



IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 면역치료제 개발에 관한 연구(Ⅲ)

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

연 구 기 관

한국과학기술연구원
부설유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “ IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 면역치료제 개발에 관한 연구 ” 과제의 제 3 차년도 보고서로 제출합니다.

1992. 6. .

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소

총괄연구책임자 : 정태화 (유전공학연구소 책임연구원)

연 구 원 : 김길현 (유전공학연구소 선임연구원)

이희구 (유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제 목

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 면역치료제 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

인체내의 면역체계에서 외부로부터의 생체보호에 T세포는 매우 중요한 역할을 하며 이러한 T세포들의 활성을 조절하는 인자를 Interleukin - 2 (IL-2) 또는 T cell growth factor (TCGF)라고 한다. IL-2는 T세포의 세포막에 있는 IL-2 수용체와 작용하여 T세포를 증식시키거나 조절 또는 활성기능을 일으키게 한다. IL-2의 임상효과는 세포막에 존재하는 IL-2 수용체에 따라 영향을 받으며, 현재 IL-2를 임상에 이용하는 경우도 IL-2를 직접 투여하지 않고 IL-2에 의해 활성화된 세포를 다시 인체에 되돌려주는 형태를 취하고 있다. IL-2를 실제적인 임상에 이용함에 따른 문제점 중의 하나는 IL-2의 생체내 활성을 적절히 조절할 수 있는 방법이 많지 않기 때문에 IL-2의 활성을 조절하는 방법 중의 하나로 세포막에 존재하는 IL-2 수용체를 항체로 막아서 IL-2가 수용체와 반응하지 못하게 하는 방법이 있다. 이러한 IL-2는 생체내에 있어서 정상적인 면역기능을 조절하거나 발현시키는데, 또한 중요한 역할을 담당하고 있어 우리 몸을 외부 물질이나 외부 세포로부터 보호하는데 극히 중요한 요소이다. 그러나 장기이식의 경우와 같이 의도적으로 외부기관을 도입한 경우 면역반응의 결과로 나타나는 외부반응은 억제되어야만 성공적인 장기이식을 보장할 수 있다. 그러한 면역반응을 억제하기 위한 방법으로서 일차적으로 고려될 수 있는 것이 IL-2의 활성을 억제하는 방법인데, 이것은 IL-2에 대한 항체를

사용하거나 T세포 표면에 있는 IL-2 수용체에 대한 항체를 투여함으로써 면역억제 효과를 얻을 수 있게 된다. 현재는 cyclosporin A 같은 화학적 치료가 일반적으로 사용되고 있으나 부작용이 매우 크므로 새로운 면역치료제의 개발이 시급한 실정이다. 현재 이와 유사한 목적으로 OKT3라고 하는 단일클론항체가 미국 FDA 승인을 받아 이미 임상에서 활용되어지고 있는데, 본 연구에서 추구하는 IL-2 수용체에 대한 항체는 활성화된 T세포를 직접 공격할 수 있으므로, 모든 T세포에 존재하는 CD3 분자를 공격하는 OKT3 항체보다 훨씬 효과적 결과를 기대할 수 있다.

본 연구에서는 합성 peptide를 이용하여 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 만들어서 IL-2 수용체의 활성을 억제하는데 그대로 쓰거나 단일클론항체와 Toxin 등의 접합체 또는 mouse-human hybridoma를 이용한 직접적인 면역치료제의 개발을 위해 IL-2 수용체의 단일클론항체를 개발하여 이의 분석방법을 확립하였다. 특히 본 연구에서 개발한 단일클론항체는 Endogen사에서 유일하게 시판되고 있는 항체와 버금가는 것이며, 합성 peptide를 이용한 IL-2 수용체에 대한 항체 개발은 세계 최초의 보고이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 생산을 위해 세포표면에 존재하는 IL-2 수용체를 조절하는 기전에 대한 연구가 선행되어야 하며, 이에 따라 Hut102c11 세포에 human recombinant IL-2 (rIL-2)를 첨가시켜 IL-2 수용체의 발현을 증가시키는 최적 배양농도를 결정한다.
2. IL-2 수용체의 발현을 증가시킨 Hut102c11 세포를 mouse에 주사

하거나 IL-2 수용체 분자의 특정 부위에 해당하는 아미노산 서열을 결정하고 거기에 해당하는 peptide를 합성하여 주사함으로써 면역화를 유도한 후 hybridoma 기법을 이용하여 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 개발하여 임상에 도입하기 위한 새로운 면역억제제의 개발을 위해 항체의 특성을 연구한다.

3. IL-2 수용체의 효율적인 분리나 생리적, 면역학적 특성 연구를 위해서 세포 표면 항원인 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 대량생산을 위해 IL-2 수용체만을 인식하는 clone을 선별하여 mouse의 복강에 주사하여 ascitic fluid를 얻어 단일클론항체를 분리 정제한다.

4. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 측정하기 위해 flow cytometer를 이용하여 competitive inhibition 측정법이나 IL-2 수용체의 측정을 위해 immunoprecipitation 방법을 이용한다.

IV. 연구개발의 결과 및 활용에 대한 건의

IL-2 수용체의 단일클론항체를 개발하기 위해 먼저 IL-2 수용체에 대한 최대발현효과를 유도하여 최적배양 조건을 확립하였다. Hut 102 cell 세포에 mitogen과 lymphokine들을 처리한 결과 rIL-2를 50 u/ml의 농도로 IMDM 배지에 첨가했을 때 최대 발현효과를 유도할 수 있었다. 이 조건을 이용하여 Hut 102 cell 세포를 자극하여 세포 자체를 직접 항원으로 사용하였으며 hybridoma 기법을 이용하여 276개의 well 중 274개의 clone이 형성되어 99.2%의 높은 융합효율로 나타났다. 그중 25개의 well만이 mouse-IgG에 강한 양성반응을 나타냈으며 이들을 flow cytometer로 competitive inhibition 측정법으로 분석한 결과 1개의 clone (8F9)만이 IL-2 수용체만을 인식하였다. 이것을 다시 limiting dilution

방법으로 **subcloning**을 하여 2개의 **clone** (8F9-48, 8F9-141)을 얻을 수 있었으며 **subtyping test** 결과 모두 **IgG₁**인 단일클론항체를 생산하였다. 2종의 단일클론항체가 **IL-2** 수용체에 특이반응을 나타내는지의 여부를 조사한 결과 **B258, Jurkat** 세포에는 거의 반응을 하지 않았으며 세포표면에 많은 양의 **IL-2** 수용체를 가지고 있는 **Hut102c11** 세포에는 뚜렷한 반응을 나타냈다. **IL-2**에 의한 **PBL**의 증식 효과에 8F9-141이 미치는 영향을 조사한 결과, 8F9-141의 농도가 증가할수록 **PBL**의 증식 억제 효과를 볼 수 있는데 **IL-2** 수용체에 결합하여 **IL-2**에 의한 생리활성을 억제하는 것을 확인하였다. 한편 **human PBL**을 이용한 **mixed lymphocyte reaction (MLR)**에 대한 억제작용을 측정해 본 결과, 8F9-141에 의해 **MLR**이 현저하게 억제됨을 관찰할 수 있었다.

또한 본 연구에서는 **IL-2** 수용체의 **heavy chain**에 대한 단일클론항체의 생산은 **IL-2** 수용체 분자를 직접 이용하지 않고 이미 보고되어 있는 수용체 아미노산의 유추서열로부터 항원으로 사용할 **peptide**를 합성하여 **peptide-KLH**와 **peptide-Sepharose 4B** 접합체를 주사하여 면역화를 유도한 후 **hybridoma** 기법을 이용 **IL-2** 수용체의 **heavy chain**에 반응하는 2종의 단일클론항체 (3-2-25, 5-19-59)를 개발하였다. 이들은 **peptide**와 **Hut102** 세포를 이용한 **ELISA** 방법과 **flow cytometer**를 이용한 방법으로 항체를 선별하였으며 모두 **IgG₁**인 것으로 판명되었다. 위에서 얻은 단일클론항체는 **IL-2** 수용체를 발현하는 **Hut102** 세포에 대해 높은 친화력을 보였으며 8F9-48, 8F9-141과 마찬가지로 **IL-2** 수용체의 발현 정도가 매우 낮은 **Jurkat**과 **B258** 세포에 대해서는 친화력이 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 이 결과 본 항체들은 **IL-2** 수용체에 선택적으로 결합하는 능력이 있는 것으로 생각되어지며 **IL-2** 수용체의 **heavy chain**에

결합한다는 명확한 증거를 얻기 위하여 이들 항체를 이용하여 immuno-precipitation을 하여 확인하였다.

본 연구에서 개발한 8F9-48,141 과 3-2-25, 5-19-59 항체는 생체내에서 IL-2 가 IL-2 수용체에 결합하여 면역반응을 유발하는 것을 억제하는 효과가 있으므로 장차 면역억제제로서 임상적 응용이 가능할 것으로 생각되며 다른 세포표면 단백질에 대한 항체 생산에 있어 중요한 기초적 자료가 될 것으로 생각된다.

