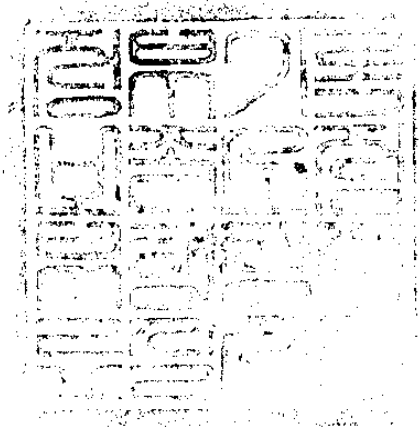




IL-2 수용체에 대한 단일클론 항체의 면역치료제 개발에 관한 연구 (I)

Development of Monoclonal Anti-Interleukin-2 Receptor
Antibody and its Application to Immunotherapy (I)

연구기관
한국과학기술연구원
부설유전공학센터



과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 면역치료제 개발”에 관한 제1차년도 연구의 최종 보고서로 제출합니다.

1990. 4.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원부설유전공학센터

협동연구기관명 : 한 양 대 학 교 의 과 대 학

연구책임자 : 정태화(유전공학센터 책임연구원)

연구원 : 김길현(유전공학센터 선임연구원)

이희구(유전공학센터 연구원)

권두한(유전공학센터 연구원)

최규삼(유전공학센터 연구원)

정태준(한양대학교 의과대학교수)

요 약 문

I 제 목

IL-2 수용체에 대한 단일클론 항체의 면역치료제 개발

II 연구개발의 목적 및 중요성

인체를 외부의 침입자로부터 보호하는데 T세포가 매우 중요한 역할을 하며 이런 T세포를 조절하는 인자가 바로 interleukin-2 (IL-2) 또는 T cell growth factor (TCGF) 인데 133개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량 15.5KD의 당단백질이다. IL-2는 T세포의 세포막에 있는 IL-2 수용체와 작용하여 T세포를 증식시키거나 조절 또는 활성화기능을 일으키게 한다.

IL-2수용체는 정상인의 세포에는 거의 존재하지 않으나 면역결핍증, 자가면역질환, 장기이식거부증 환자, leukemia 환자등의 T세포에는 과다발현되는 면역기능이 없는 T세포들이 이상증식됨으로써 결과적으로 신체내 면역기능의 저하를 초래한다. 이러한 질환의 치료에는 IL-2에 대한 단일클론항체의 이용과 IL-2수용체에 대한 단일클론항체를 만들어 이용하는 면역학적 치료의 방법이 있다.

현재는 cyclosporin A같은 화학적 치료가 일반적으로 사용되고 있으나 부작용이 매우 크므로 면역치료제의 개발이 시급하다.

본 연구에서는 IL-2와 IL-2수용체에 대한 각각의 단일클론 항체를 만들어서 IL-2수용체의 활성을 억제하는데 그대로 쓰거나 단일클론항체와 Toxin등의 접합체 또는 mouse-human hybridoma를

이용한 직접적인 면역치료제의 개발을 하기로 하고 1차년도에서는 IL-2에 대한 단일클론항체를 개발하였고 IL-2수용체에 대한 단일클론항체를 개발하여 이의 분석방법을 확립하였다.

Ⅲ 연구개발의 내용 및 범위

(1) IL-2에 대한 단일클론항체의 생산과 IL-2에 대한 ELISA 측정법

Recombinant IL-2를 Balb/c생쥐에 면역화한 후 적출한 비장세포와 myeloma cell과 세포융합을 시켜서 얻은 hybridoma세포를 cloning하여 IL-2에 대한 항체를 분비하는 clone을 선별한 결과 IgG1과 IgG₂a로 된 5종의 단일클론항체를 분비하는 clone을 얻었다.

이 중 각기 다른 epitope에 작용하는 두 종의 단일클론항체를 정제하여 alkaline phosphatase와 conjugate를 만들어서 Sandwich ELISA측정법을 개발하였으며 이의 측정범위는 2~100ng/ml으로 bioassay(3~50ng/ml)보다 광범위한 측정범위를 가지고 있다.

(2) T임파구 세포들의 IL-2수용체 발현

세포막에 발현된 IL-2수용체를 측정하기 위해 서로 다른 leukaemia T-cell line인 HUT102 C11, Molt4, CEM c. 1. 5, RPMI8401, HSB, Jurkat세포를 배양 측정한 결과 HTLV-1에 감염된 HUT102C11세포에서 제일 높게 발현되었으며 rIL-2 ALC ConA, PHA, Ionomycin으로 HUT102C11을 발현 자극시킨 결과 rIL-2의 경우가 제일 높았다.

IL-2수용체에 대한 발현 억제는 PBL세포를 interferon과 colchicine, dexamethasone으로 처리한 결과 α -interferon을 γ -interferon과 병합사용시 46%의 발현 억제 효과가 관찰되었으며 colchicine의 경우 최고 81%의 억제효과가 나타났으며 dexamethasone도 역시 mitogen 및 IL-2에 의한 IL-2수용체의 발현 억제 및 T cell증식 억제현상을 나타내었다.

(3) IL-2수용체에 대한 단일클론항체 생산

HUT102C11세포배양액에 rIL-2를 넣고 배양하여 IL-2수용체의 발현을 증가시킨 후 면역화 시킨 Balb/c의 비장세포와 myeloma cell를 세포융합하였다. Screening는 1차적으로 전hybridoma clone중 항체를 분비하는 clone만을 선별하였으며 2차 screening에서는 HUT102C11, Jurkat 그리고 B-cell line인 B258 세포들 중 HUT102C11에 보다 양성을 나타내는 clone를 선별하였다. 이들 clone들이 생산하는 항체들이 IL-2수용체에 대한 항체인지 아닌지를 확인하기 위하여 실험을 진행 중이다. 이들 중 anti-Tac 단일클론항체와 경쟁반응을 일으키는 clone은 없어 anti-Tac 단일클론항체가 반응하는 IL-2수용체의 epitope에 반응하는 단일클론항체를 분비하는 clone은 없을 가능성도 배제할 수 없다.

따라서 보다 정확한 IL-2수용체에 대한 항체의 역가확인을 위해서 IL-2수용체의 부분적 분리정제와 각 clone에 대한 ascites fluid생산을 시도하고 있다.

IV 연구개발의 결과 및 활용에 대한 건의

Recombinant IL-2를 Balb/c mouse에 면역시켜서 5종의 hybridoma cell line를 얻었으며 이들은 모두 IL-2의 생리활성을 억제하며 subtyping test결과 1종은 IgG_{2a}이며 4종은 IgG₁로 된 단일클론항체를 생산하였다. 또한 이들 단일클론항체가 서로 다른 epitope와 반응하는 성질을 이용하여 Competitive inhibition assay로 IL-2를 측정할 수 있는 Sandwich ELISA법도 개발하였다.

IL-2수용체의 효율적인 분리를 위해 세포막에 존재하는 IL-2수용체의 최대 발현효과를 가지는 실험조건을 확립하였다. HTLV-I의 genome을 갖고있는 T cell leukemia cell line인 HUT102C11세포에 여러 종류의 mitogen과 lymphokine을 처리한 결과 IL-2을 10ug/ml배지의 농도로 첨가했을 때 최대발현을 나타냈다.

IL-2수용체에 대한 단일클론항체의 개발은 HUT102C11세포들은 Balb/c mouse에 면역화시켜서 여러개의 clone을 얻었으나 이 단일클론항체를 확인함에 있어서 현재는 anti-Tac과만 비교할 수 있어 anti-Tac과 다른 epitope나 p75, p90등의 단백질에 대해서는 immunoblotting method밖에 없으나 방법의 민감도가 EIA나 RIA에 비해 현저히 떨어지므로 확인하기가 매우 어렵다. 따라서 HUT세포의 대량배양기술과 다른 assay system의 개발이 요구된다.

IL-2에 의해 발현된 IL-2수용체는 α -IFN, colchicine, dexamethasone등에 의해 양성 IL-2수용체를 가진 세포들이 증식 억제되었다.

Summary

Immune system is a complicated defense mechanism of organisms to protect themselves from foreign invaders such as bacteria, viruses and so on. T cells play a crucial role in the regulation of the immune system. Interleukin-2 (IL-2) or T cell growth factor (TCGF), a 15.5 KD glycoprotein with 155 amino acid residues, is one of the best known T-cell function regulators ; it stimulates T cells to differentiate and/or proliferate.

IL-2 interacts with a receptor molecule on the membrane of T cell to exert its biological function. High affinity (kd of $\sim 10\text{pM}$) and low affinity (kd of $\sim 10\text{pM}$) forms of the human IL-2 receptors have been identified. Low-affinity form of IL-2 receptor was characterized as a 55KD transmembrane glycoprotein, and the high-affinity form of IL-2 receptor consists of 75 KD glycoprotein noncovalently associated with 55KD molecule.

Resting T cells show very low level of IL-2 receptor expression, where as activated T cells or T cells from certain diseases such as allograft rejection, malignancy, autoimmune disease and viral infection express very large amount of IL-2 receptors.

Clinical trials to control these diseases are carried out by using monoclonal antibodies against IL-2 and receptor as well as chemotherapy.

Development of immuno-reulatory agent is very important for immunotherapy, and utilization of those antibodies as such immunoregulatory agents would be desirable.

In this study monoclonal antibodies reactive with IL-2 were developed by hybridoma technique, and established was a ELISA method for IL-2 by using the monoclonal antibodies. Modulation of IL-2 receptor molecules on T cells and T cell lines by various agents and culture conditions was studied. Development of monoclonal antibody against IL-2 receptor is under investigation.

CONTENTS

I . Introduction	13
II . Materials and Methods	16
1. Experimental materials and instruments.....	16
2. Methods	17
A. Preparation of anti IL-2 monoclonal antibodies	17
a. Mass production of antibodies from ascitic fluid	17
b. Purification of antibodies	18
c. Charaterization of antibody by ELISA	18
d. Comparison of IL-2 analysis methods.	19
B. Preparation of anti IL-2 receptor monoclonal antibodies	22
a. Charaterization of IL-2 receptor	22
b. Purification of IL-2 receptor	23
c. Development of anti IL-2 receptor monoclonal antibodies	25
III . Result and Discussion.	27
1. Preparation of anti IL-2 monoclonal antibodies	27
2. Purification of antibodies from ascitic fluids.	27
3. Development of qualitative assay of IL-2.	28
a. Production of conjugate and optimization of antibody-AP	

conjugation	28
b. Identification of epitope by competitive inhibition assay	30
c. Comparative analysis of ELISA and Bioassay	33
4. Characterization of IL-2 receptor	33
a. Expression regulation of IL-2 receptor	36
b. IL-2 receptor regulation by interferon	36
c. IL-2 receptor regulation by colchicine	39
d. IL-2 receptor regulation by dexamethasone	39
5. Purification of IL-2 receptor	39
a. IL-2 receptor expression on T cell lines.	39
b. Soluble IL-2 receptor	42
c. Isolation of IL-2 receptor	42
6. Identification of anti IL-2 receptor monoclonal antibodies	46
IV. Conclusion and remarks	54
References	57

목 차

제1장 서 론	13
제2장 실험재료 및 방법	16
제1절 실험재료 및 기기	16
제2절 실험방법	17
1. IL-2 단일클론항체의 개발	17
가. mouse의 면역화	17
나. myeloma 세포배양	18
다. 세포융합	18
라. 하이브리도마의 선별	19
1-1 단일클론항체의 대량생산	19
1-2 단일클론항체의 분리정제	20
1-3 ELISA에 의한 단일클론항체의 특성결정	20
1-4 IL-2에 대한 측정법의 비교	21
2. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 개발	22
2-1 IL-2수용체의 특성 및 조절	22
2-2 IL-2수용체의 분리정제	23
2-3 IL-2수용체 단일클론항체의 개발	25
제3장 결과 및 고찰	27
제1절 IL-2 단일클론항체의 개발	27

제2절	단일클론항체의 분리정제	27
제3절	IL-2 정량분석법 개발	28
	1. Conjugate의 제조와 최적 농도조사	28
	2. Competitive inhibition assay를 이용한 epitope의 선별	30
	3. ELISA 와 Bioassay의 비교분석	33
제4절	IL-2수용체의 특성 및 조절	33
	1. 배양기간에 따른 IL-2수용체의 발현 및 증식	36
	2. 인터페론이 IL-2수용체 발현에 미치는 영향	36
	3. Colchicine이 IL-2수용체의 발현에 미치는 영향	39
	4. Dexamethasone이 IL-2수용체의 발현에 미치는 영향	39
제5절	IL-2수용체의 분리정제	39
	1. T 임파구 세포들의 IL-2수용체량의 측정	39
	2. IL-수용체 Expression	42
	3. HUT102C11-cell 배양상층액내의 IL-2수용체량의 분석	42
	4. IL-2수용체의 분리정제	46
제6절	IL-2수용체의 단일클론항체 개발	46
제4장	결론 및 건의사항	54
참고문헌	57

제1장 서 론

인체는 세균이나 바이러스 같은 외부의 침입자로부터 자신을 보호하기 위해 면역글로블린 같은 체액성면역과 T세포와 B세포로 이루어진 세포성 면역의 방어가작을 갖고 있다. 그 중 T세포는 면역기능을 향상시키거나 억제하는 조절기능을 갖고 있을 뿐 아니라 lymphokine을 분비함으로써 다른 T세포 또는 B세포들을 활성화시키거나 증식시키는 면역체제에서 중추적인 역할을 하고있다.¹⁾

Interleukine-2는 여러 lymphokine 중 T cell growth factor로 밝혀졌는데 133개의 아미노산으로 구성된 분자량 15.5k dalton의 당단백질로서²⁾ T세포 또는 일부 B세포의 세포막에 존재하는 IL-2 수용체와 반응하여 T세포의 증식 및 다른 killer세포의 활성을 유도하는 기능을 갖고있다. IL-2수용체는 정상 T세포에서는 매우 그 수가 적으나 항원이나 mitogen을 처리하고 배양하면 많은 T세포의 세포막에서 그 수가 증가하며³⁾ HTLV-1을 갖고 있는 leukemia 세포들의 세포막에서 상당히 많은 수의 IL-2수용체를 갖고 있다. IL-2수용체는 IL-2와의 친화력에 따라 고친화(Kd=10pm)와 저친화(Kd=10nM)의 두가지 형태가 존재한다. IL-2수용체에 대한 연구는 anti-Tac이라 불리는 단일클론항체에 의해 많이 진행되었는데⁴⁾ 이 단일 클론항체와 반응하는 수용체는 251개의 아미노산으로 이루어졌으며 33Kdalton의 펩타이드가 당과 결합 55Kdalton의 당단백질로 저친화력을 갖고 있다.⁵⁾ 그런데 anti-Tac는 55Kdalton단백질(p55) 과만 반응하고 β 체인으로 불리는 다른 IL-2수용체인

