

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶

C07K 16/24

C12P 21/08

C12N 15/06

(11) 공개번호 특 1998-701550

(43) 공개일자 1998년 05월 15일

(21) 출원번호 특 1997-704941

(22) 출원일자 1997년 07월 16일

번역문제 출일자 1997년 07월 16일

(86) 국제출원번호 PCT/JP 96/000050

(87) 국제공개번호 WO 96/022309

(86) 국제출원출원일자 1996년 01월 16일

(87) 국제공개일자 1996년 07월 25일

(81) 지정국 AP ARIP0특허 : 캐나다 말라위 수단 스와질랜드

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크
 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코
 네덜란드 포르투갈

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카
 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이
 잔 바베이도스 불가리아 브라질 브라질스 캐나다 스위스 리히텐슈타
 인 중국 체크 독일

(30) 우선권주장 4995/95 1995년 01월 17일 일본(JP)

(71) 출원인 기린 비루 가부시끼가이사 사토 야스히로

일본국 도쿄 104 츠오-구 신카와 2-쪼메 10-1

(72) 발명자 미야자끼 히로시

일본 군마-겐 371 마에바시-시 소자마치 1-쪼메 2-1 기린비루가부시끼가이사
 의약탐색연구소 내

(74) 대리인 손창규, 백덕열, 이태희

심사청구 : 없음

(54) 항-트롬보포이에틴 단일클론 항체(ANTI-TPO MONOCLONAL ANTIBODIES)

요약

본 발명은 인간 트롬보포이에틴(TPO)에 대한 단일클론 항체; 항체를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 트롬보포이에틴-함유 물질로부터 트롬보포이에틴을 분리시키는 것을 포함하는 트롬보포이에틴의 정제 방법; 및 항체를 사용하여 트롬보포이에틴의 면역화학적 정량 또는 검출 방법에 관한 것이다. 항-트롬보포이에틴 단일클론 항체를 사용함으로써 다양한 형태의 인간 트롬보포이에틴 분자를 정제, 검출 또는 정량할 수 있다.

영세서

기술분야

본 발명은 트롬보포이에틴의 검출, 정제 또는 정량에 유용한 항-트롬보포이에틴 단일클론 항체에 관한 것이다.

배경기술

인간 트롬보포이에틴(TPO)은 시토킨 수용체 수퍼페밀리(superfamily)의 한 구성원인 Mpl의 리간드로서 클론된 단백질이다[드 소바즈(de Sauvage) 일행, *Nature*(런던), vol.369, 533-565페이지(1994년); 티.디.바트리(Bartley) 일행, *Cell*, vol.77, 1117-1124페이지(1994년)]. 각각의 이를 Mpl 리간드는 혈소판 감소증이 있는 동물(인간, 마우스, 개)의 혈청 및 혈장에서 검출될 수 있으며, 거핵세포 및 혈소판의 생산에 관여함이 이미 밝혀졌다.

혈소판 감소증의 치료에 사용될 치료제를 개발하기 위하여, 본 발명자는 쥐 골수로부터 정제된 거핵세포의 전구체 세포로부터 거핵세포의 생산을 자극하는 활성을 사용함으로써 혈소판 감소증 쥐의 혈장으로부터 쥐 TPO를 정제하고, 부분적인 아미노산 서열을 바탕으로 쥐 TPO cDNA 및 인간 TPO cDNA를 클론하고 재조합 DNA 기술에 의해 균일한 인간 TPO를 대량으로 얻는데 성공하였다[에이치.미야자끼(Miyazaki) 일행, *Exp. Hematol.*, vol.22, 838페이지(1994년)]. 그 결과 얻어진 인간 TPO는 인간 Mpl 리간드로서 얻은 상기 인자의 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 것으로 밝혀졌다(하기 서열 1 참조).

이에 관련해서, 재조합 DNA 기술에 의해 균일한 인간 TPO를 대량으로 생산하고, 제조된 TPO를 평가하고,

또는 TPO를 약제로서 개발하기 위하여 TPO의 검출, 정제 또는 정량을 위한 우수한 방법이 필요하다.

본 발명자는 TPO의 검출, 정제 또는 정량에 유용한 항-TPO 단일클론 항체의 제조를 연구하여, 인간 TPO 돌연변이체[h6T(1-163)으로 칭함]로 면역된 동물로부터 유도된 항체-생산 세포와 골수종 세포를 융합시켜 얻은 하이브리도마가 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현되어, h6T(1-163)을 인식할 수 있는 단일클론 항체, 하기 서열 1의 아미노산 서열을 갖고 CHO 세포[CHO(1-332)로 칭함]에서 발현되는 인간 TPO 단백질, 하기 서열 1에서 1 내지 163 위치의 아미노산 서열을 갖고 CHO 세포[CHO(1-163)로 칭함]에서 발현되는 기타 인간 TPO 단백질을 생산하고, 이들 단일클론 항체가 인간 TPO 단백질의 정제 및 정량에 사용될 수 있음을 밝혔다.

h6T(1-163)은 Ser¹과 Ala³이 각각 Ala와 Val로 치환되고 Met 및 Lys 잔기가 N-말단에 추가 결합되는 것을 제외하고, h6T(1-163)은 하기 서열 1의 아미노산 서열의 1 내지 163 위치에 해당하는 아미노산 서열(하기 서열 2)을 갖는다. h6T(1-163)의 생산 방법은 하기 실시예 1에 상세히 설명한다.

따라서, 본 발명은 인간 TPO에 대한 단일클론 항체를 제공한다. 또한 항-인간 TPO 단일클론 항체를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 TPO-항유 물질로부터 TPO를 분리시키는 것을 포함하여 TPO의 정제 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항-인간 TPO 단일클론 항체의 용도를 포함하는 TPO의 면역화학적 정량 또는 검출 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 이하에서 더욱 상세히 설명된다.