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 15.5KD 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 ~ 10 pM) and low affinity (kd of ~ 10 nM) 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 75KD 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 disease 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 IL-2 receptor as well as chemotherapy. Development of immunoregulatory agent is very important for immunotherapy, and utilization of those

antibodies as such immunoregulatory agents would be desirable.

In the present study, monoclonal antibodies reactive with IL-2 receptor protein, both α - and β -chain were developed by using hybridoma technique. Major contents of the research are summarized as follows.

1. Hut 102 cell, a human T cell leukemia line, expressing high level of IL-2 receptors on their surface were grown in the presence of phytohaemagglutinin as an activator inducing IL-2 receptor expression.
2. Hut 102 cells were immunized to Balb/c mice whose spleen cells were fused with SP2/0 myeloma line to produce antibody-producing hybridomas. Alternatively, a synthetic peptide representing a part of the sequence of IL-2 receptor molecules (residues 32-50) were covalently attached to Sepharose 4B beads, and immunized to Balb/c mice to prepare immune spleen cells for hybridoma production. The synthetic peptide constitutes strongly hydrophilic region of extracellular domain of the IL-2 receptor molecules as revealed by hydrophathy plot analysis.
3. Hybridomas were screened by ELISA using the synthetic peptides as antigenic moiety, by measuring the binding of antibody to Hut 102 cell surface that was monitored by a flow cytometer. The antibodies were further screened by their characteristics such as IL-2 binding inhibition. A large

quantity of the anti-IL-2 receptor were obtained from ascitic fluids of hybridoma-loaded BALB/c mice.

4. Antibodies were characterized by immunoprecipitation followed by autoradiography to reveal that the antibodies recognize 75 kD protein molecules on Hut 102 cell surface, which confirms the antigenic moiety to be heavy chain of IL-2 receptor molecules.

CONTENTS

I. Introduction	15
II. Materials and Methods	18
1. Materials and instrument	18
2. Experimental methods	19
A. Development of IL-2 receptor monoclonal antibodies	19
(1) Synthesis of peptide	19
(2) Cojugation of peptide to carrier protein	20
(3) Immunization of conjugates against the mice	20
(4) Culture of myeloma cells	21
(5) Selection of myeloma cells	21
(6) Cloning of hybridma cells	22
B. Purification of IL-2 receptor antibodies	23
(1) Mass production of antibodies	23
(2) Purification of antibodies from ascitic fluids	23
C. Measurement of IL-2 receptor antibodies	23
(1) Preparation of conjugate	23
(2) Measurement of antibodies by flow cytometer	24
D. Characterization of IL-2 receptor	24
(1) Measurement of IL-2 receptor	24
(2) Expression of IL-2 receptor on T-cell line by cytokine and mitogens	25

(3) Analysis of IL-2 receptor by immunoprecipitation method	25
E. Immunological characterization of IL-2 receptor antibodies	26
(1) Effect on PBL proliferation	26
(2) Effect on suppression by mixed lymphocyte reaction (MLR)	26
III. Results and Discussion	27
1. Preparation of synthetic peptide	27
2. Production of IL-2 receptor monoclonal antibodies	31
3. Characterization of IL-2 receptor monoclonal antibodies	33
IV. Conclusions and Remarks	42
Reference	45

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험재료 및 방법	18
제 1 절 실험재료 및 기기	18
제 2 절 실험방법	19
1. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 개발	19
가. Peptide의 합성	19
나. Peptide와 carrier protein의 접합	20
다. Mouse의 면역화	20
라. Myeloma 세포배양	21
마. Hybridoma의 제작 및 스크리닝	21
바. Hybridoma 세포의 cloning	22
2. IL-2 수용체에 대한 항체의 분리정제	23
가. 단일클론항체의 대량생산	23
나. 단일클론항체의 분리 정제	23
3. IL-2 수용체에 대한 항체의 측정	23
가. Conjugate의 제조	23
나. Flow cytometer를 이용한 항체의 측정	24
4. IL-2 수용체의 특성	24
가. IL-2 수용체의 측정	24
나. IL-2 수용체의 expression	25
다. Immunoprecipitation에 의한 IL-2 수용체의 분석	25

5. IL-2 수용체에 대한 항체의 면역학적 특성	26
가. PBL의 증식에 미치는 효과	26
나. 항체에 의한 MLR의 증식억제 효과	26
제 3 장 결과 및 고찰	27
제 1 절 항원의 제작	27
제 2 절 단일클론항체의 제작	31
제 3 절 단일클론항체의 특성	33
제 4 장 결론 및 건의사항	42
참 고 문 헌	45

제 1 장 서 론

인체는 세균이나 바이러스 같은 외부의 침입자로부터 자신을 보호하기 위해 면역글로블린 같은 체액성 면역과 T세포와 B세포로 이루어진 세포성 면역의 방어기작을 갖고 있다. 그중 T세포는 면역기능을 향상시키거나 억제하는 조절기능을 갖고 있을 뿐 아니라 lym-pokine 을 분비함으로써 다른 T세포 또는 B세포들을 활성화시키거나 증식시키는 면역체계에서 중추적인 역할을 하고 있다.¹⁾

Interleukine-2는 여러 lym-pokine 중 T cell growth factor 로 밝혀졌는데 133개의 아미노산으로 구성된 분자량 15.5 K dalton 의 당단백질로서²⁾ T세포 또는 일부 B세포의 세포막에 존재하는 IL-2 수용체와 반응하여 T세포의 증식 및 다른 killer 세포의 활성을 유도하는 기능을 갖고 있다. IL-2 수용체는 정상 T세포에서는 그 수가 매우 적으나 항원이나 mitogen 을 처리하여 배양하면 많은 T세포의 세포막에서 그 수가 증가하며³⁾ HTLV-1 바이러스에 감염된 leukemia 세포들의 세포막에는 상당히 많은 수의 IL-2 수용체를 갖고 있다. IL-2 수용체는 IL-2 와의 친화력에 따라 고친화 ($K_d = 10 \text{ pM}$) 와 저친화 ($K_d = 10 \text{ nM}$) 의 두가지 형태가 존재한다. IL-2 수용체에 대한 연구는 anti-Tac 이라 불리는 단일클론항체에 의해 많이 진행되었는데⁴⁾ 이 단일클론항체와 반응하는 수용체는 251개의 아미노산으로 이루어졌으며 33 K dalton 의 펩타이드가 당과 결합 55 K dalton 의 당단백질로 저친화력을 갖고 있다.⁵⁾ 그런데 anti-Tac 는 55 K dalton 단백질 (p55) 과만 반응하고 β -chain 으로 불리는 다른 IL-2 수용체인 75 K dalton 단백질 (p75) 과는 반응하지 않는다.⁶⁾ T세포의 세포막에

서 p55 와 p75 는 서로 독립적으로 존재하며 IL-2 와 반응하여 저친화력과 중친화력을 나타내는데 두 chain 이 비공유 결합하여 고친화력을 나타낸다.^{7,8)} 최근 세번째의 chain 으로서 IL-2 와 반응하는 단백질이 발견되었는데 분자량이 90K ~ 100K dalton 으로서 p75 처럼 anti-Tac 과는 반응하지 않는다.⁹⁾

IL-2 수용체는 T세포를 비롯해서 다른 여러 종류의 세포들에서도 존재한다. p55 는 휴지상태의 T세포, B세포, 단핵세포 등에서는 매우 적은 수가 존재하나³³⁾ 이들 세포들을 lectin 이나 항원 또는 mitogen 등으로 자극시켰을 경우, 보다 많은 수의 p55 가 세포막에 발현된다.³²⁾ 그리고 종양세포, HTLV-1 유전자를 갖고 있는 세포들도 많은 수의 p55 가 세포막에 발현되며¹⁰⁾ 활성화된 말초혈액내 단핵세포와 HTLV-1 에 감염된 leukemia 세포들의 p55 는 수용성 형태로도 분비된다. p75 도 역시 p55 와 마찬가지로 mitogen 등으로 활성화된 T세포, B세포, 단핵세포 등에서도 발현되며,³⁴⁾ phytohemagglutinin (PHA) 나 phorbol myristate acetate (PMA) 으로 처리된 T세포, HTLV-1 에 감염된 T세포에서 많이 존재한다.¹¹⁾ 휴지기의 B세포를 cowan-1 로 처리하거나¹²⁾ 단핵세포를 LPS 나 LPS 와 α -interferon 을¹³⁾ 함께 처리했을 때에도 p75 는 발현되며 대과립 림프구 (LGL) 는 p75 가 발현되나 p55 는 발현되지 않는다.¹⁴⁾ p55 와 p75 는 세포의 세포막에 독립적 또는 결합체로서 존재하지만 IL-2 의 신호전달에는 차이가 나고 있다. p55 의 경우 세포질내로 불과 13 개의 아미노산이 뻗어 있는데 이것은 IL-2 에 의한 신호전달에 충분하지 못하므로 결과적으로 세포의 증식작용을 유도하지 못한다.¹⁵⁾ 반대로 p75 는 p55 의 존재없이 충분한 IL-2 의 존재하에 독자적인 신호전달을 이룰 수 있다. 그러나 p55 와 p75 의 결합체는 고친화 수용체를 형성함으로써 저농도의 IL-2 와 반응해서

도 충분한 신호전달을 이룰 수 있다.