75Kdalton 단백질 (p75)과는 반응하지 않는다.⁶⁾ T세포의 세포막에서 p55와 p75는 서로 독립적으로 존재하며 IL-2와 반응하여 저친화력과 증친화력을 나타내는 데 두체인이 비공유결합하여 고친화력을 나타낸다.^{7,8)} 최근 세번체의 체인으로서 IL-2와 반응하는 단백질이 발견되었는데 분자량이 90K~100Kdalton으로서 p75처럼 anti-Tac과는 반응하지 않는다.⁹⁾

IL-2수용체는 T세포를 비롯해서 다른 여러 종류의 세포들에서도 존재한다. p55는 휴지상태의 T세포, B세포 단핵세포등에서는 매우 적은 수가 존재하나 이들세포들을 렉틴이나 항원 또는 mitogen등으로 자극시켰을 경우 보다 많은수의 p55가 세포막에 발현된다. 그리고 종양세포, HTLV-I유전자를 갖고있는 세포들도 많은 수의 p55를 세포막에 발현되며¹⁰⁾ 활성화된 말초혈액내 단핵세포와 HTLV-1에 감염된 leukemia세포들의 p55는 수용성 형태로도 분비된다. p75도 역시 p55와 마찬가지로 mitogen등으로 활성화된 T세포, B세포, 단핵세포 등에서도 발현 phytohemagglutinin (PHA)나 phorbol myristate acetate (PMA)으로 처리된 T세포 HTLV-I에 감염된 T세포에서 많이 존재한다.¹¹⁾ 휴지기의 B세포를 cowan-I로 처리하거나¹²⁾ 단핵세포를 LPS나 LPS와 α -interferon을¹³⁾ 함께 처리했을 때에도 p75는 발현되며 대과립 림프구 (LGL)는 p75는 발현하나 p55는 발현하지 않는다.¹⁴⁾

p55와 p75는 세포의 세포막에 독립적 또는 결합체로서 존재하지만 IL-2의 신호전달에는 차이가 나고 있다. p55의 경우 세포질내로 불과 13개의 아미노산이 뻗어 있는데 이것은 IL-2에 의한 신호전달에 충분하지 못하므로 결과적으로 세포의 증식작용을 유도

하지 못한다.¹⁵⁾ 반대로 p75는 p55의 존재없이 충분한 IL-2의 존재하에 독자적인 신호전달을 이룰 수 있다. 그러나 p55와 p75의 결합체는 고친화수용체를 형성함으로써 저 농도의 IL-2과 반응해서도 충분한 신호전달을 이룰 수 있다.

IL-2수용체를 가진 세포들은 정상인의 체내에서는 거의 발견할 수 없지만 면역결핍증 림프종양, 자가면역질환과 장기이식거부증을 일으킨 환자에서는 높은 빈도로 T세포, B세포 등의 세포막에서 발견된다. 면역결핍증환자는 경우 IL-2이상에도 불구하고 IL-2수용체가 세포에 발견되며 AIDS환자에서도 수용성 IL-2수용체가 발견된다. Systemic lupus erythematosus, pulmonary sarcoidosis, rheumatoid arthritis등의 자가면역질환에서도 p55가 림프구에 발견되어 있으나 IL-2의 수는 매우 감소되어있다. HTLV-1와 관련된 T세포 leukemia는 고친화력을 갖는 수용체를 갖고있는데 ^{6,21,22)} PHA로 처리된 T임파구 보다 최고 10배 이상의 수용체를 갖고 있으며 이러한 수용체는 종양 T세포의 무절제한 증식에 영향을 주고 있다.

이상과 같이 IL-2수용체의 과다발현은 T세포의 이상증식 현상을 일으킴으로써 IL-2수용체의 기능을 억제하거나 IL-2수용체에 대한 단일클론항체 개발, 이 단일클론에 toxin이나 방사성 동위원소를 부착하는 방법, IL-2에 toxin을 접합시키는 법 등이 치료제로서 이용되고 있는데 IL-2 보다는 IL-2수용체를 이용하는 방법이 보다 더 주목되고 있다.

본 연구에서는 IL-2와 IL-2수용체에 대한 각각의 단일클론항체를 개발하여 IL-2수용체 이상으로 인한 질병의 치료제를 개발코자 한다.

제2장 실험재료 및 방법

제1절 실험재료 및 사용기기

본 연구에 사용된 쥐는 Balb/c로써 본 센터에 특수사업부에서 분양받은 것을 사용하였으며 하이브리도마 세포주를 개발하기 위해 사용한 cell line은 P3×63Ag 8.653을 사용하였다. 정제된 human recombinant IL-2 (rIL-2) 본 센터의 단백질 공학 연구실에서 공급받았으며, IL-2수용체를 갖고있는 HUT102cell cell line은 California Institute of Technology (U.S.A)의 Dr. G. Y. Kim으로부터 분양받았다. IL-2수용체에 대한 단일클론항체 (Anti-Tac)와 Anti-Tac FITC conjugate는 Becton/Dickinson제품을 구입하였다.

세포배양에 필요한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), NTCT-135와 gentamicin은 Gibco사 제품을 사용하였으며, Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), RPMI 1640, HEPES, L-glutamine, Sodium bicarbonate, hypoxanthine (HA), aminopterin, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Polyethylene glycol 1,450 (PEG), alkaline phosphatase (AP), P-Nitrophenylphosphate (PNPP), phytohemagglutinin (PHA), phorbol 12-myristic 13-acetate (PMA), concanavalin A (Con A), 등은 Sigma 제품 (U.S.A)을 사용하였다.

[³H] Thymidine은 Amersham (England)에서 구입하였으며 Protein A Sepharose CL-4B와 CNBr-activated Sepharose 4B는 Pharmacia (Sweden)로부터 구입하였다.

본 연구에 사용된 각종 plastic ware와 disposable tube 등은 모두 Costar (Cambridge, U.S.A)와 Falcon 제품들이며 ELISA 용은 주로 Nunc (Denmark)의 제품들을 사용하였다.

기기로써 laminar flow chamber는 Bllco Glass Co.의 horizontal flow type을, table-top centrifuge는 Sorvall model RT 6000B를, Co₂ incubator는 Lunaire Environmental Inc.의 model Blo610H를, inverted microscope는 Leitz Diavert를 각각 사용하였고, ELISA reader는 Flow Lab. 의 Titerteck Multiskan을, Fraction collector는 Gilson사의 제품을, 전기영동용 장비는 Bio-Rad 제품을 각각 사용하였다.

IL-2 수용체의 분석을 위해 cell harvester는 Norway의 Skatron 제품을 사용하였으며 Flow cytometer는 Bacton/Dickinson의 FACScan을 사용하였다.

제2절 실험방법

1. IL-2 단일클론 항체의 개발

가. mouse의 면역화

0.2ml의 정제된 rIL-2 (100 μ g/ml)와 동량의 Freund's complete adjuvant (FCA)를 유상화가 될때까지 잘 혼합하여 생후 6~8 주된 Balb/c의 복강내에 1주간격으로 4회 주사하였다. 세포융합을 하기위해 3일전 adjuvant없이 0.2ml의 rIL-2만을 booster로 복강내에 주사하였다. 항혈청내의 항체는 쥐의 안하정맥에서 채혈하여 조사하였다.

나. myeloma 세포배양

myeloma 세포배양에 필요한 배지는 glucose함량(13.38 g/l)이 고농도로 포함되어 있는 DMEM media에 0.1% Fetal bovine Serum (FBS) 과 Gentamicin (50mg/l)이 첨가된 것을 사용하였으며 37°C에서 5%의 CO₂가 유지되는 항온기 내에서 세포수가 1×10⁶/ml 이 넘지 않도록 계대배양 하였다. 5×10⁵/ml 정도로 자란 세포는 원심분리(1,200rpm)하여 세포를 모아 10% DMSO와 90% FBS가 첨가된 cryomedia에 현탁시켜 사용하기 전까지 액체 질소에 냉동 보관하였다.

다. 세포융합

최종 booster 후 3일 후에 항체의 생성여부를 ELISA에 의해 확인한 후 Balb/c mouse를 ether로 마취시킨 후 비장을 적출하였다. 이 비장을 tissue grinder를 갈아서 비장세포를 얻어 HBSS로 현탁액을 만들고 이때 얻어진 비장세포를 15ml의 원심분리관에 넣어 원심분리 시켰으며, 이 방법을 2회 반복하여 비장세포를 충분히 세척하였다. 한편, myeloma cell인 P3×63AG8.653도 같은 방법으로 세척한 후 incomplete media를 넣어주어 10:1의 비율로 섞어 원심분리하여 상층액을 완전히 제거한 다음 45% PEG와 5% DMSO 1ml을 한방울씩 넣어 1분간 흔들며 반응시키고 HAT media를 넣어주어 96-well plate에서 약 10~15일간 배양한 후 하이브리드군 형성이 확인되면 HT media로 바꾸어 증식을 촉진시켰다.

라. 하이브리도마의 선별

clone 형성되어 충분히 성장된 하이브리도마의 상층액중 $100\mu l$ 씩을 채취하여 indirect ELISA 방법에 의하여 항체의 역가를 측정하였고 96-well plate에는 신선한 HT medium을 보충해 주었다. 측정은 96-well plate에 rIL-2를 흡착시킨 다음 상층액 $100\mu g$ 을 넣어 반응시킨 후, PBST에 1:1000으로 희석된 goat anti-mouse IgG-AP를 conjugate로 사용하였다. ELISA결과 양성으로 판정된 well의 세포 clone은 24-well plate로 옮겨서 배양한 후 그 상층액을 채취하여 항체의 역가를 재확인하였다. 여기에서 항체의 생산이 강한 양성을 나타내는 세포군을 선택하여 limiting dilution에 의해 단일클론을 얻기 위한 cloning을 실시하였다. Feeder cell인 macrophage가 분주되어 있는 96-well plate에 하이브리도마 세포수가 well당 1~2개씩 분주되도록 하였으며 10~20일 사이에 96-well plate에서 clone이 형성된 하이브리도마 세포를 또 다시 1~2번 cloning하여 완전한 단일클론이 되도록 하였다.

1-1. 단일클론 항체의 대량생산

2차 항체검사 결과 강한 양성반응을 나타내는 well의 세포를 선별하여 T-flask에 배양한 후 상층액을 취하는 in-vitro법과 FIA pristane이 감각된 Balb/c mouse에 하이브리도마 세포를 주사한 후 생성된 복수를 취하는 in-vivo법을 이용하여 항체를 생산하였다. 복수를 이용하는 경우 복강내 암유발을 priming agent인 FIA를 0.5 ml씩 Balb/c의 복강내에 주사하고 일주일 후 1×10^7 개의 하이브리도마를 다시 복강내에 주사하여 생성된 복수를 취하였다. 얻어진

복수는 4°C에서 centrifuge로 2,500rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

1-2. 단일클론 항체의 분리·정제

가) 항체의 분리정제 방법

복수내 단일클론 항체의 분리정제는 4°C에서 30분간 원심분리하여 (3,000rpm)하여 지방과 침전물을 제거한 후 NaOH를 넣어 pH를 8.0으로 조절하였다. 단일클론 항체의 분리는 protein A-Sepharose CL-4B affinity chromatography법에 의해 column을 packing한 후 0.1M sodium phosphate, PH8.0으로 충분히 평형시킨 다음 복수액을 약 5ml/hr의 속도로 흘려주어 항체가 column에 결합하도록 하였다. 그 후 같은 용액으로 세척하여 column에 결합하지 않은 단백질을 제거하고, 결합된 항체 단백질은 0.1M sodium citrate buffer로 pH를 변화시켜 항체를 분리하였다. 용출된 항체용액은 4°C에서 PBS로 충분히 투석하여 동결건조한 후 -20°C에서 보관하였다.

나) 단백질의 총량측정

복수액이나 분정제된 단일클론 항체중에 존재하는 단백질의 양은 Bradford법에 의 정량을 하였으며 coomassie blue G-250이 단백질중의 amino acid나 arginine과 반응할 때 그 최대 흡광도가 595nm로 청색으로 변하는 성질을 이용하여 단백질의 양을 측정하였다.

1-3. ELISA에 의한 단일클론 항체의 특성 결정

Avrameas (1969)의 방법에 따라 one-step glutaraldehyde방법에 의해 Mab-AP conjugate를 제조하여 IL-2에 대한 단일클론 항체의 특성을 조사하였다. IL-2 단일클론 항체의 측정은 competitive bind-

ing inhibition 측정법으로 먼저 96-well plate에 rIL-2를 $1\mu\text{g}$ 씩 coating하였다. 그리고 단일클론 항체를 포함한 배양액을 각각 2배씩 희석하여 반응시킨 후 제조한 Mab-AP conjugate를 1:100으로 희석하여 넣어주었다. 그리고 AP substrate용액 (PNPP)를 $200\mu\ell$ 를 넣어 405nm에서 측정하였다.

1-4. IL-2에 대한 측정법의 비교

가) Sandwich ELISA 측정법

IL-2의 정량을 위해 서로 반응기가 다른 2개의 단일클론 항체를 사용하였다. 먼저 IL-2에 대한 단일클론 항체 (030-101) $1\mu\text{g}$ 을 96-well plate에 PBST로 세척한 후 희석배수가 각각 다른 rIL-2를 더하여 37°C 에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. Mab-AP conjugate를 1:200으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척하고 alkaline phosphatase 기질용액 (PNPP) $200\mu\ell$ 을 가하고 실온에서 30분간 반응시켜 발색이 되면 반응액의 흡과도를 405nm에서 측정하였다.

나) IL-2에 대한 생물학적 정량

IL-2의 생리활성의 측정은 IL-2에 dependent한 cytotoxic T-cell line (CTLL)을 사용하였다. 1×10^4 cell/well에 rIL-2용액 ($200\text{ng}/\text{ml}$)을 2배씩 희석하여 well에 여러농도 ($0\sim 200\text{ng}/\text{ml}$)로 가한 다음 30시간 동안 배양시킨 후 [^3H] Thymidine ($0.5\text{Ci}/\text{well}$)을 각각 첨가하였다. 그 후 18시간동안 배양한 후 glass fiber filter (Whatman, Gf/A)에 harvest하고 60°C 에서 3시간동안 건조시킨 후 scintillation cocktail을 넣어 β -counter (Packard, Tri-card)를 사용하여 cpm 값을 측정하였다.

