시킬 수 있는 인체프로레닌 프로프라그먼트의 N말단펩티드항체를 제공한다.
또, 본 발명은 상기 인체프로레닌 프로프라그먼트의 N말단펩티드와 인체프로레닌과의 결합체인 신규한 레닌활성물질을 제공한다. 이 인체프로레닌 프로프라그먼트의 N말단펩티드항체는 프로레닌의 측정시약의 유효한 성분으로서 이용할 수 있다.

발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명의 바람직한 실시예에 대해 더욱 상세히 설명한다.
본 발명자들은 이미 43개의 아미노산잔기로 이루어진 인체프로레닌의 pf부위를 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 이용한 인체프로레닌측정시약을 개발하였으나(일본국 특개평 8-285852호 공보참조), 더욱 연구를 계속한 결과, 인체프로레닌의 pf N말단의 1 15개의 아미노산잔기로 이루어진 펩티드를 항원으로서 특이적으로 인식할 수 있는 고친화성의 항체를 얻는데 성공하였고, 또, 이 pf N말단항체가 인체프로레닌과 결합해서 레닌활성물질을 형성하고, 이것에 Ang I경합효소의 측정용의면역법(Clinical and Experimental Hypertension-Theory and Practice, 제 A12권, 제 83 95페이지(1990년)참조)을 이용해서 혈중의 프로레닌역가를 정확히 측정할 수 있다는 것을 발견하고, 이 발견내용에 의거해서 상기 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
본 발명에 의한 인체프로레닌의 pf N말단펩티드항체는 예를 들면 다음과 같이 해서 제조할 수 있다.
즉, 먼저, 인체프로레닌의 pf N말단펩티드에 상당하는 아미노산잔기 Leu-Pro-Thr-Asp-Thr-Thr-Thr-Phe-Lys-Arg-Ile-Phe-Leu-Lys-Arg로 이루어진 펩티드를 고상 펩티드합성법에 의해 합성하고, 이와 같이 해서 합성한 펩티드를 멜라민화합물 등의 가교제를 이용해서 소의 혈청알부민, 난백알부민(ovalbumin) 및 키홀림페트헤모시아닌 등의 캐리어단백질과 결합시켜 면역항원으로 한다.
다음에, 각각의 면역항원을 프로인트의 완전보조제와 잘 혼합하여, 체중 약 2.5kg의 성숙토끼에 투여해서 면역한다. 이 면역조작은 2주마다 1회씩 반복하여, 5회째이후에 귓불주변의 정맥으로부터 소량 채혈하여 항체역가를 조사하고, 이 항체역가가 충분히 상승한 시점에서, 토끼의 전체 채혈을 행하여, 이 혈액으로부터 항혈청을 얻는다. 이와 같이 해서 얻어진 항혈청을 DEAE세파로스크로마토그래피처리하여 pf N말단펩티드항체 IgG를 얻는다.
이때, 토끼에 면역항원을 투여해서 폴리클로날항체를 얻는 대신에, 이제까지 알고 있던 방법에 따라서 면역항원을 쥐에 투여해서 모노클로날항체를 제조하는 것도 가능하다.
상기와 같이 해서 얻어진 pf N말단펩티드항체 IgG에 대해서 280㎚의 파장에서의 광학밀도(흡광도)로부터 IgG의 분자량을 150,000으로 상정해서 단백질량을 산출한 바, 2.6㎎/㎖의 역가가 구해졌다. 이 pf N말단펩티드항체는, 인체프로레닌 에 대해서 강한 친화성을 표시하고, 또 pf N말단에 대해서 특이적으로 작용하는 항체이다.
다음에, 이 pf N말단펩티드항체를 인체프로레닌과 결합시키면, 효소활성, 즉 레닌활성을 나타내는 물질이 얻어진다. 이 레닌활성물질은 이하와 같이 해서 제조할 수 있다.
즉, 먼저, 인체프로레닌액에 소의 혈청을 함유하는 생리적 식염수로 희석한 pf N말단펩티드항체를 가하고, 이 혼합액을 4℃의 온도에 있어서 16 24시간 유지시킨다. 그 후, 이 반응혼합액에 인체프로레닌용 기질로서 양의 앤지오텐시노겐액을 가하여 37℃에 있어서 15분간 배양시켜 더욱 반응시켜서 얼음욕중에서의 냉각하에 반응을 정지시킨다.
이와 같이 해서 얻어진 레닌활성물질에 대해서, 그의 Ang I생산능력을, 인체프로레닌을 트립신에 의해 활성화시킨 것과 대비시켜서 측정한 바, pf N말단펩티드항체의 레닌활성은 희석도에 따라서 변화하는 것을 알 수 있다.
도 1은, 본 발명에 의한 인체프로레닌의 pf N말단펩티드항체를 일례로 해서, 이 항체를 인체프로레닌과 반응시킨 때에 있어서의 IgG의 농도와 이 반응혼합액의 파장 450㎚에서의 광학밀도와의 관계를 표시한 그래프이다. 이 그래프로부터, 본 발명에 의한 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체는 인체프로레닌에 대해서 높은 친화성을 표시하는 것을 알 수 있다.
도 2는 상기 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체를 pf N말단합성펩티드와 혼합한 때의 펩티드의 농도와 그의 파장 450㎚에서의 광학밀도와의 관계를 표시한 그래 프이다. 이 그래프로부터 인체프로레닌과 인체프로레닌 pf N말단펩티