본 발명의 단일클론 항체는 하기 방법으로 생산될 수 있다:

(1) 면역 동물 세포의 제조

마우스, 쥐 등을 인간 TPO로 면역시키고, 이들로부터 비장 세포를 준비한다. 예컨대, 인간 TPO는 재조합 DNA 기술을 사용하여 대장균에서 생산될 수 있다(실시예 1 참조). 통상 적합한 보조제와 조합하여 동물 당 5 내지 100 µg의 인간 TPO를 마우스, 쥐 또는 토끼의 피하, 혈관 또는 복강에 투여하거나 또는 발바닥(foot-pad) 투여 방법으로 면역화시킨다. 적당한 간격, 바람직하게는 1 내지 2 주(발바닥 투여인 경우, 2 내지 3 일)간격으로 1 회 또는 수 회 면역화시킬 수 있다.

면역화된 동물의 혈청 내의 항원에 대한 항체 역가를 측정하여, 그 결과를 바탕으로 충분히 높은 항체 역가를 나타내는 동물을 항체 생산 세포로서 사용한다. 최종 면역 3~4 일 후에 얻어진 항체 생산 세포가 바람직하다.

공지된 다양한 기술 예컨대 방사면역분석법(RIA), 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA) 등이 항체 역가의 측정을 위한 방법으로써 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 ELISA법이 통상 사용된다.

(2) 골수종 세포의 제조

골수종 세포로서, 통상 마우스로부터 얻은 확립된 세포, 예컨대 8-아자구아닌-내성 마우스(BALB/c 기원) 골수종 세포주 예컨대 P3-X63 Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1978)], P3-NS1/1-Ag4.1 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511-519(1976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269-270(1978)], P3-X63-Ag8.653 (653) [J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)], P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495-497(1975)] 등을 사용하는 것이 바람직하다. 이들 세포주를 적합한 배지 예컨대 8-아자구아닌 배지[8-아자구아닌 + 일반 배지 즉, 글루타민(1.5 mM), 2-메르캅토에탄올(5 × 10⁻⁵ M), 젠타마이신(10 µg/ml) 및 태아 송아지 혈청(FCS: 10 %)이 부가된 RPMI 1640 배지]; IMDM(Iscoive Modified Dulbecco's Medium); 또는 돌베코사의 MEM 안 또는 상에서 계대 배양하며, 융합시 2 × 10⁷ 이상의 융합 세포가 얻어질 수 있도록 세포 융합이 실시되기 3 내지 4 일 전에 이들을 정상 배지 안 또는 상에서 최종적으로 계대 배양한다.

(3) 세포 융합

예컨대 마우스인 경우, 단계 (1)의 방법으로 면역화시킨 마우스의 복강 또는 피하에 동물 당 5 내지 100 µg의 인간 TPO를 투여하고, 3~4 일 후 비장 세포를 얻기 위하여 마우스의 비장을 제거한다. 골수종 세포뿐만 아니라 이렇게 얻은 비장 세포를 배양 배지 또는 PBS로 잘 세척한 후, 두 세포를 비장 세포 대 골수종 세포가 약 5~10:1의 비율이 되도록 혼합하고 나서, 원심분리시킨다. 얻어진 상층액을 버리고, 침전된 세포를 완전히 풀어서, DMEM과 같은 배지 내의 폴리에틸렌 글리콜(PEG: 분자량 1,000~4,000) 용액

을 상기 혼탁액에 첨가하면서 혼탁액 0.1 내지 1.0 ml 당 비장 세포 수가 10⁸ 개가 될 때까지 1 내지 2 분 동안 37 °C에서 교반하고, 추가 1 내지 2 분 동안 계속 교반시킨다. 교반 후, 1 내지 3 분 동안 교반하면서 1 내지 3 ml의 배지를 상기 혼탁액에 첨가하고 나서, 7 내지 10 ml의 동일 배지를 서서히 첨가한다. 이 혼탁액을 37 °C에서 5 내지 10 분 동안 방치하고 나서 원심분리시킨다. 그 결과 얻어진 상층액을 버리고 남아있는 세포를 FCS-첨가 배지 안에서 다시 혼탁시키고 원심분리시킨다. 이 과정을 2 또는 3 회 반복한다. 이들 세포를 50 내지 200 ml의 FCS-첨가 배지 안에서 부드럽게 혼탁시키고, 이 혼탁액을 웰(well) 부피의 절반의 양으로 배양판의 웰에 분배하고, 3~7 % CO₂ 배양기를 사용하여 35 내지 38 °C에서

10 내지 18 시간 동안 배양한다. HAT 배지[정상 배지 안에 히포크산탄(10⁻⁶ 내지 10⁻³ M), 아미노프테린(10⁻⁸ 내지 10⁻⁷ M) 및 티미딘(10⁻⁶ 내지 10⁻⁴ M)]를 웰 부피의 절반의 양으로 배양판의 웰에 분배하고, 10 내지 30 시간 동안 계속 배양한다. 이어, 1 내지 4 일 동안 10 내지 30 시간의 간격으로 배양 상층액의 절반을 제거하고 동일 부피의 새로운 HAT 배지로 교체한 후, 이들 세포는 3~7 % CO₂ 배양기를 사용하여 35 내지 38 °C에서 10 내지 14 일 동안 배양한다.

군체 모양으로 자란 하이브리도마 세포가 웰에서 관찰될 때, 웰의 상층액의 절반을 제거하고 동일 부피의

HT 배지(아미노프테린이 없는 HAT 배지)로 교체하며, 1 내지 3 일 동안 10 내지 30 시간 간격으로 HT 배지로 상층액을 교체한다. HT 배지에서 3 내지 4 일 동안 배양한 후, 배양 상층액의 일부를 취하여 효소 면역분석법에 의해 항-TPO 항체 역가를 측정한다.

특정 항체의 생산성이 상기 항체 역가 측정에 의해 확인된 하이브리도마를 다른 배양판으로 옮겨 클로닝을 실시한다. 하나의 웰에 하나의 하이브리도마 세포가 존재하도록 한계 회석에 의해 하이브리도마를 회석시키는 방법; 부드러운 한천 배지로부터 군체가 분리되는 부드러운 한천 방법; 미세조작기를 사용하여 하나의 하이브리도마 세포를 골라내는 방법; 또는 세포 분류기를 사용하여 하나의 하이브리도마 세포가 분리되는 소터 클론(sorter clone) 방법으로 클로닝을 실시할 수 있으며, 간단하고 사용이 용이한 한계 회석 방법이 바람직하다. 항체 역가가 확인된 웰에 대하여, 클로닝을 예컨대 한계 회석 방법에 의해 2 내지 4 회 반복하고, 안정된 항체 역가를 나타내는 클론을 항-TPO 항체 생산 하이브리도마 세포주로 선택한다.