2. IL-2 수용체에 대한 단일클론 항체의 개발

2-1. IL-2 수용체의 특성 및 조절

IL-2 수용체의 측정은 indirect immunofluorescent 방법을 이용하여 분리된 말초혈액 임파구의 표면 수용체를 검색하였다. anti-Tac 단일클론 항체와 2차 항체인 Goat anti-mouse Ig-FITC (GAM-FITC, Cappel, PA)를 사용하였으며 세포는 1% paraformaldehyde PBS용액으로 고정한 후 간접면역형광법과 함께 세포증식의 측정도 겸하였으며 이는 [^3H] Thymidine의 세포핵내 용화를 β -count로 측정하는 방법을 이용하였다.

가. Peripheral Blood Lymphocyte (PBL)의 분리

말초혈액 (Peripheral blood)으로 부터 PBL의 분리는 heparin이 처리된 정상인의 혈액을 동량의 HBSS로 희석하고 이를 같은량의 Ficoll-Hypaque (비중: 1.077 g/cm^3 , Sigma) 위에 중층하여 $900 \times g$ 에서 20분간 원심분리한 후, Ficoll의 위층된 PBL층을 얻어 RPMI 1640 배지로 $400 \times g$ 에서 10분간 3회 세척하였다.

나. PBL의 배양

정제된 PBL을 complete media (RPMI 1640, NaHCO_3 2 g/l , HEPES 10 mM , glutamine 2 mM , 2-Mercaptoethanol $5 \times 10^{-5} \text{ mM}$, gentamicin 50 mg/l , FBS 10%)를 사용하였으며 HBSS로 세포를 세척하였다. PBL 세포를 CO_2 incubator (5%)로 37°C 에서 배양하였으며 각기 다른 mitogen들이 IL-2 수용체의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 사용한 mitogen으로는 PMA, PHA, Con A, calcium ionophore A 23187 등이었고 림포카인 IL-2와 interferon α 및 α 그리고 이들 혼합액을 첨가하였으며, 시간단위로 배양하여 측정하였다.

다. 면역형광법에 의한 IL-2 수용체의 분석

Mitogen을 처리한 PBL (1×10^6 cell/ml) 에 IL-2 수용체의 발현과 증식을 관찰하기 위해 배양한 세포를 원심분리로 회수하여 2.5% horse serum이 첨가된 HBSS로 세척한 후 anti IL-2R를 20 μ l 씩 가한 후 40°C에서 30분간 반응시키고 다시 세척하였다. 최종적으로 2차 항체인 GAM-FITC 용액을 반응시킨 후 1% para-formaldehyde PBS 용액으로 고정시킨 후 형광현미경으로 세포수를 200개 이상 세어서 분석하였다.

라. IL-2 수용체의 생물학적 분석

말초 혈액으로부터 분리된 PBL (1×10^6 cell/ml) 에 IL-2 또는 PMA, PHA 등의 mitogen과 그 혼합물 등을 가하여 stimulation시킨 세포를 37°C로 5% CO₂상에서 72시간 배양하였다. 배양기간중의 마지막 16시간 [³H] thymidine (0.5 μ Ci/well) 으로 처리한 후 세포를 glass fiber filter에 harvest하고 60°C에서 건조시킨 후 scintillation cocktail을 넣어 β -counter를 사용하여 측정하였다.

2-2. IL-2 수용체의 분리정제

가. T임파구 cell line의 배양

IL-2 수용체의 분리정제를 위해 세포의 표면에 IL-2 수용체를 가지고 있는 HUT102 cell line을 배양하였다. 배양에 필요한 배지는 10% FBS가 함유된 IMDM 배지 80%와 NTCT-135 20%를 혼합한 배지를 사용하였으며 점차적으로 RPMI 1640 배지로 교체시켜 주었다. 37°C에서 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 세포수가 1×10^6 ml이 넘지 않도록 계대배양하여 5×10^5 /ml 정도로 자란 세포는

tube에 옮겨 1,200rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 모으고 90% FBS에 10% DMSO를 첨가시킨 cryomedia에 현탁시킨 액체 질소를 냉동저장하였다.

나. T임파구 세포들의 IL-2 수용체 측정

IL-2 수용체를 측정하기 위해 서로 다른 leukaemia T-cell line (HUT102cell, Molt 4, CEM C.1.5, RPMI8401, HSB, Jurkat) 들을 각각 RPMI 1640 배지에 배양한 후 세포들을 회수하여 HBSS로 3번 세척한 후 anti IL-2 receptor-FITC conjugate를 $10\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 4°C 에서 30분간 반응시키고 다시 3번 세척하였다. 세포의 농도는 $5 \times 10^5/0.5\text{ml}$ 로 하여 FACScan으로 분석하였다.

다. T임파구 세포중 IL-2 수용체를 가지고 있는 HUT102 C11 세포 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) 에 다양한 rIL-2 $1\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 mitogen인 Con A $5\mu\text{g}/\text{ml}$, PHA $10\mu\text{g}/\text{ml}$, PHA $10\text{ng}/\text{ml}$, Con A Sup (Cas) 5%, Ionomycin $100\text{ng}/\text{ml}$, Con A Sup (CAS) 5%, Ionomycin $100\text{ng}/\text{ml}$, PMA + Ionomycin 등을 투여하여 24-well plate에 각각 24, 48, 72, 96 시간별로 배양하여 분석하였다. 배양 후 세포를 회수하여 30분간 반응시키고 HBSS로 세척한 후 IL-2 수용체량의 증가를 FACSCAN을 이용하여 분석하였다.

라. 세포배양 상층액내의 IL-2 수용체량의 분석

HUT102 C11세포의 배양 상층액에 IL-2 수용체의 양을 분석하기 위해 competitive inhibition assay를 이용하였다. HUT102C11 세포 (5×10^5)를 HBSS로 세척한 후 10배 농축한 배양 상층액을 $200\mu\text{g}$ 를 첨가하여 4°C 에서 30분간 반응시키고 다시 HBSS로 세척한

다음 anti IL-2R FITC conjugate를 $10\mu\text{g}$ 를 첨가한 후 4°C 에서 30분간 반응시켜 세척을 하였다. 최종 세포의 농도는 $5 \times 10^5/0.5\text{ml}$ 로 하여 FACScan으로 분석하였다.

마. IL-2 수용체이 분리정제

IL-2 수용체의 부분적인 분리는 정제된 IL-2를 이용하였다. CNBr-activated Sepharose 4B에 IL-2를 coupling시켜 affinity chromatography법을 실시하였다. sample의 준비는 HUT102 C11 세포 (8×10^{10})을 배양하여 원심분리(1,200rpm)하여 세포를 모으고 PBS (pH 7.4)로 깨끗히 세척하였다. 20ml의 extraction buffer (10mM Tris/Hcl, pH 7.4, 0.15M Nacl, $100\mu\text{g/ml}$ PMSF, 0.5% NP-40)를 첨가하여 4°C 에서 30분간 강력히 흔들여 주었다. 다시 20ml을 더하여 같은 방법으로 처리한 후 37,000rpm에서 30분간 원심분리하여 지방층을 제거하고 상층액을 모아서 column에 통과시켰다. 또 다른 sample은 세포배양상층액으로 직접 column을 통과시켰다. column을 통과시킨 후 PBS (pH 7.4)로 세척하고 0.5M ammonium hydroxide containing 3M potassium thiocyanate용액을 통과시켜 결합된 항원을 회수한다.

2-3. IL-2 수용체 단일클론 항체의 개발

가. mouse의 면역화

HUT102C11 세포 ($1 \times 10^6/\text{ml}$)를 IL-2 ($5\mu\text{g/ml}$)와 함께 48시간 동안 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지에 배양하여 세포표면의 IL-2 수용체를 증가시킨 후 세포를 원심분리(1,200rpm)하여 PBS (pH 7.4) 3번 세척하였다. 생후 6~8주된 Balb/c의 복강내에 1주

간격으로 세포수를 1마리당 1×10^6 개로 조정하여 4회를 주사하였다. 세포융합을 하기 3일전 최종 booster로 복강내에 세포를 주사하였고 항혈청의 항체는 mouse의 안하정맥에서 채혈하여 HUT102C11 세포에 반응시켜 anti-Tac FITC conjugate $10 \mu\text{g}$ 를 넣어 inhibition assay로 분석한 후 세포융합을 하였다. Myeloma 세포는 P3 \times 63AG8.653을 사용하였으며 세포융합은 앞의 실험방법 1과 동일하다.

나. 하이브리도마의 선별

Clone이 형성된 well의 상층액 $10 \mu\text{g}$ 씩을 채취하여 HUT102c11 세포에 4°C 에서 30분간 반응시킨 후 goatanti-mouse IgG FITC conjugate를 1:100으로 희석하여 $20 \mu\text{g}$ 씩 가하여 반응시키고 FACScan을 이용하여 1차적인 선별을 하여 강한 양성을 나타내는 clone을 골라 IL-2 수용체를 가지고 있는 HUT102C11세포와 leukaemia T-cell line인 Jukat세포 그리고 B-cell line인 B258세포에 다시 반응시켜 상대적으로 강한 양성을 나타내는 clone들을 2차적으로 선별하여 limiting dilution에 의해 단일클론을 얻기 위한 cloning을 실시하였고 goat-Anti mouse IgG FITC를 사용하여 항체생산을 하는 하이브리도마들을 선별하여 다시 Anti-Tac FITC conjugate를 이용하여 inhibition assay로 측정하여 clone을 선별하였다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 IL-2 단일클론 항체의 개발

세포융합과정에서 총 192개의 well중 180개의 well에서 하이브리도마가 형성되어 93.7%의 융합효율을 나타냈으며 이 하이브리도마를 계속 배양하여 상층액에 항체분비 여부를 IL-2에 의한 ELISA로 조사한 바 25개 well만이 양성반응을 나타내 13.9%가 항체를 분비하는 clone으로 확인되었다. 이중 강한 양성반응을 나타내는 5개의 clone만을 선별하여 계속적인 limiting dilution 방법으로 cloning을 하여 5개의 clone (030-01, 030-03, 030-04, 030-05, 030-06)을 얻었다. 이들 clone의 subtype을 결정하기 위해 각각의 배양 상층액을 농축하여 immunodiffusion test를 하였는데 그 결과 030-05만이 IgG 2a를 생산하며 나머지는 IgG₁을 생산하였다. 이들 단일클론 항체들은 control인 bovine serum albumin (BSA)과 human chorionic gonadotropin (HCG)에는 전혀 반응을 하지 않으며 rIL-2에 강한 반응을 나타냈다.

제2절 단일클론 항체의 분리 정제

Ascitic fluid (복수액)에 의해 생산되는 항체량은 일반적으로 세포배양에 의해 생산되는 항체량보다 훨씬 많으나 항체의량은

총 단백질 량의 10~20% 정도밖에 지나지 않는다. 특히 장기 보존의 protease의 작용으로 안정도에 영향을 미치므로 효율적인 항체의 분리 정제법은 매우 중요하다.

본 연구에서는 protein A-Sepharose 4B affinity chromatography 방법으로 IgG의 subclass를 분리하였다. ascitic fluid 030-05를 pH 8.0으로 맞추어 protein A-Sepharose 4B affinity column을 통해 그림 1과 같은 결과를 얻었다. Peak A는 0.1M sodium citrate, pH 8.0으로 column을 세척한 washing분획이며, peak B는 pH 6.0으로 elute시켰으며, Peak C는 pH 4.5로 용출시켰다. 분리된 peak를 rIL-2에 의한 indirect ELISA결과 IgG 2a인 3번째 peak에서 대부분의 항체 activity가 나타났으며 IgG₁인 2번째 peak에서는 activity가 전혀 없었으며 1번째 peak에서는 약간 나타났으나 이것은 protein A-sepharose 4B column의 binding 용량을 넘은 것으로 생각되어 반복실험을 하여 IgG 2a를 분리하였다.

제3절 IL-2 정량분석법 개발

1. Conjugate의 제조와 최적종도 조사

Conjugate의 제조는 protein A-sepharose 4B affinity chromatography에 의해 정제된 단일클론항체 IgG₁(030-01)에 alkaline phosphatase를 사용한 one step glutaraldehyde 방법(Avrameas et al., 1978)에 의해 제조하였다. 이 방법은 비교적 폭 넓게 사용되어지는 방법으로 간단하며 sensitivity도 매우 뛰어나 본 연구에 경

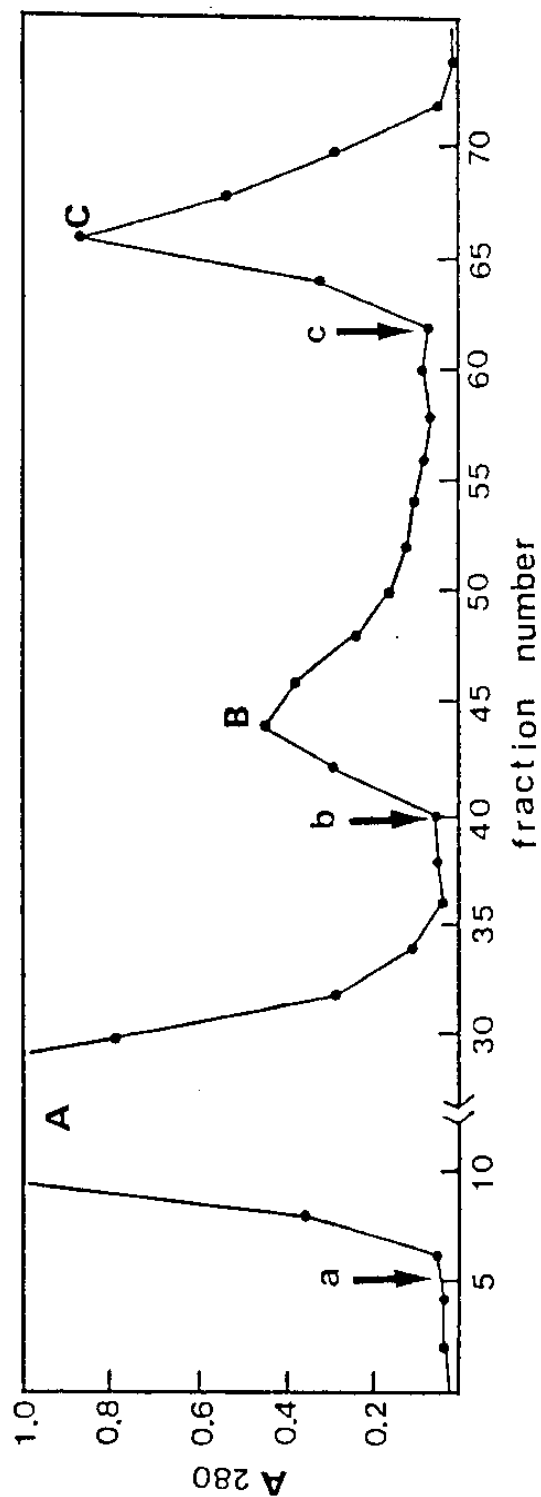


Fig.1.1. Purification of Mab 030-05 by Protein A-Sepharose 4B affinity chromatography. The ascitic fluid was adjusted to pH 8.0, followed by filtration before chromatography. Fractions of 1ml were collected at a flow rate of 5ml/hr. Most of antibody activities against rIL-2 were detected in Peak C and some in Peak A.

a: sample loading b: eluting point of pH 6.0
 c: eluting point of pH 4.5

험적으로 이용하였다.