드항체와의 결합은, pf N말단합성펩티드에 의해 완전히 저해되는 것, 즉 인체프로레닌에 대해서 특이적인 친화성을 나타내는 것을 알 수있다.
도 3은 인체프로레닌과 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체를 반응시켜 얻은 결합체의 일례에 대한 레닌활성을, 인체프로레닌을 트립신에 의해 활성화한 레닌활성을 100%로 한 상대치에 의해 부여된 농도의 함수로서 표시한 막대그래프이다. 이 그래프에 의하면, 상기 결합체가 레닌활성을 발현하고, 또 이 레닌활성은 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체 IgG의 사용량에 의존하는 것을 알 수 있다.
또, 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체 IgG와 인체프로레닌과의 결합체를, 겔여과고속액체크로마토그래피를 이용해서 분획하고, 각 분획(fraction)의 효소활성을 측정한 바, 도 4의 실선으로 표시한 결과가 얻어졌다. 마찬가지로, 인체프로레닌을 겔여과크로마토그래피하여, pf N말단펩티드항체 및 효소표식단백질A를 이용해서 효소면역측정을 행한 결과를 도 4의 파선으로 표시하고 있다.
도 5는 분자량 450kD를 지닌 페리틴, 분자량 67kD를 지닌 소의 혈청알부민, 분자량 45kD를 지닌 난백알부민 및 분자량 25kD를 지닌 키모트립시노겐을 포함한 공지의 수종의 단백질의 분자량과 용출시간과의 관계를 각각 A, B, C 및 D로 표시하고, 또 인체프로레닌과 pf N말단펩티드항체 IgG와의 결합체의 용출시간 및 인체프로레닌의 용출시간은 각각 화살표 Ⅰ 및 Ⅱ로 표시한 그래프이다.
도 4 및 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 결합체의 효소활성의 대부분은 용출시간 12.0 12.5분의 분획에서 발견되는 반면, 인체프로레닌은 용출시간 16.5 17.0분의 분획에서 발견되었다.
상기 사실로부터, 분자량 43 50kD를 지닌 인체프로레닌과 분자량 150kD를 지닌 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체 IgG와의 결합체(분자량 200 240kD를 지님)가 효소활성을 발현하고 있는 것을 알 수 있다.
또, 도 6은 상기 결합체를 이용한 측정에 의해 얻어진 인체프로레닌역가와 트립신활성화법에 의해 얻어진 인체프로레닌역가와의 상관관계를 표시한 그래프이다. 이 그래프로부터, 양쪽의 역가는 γ=0.986의 매우 양호한 상관성을 표시하는 것을 알 수 있다.
이 결합체를 프로레닌측정시약으로서 이용하여, 농도가 다른 인체프로레닌의 측정시험을 행한 바, 12.5 400ng Ang I/㎖ · 시간의 범위에서 프로레닌농도에 의한 상관성이 양호한 직선성을 표시하는 것을 알 수 있다.
또한, 고, 중 및 저농도의 인체프로레닌혈청을 희석용 인체혈청으로 희석하여, 상기 결합체를 측정시약으로 해서 효소활성을 측정한 바, 도 8에 표시한 바와 같이, 각 경우에 있어서 Ang I생산량과 희석도간에 양호한 비례성을 나타내었다.
이들 측정시험에 있어서, 다른 농도에서의 n=7의 동시재현성 시험에 대한 변동계수는 1.8 5.5%, n=5의 일간재현성 시험에 대한 변동계수는 3.8 7.5%로 양호한 재현성을 나타내었다.
이상의 결과로부터, 본 발명에 의한 인체프로레닌 pf N말단펩티드항체는, 인체프로레닌에 대해서 높은 친화성을 표시하고, 또한 pf N말단에 대해서 특이적으로 작용하는 것과, 이 항체와 인체프로레닌과의 결합체는 효소활성을 지니고, 이 효소 활성이 농도변화와 잘 상관하고 있는 것과, 상기 결합체가 프로레닌측정시약으로서 유용하다는 것을 알 수 있다.
다음에, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세히 설명하나, 본 발명의 범위는 이것으로 한정되는 것은 아니다. 또, 각 예에서 사용한 시약은 이하의 방법으로 제조하고, 또 프로레닌의 역가표시는, Ang I생산능을 기준으로 해서 행하였다.
(1) 발색용액:
이 용액은 테트라메틸 벤지딘(이하, 'TMB'라 약칭함)을 5.5mM농도로 pH 6.5의 아세트산완충액에 용해해서 제조하였다.
(2) 앤지오텐시노겐시약:
양쪽 신장을 적출한 양으로부터 해당 적출수술 48시간후에 채혈하고, 즉시 이 피에서 분리한 혈청을 동결건조하고, 이 건조물 20㎎을, 디이소프로필플루오로포스페이트(DFP) 10밀리몰 및 EDTA 10밀리몰을 함유하는 pH 6.5의 0.2M인산완충액(이하, 'PBS'라 약칭함) 1ℓ에 용해해서 앤지오텐시노겐 시약을 제조하였다.
(3) 세정용 완충액:
PBS생리식염수에, 0.05중량%의 농도로 계면활성제 트윈(Tween) 20을 용해해서 해당 완충액을 제조하였다.
(4) 희석용 인체혈청:
(주)일본생물재료센터제품인 정상인의 혈청을, 완숙형 레닌 및 인체프로레닌의 양쪽을 인식할 수 있는 항체를 이용해서 친화도크로마토그래피처리하여, 흡착된 완숙형 레닌 및 인체프로레닌을 56℃에서 30분간 비활성화 열처리해서 제조하였다. 제조예 1
다음과 같이 해서 재결합인체프로레닌원액을 제조하였다. 즉, Journal of Hypertensions, 제 4권, 제 S388 S390페이지(1986)에 보고된 무라카미 등의 방법에 따라, 인체신장으로부터 유래된 인체프로레닌의 cDNA를 발현벡터에 도입하여, 차이니즈햄스터 난소세포(이하, 'CHO세포'라 약칭함)에 조립한 것을, 소태아혈청 10%를 함유하는 델베코(Dulbecco)변법이글배지에서 배양하여, CHO세포가 완전히 자란 시점에서 무혈청배지로 변환함으로써 재결합인체프로레닌을 함유하는 배양상청액을 얻었다.
이와 같이 해서 얻어진 CHO배양상청액 5㎖를, 5mM EDTA를 함유하는 PBS생리식염수에 대해서 투석한 후, 재결합인체프로레닌의 농도를 200μg Ang I/㎖ · 시간으로 조정함으로써 재결합프로레닌원액을 얻었고, 이것을 4℃에서 보존하였다.
제조예 2
다음과 같이 해서 효소표식 Ang I를 제조하였다. 즉, 양고추냉이퍼옥시다제 5mg을 0.2M PBS 500μℓ에 용해한 용액중에, 2.5% 글루타르알데히드용액 1㎖를 활발하게 휘저으면서 적하하였다. 글루타르알데히드용액의 적하완료후, 해당 혼합액을 25℃에 있어서 30분간 휘저은 후, 얼음욕에서 냉각하에 멤브레인필터(잘트리우스사제품)를 이용해서 약