(4) 단일클론 항체의 제조

상기 단계 (3)에서 얻은 하이브리도마를 HT 배지 대신에 정상 배지 안에서 배양한다. 스피너(spinner) 또는 로울러(roller) 병을 사용하여 대량 배양한다. IgG 분획을 수집 및 정제하기 위하여 예컨대 대량 배양으로부터 얻은 상층액을 젤 여과시킴으로써 항-인간 TPO 단일클론 항체를 얻을 수 있다.

또는, 면역시킨 동물이 마우스인 경우, 하이브리도마는 비슷한 계통에 속하는 다른 마우스(예컨대, Balb/c 또는 Nu/Nu)의 복강에서 자랄 수 있다. 이 경우, 상기 단계 (3)에서 얻은 항-TPO 단일클론 항체 생산 하이브리도마가 동물 당 $4 \times 10^4 \sim 10^7$ 세포의 투여량으로 복강 주사에 의해 프리스탄-처리 암컷 마우스(4 내지 8 주생)에 투여될 때, 하이브리도마는 투여 2 내지 3 주 후 복수 종양을 야기한다. 각각의 마우스로부터 복수액을 채집하여 원심분리에 의해 고형 성분이 제거될 때, 복수액은 인간 TPO의 검출 또는 정량 및 정제를 위한 단일클론 항체로서 사용될 수 있다. 추가 정제가 필요하면, IgG 분획은 DEAE-세파로스 칼럼, 단백질 A-세파로스 칼럼 등을 사용하여 원심분리된 상층액으로부터 얻을 수 있다.

아우처로니(Ouchterlony) 방법(Introduction to immunological Experiments, Methods for Biochemical Experiments 15, Gakkai Shuppan Center사 발행, 도쿄, 일본, 74페이지, 1981년) 또는 EIA에 의해 항체의 아이소타입(isotype) 또는 서브클래스(subclass)를 결정한다.

단백질 함량은 폴린-로우리(Folin-Lowry) 방법 및 $280 \text{ nm} [1.4(\text{OD}_{280}) = \text{면역글로불린 } 1 \text{ mg/ml}]$ 에서의 흡광도에 의해 계산한다.

본 발명의 단일클론 항체의 제조 방법은 하이브리도마 세포주 L3-1 및 L4-1로부터 얻은 단일클론 항체(L3-1 및 L4-1로 칭함)가 각각 서브클래스 IgG 2a 및 IgG 2b에 속하는 것으로 밝혀진 하기 실시예에서 설명된다.

수득된 단일클론 항체 L3-1 및 L4-1의 항원 특이성은 하기 실시예에서 설명된다.

본 발명의 단일클론 항체는 인간 TPO의 분리 및 정제를 위한 친화성 크로마토그래피에서 리간드로서 사용될 수 있다. 친화성 크로마토그래피에서 유용한 부동 단일클론 항체는 겔 지지체 예컨대 CNBr-활성 세파로스 4B(Pharmacia Fine Chemicals사 제조) 또는 막 지지체를 사용하는 다양한 단백질 부동화 기술에 따라 제조될 수 있다. 부동 단일클론 항체를 사용하여 인간 TPO를 정제하기 위하여, 항체를 칼럼에 채우고 인간 TPO를 함유하는 용액을 칼럼에 가한다. 이어, 결합되지 않은 물질은 세척 제거하고 칼럼에 결합된 TPO는 예컨대 염화 나트륨, 프로피온산, 디옥산, 에틸렌 글리콜, 카오트로프 염(chaotropic salt), 글루아닌, 요소 등을 함유할 수 있는 글리신-HCl 완충액(pH 2.5)을 사용하여 용출시킨다.

본 발명의 단일클론 항체는 예컨대 고체상 샌드위치 방법과 같은 효소 면역분석법에 의해 인간 TPO의 결정에 사용될 수 있다.

본 발명의 구체예에 따라서, 본 발명의 검출 또는 정량 방법은 형성된 면역학적 복합체를 검출 또는 정량하기 위하여 항-TPO 단일클론 항체와 TPO-함유 시료를 접촉시키는 것을 포함한다.

고체상 샌드위치 방법은 하기 방법에 의해 실시된다:

고체상 샌드위치 방법은 동일한 항원의 상이한 에피톱(epitope)을 인식할 수 있는 두 개의 상이한 항체를 사용하여 항원을 검출하거나 또는 정량하는 비경쟁 고체상 효소 면역분석법의 한 형태이다. 즉, 첫 번째 단계에서 TPO를 인식하는 항체를 고체상에 부동화시키고, 이어 두 번째 단계에서 TPO와 고체상에 부동화 시킨 항체의 면역 복합체의 형성을 통하여 TPO를 고체상에 흡착시킨다. 세 번째 단계에서, 첫 번째 단계에서 사용된 항체에 의해 인식될 수 있는 에피톱 이외의 TPO 에피톱을 인식할 수 있는 표지된 항체 또는 이의 항체 단편과의 반응을 통하여 TPO를 검출하거나 정량한다. 표지된 항체 또는 이의 단편은 말레이이미드-힌지(hinge) 방법 등에 의해 효소 예컨대 호오스래디시 과산화효소를 사용하여 직접적으로 또는 아비딘-바이오틴 방법 등에 의해 간접적으로 표지함으로써 제조될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 CHO(1-163) 또는 CHO(1-332)의 투여에 따른 450/570 nm 흡광도의 변화를 나타내는 그래프.

도 2는 CHO(1-163), CHO(1-332), MKT(L-163) 또는 MKT(1-332)의 함량(또는 농도)에 따른 450/570 nm 흡광도의 변화를 나타내는 그래프.

도 3은 A450/A570의 흡광율에 의해 비교한, 본 발명의 단일클론 항체와 CHO(1-332) 및 재조합 인간 에리트로포이에틴의 반응성을 나타내는 그래프.