IL-2 수용체를 가진 세포들은 정상인의 체내에서는 거의 발견할 수 없지만 면역결핍증 림프종양, 자가면역질환과 장기이식 거부반응을 일으킨 환자에서는 높은 빈도로 T세포, B세포 등의 세포막에서 발현된다. 면역결핍증 환자의 경우 IL-2 이상에도 불구하고 IL-2 수용체가 세포에 발현되며 AIDS 환자에서도 수용성 IL-2 수용체가 발견된다. Systemic lupus erythematosus, pulmonary sarcoidosis, rheumatoid arthritis 등의 자가면역질환에서도 p55가 림프구에 발현되어 있으나 IL-2 수용체 수는 매우 감소되어 있다. HTLV-1와 관련된 leukemia T세포는 고친화력을 갖는 수용체를 갖고 있는데^{16,21,22)} PHA로 처리된 T임파구 보다 최고 10배 이상의 수용체를 갖고 있으며 이러한 수용체는 종양 T세포의 무절제한 증식에 영향을 주고 있다.

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

본 연구에서는 이미 IL-2 수용체의 발현을 증가시키는 최적 배양조건을 확립하였으며 IL-2와 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 개발하여 그 각각의 특성을 조사하였다.

이들 항체를 이용 면역체계 내의 역할과 세포표면 단백질에 대한 화학적 및 면역학적 특성을 밝혀내고 임상에 적용할 경우 면역학적 치료법에 기술 축적 및 응용에 의한 파급효과가 매우 클 것으로 생각되며 임상에 많은 기여를 하게 될 것으로 생각된다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 사용기기.

본 연구에 사용된 쥐는 Balb/c 로써 유전공학연구소 특수사업부에서 분양 받은 것을 사용하였으며 하이브리도마 세포주를 개발하기 위해 사용한 cell line 은 SP2/0 를 사용하였다. 정제된 human rIL-2 는 Boehringer Mannheim 제품을 구입하였으며, IL-2 수용체를 갖고 있는 Hut 102 cell cell line 은 California Institute of Technology (U.S.A)의 Dr G.Y. Kim으로부터 분양 받았다. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체 (Anti-Tac) 와 Anti-Tac FITC conjugate 는 Dako 와 Becton/Dickinson 제품을 사용하였으며 β -chain 에 대한 단일클론항체는 Endogen 사 제품을 사용하였다.

세포배양에 필요한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), NTCT-135 와 gentamicin 은 Gibco 사 제품을 사용하였으며, Iscove's Modified Dulbecco's Medified 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 (ConA) 등은 Sigma 제품 (U.S.A) 을 사용하였다. [3 H] Thymidine 과 [125 I] Iodine 은 Amersham (England) 에서 구입하였으며 Protein-A Sepharose CL-6B 와 CNBr-activatide Sepharose 4B 는 Pharmacia

(Sweden)로부터 구입하였다.

본 연구에 사용된 각종 Plastic ware 와 disposable tube 등은 모두 Costar (U.S.A)와 Falcon 제품들이며 96-well Plate 는 Nunc (Denmark)의 제품을 사용하였다.

기기로써 laminar flow chamber 는 ASSAB (Sweden)의 horizontal flow type 을, centrifuge 는 Sorvall RT 6000B CO₂ incubator 는 Forma Scientific 제품을 사용하였다. microscope 는 Leitz 제품인 inverted type, ELISA reader 는 Flow Lab. 의 titerteck multiscan, fraction collector 는 Gilson, 전기영동장비는 Bio-Rad 제품을 각각 사용하였다. Cell harvester 는 Inotech (Switzerland) 제품을 scintillation counter 는 Beckman 제품을 사용하였으며, flow cytometer 는 Becton/Dickinson사의 FACScan 을 사용하였다.

제2절 실험 방법

1. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 개발

가. Peptide 의 합성

Interleukin-2 수용체 단백질의 아미노산 서열중 32 - 50 번에 해당되는 polypeptide 를 자동 peptide 합성기 (Applied Biosystem, USA) 를 이용하여 합성하였으며, 그의 아미노산 서열은 다음과 같다.

NH₂ -Ser -Cys -Gln -Val -His -Ala -Trp -pro -Asp -Arg -Arg -Trp -
Asn -Gln -Thr -Cys -Glu -Leu -COOH

나. Peptide 와 carrier protein 의 결합

제 1 방법 : keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma Chem. Co.)

2 mg/ml 을 PBS 에 투석시킨 후 25 % glutaraldehyde 10 μ l 을 가하고 반응시키고 다시 투석하여 미반응 glutaraldehyde 를 제거한다. PBS 에 녹인 2 mg 의 peptide 를 가하고 잘 섞은 후 30 분간 실온에 방치한 다음, 5 μ glutaraldehyde 를 다시 추가하고 15 분간 방치한다. 1 M glycine (pH 6.0) 200 μ l 을 가하고 15 분간 방치하여 미반응 glutaraldehyde 를 중화시킨다.

제 2 방법 : 제 1 방법과 근본적으로 유사하나, peptide 에 먼저 glutaraldehyde 를 반응시키고 난 후 나중에 KLH 용액을 넣어주어 반응시킨다. 나머지의 과정은 제 1 방법과 똑같이 수행한다.

다. mouse 의 면역화

Balb/c 마우스를 다음과 같은 항원을 각각의 형태대로 주사함으로써 면역화를 유도한다. 여기서 사용된 수용성 peptide 나 carrier protein (KLH) 에 결합된 peptide 는 Complete Freund's Adjuvant 와 함께 emulsion 을 만들어 주사하였으며, 2 차 면역주사는 Incomplete Freund's Adjuvant 를 사용하여 2 주 간격으로 주사하였다.

- 1) Hut 102 세포를 1×10^7 개씩 2 회에 걸쳐 복강내에 주사하였다.
- 2) Hut 102 세포 1×10^7 개를 복강에 1 회 주사하고 제 1 방법으로 제조한 peptide-KLH 결합체를 2 주 후에 추가로 접종하였다.
- 3) 제 1 방법으로 제조한 peptide-KLH 결합체를 2 주 간격으로 2 회 접종하였다.

4) 제 2 방법으로 제조한 peptide-KLH 접합체를 2 주 간격으로 2 회 접종하였다.

5) Peptide를 CNBr-activated Sepharose 4B(Pharmacia, Sweden)에 접합시키고 이를 복강내에 2 주 간격으로 2 회 주사하였다.

라. Myeloma 세포 배양

세포(SP2/0) 배양에 필요한 배지는 glucose 함량(13.38 g/L)이 고농도로 포함되어 있는 DMEM media에 0.1% Fetal bovine Serum(FBS)과 Gentamicin(50 mg/L)이 첨가된 것을 사용하였으며 37°C에서 5%의 CO₂가 유지되는 항온기 내에서 세포수가 1 × 10⁶/ml이 넘지 않도록 계대 배양하였다. 5 × 10⁵/ml 정도로 자란 세포는 원심분리(400 × g)하여 세포를 모아 10% DMSO와 50% FBS가 첨가된 cryomedia에 현탁시켜 사용하기 전까지 액체 질소에 냉동 보관하였다.

마. Hybridoma의 제작 및 스크리닝

앞에서 언급한 바와 같은 방법으로 면역화한 마우스로부터 비장세포를 얻어 SP2/0 myeloma 세포와 융합을 실시하였으며, HAT medium으로 hybridoma를 선별해 내었다.

선별된 hybridoma의 배양액중 면역글로불린의 생성량을 각각 측정하여 다량의 면역글로불린을 생산하는 hybridoma를 일차적으로 선별하였다. 여기서 선별된 hybridoma는 다음과 같은 여러가지 선별방법을 통하여 2차적으로 스크리닝을 실시하였다.

첫째는 항원 peptide를 이용한 ELISA 방법이다. 즉, microtiter plate에 peptide(1.5 µg)을 가하여 plate의 표면에 부착시키고 미반응 peptide를 세척해 낸다. Hybridoma의 배양액을 각각의 well에 가하고 1 시간 동안 반응을 시키고 난 후 충분히 세척하여 배양액을 제거한다.

Goat anti-mouse Ig-biotin 을 가하고 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 충분히 세척하고 Avidin-peroxidase 를 적당량 가하고 1 시간 동안 실온에 방치한다. 충분히 세척한 후 peroxidase 의 기질 용액을 넣어 반응을 시키고 그 반응정도를 450 nm에서 ELISA Reader 로 측정한다.