100㎕로 농축하고, 과잉의 글루타르알데히드를 겔여과에 의해 제거하여 효소분획을 회수하였다.
다음에, 이 혼합액을 더욱 농축시킨 후, 합성 Ang I펩티드 1㎎을 순수 1㎖에 용해해서 얻은 용액 130㎕를 가하고, 30℃에서 2시간 배양하였다. 그 후, 0.2M 리신수용액 100㎕를 가해서 반응을 정지시킨 후, 반응혼합액을 재차 100㎕로 농축하고 겔여과에 의해 미반응 Ang I를 제거하여 소망의 효소표식 Ang I용액을 얻었다.
이와 같이 해서 얻어진 효소표식 Ang I용액에 소의 혈청알부민(이하, 'BSA'라 약칭함)을 농도 0.1%가 되도록 가해서 효소표식 Ang I원액으로 하고, 이것을 -80℃에서 보존하였다.
이와 같이 해서 제조한 원액은, 0.1% BSA, 0.1M 염화 나트륨 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS로 3000배 희석한 후 사용하였다.

제조예 3

다음과 같이 해서 Ang I항체를 제조하였다. 즉, 시판의 합성 Ang I펩티드 6.8㎎을 0.2M PBS 1㎖에 용해한 용액에, m-말레이미도벤조일 N-안히드로숙시이미드에스테르(이하, 'MBS'라 약칭함) 3.4㎎을 테트라히드로푸란 0.5㎖에 용해해서 제조한 용액을 적하하였다.
이어서, 이 용액을 30℃에서 30분간 방치시킨 후, 질소가스를 버블링시켜서 테트라히드로푸란을 증발시키고, 나머지 용액을 염화메틸렌 5㎖를 가해서 휘저은 후, 원심분리해서 Ang I-MBS용액을 수상(aqueous phase)으로서 얻었다.
별도로, BSA 10㎎을 0.1M EDTA를 함유하는 6M 요소용액 500㎕에 용해해서 제조한 용액을, 수소화 붕화 나트륨 20㎎과, n-부틸알콜 100㎕를 소포제로서 가하고, 30분간 방치한 후, 0.2M PBS 1㎖와 아세톤 0.4㎖를 가해서 환원 BSA를 얻었다.
상기 Ang I-MBS용액과 환원 BSA를 혼합하고 37℃에서 2시간 배양해서 반응시 킨 후, PBS로 투석해서 미반응 Ang I를 제거하였다.
이와 같이 해서 얻어진 반응생성물을 면역항체로서 이용해서 면역처리하여 Ang I항혈청을 얻었다.

제조예 4

다음과 같이 해서 Ang I 항체플레이트를 제조하였다. 즉, 제조예 3에서 얻은 Ang I 항혈청을 pH 9.6의 0.05M 탄산완충액으로 5000배 희석하고, 이 희석액 100㎕를 면역측정용의 96구멍의 마이크로플레이트(막시소프, 눈크사제품)의 각 구멍에주입하고, 4℃에서 16 24시간 방치하였다. 그 후, 이 구멍속의 희석액을 버리고, 1% 카세인을 함유하는 PBS생리식염수를 200㎕씩 각 구멍에 주입하고, 4℃에서 적어도 16시간 방치하여 Ang I항체를 고정화하였다. 이와 같이 해서 제조한 플레이트를 4℃에서 보존하였다.