실시예

하기 실시예는 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

실시예 1: 항원 단백질 h6T(1-163)의 제조

하기 서열표(서열 3)에 나타낸 h6T(1-163)을 코딩하는 DNA를 화학적으로 합성하여 *Xba* I 및 *Hind*III로 절단된 pCFM536(ATCC No.39934; JP-A-60-501988) 안으로 클로닝하였다[마리 pmW1(ATCC No.39933)으로 형질전환된 대장균 JM109를 숙주로 사용하였다]. 이렇게 수득된 클론을 pCFM536/h6T(1-163)으로 명명하고, 이 발현 벡터를 함유하는 대장균 균주를 h6T(1-163)의 발현에 있어서 형질전환체로 사용하였다.

발현 플라스미드 pCFM536의 발현은 c1857 억제 유전자의 조절하에 있는 *λ*PLI 프로모터에 의해 조절된다. 상기 형질전환체는 50 μ g/ml의 앰피실린 및 12.5 μ g/ml의 테트라시클린이 첨가된 60 ml의 LB 배지에서 교반시키면서 30 °C에서 하룻밤 배양하고, 25 ml의 배양액을 50 μ g/ml의 앰피실린이 함유된 1,000 ml의 LB 배지에 첨가하고 A600에서 OD가 1.0 내지 1.2에 도달할 때까지 30 °C에서 교반시키면서 배양하였다. 이어, 65 °C로 예열된 약 330 ml의 LB 배지를 최종 온도가 42 °C가 되도록 첨가하고, h6T(1-163)의 발현을 유도하기 위하여 42 °C에서 3 시간 동안 교반 배양을 계속하였다.

형질전환체를 생산하는 0.6 g의 h6T(1-163) 냉동 세포를 3 ml의 물에 혼탁시키고 고압 분쇄기를 사용하여 파쇄시켰다. 침전된 분획을 원심분리에 의해 회수하고, 이로써 대부분의 단백질 불순물, 세포 성분 등을 제거하였다. 이렇게 회수된 h6T(1-163)을 함유하는 침전 분획을 2 ml의 물에 혼탁시키고, 0.5 ml의 1 M Tris-HCl 완충액(pH 8.5) 및 10 ml의 10 M 요소와 혼합하고 나서, 실온에서 5 분 동안 교반시켰다. 그 결과 얻어진 4 ml의 혼탁액에 28 ml의 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.5) 및 1 M 요소를 함유하는 8 ml의 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.5)을 첨가하고, 4 °C에서 하룻밤 동안 부드럽게 교반시켰다. 침전된 분획을 원심분리에 의해 회수하고, 이렇게 회수된 h6T(1-163)을 함유하는 침전 분획은 8 M 구아ニ딘, 5 % 아세토니트릴 및 0.3 % EDTA를 함유하는 200 μ l의 0.5 M Tris-HCl 완충액(pH 8.5)을 첨가함으로써 실온에서 용해시키고, 20 mg의 DTT를 첨가한 후 60 °C에서 1 시간 동안 환원 처리하였다. 이어, 용출 용매 A(0.1 % TFA) 및 용출 용매 B(0.05 % TFA를 함유하는 n-PrOH)를 사용하여, 이의 100 μ l를 25 % B로 평형화시킨 Capcell Pak C1 300A(Shiseido사 제조, 카탈로그 번호 C1 형: SG300A, ϕ 4.6 × 150 mm) 칼럼에 가하고 나서, 약 28 % 내지 약 30 % n-PrOH의 범위에서 용출된 h6T(1-163)의 피크(peak) 분획을 회수하기 위하여 25 % B 내지 40 % B의 50 분 선형 구배로 유량 0.4 ml/분에서 전개시켰다. 이 분획에 100 μ l의 50 % 글리세롤을 첨가한 후, 항원으로 사용된 h6T(1-163)을 제조하기 위하여 원심분리-증발에 의해 TFA 및 n-PrOH를 제거하였다.

실시예 2: 항-인간 TPO 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 제조

(1) 마우스의 면역화

유탁액을 제조하기 위하여 상기 실시예 1에서 수득한 500 μ g의 h6T(1-163)을 1,000 μ l의 리비(Rivi) 보조제(IMMUNOCHEM RESEARCH사 제조, 카탈로그 번호 52017700)와 잘 혼합하였다. 이어, 마리 당 5 μ g의 항원을 에테르하에서 각각의 Balb/c 암컷 마우스(4 주생)의 발바닥에 주사하였다. 부우스터(booster)는 상기와 동일한 방법에 의해 3 일 간격으로 총 8 회 반복하였다. 마지막 부우스터시에, 인간 IL-6를 마리 당 5 μ g의 투여량으로 피하 주사하였다. 마지막 부우스터한 지 3 일 후에, 헤마토크리트 모세관을 사용하여 안와로부터 혈액을 채취하고, 이로부터 혈청을 분리하여 효소 면역분석법에 의해 혈액 항체 역가 및 h6T(1-163)과의 반응성을 측정하였다. 1:1,000 이상의 항체 역가 및 TPO 반응성을 나타내는 마우스의 비장 세포가 이후 세포 융합에 사용되었다.

(2) 골수종 세포주의 제조

골수종 세포(P3X63-Ag.8-653)을 녹이고, 10 % FCS(Hyclone사 제조, 카탈로그 번호 A-1115-L)-첨가 DMEM 배지에 혼탁시키고 나서 300 × g에서 5 분 동안 원심분리시켰다. 상층액을 버리고, 남아있는 세포를 10 % FCS/DMEM에서 다시 혼탁시키고 37 °C, 5 % CO₂ 배양기 안에서 배양하였다.