둘째는 Hut 102 cell 을 이용한 ELISA 방법이다. 즉, Hut 102 cell (1×10^6) 을 polyethylene 96-well plater 에 넣고 30 분간 실온에 방치한 후 1000 rpm 에서 10 분간 원심 분리하여 상층액을 제거한다. 각 well 에 2.5 % glutaraldehyde $10 \mu\text{l}$ 를 가하고 30 분간 방치한다. 충분히 세척하여 미반응 glutaraldehyde 를 제거하고 hybridoma 의 배양액을 가하여 30 분간 반응시킨 후 다시 세척해 낸다. 그 이후의 방법은 위에서 언급한 peptide 를 이용한 ELISA 법과 동일하다.

셋째는 Hut 102 세포를 이용한 flow cytometry 이다. 즉, 5×10^5 의 Hut 102 cell 을 hybridoma 배양액 $100 \mu\text{l}$ 와 섞어 30 분간 실온에서 반응을 시킨 다음 PBS 로 세척해 내고 Goat anti-mouse Ig-FITC 를 가한다. 30 분간의 반응이 끝나면 다시 세척하여 flow cytometer (FACS can, Becton-Dickinson) 로 형광강도를 측정한다.

마. Hybridoma 세포의 cloning

Flow cytometer 로 측정한 결과 IL-2 수용체에 강한 양성을 나타내는 hybridoma 세포군을 선택하여 limiting dilution 에 의해 단일클론을 얻기 위한 cloning 을 실시하였다.

Feeder cell 인 macrophage 들이 분주되어 있는 96-well plate 에 hybridoma 세포가 well 당 1~2 개씩 분주되도록 하였으며 10~15 일 사이에 96-well plate 에서 clone 이 형성된 세포들을 다시 1~2 번 cloning 을 반복하여 완전한 단일클론이 되도록 하였다.

2. IL-2 수용체에 대한 항체의 분리 정제

가. 단일클론항체의 대량생산

Flow cytometer로 측정하여 IL-2 수용체에 강한 양성을 나타내는 well의 세포를 선별하여 T-flask에 배양한 후 상등액을 취하는 in-vitro 법과 FIA Pristane이 감작된 Balb/c mouse에 하이브리도마 세포를 주사한 후 생성된 복수를 취하는 in-vivo법을 이용하여 항체를 생산하였다. 복수를 이용하는 경우 복강내 암 유발을 Priming agent인 FLA를 0.5ml 씩 Balb/c의 복강내에 주사하고 일주일 후 1×10^6 개의 하이브리도마 세포를 다시 복강내에 주사하여 생성된 복수를 취하였다. 얻어진 복수는 4°C에서 $1,400 \times g$ 으로 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

나. 단일클론항체의 분리 정제

Ascitic fluid에 NaOH를 넣어 pH를 8.0으로 조절하였다. 항체의 분리는 Protein-G Sepharose 4B bead를 column (1.5 × 7 cm)에 packing하고 PBS (pH 7.4) 용액으로 충분히 평형시킨 후 ascitic fluid를 1시간당 약 5 ml의 속도로 흘려주어 항체가 protein-G bead에 결합하도록 하였다. 그후 같은 용액으로 결합하지 않은 단백질을 제거하고 결합된 항체 단백질은 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7) 용액으로 항체를 분리하였다. 용출된 항체 용액은 4°C에서 PBS로 충분히 투석하여 5% glycerol을 첨가하여 -70°C에 보관하였다.

3. IL-2 수용체에 대한 항체의 측정

가. Conjugate의 제조

분리 정제된 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체 및 IL-2를 0.1 M

Sodium carbonate (pH9.6) 용액에 투석하여 2 mg/ml 의 항체 용액과 10% FITC를 섞어 실온에서 90분간 반응시킨 후 Sephadex G-25 column (1 × 50 cm) 을 통과시켜 IL-2 FITC와 3-2-25, 5-19-59 FITC 접합체를 제조하였다. 이들 접합체가 IL-2 수용체에 대해 반응하는 최적농도를 결정하기 위해 Hut 102 세포를 한 tube 당 5×10^5 cells을 넣은 후 접합체들을 2-fold로 희석하여 그 각각을 20 μ l 씩 넣어 4 °C에서 30분간 반응시켜 IL-2 수용체에 대한 반응성의 차이를 조사하였다.

나. Flow cytometer 를 이용한 항체의 측정

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 측정은 수용체의 발현이 현저한 Hut 102 세포에 hybridoma 배양액 100 μ l와 섞어 30분간 실온에서 반응시킨 후 PBS로 세척해 내어 Goat anti-mouse Ig-FITC를 가하여 flow cytometer로 형광강도를 측정하는 방법과 competitive inhibition 측정법을 이용하였다. 먼저 한 tube당 Hut 102 cell 세포(2×10^5)를 넣어 400 × 8에서 원심분리한 후 상층액을 버리고 분리 정제한 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 20 μ l 씩 넣어준 후 4 °C에서 30분간 반응시키고 PBS로 3번 세척하였다. IL-2 FITC conjugate 용액을 20 μ l 씩 넣어 4 °C에서 30분간 반응시켜 측정하였으며 다른 방법으로 IL-2 수용체 heavy chain FITC 접합체 (endogen) 용액을 20 μ l 씩 넣어 inhibition 정도를 flow cytometer를 이용하여 측정하였다.

4. IL-2 수용체의 특성

가. IL-2 수용체의 측정

여러 종류의 leukemia T-cell line의 세포표면에 있는 IL-2 수용체의 양을 측정하기 위해 Hut 102 (5×10^6 cells/tube) 세포에 anti

-Tac FITC와 IL-2 수용체의 heavy chain FITC를 20 μ l씩 넣어 저온에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer를 이용하여 IL-2 수용체의 양을 측정하였다.

나. IL-2 수용체의 expression

Hut 102 cll 세포의 표면에 있는 IL-2 수용체의 발현을 위한 최적조건을 조사하기 위해 Hut 102 cll 세포에 mitogen과 lymphokine의 농도 변화를 주어 배양하였다. PHA, PMA, ConA sup, Ionomycin과 IL-2 또는 이들을 혼합으로 처리하여 24 시간에서 92 시간까지 배양하여 얻은 Hut 102 cll 세포를 anti-Tac FITC와 heavy chain FITC 접합체를 투여하여 IL-2 수용체의 증식에 미치는 효과를 flow cytometer로 측정하였다.

다. Immunoprecipitation에 의한 IL-2 수용체의 분석

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체라고 생각되어지는 8F9-48, 141과 3-2-25, 5-19-59 항체가 IL-2 수용체에 만 특이적으로 반응하는지를 조사하기 위해 Iodine-125를 Hut 102 세포 표면에 labeling시켜 extraction 용액(10mM Tris/HCl, pH7.0, 0.5% NP-40)을 넣어 세포표면 항원을 Solubilization시켰다. protein G-sepharose bead에 항체를 붙이고 lysate를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 반응하여 immunoprecipitation시킨 후 extraction 용액으로 세척한 다음 SDS-PAGE를 하여 autoradiography로 band를 확인하였다.

5. IL-2 수용체에 대한 항체의 면역학적 특성

가. PBL의 증식에 미치는 효과

말초혈액 (peripheral blood) 으로부터 PBL의 분리는 heparin 이 처리된 정상인의 혈액을 동량의 HBSS로 희석하고 이를 동량의 Ficoll-Hypaque (비중 : $1.077g/cm^3$, Sigma) 위에 중층하여 $900 \times g$ 에서 20분간 원심분리한 후, Ficoll의 위층인 PBL 층을 얻어 RPMI 1640 배지로 $400 \times g$ 에서 10분간 3회 세척하여 PBL을 분리하였다. 정제된 PBL을 complete media (RPMI 1640, $NaHCO_3$ $2g/l$, 10mM HEPES, 2mM glutamine, 2-Mercaptoethanol 5×10^{-5} mM, gentamicin $50mg/l$, 10% FBS)로 CO_2 incubator (5%)의 $37^\circ C$ 에서 rIL-2 ($10 \sim 50$ u/ml)와 IL-2 수용체에 대한 항체 ($0 \sim 100 \mu g/ml$)를 농도별로 첨가하여 배양하였으며 48시간 후 PBL의 증식효과를 현미경으로 관찰하였으며 16시간 동안 [3H] thymidine 으로 Pulse 한 후 세포를 harvest 하고 $60^\circ C$ 에서 건조시킨 것을 scintillation cocktail 을 넣어 β -counter (Beckman) 를 사용하여 cpm 값을 측정하였다.