실시예 1

키홀림페트헤모시아닌 16㎎을 pH 7.2의 0.1M PBS 1㎖에 용해한 용액에, 15㎎/㎖농도의 N-(γ-말레이미도부티르옥시)숙시이미드의 디메틸포름아미드용액 100㎕를 가하고, 실온에서 3시간 방치시켰다. 반응종료후, 반응혼합액을 세파덱스 G-25칼럼에 통과시켜 미반응의 N-(γ-말레이미도부티르옥시)숙시이미드를 제거하였다. 그 후, 반응생성물을 pH 6.0의 0.1M PBS에 의해 용출하고, 그 용출액에, 보호기를 탈리한 프로레닌의 pf N말단의 제 1번째에서 제 15번째의 아미노산잔기로 이루어진 합성펩티드 10㎎을 가하고, 실온에서 3시간 방치시켜 프로레닌과 pf N말단합성펩티드 헤모시아닌과의 결합체를 면역항체로서 얻었다. 이 용액을 동물의 면역용으로 사용할 때까지 -80℃에서 보존하였다.
이와 같이 해서 제조한 면역항체를 생리식염수로 희석해서 단백질농도를 1㎎/㎖로 조정한 후, 등량의 프로인트 완전보조제를 혼합하였다. 이와 같이 해서 제조한 용액 전량을 체중 약 2.5㎏의 뉴질랜드화이트종의 토끼의 피하의 여러 곳에 나누어 주사하였다. 이후, 면역항원량을 첫회 주입량의 절반으로 2주간격으로 7회 주입하여 토끼의 면역을 행하였다. 최종면역후, 토끼로부터 전체 채혈하여, 이 피로부터 항혈청을 제조하였다.
이와 같이 해서 제조한 항혈청을 pH 7.0의 0.1M PBS에 대해서 투석한 후, 농축시키고 나서, 생리식염수 1ℓ중 아지화 나트륨(NaN_3) 100g을 용해해서 얻은 용액을 100분의 1용적의 비율로 첨가해서 4℃에서 보존하였다.
이와 같이 해서 얻어진 항혈청액 1㎖를 황산나트륨에 의해 염석처리하고, 침전된 고체를 pH 6.3의 17.5mM PBS에 용해하였다. 이 용액을 마찬가지의 PBS에 대해서 하룻밤 투석한 후, 마찬가지 PBS로 평형화한 DEAE세파로스칼럼에 유속 0.3 0.5㎖/분으로 통과시켜 파장 280㎚에서의 흡광도를 지닌 분획을 포집하였다. 이 분획의 용액을 pH 7.0의 0.1M PBS에 대해서 투석한 후, 센트리콘-30(아미콘사제품)을 이용해서 농축하고 나서 상기한 농도 100g/ℓ의 아지화 나트륨용액을 100분의 1용적의 비율로 첨가하여 4℃에서 보존하였다.
이와 같이 해서 얻어진 pf N말단펩티드항체 IgG중의 단백질함량은, IgG에 대해서 분자량을 150,000으로 상정해서 파장 280㎚에서의 광학밀도로부터 산출한 바, 2.6㎎/㎖였다.
다음에, 이와 같이 해서 얻어진 pf N말단펩티드항체 IgG의 인체프로레닌에 대한 결합능력을 이하와 같이 해서 측정하였다.
즉, 상기 제조예 1에서 제조한 농도 200㎍ Ang I/㎖ · 시간의 재결합인체프로레닌원액을, pH 9.6의 0.05M 탄산완충액으로 농도 1㎍ Ang I/㎖ · 시간이 되도록 희석하고, 이 희석액을 면역측정용의 96구멍의 마이크로플레이트(폴리소프, 눈크사제품)의 각 구멍에 주입하고, 4℃에서 16시간 방치하였다. 그 후, 각 구멍속의 희석액을 버리고, 1% 카세인을 함유하는 pH 7.4의 PBS생리식염수를 200㎕씩 각 구멍에 주입하고, 4℃에서 적어도 16시간 방치하여 프로레닌고정화 마이크로플레이트를 제작하고, 이것을 4℃에서 보존하였다.
다음에, 상기 pf N말단펩티드항체 IgG를, 0.1% BSA 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 pH 7.2의 PBS생리식염수로 10^{10} 10^{9} 배의 각 희석도로 희석하였다. 이 각 희석도의 희석액 100㎕를, 프로레닌고정화 마이크로플레이트의 각 구멍에 주입하고, 실온에서 2시간 방치하여 반응시킨 후, 퍼옥시다제표식단백질A(자임드 라보라토리즈사제)를, 0.1% BSA, 0.1M 염화 나트륨 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4000배 희석하여 얻은 용액 100㎕를 가하고, 또 실온에서 2시간 방치하여 반응시켰다. 반응종료후, 상기 용액을 각 구멍으로부터 버리고, 세정용 완충액 300㎕로 5회 반복

해서 세정하였다.
그 후, 상기 마이크로플레이트의 각 구멍에 발색용액 150㎕를 가하고, 37℃ 에서 5분간 배양한 후, 각 구멍에 0.03% 과산화수소수 50㎕를 가해서, 37℃에서 30분간 배양하였다.
최후로, 2M 황산 100㎕를 가해서 반응을 정지시킨 후, 마이크로플레이트 리더(몰리큘러데바이스사제품)를 이용해서 상기 마이크로플레이트에 대한 파장 450㎚에서의 광학밀도를 측정한 결과를 도 1에 그래프로 표시하였다. 이 그래프로부터 명백한 바와 같이, pf N말단펩티드항체 IgG는 인체프로레닌에 대해 강한 친화성을 나타내었다.
다음에, pf N말단펩티드항체 IgG의 특이성을 조사하기 위하여, 이하의 저해시험을 행하였다.
즉, 상기의 항체 제조에 이용한 pf N말단합성펩티드 1㎎을, BSA 및 트윈 20을 함유하는 PBS생리식염수 1㎖에 용해하고, 이 용액을 마찬가지의 PBS생리식염수로 10 10 7 배의 각 희석도로 희석해서 일련의 희석액을 제조하였다.
이어서, 이 각 희석액 500㎕에 pf N말단 펩티드항체 IgG 10㎕를 가하고, 각 용액 100㎕씩을 프로레닌고정화 마이크로플레이트의 각 구멍에 주입하고, 실온에서 2시간 방치하였다.
반응종료후, 세정용 완충액 300㎕로 5회 반복해서 세정하고, 이어서, 각 구멍에 퍼옥시다제 표식단백질A용액 100㎕를 가해서 항체역가측정과 마찬가지로 파장 450㎚에서의 광학밀도측정을 행한 결과를 도 2의 그래프로 표시하였다.
이 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, pf N말단펩티드항체와 인체프로레닌과의 항원-항 체반응은, 항원인 pf N말단합성펩티드에 의해 완전히 저해되는 것, 즉 pf N말단펩티드항체는 항원특이성을 지니는 것을 알 수 있다.