(3) 세포 융합

세포 융합은 통상적인 방법으로 실시하였다. 요약하면, h6T(1-163)으로 면역화시킨 마우스의 콩부(즉, 오금, 서혜 및 장간막) 림프절 및 비장을 무균 제거하고, 항체 생산 세포를 준비하기 위하여 림프절 세포 및 비장 세포를 따로 10 % FCS/DMEM 안에서 혼탁시켰다. 이어, 로그 생장기의 골수종 세포 1 부를 5 부의 림프절 세포 또는 비장 세포와 혼합하고, 혈청을 제거하기 위하여 DMEM으로 세척하고 나서 폴리에틸렌 글리콜(PEG 1500, 빙링거 만하임사 제조, 카탈로그 번호 783641)을 사용하여 세포 융합시켰다. 세포 융합이 끝난 후, 그 결과 얻어진 세포를 10 % FCS 및 10 ng/ml 인간 IL-6를 함유하는 DMEM으로 1×10^6 세포/ml로 맞추고 96-웰 미세역가판[Nunc-Immuno Plate MaxiSorpTM, 인터메드(InterMed)사 제조, 카탈로그 번호 4-42404]의 웰에 100 μ l씩 분배하였다. 18 시간 후, 2×HAT(시그마사 제조, 카탈로그 번호 H0262)를 함유하는 10 % FCS/10 ng/ml-인간 IL-6/DMEM을 100 μ l/웰의 양으로 웰에 첨가하고, 세포를 37 °C, 5 % CO₂ 배양기 안에서 약 10 내지 약 14 일 동안 배양하였다.

(4) 항-인간 TPO 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 스크리닝

항-인간 TPO 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마는 효소 면역분석법으로 스크리닝하였다. h6T(1-163) 또는 CHO(1-332)는 PBS를 사용하여 20 μ g/ml로 맞추고 96-웰 미세역가판[Nunc-Immuno Plate MaxiSorpTM, 인터메드(InterMed)사 제조, 카탈로그 번호 4-42404]의 웰에 50 μ l씩 분배하였다. 미세판 혼합기[MICROPLATE MIXER MPM-1, 이와키 글래스(Iwaki Glass)사 제조]를 사용하여 교반시키면서 항원을 각 웰의 바닥에 완전히 퍼지도록 하였다. 판은 판 밀봉제[수밀론(Sumilon)사 제조, 카탈로그 번호 MS-30020]로 밀봉하고 항원을 판 위에 흡착시키기 위하여 37 °C에서 2 시간 또는 4 °C에서 하룻밤 방치하였다. 이어, 20 mM Tris-HCl/0.5 M NaCl/0.1 % Tween 20의 세척 완충액(pH 7.5)을 사용하여 세척한 후, 300 μ l의 4-배 회석된 블록 에이스(Block Ace, Dainippon Pharmaceuticals사 제조, 카탈로그 번호 UK-B25)를 각 웰에 첨가하고, 판을 판 밀봉제로 밀봉하고 37 °C에서 1 시간 또는 4 °C에서 하룻밤 방치하였

다. 세척 완충액으로 4 회 세척 후, 50 μ l의 배양 상층액의 하이브리도마 클론을 각 웰에 첨가하고, 미세판 혼합기를 사용하여 판을 교반시킨 후, 판 밀봉제로 밀봉하여 37 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 세척 완충액으로 4 회 세척하고, 50 μ l의 알칼리 탈인산가수분해효소로 표지되고 10-배 희석된 블록 에이스 안에서 1:500으로 희석된 단백질 A(PIERCE사 제조, 카탈로그 번호 32300)를 각 웰에 첨가하고 나서 37 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 웰을 세척 완충액으로 4 회 세척하고, 알칼리 탈인산가수분해효소(Kirkegaard Perry Laboratories제조, 카탈로그 번호 50-80-00)에 대한 발색 키트의 발색제 100 μ l를 각 웰에 첨가하고 나서, 판을 미세판 혼합기 상에서 교반시키고, 판 밀봉제로 밀봉한 후 실온에서 반응시켰다. 약 30 분 후, 판 판독기(Well reader SK601, Seikagaku Kogyo사 제조)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. h6T(1-163) 및 CHO(1-332) 모두에 대하여 양성인 클론을 웰로부터 선택하였다. 이렇게 선택된 클론을 펴서 추후 사용할 때까지 냉동시켰다. 이와 동시에, 한계 희석 방법으로 클로닝을 실시하였다. 한계 희석 방법은 1×HT(시그마사 제조, 카탈로그 번호 H0137)를 함유하는 10 % FCS/10 ng/ml-인간 IL-6/DMEM 배지를 사용하여 실시되었으며, 1 차 스크리닝은 효소 면역분석법에 의해 상기와 동일한 방법으로 실시되었다. 클론이 안정화되었을 때, 10 % FCS/DMEM에서 계대 배양하고 나서 편 후, 추후 사용할 때까지 냉동시켰다.

(5) 항-인간 TPO 단일클론 항체의 인식 위치

상기 방법에 의해, 총 63 개의 항-인간 TPO 단일클론 항체 클론을 수득하였다. 이들 클론으로부터 높은 반응성을 갖는 13 개의 클론을 선택하고, TPO 단백질과 반응하는 이들의 영역은 하기 서열 1의 인간 TPO 아미노산 서열을 바탕으로 합성된 다수의 항원 펩티드(HT-1, 2, 3, 4, 5 및 6)(하기 표 1 참조)를 사용하여 상기 단계 (4)에서 사용된 효소 면역분석법에 의해 결정되었다. 그 결과, HT-1(항체 L3-1)과 반응하는 항체, HT-2(항체 L4-1)과 반응하는 항체, 및 HT-3과 반응하는 10 개의 항체(항체 L1-10, S6-27, S3-13, S2-2, L3-15, L2-43, L3-4, L4-13, S4-12 및 S3-52)를 수득하였다.