나. 항체에 의한 MLR의 증식 억제 효과

서로 다른 3종류의 PBL을 분리하여 각각을 1 : 1로 나누어 한 종류는 γ 선으로 1,000 rad 조사하여 한 well (1×10^6 cells/total)에 2종류의 PBL을 5×10^5 씩 서로 혼합하여 분주하고 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 농도별로 ($0 \sim 10 \mu g$) 첨가하여 5% CO_2 incubator 에서 72시간 배양하여 [3H] thymidine incorporation 으로 mixed lymphocyte reaction (MLR) 의 반응에 의한 PBL의 증식효과를 cpm 값으로 측정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 항원의 제작

IL-2 수용체에 대한 항체를 생산함에 있어서 항원으로 사용할 항원을 세포로부터 직접 분리·정제하는 것은 매우 어려운 작업이다. 그것은 IL-2 수용체 분자가 세포 표면에 발현되는 정도가 매우 낮기 때문에 실험동물을 면역화하는데 필요한 양을 얻기 위해서는 엄청난 시간과 노력이 소요된다. 그리하여 본 연구에서는 IL-2 수용체 분자를 직접 이용하지 않고 이미 보고되어 있는 수용체 아미노산의 유추 서열로부터 항원으로 사용할 peptide를 합성하였다. Peptide 합성에 있어서 가장 주요한 점은 수용체 분자의 구조에 있어서 분자의 바깥쪽에 위치하는 부위를 대상으로 해야 된다는 점이다. 그래야만 그 특정 부위에 대한 항체를 만들었을 때 그 항체가 원래의 수용체 분자와 친화력을 가질 가능성이 높아지게 되는 것이다. 따라서 IL-2 수용체 분자와 3차 구조상의 특정 부위에 해당되는 합성 peptide를 항원으로 사용할 때는 과연 어떤 부위가 가장 적절한가 하는 점이 관건이 되는 것이다.

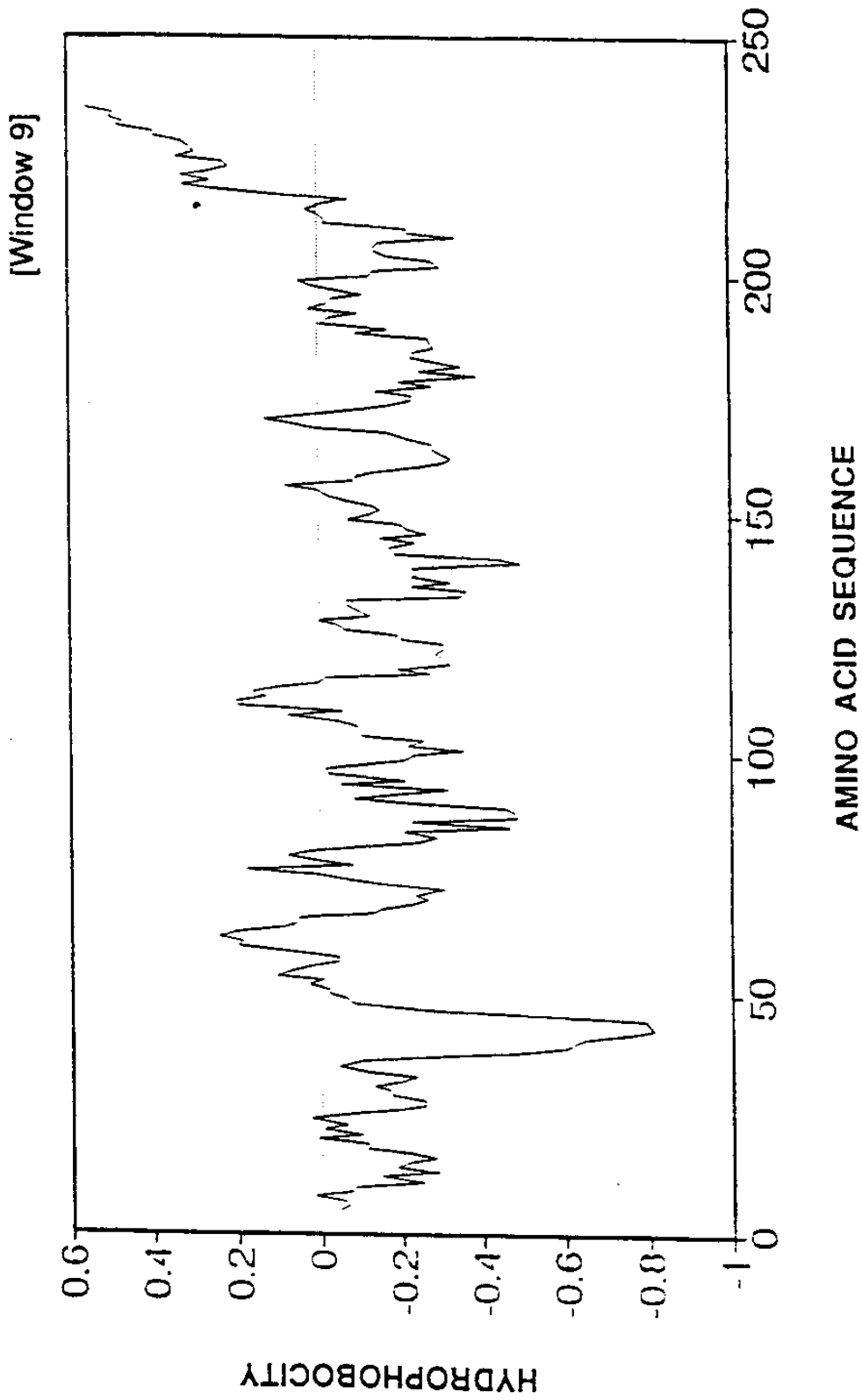
그러나 IL-2 수용체 분자의 3차원 구조는 아직 밝혀지지 않은 상태이므로 어느 부위가 분자 구조상 바깥 부분으로 돌출되어 있을 것인지는 알 수 없다. 다만, 이미 알려져 있는 아미노산 서열을 활용하면 어느 정도 추정은 경우에 따라 가능할 수도 있을 것이다. 즉, 수용체의 아미노산 구성을 살펴보았을 때, 친수성 아미노산이 많이 분포되어 있는 부위는 아무래도 분자 구조상 바깥쪽으로 돌출될 가능성이 많으며, 한편 소수성 아미노산이 많이 분포되어 있는 부위는 분자 구조상 내부쪽으로 들어와 있을 가능성이

많다.

이러한 이론을 바탕으로 하여 IL-2 수용체 분자의 아미노산 서열을 각 부위의 친수성 및 소수성을 검정하여 보았다. Kyte 와 Doolittle의 방법을 이용하여 IL-2 수용체의 N-terminal로부터 235개의 아미노산에 대한 hydrophathy plot analysis를 행하였다. 이 235개 아미노산으로 구성되는 부위는 IL-2 수용체 분자의 extracellular domain 전부와 transmembrane region의 일부가 포함될 것으로 추정된다. 그림 1에 나타난 바를 보면, 그림 1의 hydrophathy plot 마지막 부분에 아주 강한 소수성 부위가 나타나는 것으로 보아 그 마지막 부분은 transmembrane region에 해당될 것이 틀림없을 것으로 추정된다. 한편 transmembrane region의 N-terminal 방향, 즉 extracellular domain에 해당되는 부위의 hydrophathy plot을 관찰해 보면 여러 군데에서 친수성 부위가 존재하는 것이 나타나고 있으며, 특히 아미노산 30 - 50 번 사이에서 아주 강한 친수성 부위가 나타남을 볼 수 있다. 이 부위는 주위의 다른 어느 부위 보다는 친수성이 강하게 나타나고 있으며, 그 길이도 20여개의 아미노산에 해당하는 충분한 길이를 갖고 있어 그 부위는 IL-2 수용체 분자의 바깥 부분에 돌출되어 위치할 가능성이 매우 높을 것으로 추정된다. 그리하여 본 연구에서는 아미노산 32 - 50번에 해당하는 19개의 아미노산으로 구성된 polypeptide를 automated peptide synthesizer (Applied Biosystem)을 이용하여 합성하였으며, 이를 IL-2 수용체 분자를 대신한 항원으로 사용하였다.

이렇게 선정된 peptide (아미노산 서열 32-50) 가운데에 면역반응을 유도할 수 있는 T-cell epitope이 존재하는지를 알아보기 위해 이미 개발되어 있는 T-cell epitope selection algorithm을 활용하여 분석하였을

Fig. 1. Hydropathy plot analysis of deduced Interleukin-2 receptor amino acid sequence (residue 1-235)



때, 표1에 나타난 바와 같이 extracellular domain에서는 7개 정도의 후보자가 나타났으며 본 연구에서 사용한 peptide도 포함되었음(아미노산 서열 46-48)을 알 수 있었다.

Table 1. Potential T cell epitopes as predicted by an algorithm based on amphipathicity of proteins

Protein	Predicted amphipathic segments (centers of 11 residue blocks)*	Range of angles	Amphipathic scores
IL-2 receptor heavy chain	46 -- 48	100 -- 115	5.7
	69 -- 71	130 -- 135	6.7
	84 -- 85	90 -- 95	4.0
	94 -- 111	120 -- 135	49.0
	134 -- 136	85 -- 105	6.8
	148 -- 152	85 -- 115	8.4
	192 -- 199	105 -- 130	20.9

* Predictions were made by running the algorithm and setting the threshold to 4. The second column indicates the predicted segments by the midpoint positions of the predicted 11 residue blocks.

제 2 절 단일클론항체의 제작

IL-2 수용체에 대한 면역화를 시키기 위해 “재료 및 방법”에서 기술한 바와 같이 5 가지 종류의 서로 다른 항원을 각각의 Balb/c 마우스에 2 주 간격으로 2 회 주사하였다.