실시예 2

제조예 1에서 얻은 CHO배양상청액을 1% BSA를 함유하는 pH 7.0의 PBS생리식염수로 10배로 희석하고, 이 희석액 200㎕에, pf N말단펩티드항혈청을 0.1% BSA를 함유하는 pH 7.6의 PBS생리식염수로 10 10 6 배의 각 희석도로 희석한 각 항혈청액 40㎕를 가하고, 4℃에서 16시간 방치하였다.
그 후, 상기에서 얻어진 각 반응혼합액 50㎕에, 앤지오텐시노겐시약 150㎕를 가하고, 37℃에서 30분간 배양하였다.
다음에, 상기에서 얻어진 반응혼합액 100㎕를 제조예 4에서 얻은 Ang I항체고정화 마이크로플레이트에 분배하고, 여기에 제조예 2에서 얻은 효소표식 Ang I 100㎕를 가하고 4℃에서 2시간 방치하였다. 반응종료후, 이 마이크로플레이트를 세정용완충액 300㎕로 3회 반복해서 세정한 후, 발색용액 150㎕를 가하고 나서 37℃에서 5분 배양하고, 또 0.03% 과산화수소수 50㎕를 가하고 37℃에서 30분 배양하여 반응시켜서 발색시켰다.
최후로 2% 황산 100㎕를 첨가하여 반응을 정지시키고, 마이크로플레이트 리더를 이용해서 파장 450㎚에서의 광학밀도를 측정하였다.
별도로, 제조예 1에서 얻은 CHO배양상청액 200㎕에, 소의 췌장에서 유래된 트립신(시그마사제품) 1㎎을 1mM 염산 1㎖에 용해해서 얻은 용액 5㎕를 가하고, 25 ℃에서 10분간 방치시킨 후, 대두에서 유래된 트립신저해제(시그마사제품) 2㎎을 pH 7.4의 0.2M PBS 1㎖에 용해해서 얻은 용액 5㎕를 가해서 트립신의 효소반응을 정지시킴으로써 인체프로레닌을 완숙형 프로레닌으로 변화시켜 놓았다.
다음에, 상기 반응혼합액 100㎕를 Ang I항체 고정화 마이크로플레이트의 구멍에 가하여 상기한 방법에 의해 Ang I측정을 행하였다. 이와 같이 해서 얻어진 결과를 인체프로레닌의 트립신에 의한 활성화값, 즉 Ang I 생산량을 100%로 한 때의 pf N말단펩티드항체에 의한 상대적 활성화율로서 도 3에 막대그래프로 표시하였다. 이 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, pf N말단펩티드항체 IgG와 인체프로레닌과의 결합체에 의한 활성화능은 용량의존성을 나타낸다.

실시예 3

농도 800ng Ang I/㎖ · 시간의 재결합 인체프로레닌희석액 2㎕에, 제조예 1에서 얻은 pf N말단펩티드항체 IgG 200㎕를 가하고, 또 5mM EDTA를 함유하는 PBS생리식염수를 가해서 총량 500㎕로 한 것을 4℃에서 24시간 방치하여 인체프로레닌과 pf N말단펩티드항체 IgG와의 결합체를 생성시켰다.
다음에, 이 반응혼합액 100㎕를 겔여과고속액체크로마토그래피칼럼(토소사제품, 상품기호 TSK-GEL-G3000SXL)에 통과시켜, 5mM EDTA를 함유하는 PBS생리식염수를 이용해서 0.6㎖/분의 유속으로 전개시켜, 용출액을 각 분획 0.3㎖마다 회수하였다.
각 분획으로부터 취한 50㎕에 레닌기질로서 앤지오텐시노겐시약 50㎕를 가하고, 37℃에서 15분간 배양시켜서 Ang I를 생성시킨 후, 즉시 이 용액을 얼음위에 옮기고, 0.1% BSA, 0.1M 염화 나트륨 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS 150㎕를 가하여총량을 250㎕로 하였다.
다음에, 이 반응혼합액 100㎕씩을 Ang I 항체고정화 플레이트의 각 구멍에 가하고, 여기에 제조예 2에서 얻은 효소표식 Ang I용액 100㎕씩을 가하여 4℃에서 2시간 방치하여 반응시켰다. 그 후, 이 플레이트를 세정용 완충액 300㎕로 3회 세정하였다.
다음에, 이 반응생성물에 발색용액 150㎕를 가하고, 25℃에서 5분간 방치시킨 후, 0.03% 과산화수소수 50㎕를 가하고, 25℃에서 30분 반응시켰다.
최후로, 2M 황산 100㎕를 가해서 반응을 정지시키고, 마이크로플레이트 리더를 이용해서 파장 450㎚에서의 광학밀도를 측정하고, 그 결과를 도 4에 실선으로 표시하였다. 이 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, 용출시간 12.0 12.5분의 분획에 있어서, 대부분의 레닌활성, 즉, 레닌생산능이 확인되었다.
대조용으로, 상기와 마찬가지의 재결합인체프로레닌희석액 100㎕에 상기와 마찬가지조건하에서 겔여과고속액체크로마토그래피를 행하고, 각 용리분획으로부터 100㎕를 취해서 pf N말단펩티드합체 IgG의 결합체형성 시험과 마찬가지로 처리해서, 퍼옥시다제 표식단백질A, 발색용액 및 0.03% 과산화수소수를 가하고, 마이크로플레이트 리더를 이용해서 파장 450㎚에서의 광학밀도측정을 행한 결과를 도 4에 파선으로 표시하였다. 이 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, 면역측정법에 의한 프로레닌을 표시하는 분획은 대부분 용출시간 16.5 17.0분에서 용출하였다.
또, 용출시간과 분자량의 관계를 조사하기 위하여, 분자량마커(서버사제품) 를 상기와 마찬가지 조건하에서 겔여과한 바, 도 5에 표시한 바와 같이, 프로레닌은 난백알부민의 분자량 45kD보다도 약간 큰 약 43kD 50kD의 분자량을 지

니는 것 및 프로레닌과 pf N말단펩티드항체 IgG와의 결합체의 분자량은 200kD 240kD인 것을 알 수 있다.
이상의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 프로레닌과 pf N말단펩티드항체와의 항원-항체반응에 의해 면역복합물을 생성하면 효소활성 또는 레닌활성을 나타내었고, 또 레닌기질로서 앤지오텐시노겐을 분해해서 Ang I를 생산하였다.