[표 1]

인간 TPO(아미노산 위치 8~28) 펩티드 HT-1 영역	DLRVLSKLLRD SH VLHSRLSQ
인간 TPO(아미노산 위치 47~62) 펩티드 HT-2 영역	SLGEWKTQ M EETKAQD
인간 TPO(아미노산 위치 108~126) 펩티드 HT-3 영역	LGTQLPPQGR T TAHKDPNA
인간 TPO(아미노산 위치 172~190) 펩티드 HT-4 영역	NELPNRTSG L LETNFTASA
인간 TPO(아미노산 위치 262~284) 펩티드 HT-5 영역	SLPPNLQPGYSPSP T H P PTGQYT
인간 TPO(아미노산 위치 306~332) 펩티드 HT-6 영역	PSAPTPPTSP L NNTSYTHSQNLSQEG

수탁 기관: 일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소(National Institute of Bioscience and Human-Technology)

주소: 일본 이바라끼-켄 305 쪽꾸바-시 히가시 1-쪼메 1-3

수탁 기관: 차이나 센터 포 타입 컬쳐 콜렉션(China Center for Type Culture Collection)

주소: 중국 우한 430072 루오 짜아 산

이와 관련하여, 하이브리도마 L4-1의 서브클론(subclone)(L4-1-31) 및 하이브리도마 L3-1의 서브클론(L3-1-54)은 각각 수탁 번호 FERM BP-4956호와 FERM BP-4955호로 1994년 12월 27일에 일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소에 수탁되었다. 이들 서브클론은 또한 각각 수탁 번호 CCTCC-C95003호와 CCTCC-C95002호로 중국 수탁 기관(CCTCC)에 수탁되었으며, 이들 서브클론은 각각 마우스-마우스 하이브리도마 L4-1-31과 마우스-마우스 하이브리도마 L3-1-54로 명명되었다.

(6) 항-인간 단일클론 항체의 서브클론

상기 단계 (5)에서 수득한 항-인간 TPO 단일클론 항체 L3-1, L4-1, L1-10, S6-27 및 S3-13의 서브클래스는 EIA 방법에 의해 결정되었다(INNOGENETICS). 각 배양 상층액은 부동화된 쥐 항-마우스(서브클래스 특이적) 단일클론 항체와 반응시키고 나서, 알칼리 탈인산가수분해효소로 표지된 쥐 항-마우스(κ/경쇄 특이적) 단일클론 항체와 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 서브클래스를 결정하기 위하여 BCIP 기질을 첨가하여 발색 반응을 실시하였다. 그 결과, 항-인간 TPO 단일클론 항체 L3-1, L4-1, L1-10, S6-27 및 S3-13의 서브클래스는 각각 IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG3 및 IgG3임이 밝혀졌다.

(7) 항-인간 TPO 단일클론 항체의 정제

항-인간 TPO 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 10 mg의 소 인슐린, 10 mg의 인간 트랜스페린, 20 mM의 모노에탄올아민 및 5×10^{-5} M의 아셀렌산염 나트륨이 부가된 1 l의 무혈청 eRDF 배지에서 로울러

병(팔코사 제조, 카탈로그 번호 3000)을 사용하여 대량으로 배양하였다. 하이브리도마의 소생률이 90 % 이하로 도달할 때, 원심분리를 실시하여 배양 상층액을 회수하고 나서 0.22 μm 막 필터를 사용하여 여과하였다. 그 결과 얻어진 배양 상층액은 0.15 M 인산염 완충액(PBS)으로 평형화시킨 단백질 A 칼럼(일본 Fuji Filter Industries K.K.사 제조)에 100 $\text{m}\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 가하였다. 배양 상층액 내의 항체를 단백질 A에 흡착시킨 후, 흡착되지 않은 물질은 280 nm에서의 흡광도가 베이스 라인(base line)에 도달할 때 까지 PBS를 100 $\text{m}\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 칼럼을 통과시켜 세척제거하였다. 흡착되지 않은 물질을 세척제거한 후, 항체는 0.1 M 글리신 용출액(pH 2.5)으로 용출 및 회수하였다. 회수된 용액은 0.1 M Tris를 사용하여 중화시키고, 한외여과에 의해 적합한 농도로 맞추고, 멸균시키고 나서 -20 °C에 보관하였다.

실시예 3: 항-인간 TPO 단일클론 항체를 사용한 ELISA

고상 항체로서 HT-1 영역을 인식하는 항-인간 TPO 단일클론 항체(L3-1의 서브클론 L3-1-54)는 50 mM 탄산염 완충액(pH 9.2)을 사용하여 20 $\mu\text{g}/\text{m}\mu\text{l}$ 로 맞추고 나서 96-웰 미세역가판[Nunc-Immuno Plate MaxiSorpTM, 인터메드사 제조, 카탈로그 번호 4-42404]의 웰에 50 μl 씩 분배하였다. 고상 항체는 미세판 혼합기[MICROPLATE MIXER MPM-1, 이와키 글래스사 제조, 카탈로그 번호 MS-30020]를 사용하여 교반시키면서 각 웰의 바닥에 완전히 퍼지도록 하였다. 판은 판 밀봉제(수밀론사 제조, 카탈로그 번호 MS-30020)로 밀봉하고 고상 항체를 판 위에 흡착시키기 위하여 37 °C에서 2 시간 또는 4 °C에서 하룻밤 방치하였다. 세척 완충액[20 mM Tris-HCl/0.5 M NaCl/0.1 % Tween 20 (pH 7.5)]을 사용하여 세척한 후, 300 μl 의 4-배 희석된 블록 애이스(Dainippon Pharmaceuticals사 제조, 카탈로그 번호 UK-B25)를 각 웰에 첨가하고, 판을 판 밀봉제로 밀봉하고 37 °C에서 1 시간 또는 4 °C에서 하룻밤 방치하였다. 세척 완충액으로 4 회 세척 후, 50 μl 의 검사시료 또는 10-배 희석 블록 애이스로 희석된 기준으로서 농도를 알고 있는 TPO를 각 웰에 첨가하고, 미세판 혼합기를 사용하여 판을 교반시킨 후, 판 밀봉제로 밀봉하여 37 °C에서 1 시간 또는 4 °C에서 하룻밤 방치하였다. 반응 후, 세척 완충액으로 4 회 세척하고, 바이오틴으로 표지되고 HT-2 영역을 인식하는 항-인간 TPO 단일클론 항체(L4-1의 서브클론 L4-1-31; 1차 항체)는 10-배 희석 블록 애이스를 사용하여 500 $\text{ng}/\text{m}\mu\text{l}$ 로 희석하고, 50 μl 씩 각 웰에 분배한 후, 미세판 혼합기를 사용하여 판을 교반시키고, 판 밀봉제로 밀봉하여 37 °C에서 2 시간 또는 4 °C에서 하룻밤 방치하였다. 반응 후, 웰을 세척 완충액으로 4 회 세척하고, 과산화효소로 표지된 아비딘(UltraAvidinTM-호오스래디시 과산화효소, Leinco Technologies, 카탈로그 번호 A106)은 10-배 희석 블록 애이스를 사용하여 1:2,000으로 희석하고 각 웰에 50 μl 씩 분배한 후, 판을 미세판 혼합기 상에서 교반시키고, 판 밀봉제로 밀봉한 후 37 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 세척 완충액으로 4 회 세척하고, 1/100 부피의 기질 용액을 과산화효소(수밀론사 제조, 카탈로그 번호 ML-1120T)에 대한 발색 킷트의 TMBZ 발색제에 첨가하여 제조한 100 μl 의 발색제를 각 웰에 첨가한 후, 판을 미세판 혼합기 상에서 교반시키고, 판 밀봉제로 밀봉한 후 실온에서 반응시켰다. 약 20 분 후, 발색 반응을 중지시키기 위하여 100 μl 의 반응 종결 용액을 각 웰에 첨가하고 판을 미세판 혼합기 상에서 교반시켰다. 450 nm/570 nm 파장에서 흡광도는 ELISA 판 판독기(Well reader SK601, Seikagaku Kogyo사 제조)를 사용하여 측정하였다. 기준 그래프는 농도를 알고 있는 CHO(1-163) 또는 CHO(1-332)에 의해 얻어진 흡광도를 기준으로 작성하였다(하기 도 1 참조). CHO(1-163)과 CHO(1-332) 이외에, 또 다른 기준 그래프가 또한 대장균에서 생산된 인간 TPO 돌연변이체를 위하여 작성되었다[예컨대, MKT(1-332) 및 MKT(1-163)](하기 도 2 참조). 이로써, 다양한 종류의 TPO 분자가 양적으로 측정될 수 있었다.