그림 2는 conjugate의 농도는 변화시켜 sensitivity를 측정한 것으로 희석배수의 조건에 관한 반응이 잘 나타나있다. rIL-2가 coating되어 있는 plate에 conjugate를 농도별로 가하여 실온에서 30분간 incubation시켜 측정한 것으로 그림 2에서 보는 바와 같이 1:100과 1:200의 희석배수에서 민감한 것으로 나타났다.

2. Competitive inhibition assay를 이용한 epitope의 선별

본 연구에서는 epitope이 서로 다른 단일클론 항체를 선별하기 위해 매우 간단하고 빠른 competitive binding inhibition assay를 이용하였다. 주로 epitope의 분석을 위해서는 정제된 항체와 radiolabel된 항원이 필요하나 본 연구에 사용된 sandwich ELISA 방법으로 서로 다른 단일클론 항체를 결합시키는 competitive assay로 쉽게 선별할 수 있었다. 그림 3의 결과 단일클론 항체 (030-01, 030-03, 030-04, 030-05, 030-06)들을 rIL-2가 coating된 plate에 2배씩 희석하여 반응시킨후 030-01-AP conjugate를 가하여 그림 3과 같은 결과를 얻었다. 030-01은 그림에서와 같이 inhibition 되었으며 030-03도 같은 결과를 얻었다. 따라서 030-01과 030-03 단일클론 항체는 rIL-2에 대한 epitope의 위치가 같거나 아주 밀접하다고 할 수 있다. 그러나 030-04, 030-05와 030-06은 030-01-AP conjugate에 대해 inhibition을 적게 받았기 때문에 030-01과 030-03과는 서로 다른 epitope를 가지고 있는 단일클론 항체라고 볼 수 있다. 그러나 030-04, 030-05와 030-06 단일클론 항

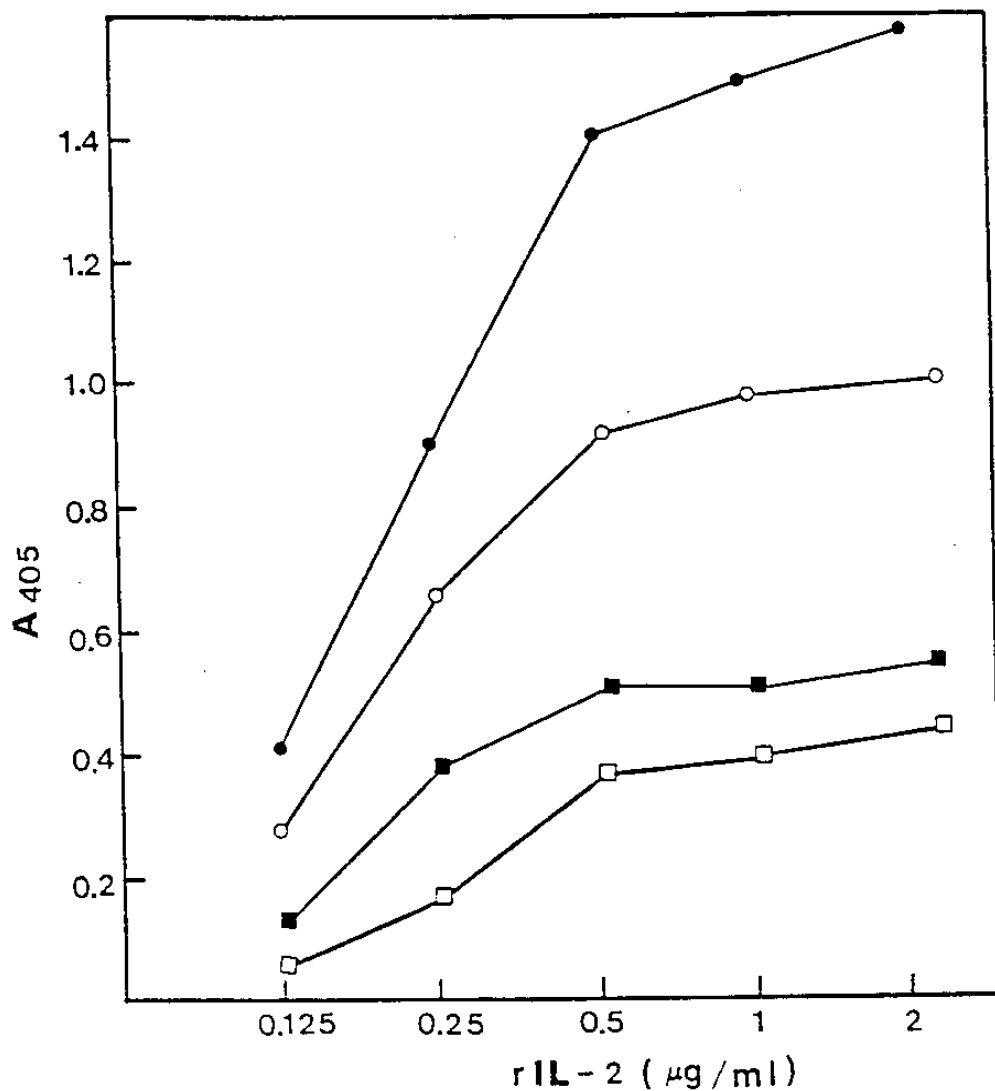


Fig.2. The effects of AP-Mab 030-01 conjugate concentration and rIL-2. Each dilution of conjugate was incubated with rIL-2 coated immunoassay plates. After 30 min. incubation, its absorbance was measured at 405nm.

□—□ : 1/800 ■—■ : 1/400 ○—○ : 1/200
 ●—● : 1/100

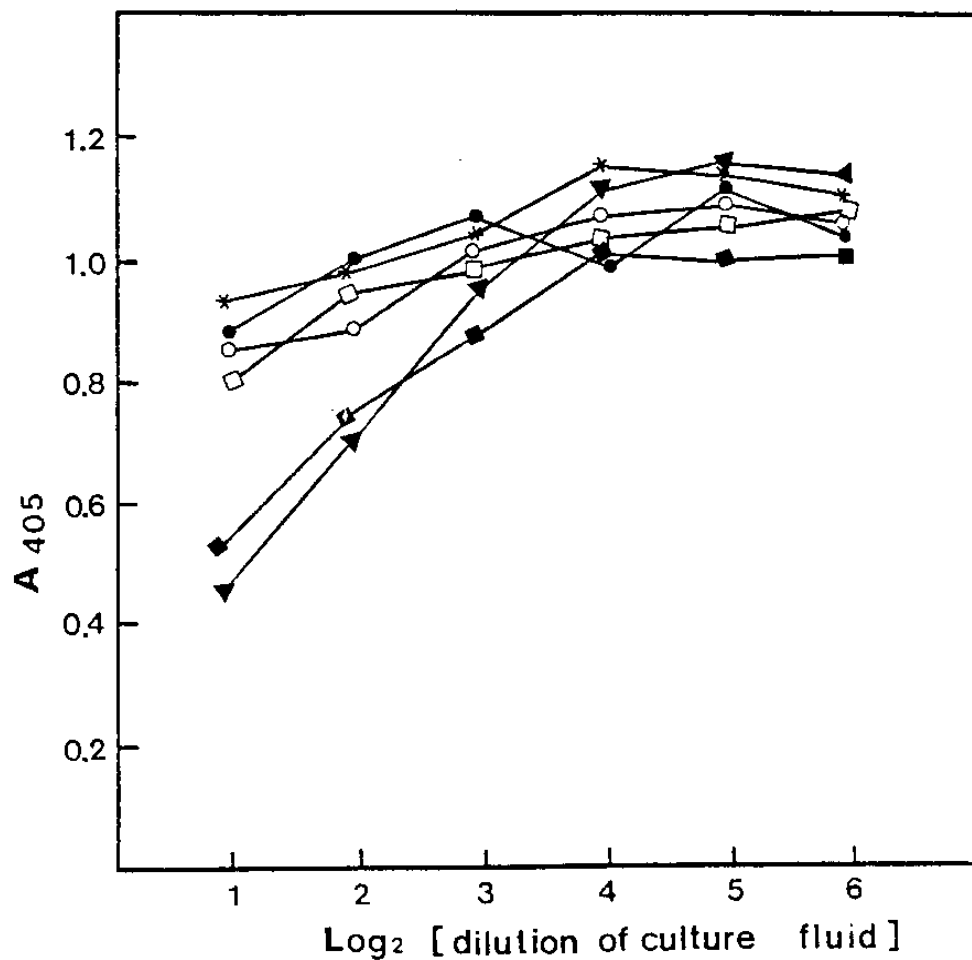


Fig.3. Competitive binding inhibition assay. Two-fold serial dilutions of each hybridoma culture fluid were incubated together with AP-Mab 030-01 diluted to 1/100 on rIL-2 coated immunoassay plates. After 30 min. incubation, its absorbance was measured at 405 nm.

●—● : 030-05 ○—○ : 030-06 □—□ : 030-04
 ■—■ : 030-01 ▲—▲ : 030-03 ★—★ : myeloma

체가 같은 epitope에 반응하는 항체인지는 알 수가 없었다.

3. ELISA와 Bioassay법의 비교 분석

IL-2의 정량측정을 위한 sandwich ELISA법에 사용된 단일클론 항체는 030-01라는 서로 다른 epitope에 반응하는 030-05를 96-well plate에 coating하여 그림 4와 같은 standard curve(표준곡선)을 얻었다. 또한 CTLL세포를 이용한 Bioassay의 결과는 그림 5와 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과들로 부터 Bioassay에 의한 표준곡선의 반응을 살펴보면 linearity를 나타내는 범위가 3~50ng/ml까지 정확한 일직선을 이루고 있으나 ELISA의 경우 비교적 넓은 범위인 2~100ng/ml까지 linearity를 나타내고 있다. 이들 방법의 경우 거의 유사한 sensitivity를 나타내나 Bioassay가 최소량이 3ng/ml인 것에 비해 ELISA는 2ng/ml까지도 측정이 가능하였다.

이전에 보고되어진 IL-2 측정법(smith et al., 1983 ; Gehman and Robb, 1984 ; Jose et al., 1986)은 단일클론항체와 polyclonal 항체를 이용한 것으로 이 연구에서는 처음으로 서로 다른 epitope에 반응하는 두개의 단일클론 항체를 이용하여 보다 정확하고 빠른 시간내에 IL-2의 양을 정량적으로 측정할 수 있었다.

제 4 절 IL-2 수용체의 특성 및 조절

IL-2 수용체의 효율적인 분리를 위해서는 세포 표면의 IL-2R 표현을 조절하는 기전에 대한 연구가 선행되어야 한다. 본 연

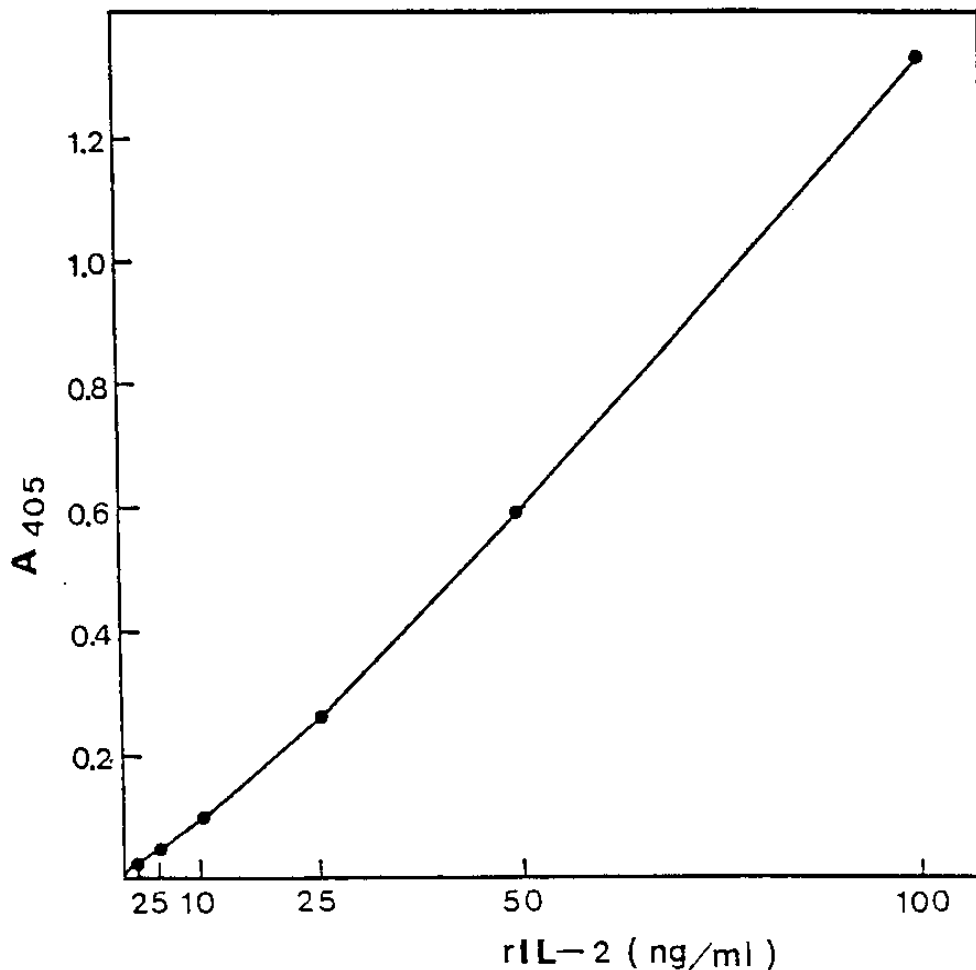


Fig.4. Standard curve of rIL-2 by ELISA. IL-2 was added on Mab 030-05 coated immunoassay plate and incubated for 2hrs. at room temperature. Conjugate (AP-Mab 030-01) diluted to 1/200 was added and incubated. After adding substrate solution(PNPP), absorbance at 405 nm was measured at 1hr. incubation. Background absorbance(0.078) has been subtracted.