첫째, IL-2 수용체를 발현하는 Hut 102 cell 을 마우스의 복강내에 1×10^7 세포를 주사하였다. 이때 102 cell 은 복강내에서 증식하여 암을 일으키지 않도록 미리 γ 선으로 10,000 rad 조사하여 주었다. 둘째, γ 선을 Hut 102 cell 을 먼저 복강내에 1 회 주사하고 난 후, carrier protein 인 keyhole limpet hemocyanin (KLH)와 접합한 peptide를 complete freund's adjuvant (CFA)와 섞어 유탁액을 만들어 발바닥에 1 회 주사하였다. 셋째, peptide 를 CNBr로 활성화시킨 Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden)에 접합시키고 이를 마우스의 복강내에 주사하였다. 넷째, KLH와 peptide 를 서로 다른 2 가지 방법으로 접합을 시키고 이를 CFA와 섞어 1 회 주사하고, 2 회째는 IFA와 섞어 주사하였다.

이들 마우스들이 peptide 에 대한 면역학적 반응성을 획득하였는지 조사하기 위하여 각각의 마우스로부터 lymph node cell 을 취하고 이들 세포에 peptide 를 가하여 항원 자극을 주고 배양하였다. 이때 각각의 세포들의 세포증식 반응을 ^3H -thymidine 의 흡수정도를 측정함으로써 결정하였다. 표 2에 나타난 바와 같이 lymph node cell 의 경우 공히 peptide 를 culture 중에 가해줌으로써 세포증식이 증가함을 볼 수 있었으며, lymph node cell 의 경우에 높은 반응성을 보였다. 또한 이들 면역화된 마우스의 혈청을 뽑아 ELISA로 측정한 결과 정상 마우스의 경우보다 훨씬 높은 반응성이 나타났다.

Table 2. Induction of immune responses by IL-2R peptide : Proliferation of IL-2R peptide-immune T cells in response to the IL-2R peptide and serum antibody level of the immune mice.

Stimulation	T cell proliferation (cpm)*		
	Mouse I**	Mouse II**	Mouse III**
Medium	111	167	57
Con A sup***	3180	3685	8794
Peptide	105	1887	4619
Peptide-KLH	182	3841	4676
Serum antibody	0.193****	0.920	0.735

- * Lymph node cells obtained from each mouse were incubated with appropriate stimulation as indicated for 3 days before they were pulsed with ³H-thymidine, harvested, and counted on a liquid scintillation counter.
- ** Mouse I, non-immune mouse; Mouse II, Mouse immunized with peptide conjugated with Separose 4B; Mouse III, Mouse immunized with peptide conjugated with KLH.
- *** Con A Sup, Concanvalin A-stimulated rat spleen culture supernatant
- **** Serum antibodies against IL-2R peptide obtained from Balb/c mice previously immunized twice with the peptide were analyzed by ELISA on a microtiter plate precoated with IL-2R peptide. Optical densities at 450 nm were shown.

이들 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포와 myeloma 세포를 각각 융합시키고 HAT medium 상에서 배양하였을 때, 각각 90% 가량의 fusion efficiency를 나타내었다. 이들에 대해 면역글로불린의 생성을 측정하여 1차 스크리닝 하였을 때 약 25% 가량이 면역글로불린 생성이 매우 높은 것으로 나타났다.

면역글로불린 생성량이 높은 이들에 대해 “재료 및 방법”에서 기술한 바와 같이 peptide를 이용한 ELISA, Hut 102 세포를 이용한 ELISA 및 면역글로불린의 Hut 102 세포에 대한 결합능을 측정하는 flow cytometry 등의 방법을 이용하여 2차 스크리닝을 실시하였으며, 그 결과를 표 3과 같이 요약하였다. 전반적으로 peptide를 이용한 ELISA와 Hut 102를 이용한 ELISA 모두에 반응하는 hybridoma가 많이 생성되었으며, 3가지 방법의 스크리닝에서 적어도 한가지 이상의 방법에 대해 양성 반응을 보이는 well이 44개로 나타났다. 이들중 3가지 스크리닝 방법에 의해 모두 양성으로 나타난 4개와 두가지 ELISA법에 의해 강한 양성으로 판정된 16개의 well에 대해 다시 반복적 스크리닝을 실시하여 그중 가장 강한 양성반응을 나타낸 2개의 well의 hybridoma를 선정하여 cloning을 실시하고 다시 스크리닝하여 각각의 clone들을 얻었다. 또한 이들 클론들중 스크리닝 과정에서 가장 강한 양성반응을 보이는 클론을 subclone을 하여 5-19-59과 3-2-25 등 2개의 클론을 얻었다.

제 3 절 단일클론항체의 특성

위에서 얻은 단일클론항체는 공히 IgG1으로 판명되었으며, flow cytometer로 분석하였을 때 IL-2 수용체를 발현하는 Hut 102 세포에 대한

Table 3. Results of Hybridoma screening : The number of positive wells as measured by a combination of three different assay methods.

Assay* \ Mouse**	I	II	III	IV	V	Total
ELISA I & II Flow cytometry			1***	3		4
ELISA I & II	4	2	3	5	2	16
ELISA I & Flow cytometry					1	1
ELISA II & Flow cytometry	1			2	2	5
ELISA II		2		3	5	10
ELISA I			2	2	3	7
Flow cytometry				1		1
Total	5	4	6	16	13	44

* ELISA I : ELISA measuring affinity to the synthetic peptides
 ELISA II : ELISA measuring affinity to Hut 102 cells
 Flow cytometry : Affinity to Hut 102 cells were measured by flow cytometry.

** Mice were immunized with different types of immunogen

I : Immunized with Hut 102 cells only

II : Immunized with Hut 102 cells and subsequently with peptide

III : Immunized with peptided conjugated with agarose beads

IV : Immunized with peptide conjugated with KLH (I)

V : Immunized with peptide conjugated with KLH (II)

*** The number of positive wells as measured by the method(s) as indicated.

높은 친화력을 보였다. 그림 2에 나타난 바와 같이 항체를 Hut 102와 반응을 시키고 goat anti-mouse Ig-FITC로 염색하여 분석해 보면 Hut 102 세포가 매우 높은 형광강도를 보이는 것으로 보아 일단 본 항체가 Hut 102 세포에 대해 높은 친화력을 갖고 있음을 알 수 있다. 한편 IL-2 수용체를 발현하는 정도가 매우 낮은 Jurkat (T cell leukemia)에 대해서는 친화력이 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 이 결과는 본 항체가 IL-2 수용체에 선택적으로 결합하는 능력이 있을 가능성을 주고 있다.

본 항체가 IL-2 수용체에 대한 친화력을 좀더 직접적으로 확인하고 나아가 natural ligand인 IL-2가 수용체에 결합하는데 영향을 미치는지를 조사하였다. 즉, FITC가 결합된 IL-2 (IL-2-FITC)를 IL-2 수용체를 발현하는 Hut 102에 반응시켰을 때 IL-2-FITC가 Hut 102에 결합하는 정도가 본 항체를 가해 줌으로써 저해됨을 보여주었다(그림 3). 따라서 이 결과는 본 항체가 IL-2 수용체와 선택적으로 결합하는 친화력을 갖고 있음을 강력히 시사해 주고 있으며, 더욱이 IL-2가 IL-2 수용체에 결합하는 것을 본 항체가 저해하고 있음을 볼 때 본 항체의 결합부위가 IL-2의 결합부위와 유사하거나 항체의 결합에 의해 IL-2 수용체의 3차원 구조가 현저히 변화할 것이라는 추측을 가능케 한다.

한편 스크리닝 과정에서 얻어진 일부 항체는 이미 보고된 바 있는 IL-2 수용체 light chain (Tac)에 대한 항체인 것으로 밝혀지는 등 부수적 소득도 얻을 수 있었다. 그림 4에 나타난 바와 같이 항체(3-16, 3-20)는 anti-Tac-FITC의 Hut 102 세포에 대한 결합을 저해하는 것으로 나타났으므로 본 항체는 anti-Tac 항체일 가능성이 매우 높다 하겠다.

본 항체가 결합하는 부위가 IL-2 수용체임을 확인하기 위한 또 다른 방법으로 정상인의 백혈구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)

Fig. 2. Hut 102, a human T cell leukemia expressing interleukin-2 receptor binds 5-19-59 and 3-2 antibody.