MKT(1-332)는 Met 잔기(-2 위치에서) 및 Lys 잔기(-1 위치에서)가 하기 서열 1의 인간 TPO 아미노산 서열의 N-말단에 첨가된 아미노산 서열을 갖는다. MKT(1-163)는 Met 잔기(-2 위치에서) 및 Lys 잔기(-1 위치에서)가 하기 서열 1의 1~163 아미노산 서열의 N-말단에 첨가된 아미노산 서열을 갖는다.

또한, 항원 특이성은 서열 1의 인간 TPO의 N-말단 아미노산 서열과 높은 상동성을 나타내는 인간 에리트로포이에틴(hEPO)을 사용하여 검사하였다. 그 결과, 이 계가 TPO를 특이적으로 검출할 수 있음이 밝혀졌다(하기 도 3 참조).

또한, 샌드위치 방법이 고상 항체 및 바이오틴으로 표지된 1차 항체의 조합처럼 L3-1과 S3-13, S3-13과 L3-1, 또는 S3-13과 L4-1의 조합을 사용하여 실시될 때, TPO의 검출 및 정량은 L3-1-54와 L4-1-31의 조합의 경우와 같이 실시될 수 있었다.

상기 구체적인 실시예에서 설명한 바와 같이, 다양한 종류의 인간 TPO 분자는 본 발명의 단일클론 항체를 사용함으로써 검출 또는 정량할 수 있다.

서열표

하기 서열 1에 대한 정보:

서열 특성: 길이: 332 아미노산

종류: 아미노산

기원: 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)

서열 1

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
 20 25 30
 His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
 35 40 45
 Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
 50 55 60
 Gly Ala Val Thr Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
 85 90 95
 Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
 100 105 110
 Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
 115 120 125
 Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
 130 135 140
 Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
 145 150 155 160
 Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn
 165 170 175
 Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr
 180 185 190
 Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile
 195 200 205
 Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
 210 215 220
 Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe
 225 230 235 240

 Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly
 245 250 255
 Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser
 260 265 270
 Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu
 275 280 285
 Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
 290 295 300
 Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr
 305 310 315 320
 Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
 325 330

하기 서열 2에 대한 정보:

서열 특성: 길이: 165 아미노산

종류: 아미노산

기원: 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)

서열 2

```

Met Lys Ala Pro Val Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys
-2 -1 1 5 10
Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro
15 20 25 30
Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe
35 40 45
Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp
50 55 60
Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg
65 70 75
Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser
80 85 90
Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr
95 100 105 110
Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala
115 120 125
Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu
130 135 140
Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr
145 150 155
Thr Ala Val Pro Ser
160 163

```

하기 서열 30에 대한 정보:

서열 특성: 길이: 535 핵산

종류: 핵산

가닥: 이중

토플로지: 선형

분자 종류: 합성 DNA

기원: 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)

서설 3

CTAGAAAAAA CCAAGGGAGGT AATAAATA	28
ATG AAA GCA CCT GTA CCA CCT GCA TGT GAT TTA CGG GTC CTG TCT AAA	76
Met Lys Ala Pro Val Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys	
+1 5 10	
CTG CTG CGC GAC TCT CAC GTG CTG CAC TCT CGT CTG TCC CAG TGC CCG	124
Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro	
15 20 25 30	
GAA GTT CAC CCG CTG CCG ACC CCG GTT CTG CTT CCG GCT GTC GAC TTC	172
Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe	
35 40 45	
TCC CTG GGT GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAA GAG ACC AAA GCT CAG GAC	220
Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp	
50 55 60	
ATC CTG GGT GCA GTA ACT CTG CTT CTG GAA GGC GTT ATG GCT GCA CGT	268
Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg	
65 70 75	
GGC CAG CTT GGC CCG ACC TGC CTG TCT TCC CTG CTT GGC CAG CTG TCT	316
Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser	
80 85 90	
GGC CAG GTT CGT CTG CTG CTC GGC GCT CTG CAG TCT CTG CTT GGC ACC	364
Gly Gln Val Arg Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr	
95 100 105 110	
CAG CTG CCG CCA CAG GGC CGT ACC ACT GCT CAC AAG GAT CCG AAC GCT	412
Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala	
115 120 125	
ATC TTC CTG TCT TTC CAG CAC CTG CTG CGT GGC AAA GTT CGT TTC CTG	460
Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu	
130 135 140	
ATG CTG GTT GGC GGT TCT ACC CTG TGC GTT CGT CGG GCG CCG CCA ACC	508
Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr	
145 150 155	
ACT GCT GTT CCG TCT TAATGAAAGC TT	535
Thr Ala Val Pro Ser	
160	

(57) 청구의 범위**청구항 1**

인간 트롬보포이에틴(TPO)에 대한 단일클론 항체.