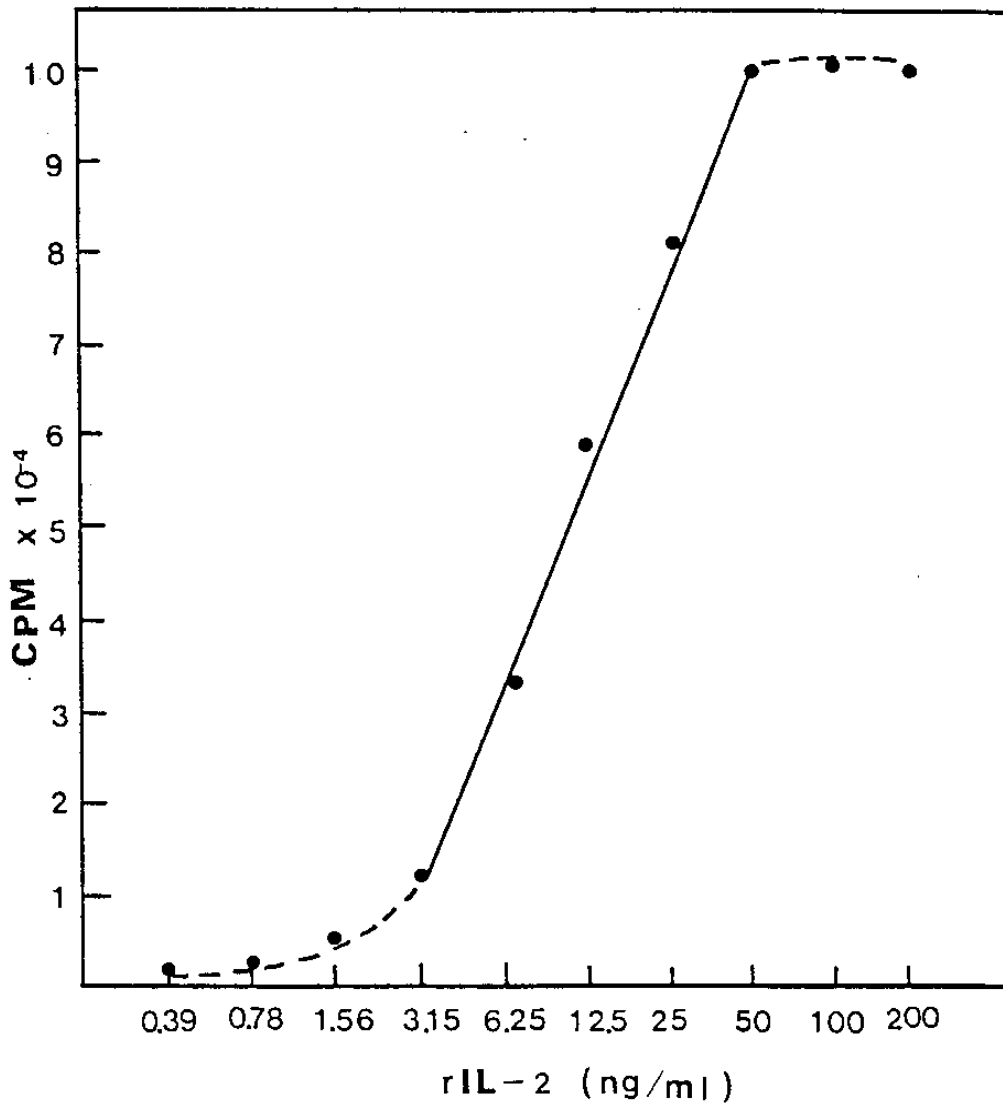


Fig.5. Bioassay of rIL-2 using IL-2 dependent cytotoxic T cell line(CTLL). 1×10^4 cells/well were cultured with serial dilutions of rIL-2 solution. After 30 hrs. 0.5uCi of ^3H -thymidine was added to each well and incubated for further 18 hrs. Background (3,016 cpm) has been subtracted.

구에서는 사람의 말초혈액으로부터 임파구를 분리하여 mitogen, lymphokine, steroid 및 세포분열억제 물질인 colchicine 등과 함께 배양하면서 IL-2R의 발현양상을 관찰하였다.

1. 배양시간에 따른 IL-2 수용체의 발현 및 증식

IL-2 수용체의 발현 및 증식능은 그림 6의 A와 B의 결과에 나타난 것과 같이 배양 후 72시간까지는 점차로 증가하였으며 mitogen에 의한 반응은 이후 감소되었으나 IL-2에 의한 IL-2 수용체의 표현율과 세포의 증식은 계속 증가한 것으로 나타났다. 따라서 이후의 실험에서는 mitogen으로 3일간 배양한 후 임파구가 IL-2수용체를 최대로 표현함으로써 이를 실험기준으로 하여 IL-2수용체의 발현을 관찰하였다.

2. 인터페론이 IL-2 수용체 발현에 미치는 영향

이미 인터페론과 IL-2 각각의 특성 및 세포활성능에 대한 것은 잘 알려져 있다. 또한 IL-2와 인터페론의 병합은 LAK 세포의 활성 및 NK세포의 기능을 상승적으로 증가시킨다고 한다. 본 실험에서는 $1000 \mu/ml$ 의 인터페론 α 와 r 그리고 $1000 \mu/ml$ 의 IL-2를 병합 사용하여 PBL과 함께 72시간 배양한 후 IL-2 수용체의 발현율을 조사하였다. 그림 7의 결과와 같이 IL-2에 의한 Tac 양성세포의 발현은 인터페론 $-\alpha$ 에 의하여 46% 이상의 억제 현상이 관찰되었으나 인터페론 $-r$ 는 뚜렷한 억제 효과가 없었다. 그러나 인터페론 $-\alpha$ 및 r 각각을 단독으로 사용했을 경우는 control에

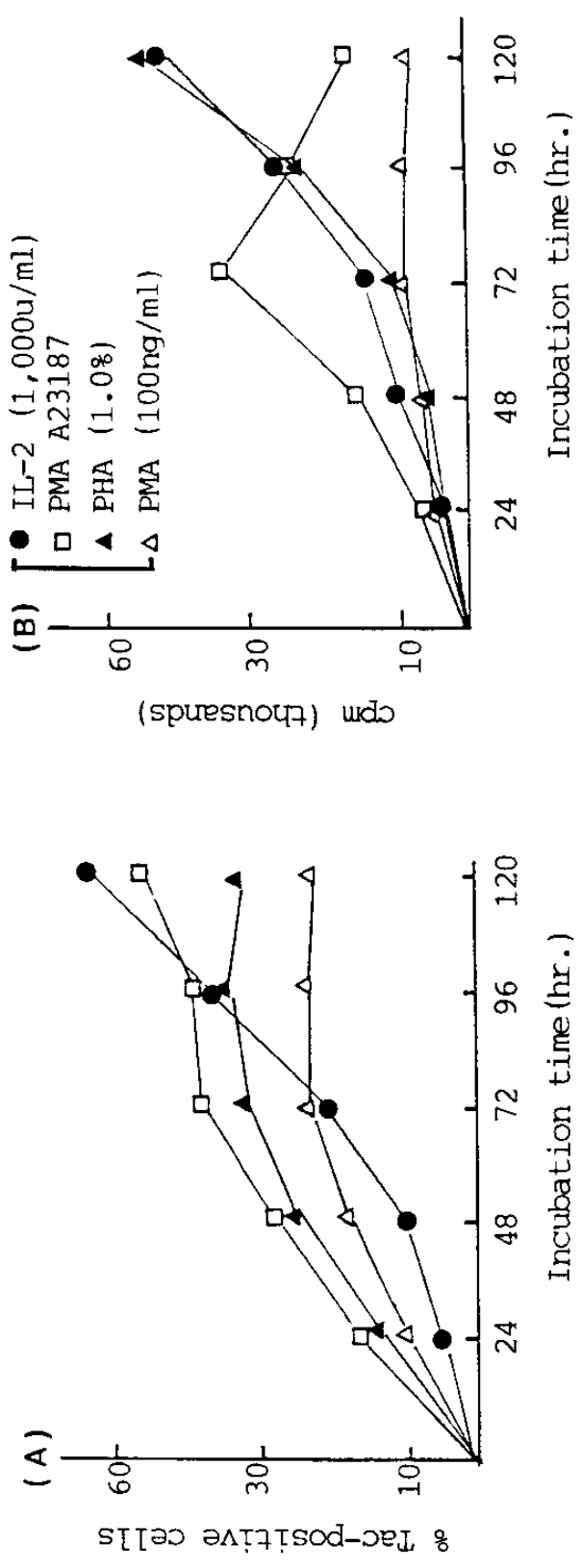


Fig. 6. Changes of IL-2 receptor (Tac) expression (A) and proliferation (B) of human peripheral blood lymphocytes (PBL) in relation to incubation time with stimulators.
 (A) Human PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured with mitogens or IL-2 during 24 to 120 hours. After incubation, the cells were examined by indirect immunofluorescent method on fluorescent microscope.
 (B) Human PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured with mitogens or IL-2 for 24 to 120 hours. ^3H -thymidine incorporation into cultured lymphocytes were expressed in cpm. The results represent the mean cpm values of triplicated tests.

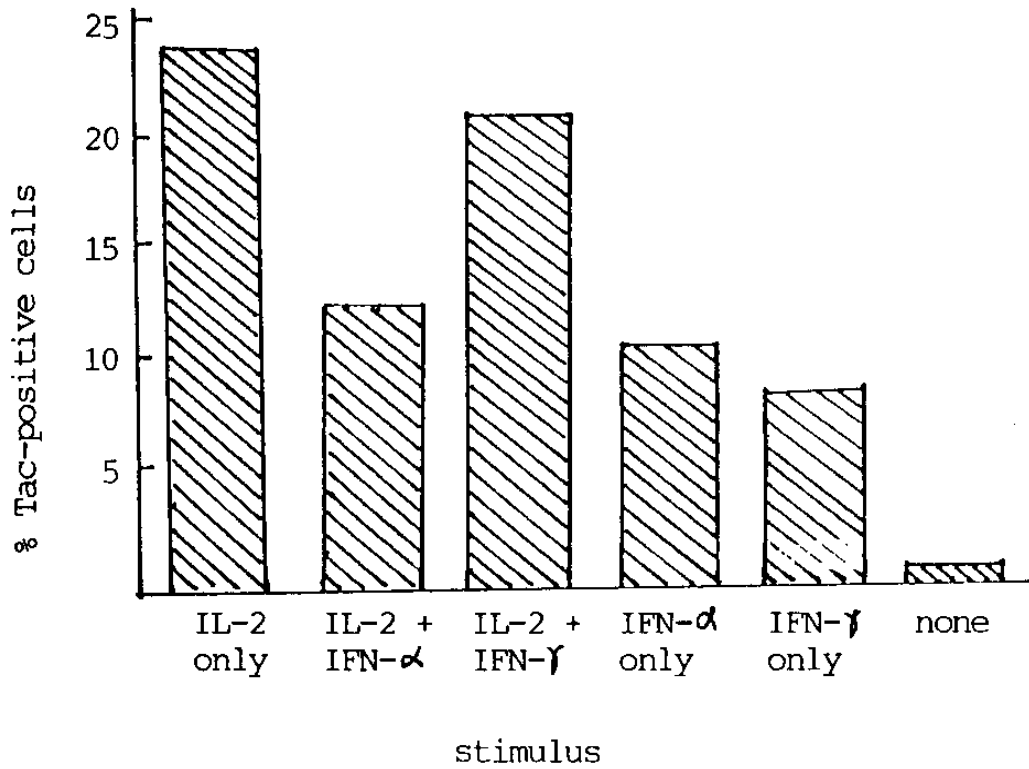


Fig. 7. Effects of IFN- α and IFN- γ on IL-2 receptor(Tac) expression of human peripheral blood lymphocytes (PBL) induced by recombinant human IL-2. Human PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured with IL-2 (1000u/ml) and or IFN- α (1000u/ml) or IFN- γ (1000u/ml) for 72 hours. After incubation, the cells were examined by indirected immunofluorescent method on fluorescent microscope.

비해 Tac 양성세포의 발현율이 각각 11.8%와 8.8%이었다.

3. Colchicine이 IL-2 수용체의 발현에 미치는 영향

Colchicine은 macrophage의 차단물질로서 세포의 증식 및 성장을 억제하게 된다. immunoflourescent법으로 형광현미경으로 관찰한 세포 표현율과 ^3H -thymidine을 이용한 cpm값의 측정으로 인한 세포의 증식에 관한 결과는 그림 8과 같다. 예상한대로 PHA나 IL-2에 의한 Tac 양성세포의 발현율은 colchicine과 같이 첨가하여 72시간 배양시 각각 52% 및 81.0%의 억제효과가 나타났다.

4. Dexamethason이 IL-2 수용체의 발현에 미치는 영향

Dexamethasone도 역시 PHA, PMA 및 IL-2만을 첨가하였을 때 그림9에서와 같이 Tac 양성세포의 발현과 증식에 있어 강한 억제 현상을 나타냈으며 PHA와 PMA 또는 IL-2와 PHA를 병합하여 첨가해준 것에서는 Tac 양성세포의 발현율이 약간의 억제현상만을 보였으며 증식에 있어서는 각각 첨가해준 것과 유사한 억제효과를 나타내었다.