실시예 4

200ng Ang I/㎖ · 시간의 프로레닌액을 희석용 인체혈청으로 등배희석하여 일련의 희석액을 제조하고, 각 희석액으로부터 100㎕씩 취하여 2조의 시료를 준비하였다.
다음에, 제 1조의 시료액에 대해서 공지의 트립신활성화법에 의해 Ang I생산량을 구하고, 제 2조의 시료액에 대해서 실시예 3에서 얻은 인체프로레닌과 pf N말단펩티드항체와의 결합체를 이용해서 Ang I생산량을 산출하였다.
도 6은 이와 같이 해서 얻은 2조의 산출치간의 상관그래프로, 이들 사이에는 상관계수 γ^2 =0.972의 양호한 상관성을 나타내고 있다.
다음에, 400ng Ang I/㎖ · 시간의 프로레닌액을 희석용 인체혈청으로 등배희석해서 일련의 희석액을 제조하고, 각 희석액으로부터 100㎕씩 취해서 시료를 준비하고, 이들 시료에 대해 상기 결합체를 이용해서 Ang I생산량 측정을 행한 결과를 도 7에 표시하였다. 도 7은 프로레닌농도와 Ang I생산량과의 관계를 나타낸 그래프이다. 이 그래프로부터 명백한 바와 같이, 프로레닌농도 12.5 400ng Ang I/㎖ · 시간의 범위에서 양호한 직선성이 확인되었다.
또, 희석용 인체혈청에 의해, 농도 503.2ng Ang I/㎖ · 시간의 고농도출발용액, 농도 160.4ng Ang I/㎖ · 시간의 중간농도출발용액 및 농도 70.6ng Ang I/㎖ · 시간의 저농도출발용액의 등배희석에 의해 (A), (B), (C) 3계열의 인체프로레닌희석액을 제조하고, 각 계열에 속한 희석액으로부터 100㎕씩 취해서 3조의 시료를 준비하고, 이들 각각에 대해 상기 결합체를 이용해서 효소활성을 측정하고 그 결과를 도 8에 표시하였다. 이 도면으로 명백한 바와 같이, 각 계열에 속한 희석액에 대해 원점을 통과하는 직선성이 얻어졌다.

응용예

실시예 3에서 얻어진 인체프로레닌과 pf N말단펩티드항체와의 결합체를 이용해서, 20 40세의 건강한 성인남자 4명으로부터 취한 혈청시료중의 프로레닌역가를 실시예 4와 마찬가지 방법으로 측정하였다.
대조용으로, 상기와 동일한 혈청시료에 대해서 종래의 트립신활성화법을 이용해서 프로레닌역가를 측정하였다.
이들 시험에서 얻어진 결과를 피시험인 4명 각각에 대해 하기 표 1에 ng Ang I/㎖ · 시간의 단위로 표시하였다.

[표 1]

피시험인 번호	혈청중 프로레닌역가(ng Ang I/㎖ · 시간)	
	본 발명의 측정시약	트립신활성화법
1	20.5	31.5
2	28.8	24.2
3	21.1	25.9
4	32.2	13.8

발명의 효과

이상, 본 발명에 의하면, 신규의 pf N말단펩티드항체를 이용함으로써, 정확하고 간단하게 혈청중의 인체프로레닌량을 측정하는 것이 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

인체프로레닌 프로프라그먼트의 N말단펩티드중 제 1번째의 로이신잔기로부터 제 15번째의 아르기닌잔기까지의 15개의 아미노산잔기로 이루어진 펩티드를 특이적으로 인식함으로써 프로레닌을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 단리 · 정제된 인체프로레닌 프로프라그먼트 N말단 펩티드 항체.

청구항 2.

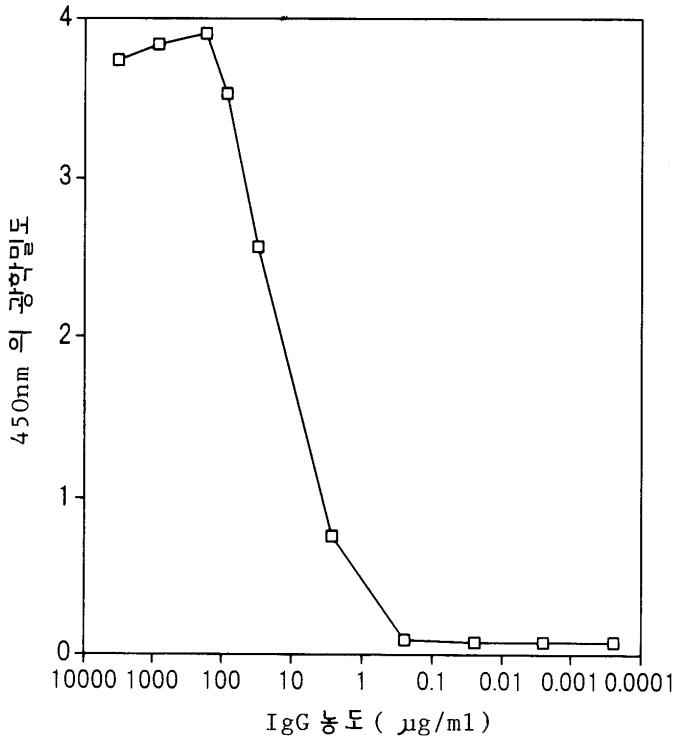
제 1항에 의한 항체와 인체프로레닌과의 결합체로 이루어진 것을 특징으로 하는 레닌활성물질.

청구항 3.

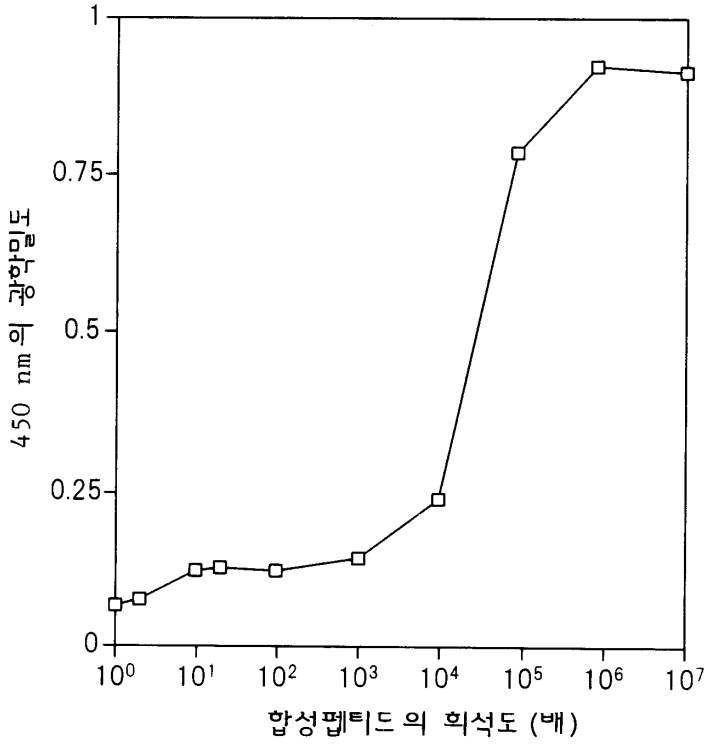
(a) 제 1항에 의한 인체프로레닌 프로프라그먼트 N말단펩티드 항체와 혈액중의 인체프로레닌을 반응시켜 상기 인체프로레닌 프로프라그먼트 N말단펩티드항체와 인체프로레닌과의 결합체로 이루어진 레닌활성물질을 형성하는 공정;
(b) 상기 레닌활성물질에 레닌기질로서의 앤지오텐시노겐을 첨가하여 앤지오텐신 I를 형성하는 공정; 및
(c) 상기 앤지오텐신 I를 측정하는 공정을 구비한 것을 특징으로 하는 혈액중의 인체프로레닌의 측정방법.