- (A) Antibody binding to Hut 102 cells (B) Antibody binding to B258 cells
- (1) Cells only (unstained)
 - (2) Normal mouse serum
 - (3) 5-19-59 antibody
 - (4) 3-2 antibody

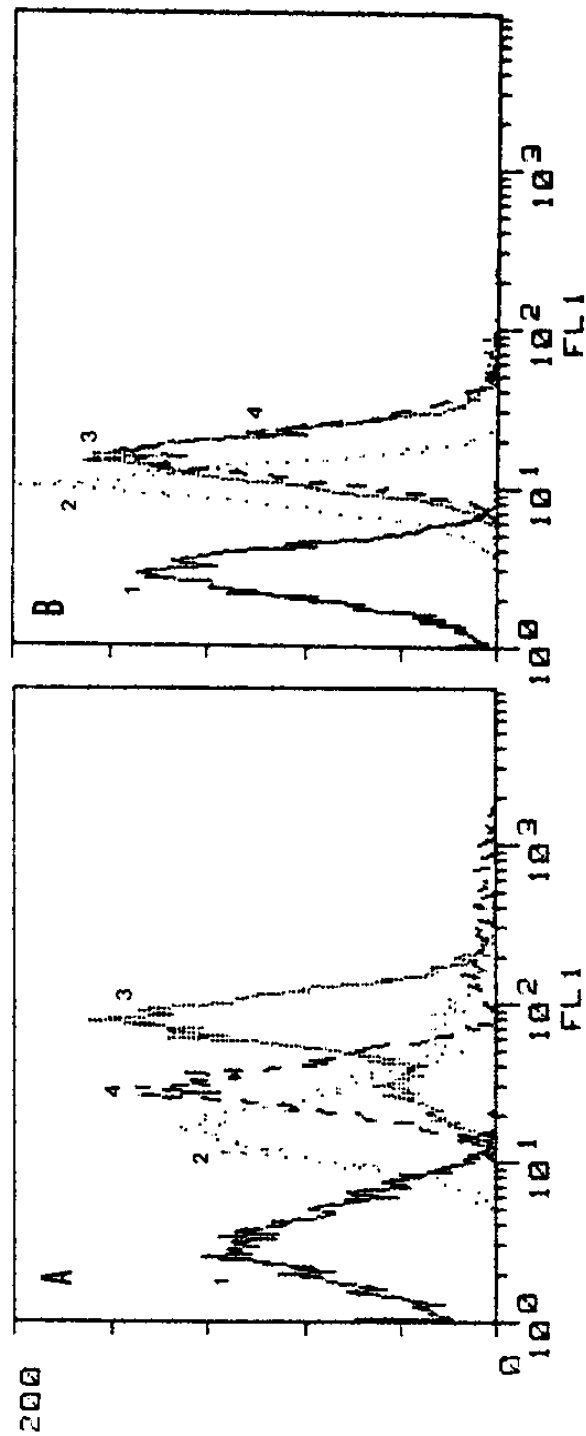


Fig. 3. Inhibition of IL-2-FITC binding to Hut 102 cells by antibodies.

- (1) Cells only (unstained)
- (2) IL-2-FITC + normal mouse serum
- (3) IL-2-FITC + 5-19-59 antibody
- (4) IL-2-FITC + 3-2 antibody

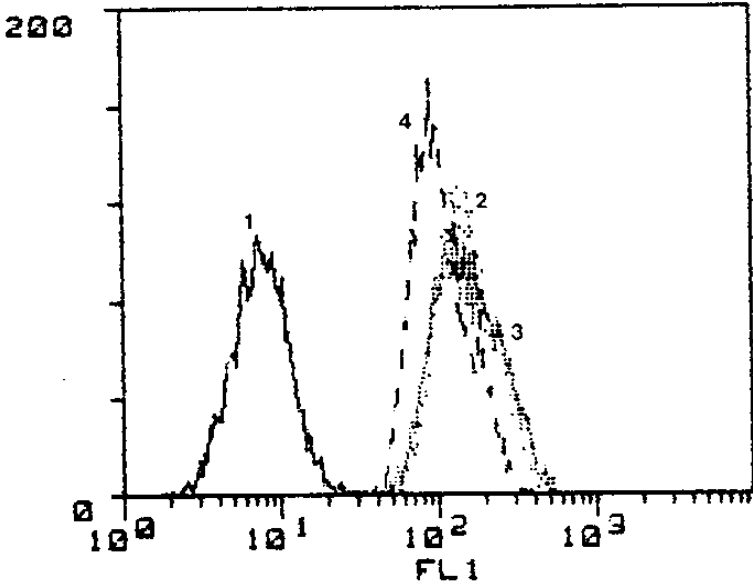
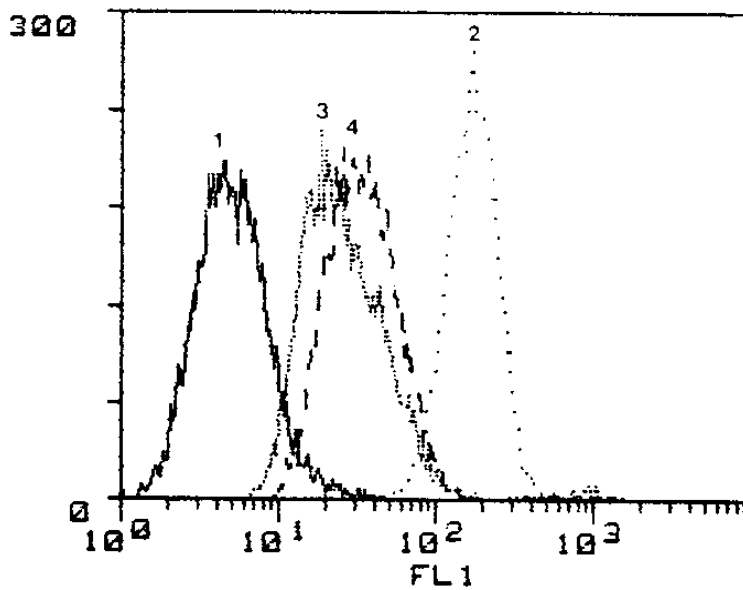


Fig. 4. A clone produced anti-Tac antibody that interfere with the binding of another anti-Tac antibody.

- (1) Cells only (unstained)
- (2) Anti-Tac antibody-FITC (Dako)
- (3) Anti-Tac antibody-FITC + Clone 3-16
- (4) Anti-Tac antibody-FITC + Clone 3-20



상에서 본 항체가 결합하는 세포군과 Endogen사에서 시판하고 있는 IL-2 수용체 heavy chain에 대한 항체가 결합하는 세포군 사이에 어떠한 차이가 있는지를 조사하였다. 그림 5에서 나타난 바와 같이 정상인의 PBMC에서의 항체 결합 세포군은 Endogen사의 그것과 일치하는 것으로 나타났으며, 그 PBMC를 phytohemagglutinin (PHA)으로 처리하여 T cell을 활성화시킴으로써 IL-2 수용체의 발현을 높여주게 되면 항체 결합 세포군의 비율이 증가함을 알 수 있다. 따라서 본 항체가 결합하는 세포군이

Fig. 5. Antibody 5-19-59 binds to the same population of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as commercial anti-IL-2 receptor heavy chain antibody (Endogen).

(A) Normal PBMC

FL1 : Anti- IL-2 receptor heavy chain-FITC (Endogen)