제5절 IL-2 수용체의 분리 정제

1. T세포 세포들의 IL-2 수용체량의 측정

여러 종류의 leukaemia T-cell line의 세포 표면에 있는 IL-2 수용체의 양을 측정하기 위해 anti-Tac FITC conjugate를 세포에

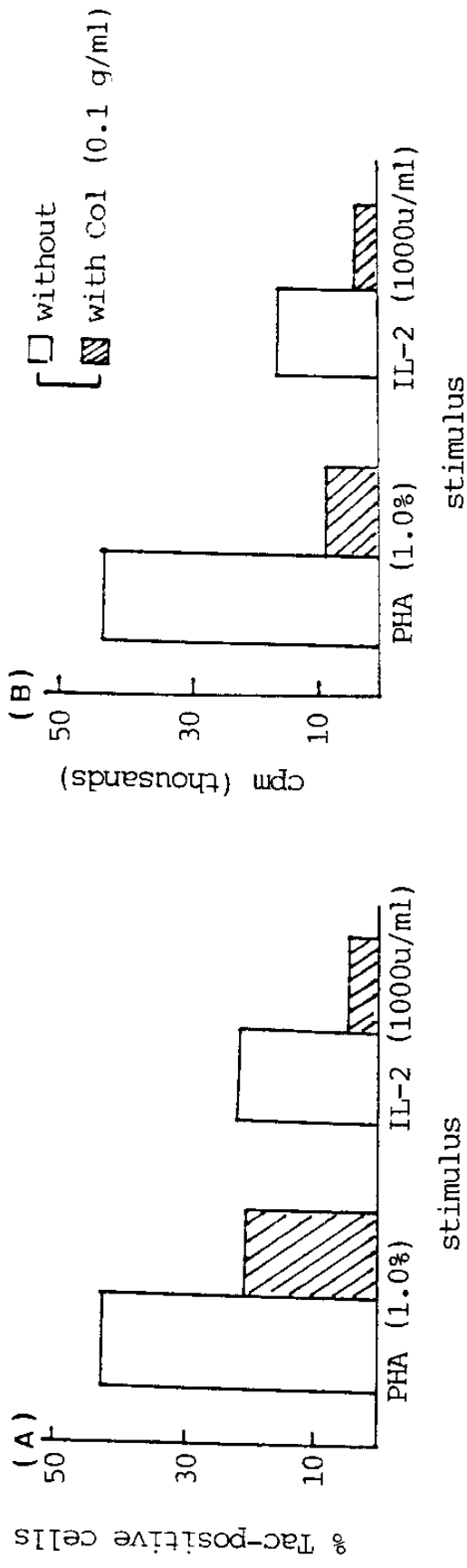


Fig. 8. Effects of colchicine on IL-2 receptor (Tac) expression (A) and proliferation (B) of human peripheral blood lymphocytes (PBL).
 (A) Human PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured with PHA (1.0%) or IL-2 for 72 hours. After incubation, the cells were examined by indirect immunofluorescent method on fluorescent microscope.
 (B) Human PBL (1×10^6 cells/ml) were cultured with PHA (1.0%) or IL-2 for 72 hours. ^3H -thymidine incorporation into cultured lymphocytes were expressed in cpm. The results represent the mean cpm values of triplicated tests.

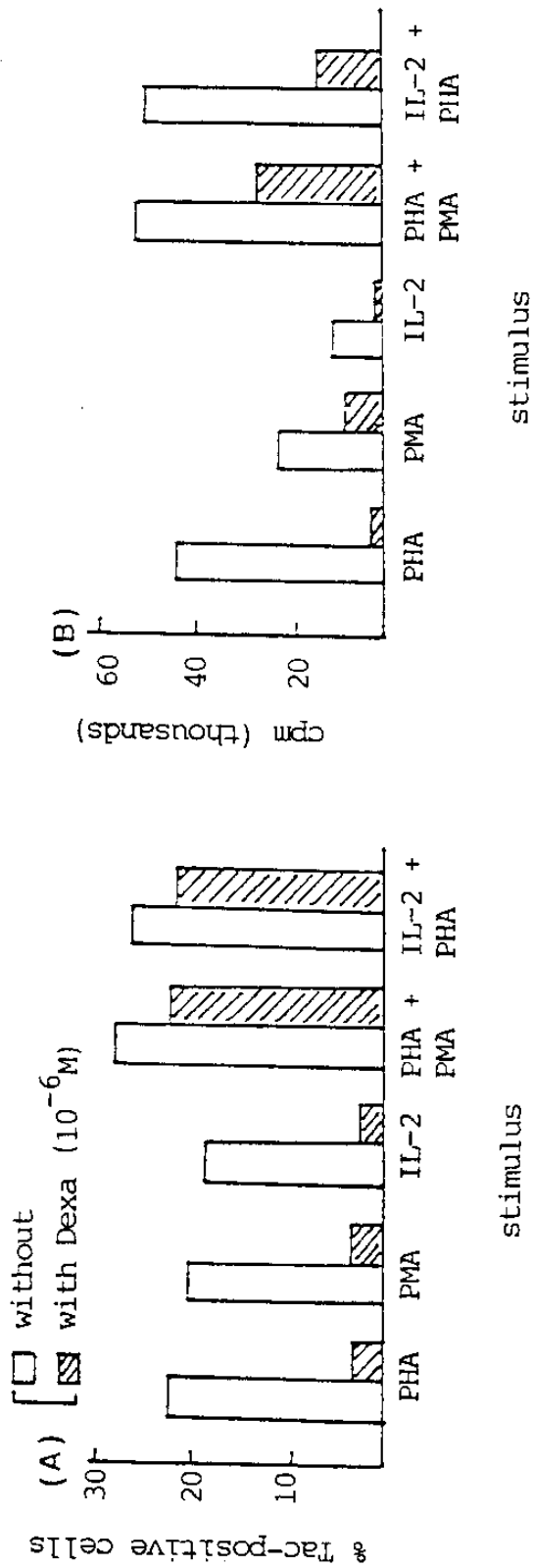


Fig. 9. Effects of dexamethason (dexa) on IL-2 receptor (Tac) expression (A) and proliferation

(B) of human peripheral blood lymphocytes (PBL).

(PHA : 1.0 %, PMA : 100ng/ml, IL-2 : 1000u/ml)

(A) Human PBL (1 X 10⁶ cells/ml) were cultured with mitogens or IL-2 for 72 hours.

After incubation, the cells were examined by indirect immunofluorescent microscope.

(B) Human PBL (1 X 10⁶ cells/ml) were cultured with mitogens or IL-2 for 72 hours.

³H-thymidine incorporation into cultured lymphocytes were expressed in cpm. The results represent the mean cpm values of triplicated tests.

접합시켜 FACScan을 이용하여 IL-2 수용체의 양을 조사한 결과 그림 10에서와 같이 이미 보고되어 있는 HUT 102 cll line에 매우 많은 양의 IL-2수용체가 존재하는 것으로 나타났다.

2. IL-2 수용체 Expression

HUT 102 cll cell line의 표면에 있는 IL-2 수용체의 발현을 위한 최적 조건을 조사하기 위해 HUT 102 cll 세포에 mitagen과 lymphokine의 농도변화를 주어 배양하였다. PHA, PMA, ConA, ConA sup, Ionomycin과 IL-2 또는 이들을 혼합으로 처리하여 24에서 92시간까지 배양한 후 얻은 HUT 102 cll 세포를 anti-Tac FITC conjugate를 투여하여 IL-2 수용체의 증식에 미치는 효과를 FACScan으로 비교 측정하였다. 그 결과 그림 11에서와 같이 Ionomycin과 PHA에 의해 배양 48시간까지 증가하였으며, 따라서 1 μ g에 의해서는 배양 72시간까지 점차 증가하였으나 이후 감소하였다. 따라서 이후의 실험에서는 IL-2 (1 μ g/ml)로 3일간 배양한 후 IL-2 수용체의 양이 최대로 표현될 때 실험에 사용하였다.

3. HUT 102 cll - cell 배양상층액내의 IL-2 수용체량의 분석

HUT 102 cll 세포의 배양상층액내의 IL-2 수용체의 양을 측정하기 위해 inhibition assay를 시도하였다. HUT 102 cll 세포를 배양하여 증식이 현저하게 관찰되었을 때 원심분리하여 얻은 상층액을 농축하여 HUT 102 cll 세포에 첨가시켜 반응시킨 후 anti-Tac FITC conjugate도 다시 반응을 시킨 결과 그림 12에서와 같이 FACScan

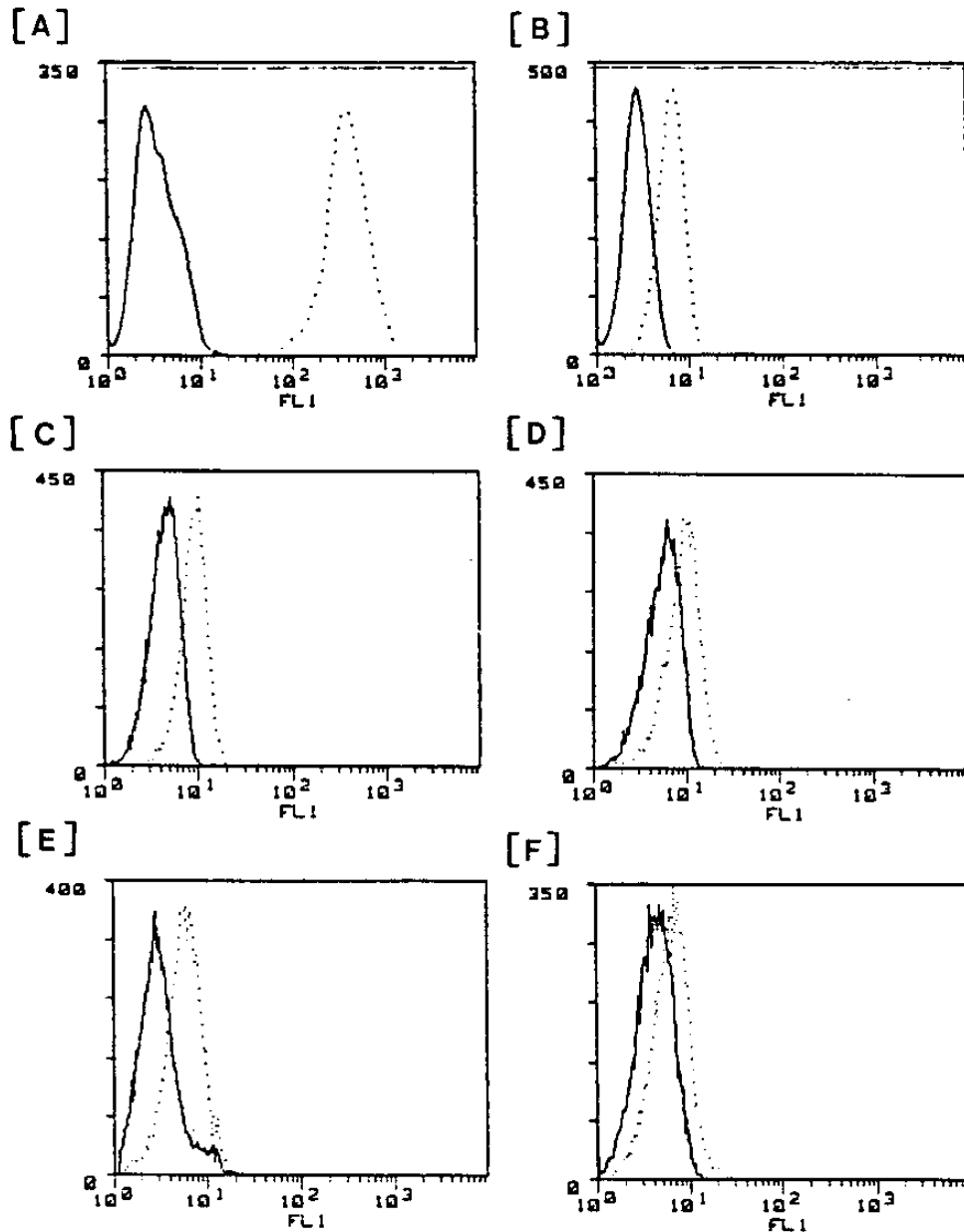


Fig. 10. Expression of IL-2 receptors on various leukaemia T-cell lines.

* fluorescence intensity			
A : Hut102C11	—	4.03	---- 439.90
B : Jurkat	—	2.87	---- 6.61
C : HSB	—	4.68	---- 9.40
D : RPMI8402	—	5.83	---- 9.62
E : CEM C.1.5	—	4.49	---- 6.80
F : MOLT 4	—	3.62	---- 6.28

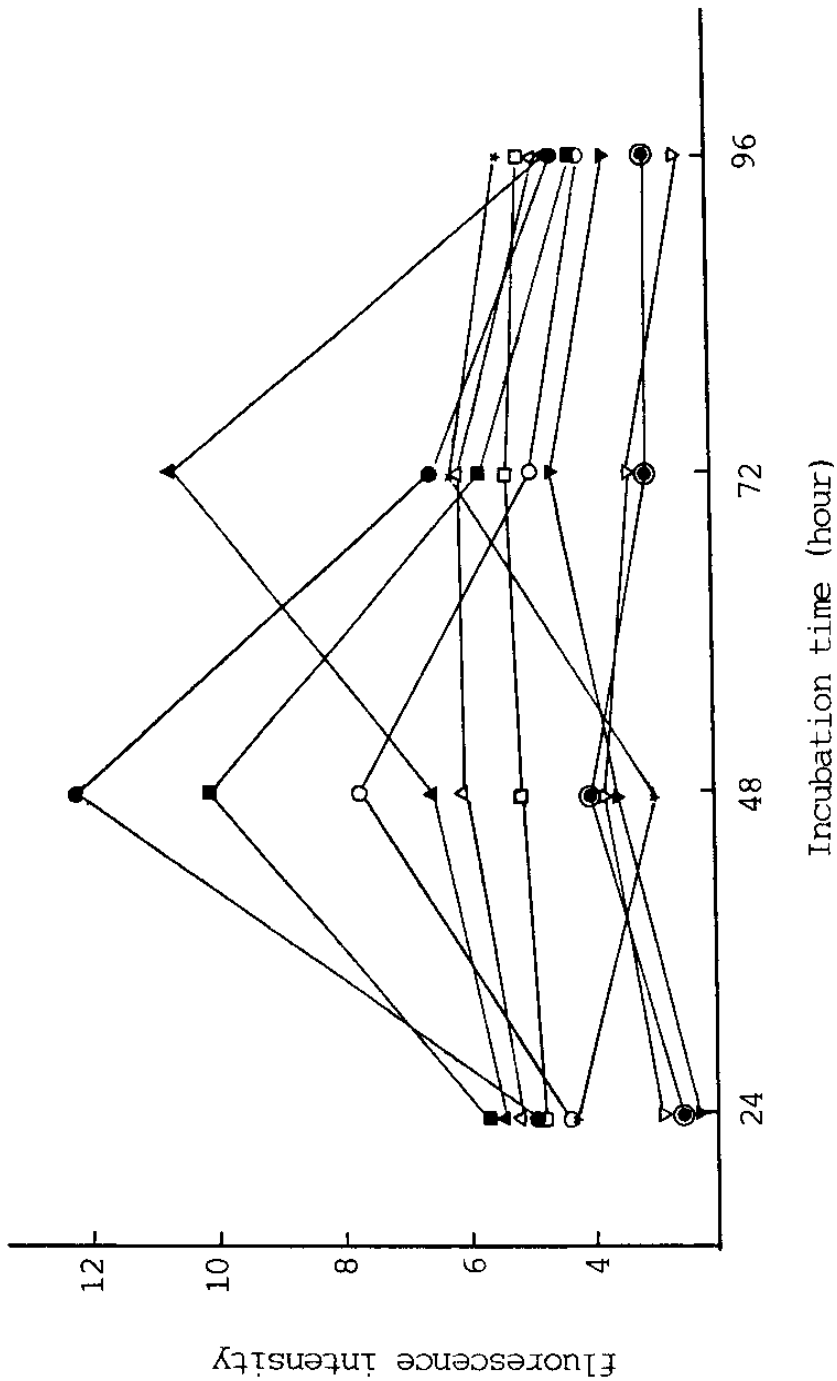


Fig. 11. IL-2 receptor expressions on Hut102C11 cell stimulated with various mitogens and lymphokine.