도면

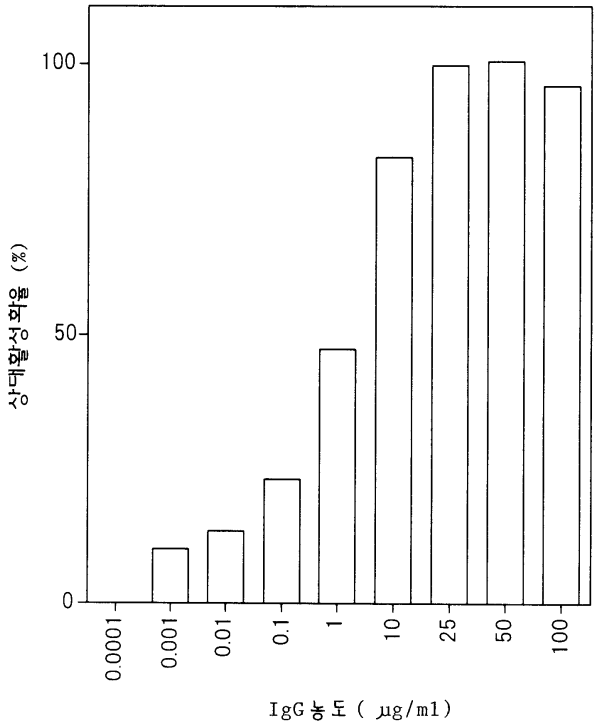
도면1


4
3
2
1
0
450nm 의 광학밀도
10000 1000 100 10 1 0.1 0.01 0.001 0.0001
IgG 농도 (μg/ml)

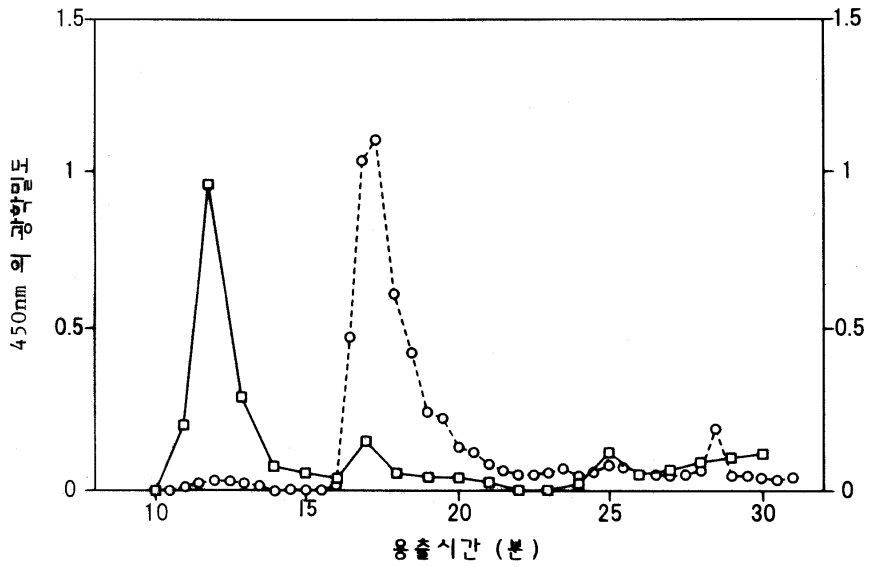
도면2


1
0.75
0.5
0.25
0
450 nm의 광학밀도
10⁰ 10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷
합성펩티드의 희석도 (배)

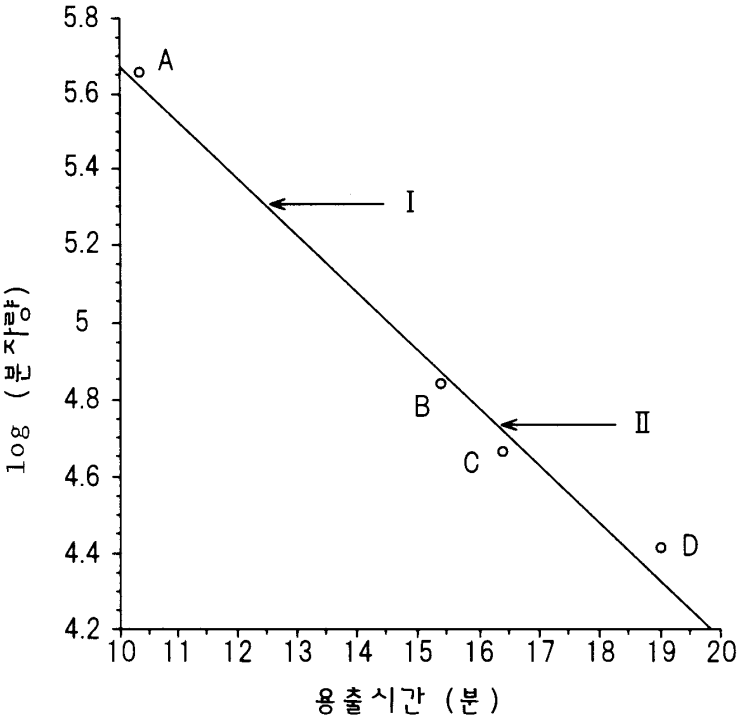
도면3


100
50
0
상대활성화율 (%)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
25
50
100
IgG 농도 (μg/ml)