청구항 2

인간 트롬보포이에틴에 대한 단일클론 항체를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 트롬보포이에틴-함유 물질로부터 트롬보포이에틴을 분리하는 것을 포함하는, 트롬보포이에틴의 정제 방법.

청구항 3

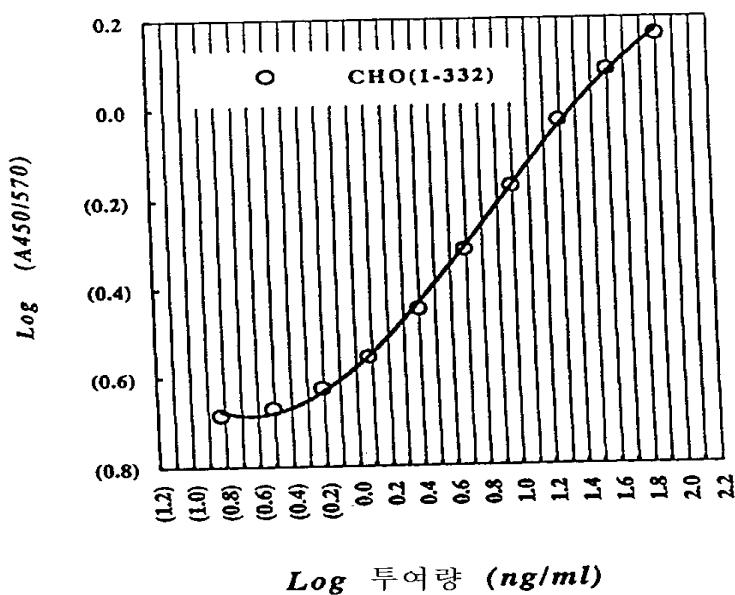
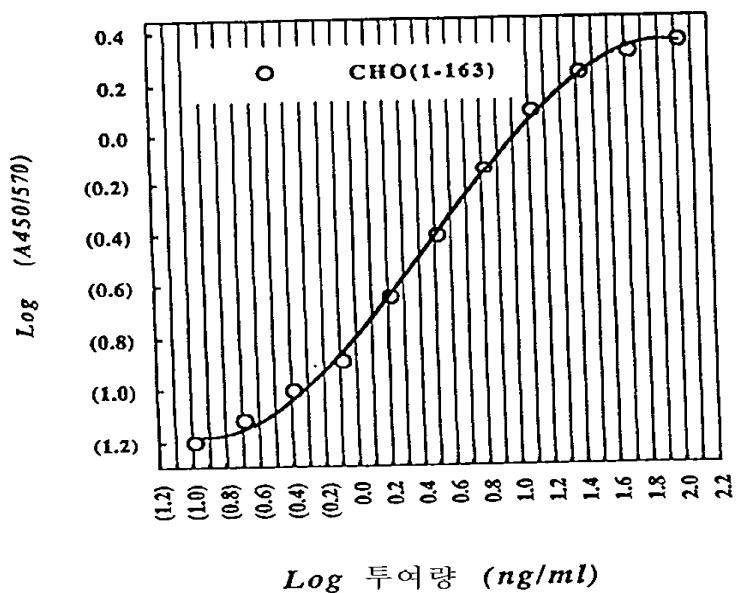
인간 트롬보포이에틴에 대한 단일클론 항체를 사용하는 것을 특징으로 하는, 트롬보포이에틴의 면역화학적 정량 또는 검출 방법.

청구항 4

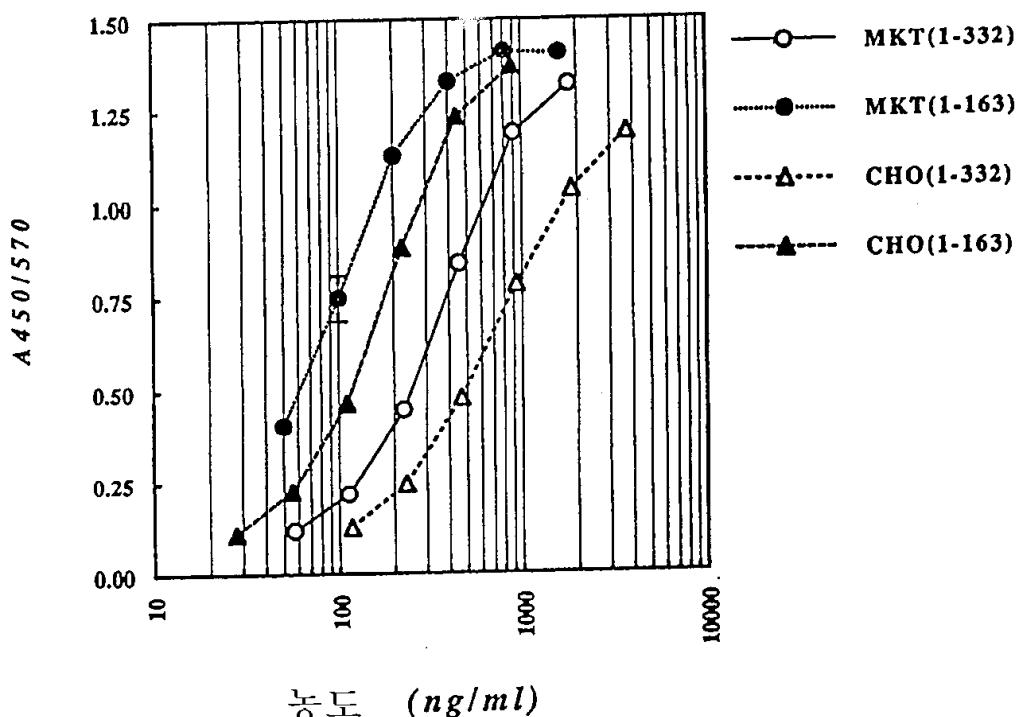
제 3항에 있어서, 형성된 면역학적 복합체를 정량 또는 검출하기 위하여 상기 단일클론 항체와 트롬보포이에틴-함유 시료를 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

도면

도면1



도면2



도면3