- | | | | |
|-------|----------------|--------|----------------------|
| 1 : □ | control | 6 : ■ | Ionomycin (100ng/ml) |
| 2 : △ | Con A (5ug/ml) | 7 : ● | PMA + Ionomycin |
| 3 : ○ | PHA (10ug/ml) | 8 : ▲ | rIL-2 (1ug/ml) |
| 4 : ★ | CAS (5%) | 9 : ● | rIL-2 (10ug/ml) |
| 5 : ▽ | PMA (10ng/ml) | 10 : ▼ | rIL-2 (100ug/ml) |

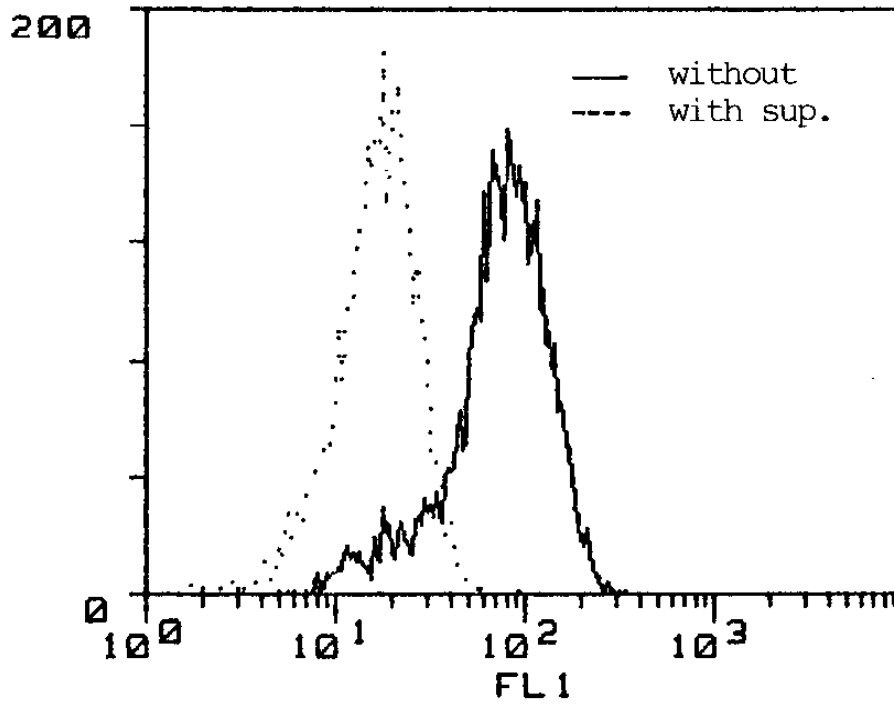


Fig. 12. IL-2 receptor inhibition by culture supernatant of Hut102C11 cell line (FACScan assay).

으로 분석한 결과 현저하게 억제되는 것으로 관찰되었다. 따라서 HUT 102 cell cell 표면에서와 같이 배양상층액내에도 IL-2 수용체가 존재하는 것을 알 수 있다.

4. IL-2 수용체의 분리 정제

IL-2 수용체의 분리는 rIL-2가 결합된 CNBr-activated sepharose-4B affinity chromatography에 의해 분리하였다. sample은 HUT 102 cell 세포를 통과시켜 분리하였으며, 또 다른 sample은 배양상층액으로 column에 통과시켜 IL-2 수용체를 부분적으로 분리하여 그림 13에서와 같이 10% SDS-PAGE로 분석하였다. 전기영동 결과에 의해 확실한 IL-2 수용체의 분석을 위해 immuno-blotting으로 IL-2 수용체를 분석한 결과 그림 13에 잘 나타나 있다. HUT 102 cell cell surface에 존재하는 IL-2 수용체는 매우 적은 양으로 존재하므로 전기영동 결과에서는 구별하기가 어려운 점이 있다. 때문에 본 실험에서는 immuno-blotting 방법을 이용하여 IL-2 수용체를 분석하였다. 그 결과 6번 lane Serotec에서 구입한 anti-Tac과 거의 같은 위치에 나타난 것으로 보아 clone 33.A6는 anti-Tac을 분비하는 clone일 가능성이 많은 것으로 생각되며 계속적인 실험으로 분석하고 있다.

제6절 IL-2 수용체의 단일클론항체 개발

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 개발을 위해 HUT 102 cell

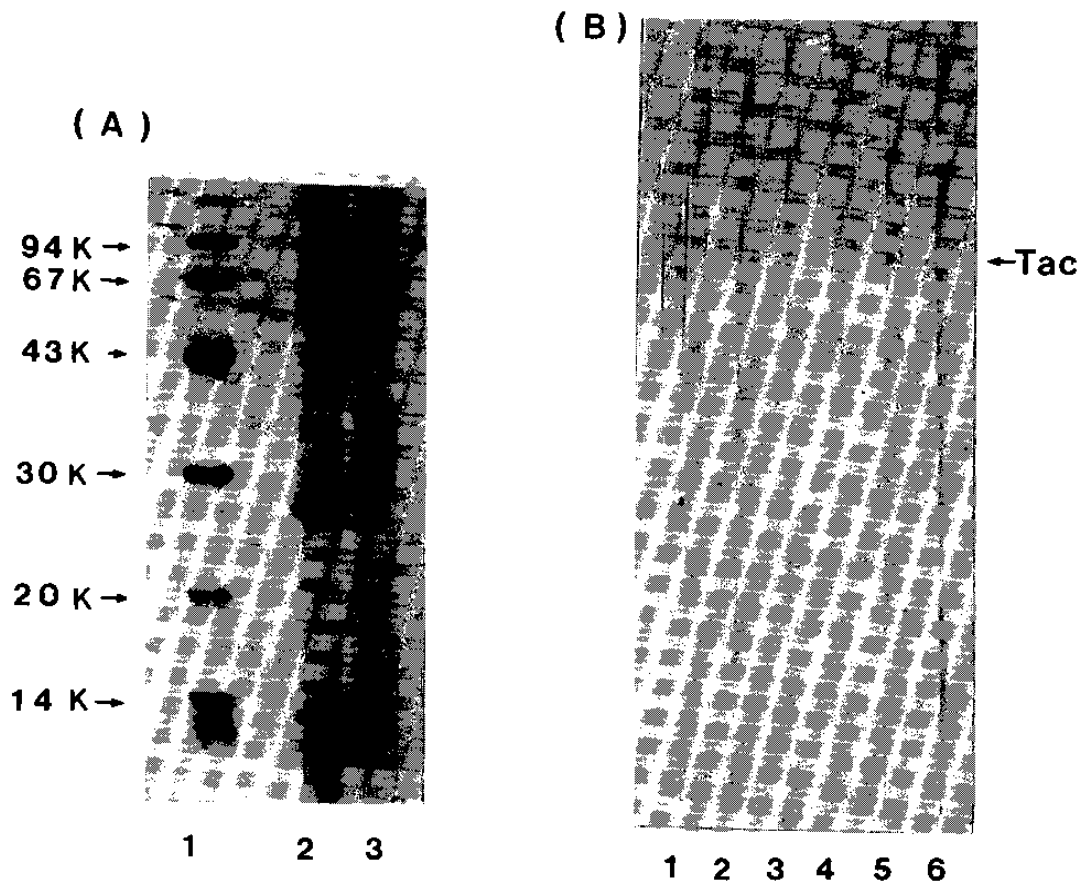


Fig. 13. 10% SDS-PAGE pattern (A) and immunoblotting pattern (B) of cell lysate and culture supernatant of Hut102C11 cell line.

- A : lane 1 - standard low marker (Pharmacia)
 . lane 2 - Hut102C11 cell lysate
 lane 3 - Hut102C11 cell culture supernatant
- B : lane 1 - anti IL-2 receptor (Serotec)
 lane 2 - ascitic fluid (clone 188-F5)
 lane 3 - ascitic fluid (clone 177)
 lane 4 - ascitic fluid (clone 165-G9)
 lane 5 - ascitic fluid (clone 159-A8)
 lane 6 - ascitic fluid (clone 33-A6)

세포에 rIL-2 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 72시간 배양으로 IL-2 수용체를 expression시켰다(그림 14). 그후 Balb/c mouse에 주사하여 세포 융합을 하기 직전에 FACScan을 이용하여 항체 생성 여부를 competitive inhibition assay로 확인한 후(그림 15) 세포융합을 하였다. 세포융합 과정에서 총 244개의 well중 229개의 hybridoma가 형성되어 93.8%의 융합 효율을 나타냈으며 이 hybridoma를 각각 배양하여 상등액 $100\mu\text{l}$ 씩을 취하여 항체 분비 여부를 HUT 102 cell 세포에 반응시킨 후 goat-anti-mouse IgG FITC conjugate를 사용하여 FACScan으로 분석하여 1차적인 선별을 하였다. 그중 64개의 well만이 양성반응을 나타내어 27.9%가 항체를 분비하는 클론으로 확인되었다. 2차적으로 IL-2 수용체를 가지고 있는 HUT 102 cell 세포와 leukaemia T-cell line인 Jurkat 그리고 B-cell line인 B258 세포들에 각각 반응시켰다(그림 16) 그 결과 각각의 세포에 상대적으로 강한 양성 반응을 나타내는 11개의 클론 즉 Table 1에서와 같이 33, 44, 45, 46, 47, 154, 159, 165, 175, 177, 188 등을 선별적으로 골라내어 그중 anti-Tac을 분비하는 가능성이 높은 클론들을 골라 limiting dilution 방법으로 cloning을 실시하였으며 이들 clone들의 상등액을 $100\mu\text{l}$ 씩 취하여 항체분비 여부를 FACScan으로 다시 확인하였다. 항체의 대량생산을 위해 Balb/c mouse의 복강내에 복수 생성을 촉진시키기 위한 priming agent로 FIA를 주사한 후 각각의 clone들을 주사하여 ascitic fluid를 만들었다. 생성된 복수액은 HUT 102 cell세포의 lysate를 전기영동하여 immuno-blotting 방법으로 확인중에 있으며, 또 다른 assay로서 HUT 102 cell 세포에

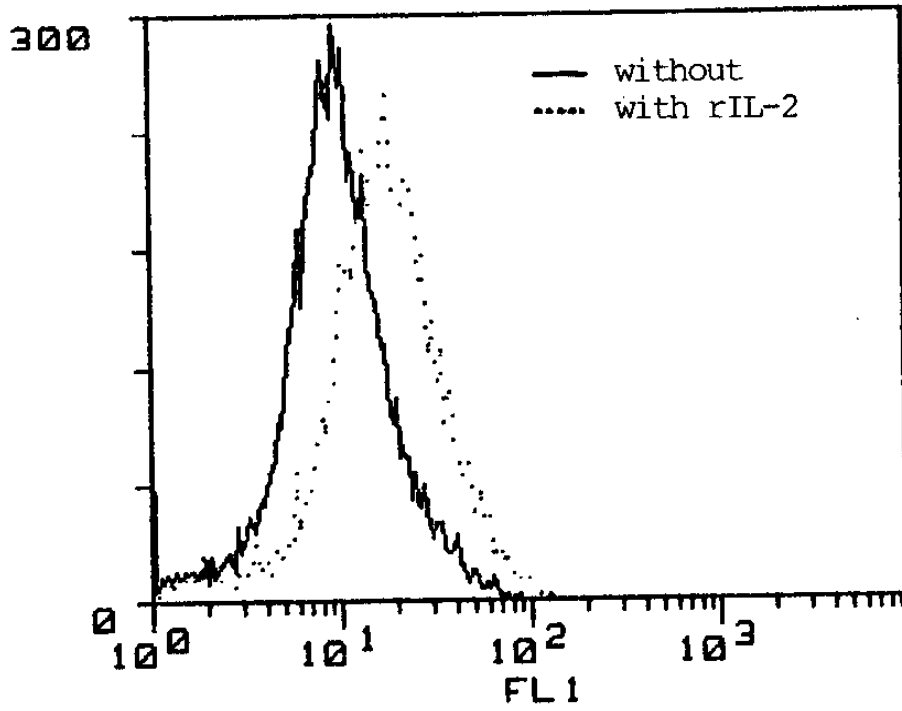


Fig. 14. IL-2 receptor expression on Hut102C11 cell induced by human recombinant IL-2 (FACScan assay).

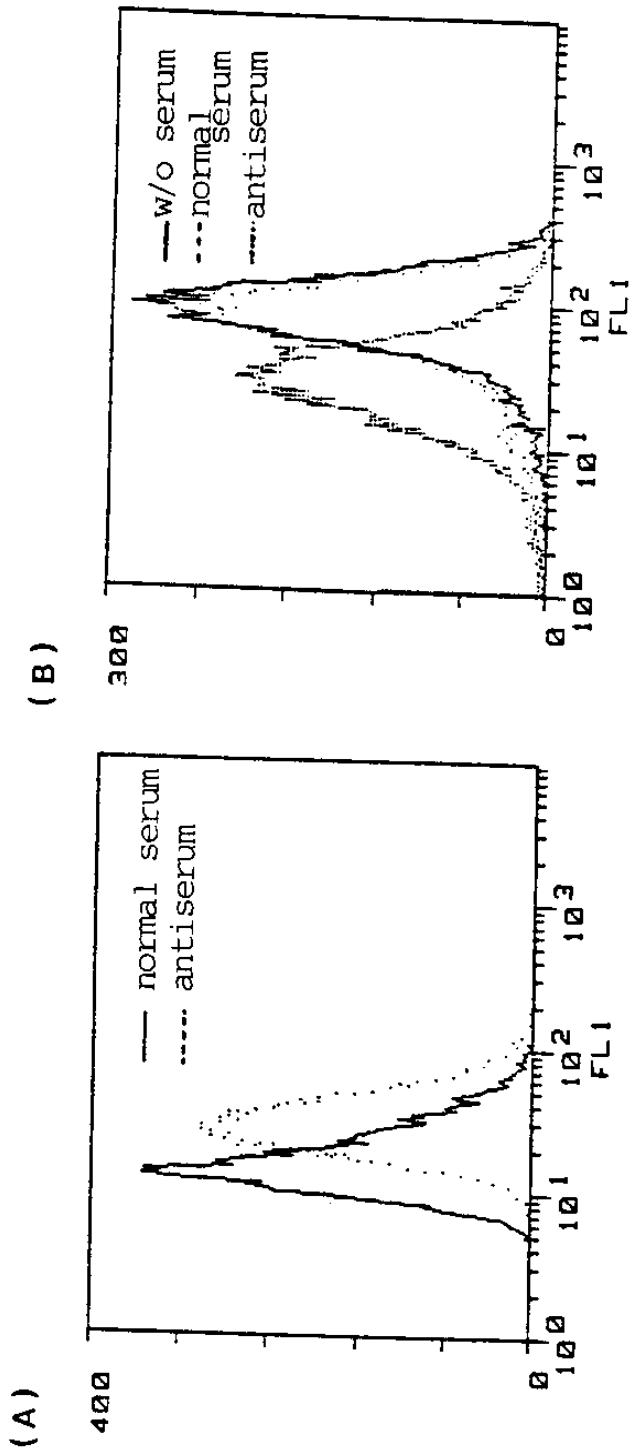


Fig. 15. Determination of the titer of anti-Tac serum obtained from the Balb/c mouse (FACScan assay).