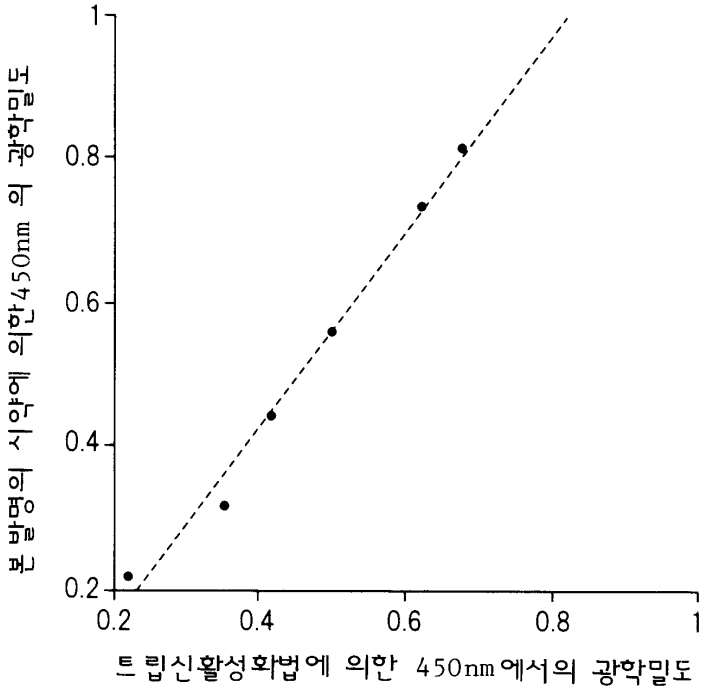
도면4


1.5
1
0.5
0
450nm 의 광학밀도
10
15
20
25
30
용출시간 (분)

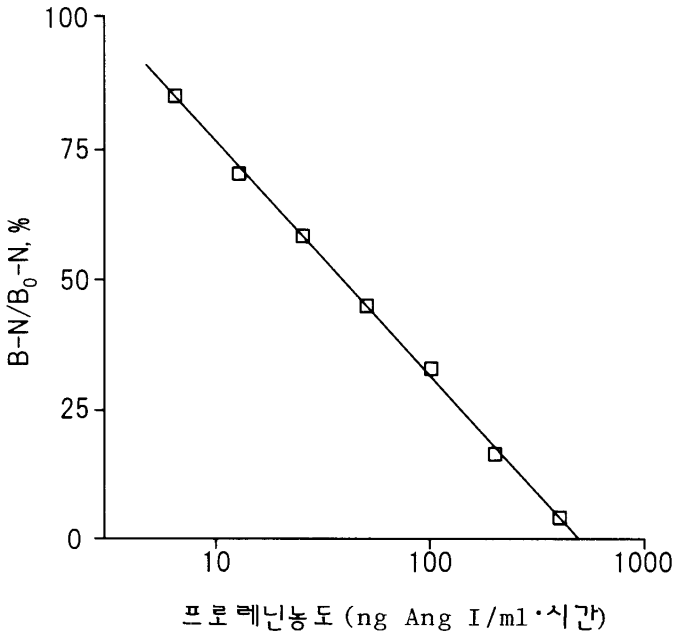
도면5


5.8
5.6
5.4
5.2
5
4.8
4.6
4.4
4.2
log (분자량)
A
B
C
D
I
II
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
용출시간 (분)

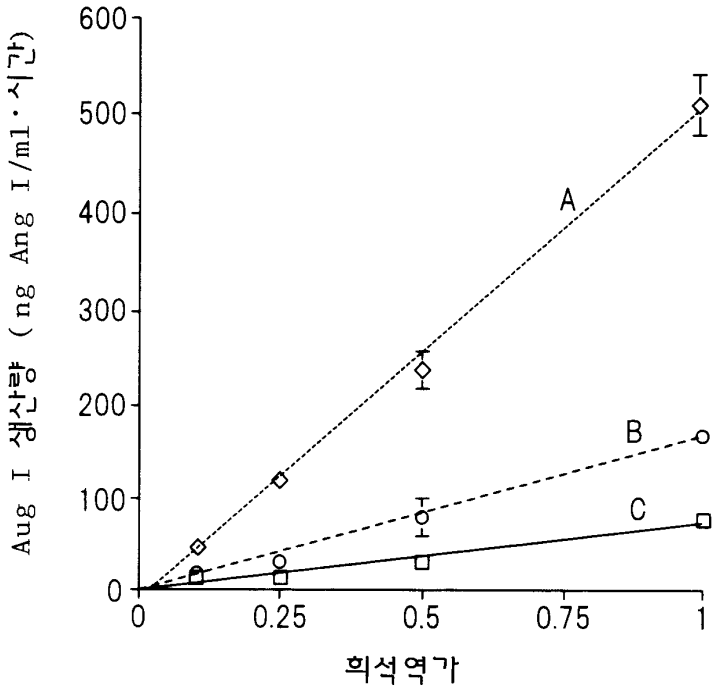
도면6


1
0.8
0.6
0.4
0.2
본발명의 시약에 의한450nm 의 광학밀도
0.2 0.4 0.6 0.8 1
트립신활성화법에 의한 450nm에서의 광학밀도

도면7


100
75
50
25
0
B-N/B0-N, %
10
100
1000
프로레닌농도 (ng Ang I/ml·시간)

도면8


600
500
400
300
200
100
0
Aug I 생산량 (ng Ang I/ml·시간)
A
B
C
0
0.25
0.5
0.75
1
희석역가