A : Determination of mouse IgG in anti-Tac serum with goat anti-mouse IgG FITC conjugate.

B : Competitive inhibition of anti-Tac serum by anti-Tac FITC conjugate.

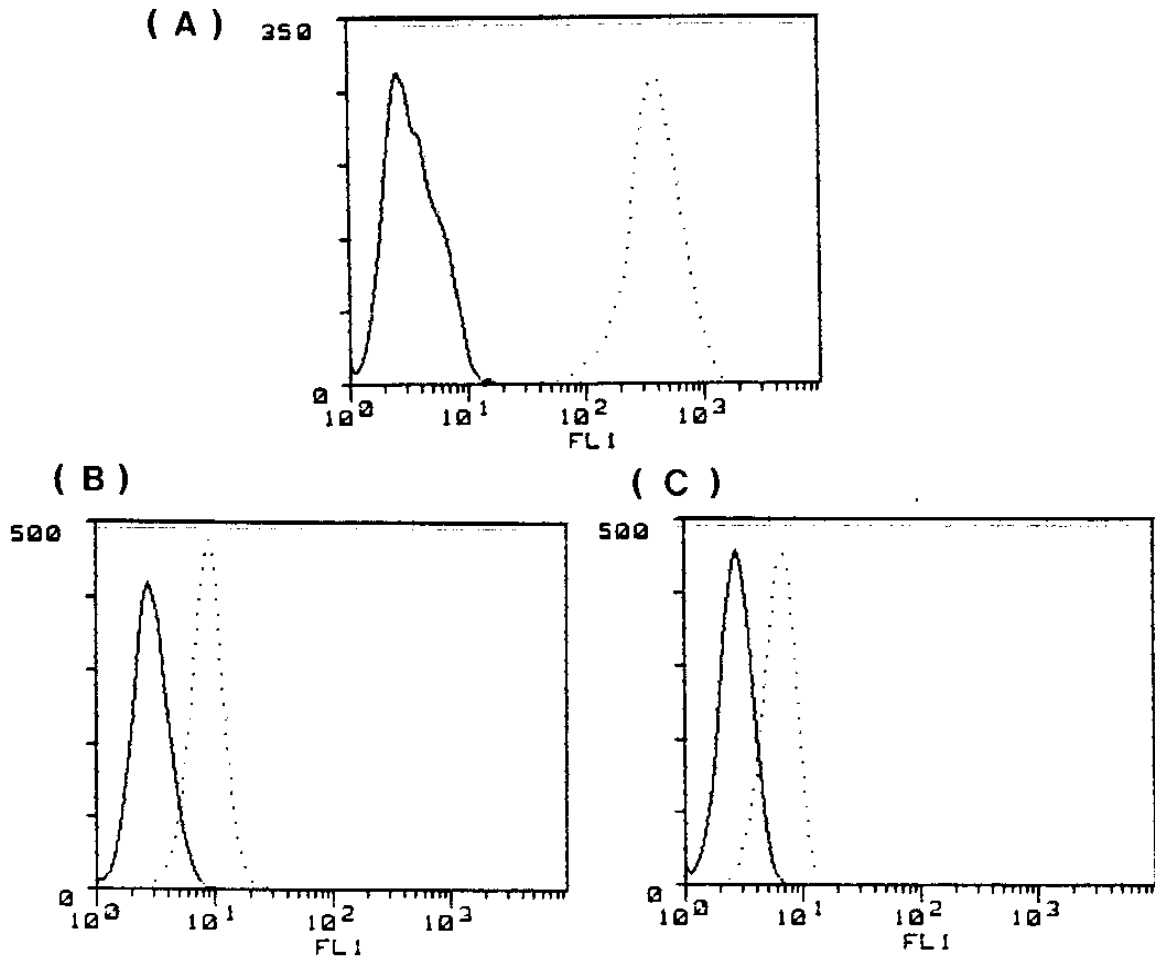


Fig. 16. Binding effect of anti IL-2 receptor on (A) Hut102C11, (B) B258, (C) Jurkat cell line.

— : without anti-Tac FITC conjugate
 - - - : with anti-Tac FITC conjugate

Table 1. The result of first screening after fusion.

positive well	fluorescence intensity		
	B258	Jurkat	Hut102C11
control**	3.40	3.13	3.60
NMS***	4.14	3.87	5.47
33*	7.70	3.58	22.56
44	10.83	32.48	19.52
45*	19.76	3.41	38.16
46*	16.65	5.30	37.43
47	7.27	5.39	11.03
154	13.25	3.84	8.13
159*	9.81	3.84	18.76
165*	9.61	2.26	25.75
175	71.89	4.44	12.97
177*	28.78	5.31	20.48
188*	5.40	5.89	29.79

- * Selected clones for first cloning
- o Fusion efficiency (229/244) 93.8%
- o Positive efficiency (64/229) 27.9%
- o High positive efficiency (11/64)
- ** Culture media
- *** Normal mouse serum

반응시켜 competitive inhibition assay로 anti-Tac FITC conjugate를 사용하여 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 생성여부를 확인하였으나 정확한 측정이 어렵고 anti-Tac의 측정을 위해서는 정제된 IL-2수용체가 필요하기 때문에 분리정제가 선행되어야 하며 sensitivity가 높은 assay system 개발이 절실히 필요한 것으로 사료된다.

제4장 결론 및 건의사항

본 연구는 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체 개발에 관한 기초 연구로서 제1차년도 연구결과 recombinant IL-2를 억제하는 단일클론항체의 생산과 측정법을 확립하였으며 IL-2 수용체의 측정법 및 IL-2 수용체의 발현을 유도한 후 증가된 IL-2 수용체를 이용하여 분리제정 방법의 확립 및 단일클론항체를 생산할 수 있는 기초를 마련하였다. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체는 장기이식 수술시의 거부 반응을 감소시키는 면역억제제로서 임상 및 치료에 이용함을 목적으로 하고 있다.

1차년도의 결과를 종합하여 보면 rIL-2를 Balb/c mouse에 면역주사하여 얻은 spleen cell을 P3×63AG 8.653과 융합시켜 IL-2의 생리활성을 억제하는 5종의 hybridoma cell line을 개발하였다. 이 cell line에서 분비하는 단일클론항체는 IL-2에 반응하는 클론으로 030-01, 030-03, 030-04, 030-05, 030-06이라 명명하였으며 affinity chromatography법으로 IgG subtype을 분리하였다. 이중 030-05만이 IgG_{2a}를 생산하며 나머지 클론들은 IgG₁을 생산하였다. 이들은 competitive inhibition assay로 서로 다른 epitope에 반응하는 클론들을 선별하여 IL-2를 측정할 수 있는 sandwich ELISA법도 개발하였다. 또한 IL-2 수용체에 반응하는 IL-2의 binding site가 같은 epitope을 갖고 있을 경우 그 epitope에 대한 단일클론항체를 찾아 anti-idiotypic antibody를 만들어 IL-2 수용체와 같은 epitope에 반응

한다면 IL-2 수용체의 측정 뿐만 아니라 IL-2 수용체의 분리정제에 적용하는 것도 가능하리라 생각되어진다.

IL-2 수용체의 효율적인 분리를 위해 세포표면에 존재하는 IL-2 수용체의 표현을 조절하는 기전에 대한 연구를 위해 IL-2 수용체의 최대 발현 효과를 가져오기 위한 실험 조건을 확립하였다. 그 결과 PBL 또는 T-cell line인 HUT 102 cell 세포에 여러 종류의 mitogen과 lymphokine을 이용하여 IL-2 수용체의 발현을 측정된 결과 rIL-2의 첨가로 인하여 IL-2 수용체의 발현에 매우 선별적으로 작용한다는 점에 착안하여 IL-2수용체의 분리제정 및 단일클론 항체의 개발에 적용하였다.

IL-2 수용체의 분리 정제는 1차적인 방법으로 IL-2 수용체와 IL-2결합 부위가 같은 부분을 포함하고 있는 것에 착안하여 IL-2 affinity column을 만들어 IL-2 수용체를 분리하였으나 세포표면에 존재하는 IL-2 수용체가 극소량인 점으로 IL-2수용체의 측정방법에 문제점이 대두되어 우선은 immuno-blotting 방법으로 측정조건을 확립하고 있으나 완전히 정립되지 않은 상태로 계속적으로 많은 연구가 필요하며 보다 sensitivity가 뛰어난 assay system의 개발이 요구되고 있다.

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체는 세포표면에 존재하는 IL-2 수용체를 IL-2 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 72시간 동안 배양하여 IL-2 수용체를 expression시킨 HUT 102 cell 세포를 면역주사하여 얻은 spleen cell을 P3 \times 63AG 8.653과 융합시켜 hybridoma를 생산하였다. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 분리하는 클론을 선별하는 방

법은 inhibition assay를 이용하였다. 그러나 이 방법은 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 측정에 있어 anti-Tac과 같은 epitope에 반응해야만 inhibition이 된다는 문제점이 있으며 같은 epitope에 반응할지라도 anti-Tac밖에 찾을 수 없는 단점이 있다. 단일클론항체 간의 반응으로 서로 다른 epitope에 반응을 하면 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체일지라도 선별을 해내기가 불가능하기 때문에 IL-2 수용체의 단일클론항체를 측정할 수 있는 다른 assay system 개발의 필요성이 시급한 것으로 판단되어 hybridoma들을 액체질소에 냉동보관하며 assay system 확립에 중심으로 연구를 진행하고 있다.

참 고 문 헌

1. Morgan D.A. , Ruscehi F.W. and Gallo R.C. (1976) Science 193 : 1007.
2. Taniguchi T. , Matsui H. , Fujita T. , Takaoka C. and Kashima N. (1983) Nature 302 : 305.
3. Robb R.J. Munck A. and Smith K.A. (1981) J. Exp. Med. 154 : 1455
4. Uchiyama T. , Broder S. and Waldmann T.A. (1981) J. Immunol. 126 : 1393.
5. Leonard W.J. ,Depper J.M. , Uchiyama T. , Smith K. A. and Waldmann T. A. (1982) Nature 300 : 267.
6. Waldmann T.A. , Kozak, R.W. , Tsudo M. , Oh—ishi T. , Bongiovanni K. F. and Goldman C.K. (1986) Progress in Immunology VI, ed. B. Cinider, R.G. Miller, pp553. Orlando : Academic.
7. Robb R.J. Munck A. and Smith K.A. (1981) J. Exp. Med. 154 : 1455.
8. Smith K.A. (1988) Science 240 : 1169
9. Sharon M. , Klausner R.D. , Cullen B.R. , Chizzonite R. and Leorard W.J. (1986) Science 234 : 859
10. Depper J.M. , Leorard W.J. , Drogula C. , kronke M. J. and Waldmann T. A. (1985) J. Cell.Biochem. 27 : 267.
11. Thy L.T.B. , Dukovich M. , Peffer N.J. Fauci A.S. and Kehrl J.H. (1987) J. Immunol. 139 : 1550.
12. Greene W.C. (1987) Clin. Res. 35 : 439.

13. Herrmann F. , Cammistra S.A. , Levine H. and Griffin J.D. (1985) J. Exp. Med. 162 : 1111
14. Tsudo M. , Goldman C.K. , Bongiovanni K.F. Chan W.C. and Winton E.F. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 5394.
15. Lorberboum Galski H. , Kozak R. , Waldmann T. , Bailon P. and Fitzgerald D. (1988) J. Biol. Chem. 263. 18650
16. Nelson D.L. , Rubin L.A. , Kurman C.C. , Fritz M. E. and Boutin B. (1986). J. Clin. Immunol. 6 : 114.
17. Waldmann T.A. (1986) Science 232 : 727.
18. Williams J.M. , Kelly V.E. , Kirkman R.L. , Tilney N.L. and Shapiro M.E. (1988) Immunol. Invest. 16 : 687.
19. Diamantstein T. , Osawa H. (1986) Immunol. Rev. 92 : 5
20. Waldmann T.A. , Greene W.C. , Sarin P.S. , Saxinger C. and Blayney D. W. (1984) J. Clin. Invest. 73 : 1711.
21. Tsudo M. , Kozak R.W. , Goldman C.K. , and Waldmann T.A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 9694.
22. Tsudo M. , Kozak R.W. , Goldman C.K and Waldmann T.A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 4215
23. Salvatore R.E. and Ross G. T. (1976) Bull. Wld. Hlth. Org. 54 : 463.
24. Ey D.L. Prowse S.J. and Jenkin C.R. (1978) Immunochemistry 15 : 429.
25. Neoh S.H. , Colin G. , Angela P. and Headdy Z. (1986) J. Immunol. Methods 91 : 231
26. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem. 72 : 248.

27. Laemmli V.K. (1970) *Nature* 227 : 680.
28. Avrameas S. , Terynck T. and Guesdon J.L. (1978) *Scand. J. Immunol.* 8 : 7.
29. Smith K.A. , Favata M.F. and Oroszlan S. (1983) *J. Immunol.* 131 : 1808.
30. Gehman L.D. and Robb R.J. (1984) *J. Immunol.* 130 : 2644.
31. Jose M.C. , Marshall P. , Henderson B. and Altman A. (1986) *J. Immunol Methods* 89 : 181.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.