FL2 : Anti-CD23-PE

(C) Normal PBMC

FL1 : 5-19-59 antibody-FITC

FL2 : Anti-CD23-PE

(B) PHA-activated PBMC

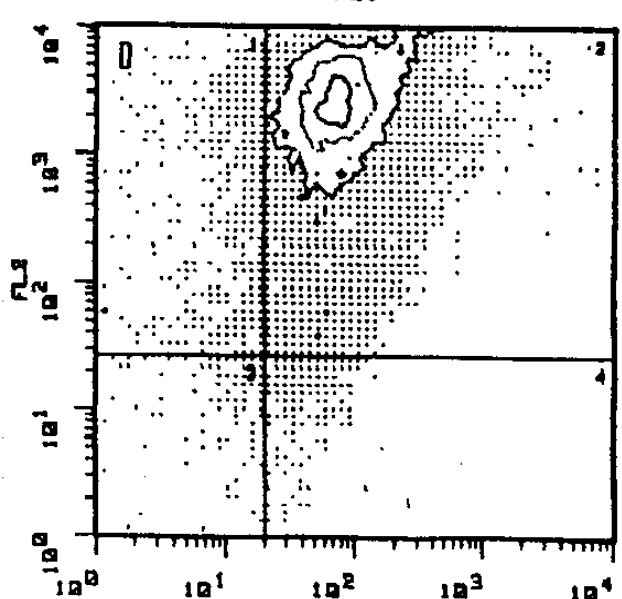
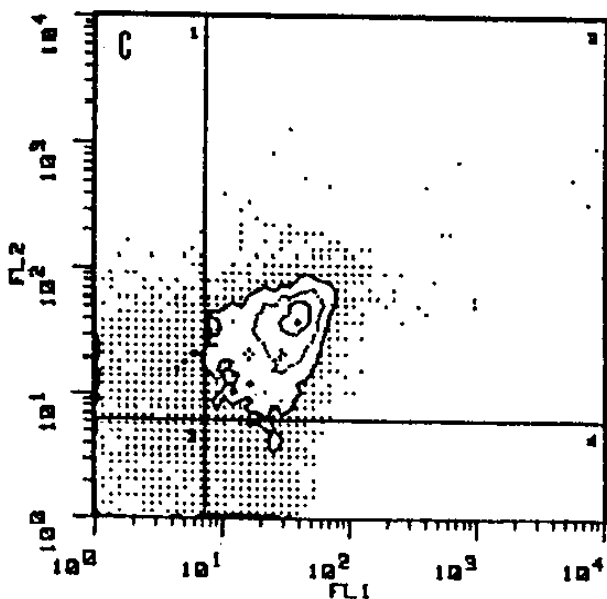
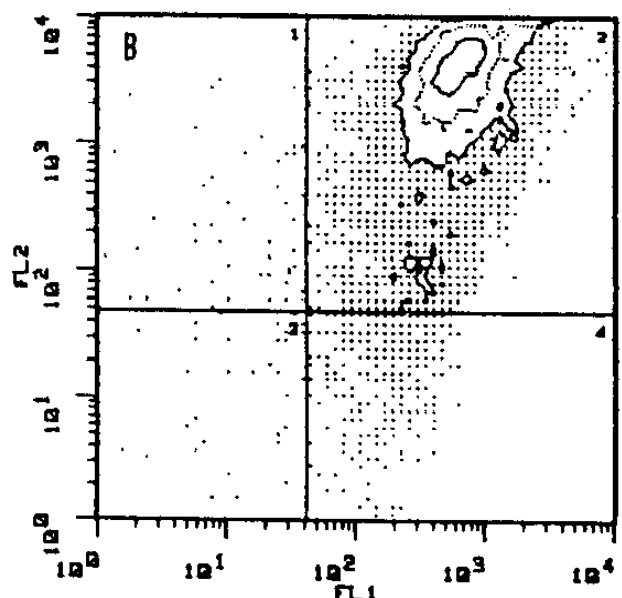
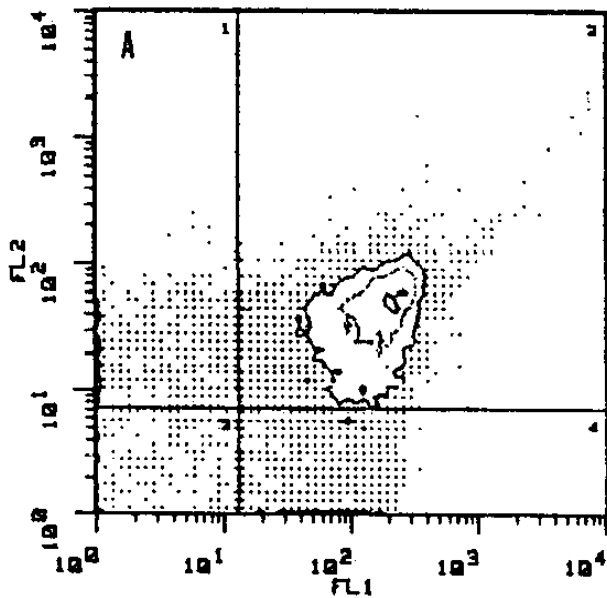
FL1 : Anti- IL-2 receptor heavy chain-FITC (Endogen)

FL2 : Anti-CD23-PE

(D) PHA-activated PBMC

FL1 : 5-19-59 antibody-FITC

FL2 : Anti-CD23-PE



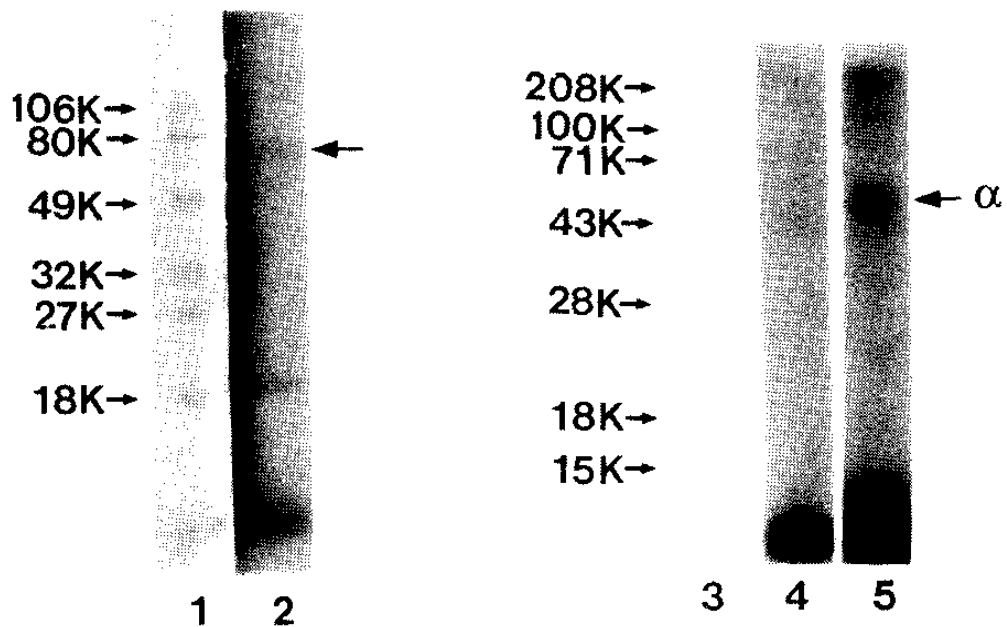
Endogen 사 제품의 그것과 동일하게 나타난 것으로 보아 본 항체도 역시 IL-2 수용체 heavy chain에 대한 결합력이 있는 항체임이 분명하다 할 수 있다.

본 항체가 IL-2 수용체의 heavy chain에 결합한다는 명확한 증거를 얻기 위하여 본 항체를 이용하여 immunoprecipitation을 시행하였다. 즉, Hut 102 세포를 ^{125}I 로 세포표면 labeling을 하고 0.5% nonidet P-40을 이용하여 lysate를 만들었다. 이 lysate를 항체를 결합시킨 protein A Sepharose 4B로 precipitation을 시키고 이를 SDS-PAGE를 시행한 후 autoradiogram을 얻었다(그림 6). 그림 6에서 화살표로 표시된 부분이 IL-2 receptor heavy chain에 해당되는 것으로 그 분자량이 약 75 kD 정도였다.

이상과 같은 결과를 놓고 볼 때 본 항체는 IL-2 수용체의 heavy chain에 결합하는 항체임이 분명하다. 본 항체는 첫째, IL-2 수용체를 다량 발현하는 Hut 102에 높은 결합력을 보이는 한편, IL-2 수용체를 발현하지 않거나 매우 낮은 수준으로 발현하는 Jurkat에 거의 결합하지 않았다. 둘째, 본 항체는 IL-2가 Hut 102 표면의 IL-2 수용체에 결합하는 것을 저해하였다. 셋째, 시판되고 있는 Endogen사의 anti-IL-2 receptor heavy chain과 비교하였을 때 PBMC 상에서의 반응세포군이 유사하게 나타났다. 넷째, 본 항체를 이용하여 Hut 102 세포 표면의 IL-2 수용체를 immunoprecipitation시켰을 때 75 kD의 band가 나타나는 것으로 보아 IL-2 수용체의 heavy chain에 결합함이 분명하다.

Fig. 6. Immunoprecipitation of IL-2 receptor with 3-2-25 and 8F9-48.

- Lane 1; standard marker (Bio Rad)
- 2; precipitate with 3-2-25
- 3; standard marker (BRL)
- 4; precipitate with A4W(HCG)
- 5; precipitate with 8F9-48



제 4 장 결 론 및 건 의 사 항

본 연구는 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 개발하여 장기이식 수술 시 거부반응을 감소시키는 새로운 면역억제제로서 임상의 적용 및 응용에 이용함을 목적으로 연구를 진행하였다. 면역반응의 억제를 위해 고려되어야 할 것은 IL-2의 생체내 생리활성을 적절히 조절하는 방법인데 먼저 IL-2에 대한 항체를 사용하여 IL-2의 생체내 활성을 적절히 조절하거나 또는 IL-2 수용체에 대한 항체를 이용하여 IL-2가 수용체와 반응하지 못하게 하는 방법이 있다.

제 1차년도 연구결과로 IL-2의 생리활성을 억제시키는 5종의 hybridoma cell line (030-01, 030-03, 030-04, 030-05, 030-06)을 개발하였으며 IL-2를 정량적으로 측정할 수 있는 indirect ELISA 방법을 개발하였다. 또한 IL-2 수용체의 발현을 최대로 유도하는 배양조건의 확립과 단일클론항체의 생산 및 분리정제를 연구하기 위한 기초적인 자료를 마련하였다.

제 2차년도 연구결과 IL-2 수용체의 발현을 증가시키는 최적배양 조건을 확립하였으며 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 생산하는 2종의 hybridoma cell line (8F9-48, 8F9-141)들을 개발하여 double diffusion 방법으로 subtype을 측정한 결과 IgG₁을 생산하였다. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 대량생산을 위해 2종의 hybridoma cell line을 이용하여 각각의 ascitic fluid를 생산하여 단일클론항체를 순수 분리·정제하였다. 본 연구를 통해 개발된 2종의 단일클론항체가 IL-2 수용체에 특이 반응을 나타내는지의 여부를 조사한 결과 B258 (B cell leukemia), Jurkat (T cell leukemia) 세포에서는 거의 반응을 하지 않았으며 세

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 Coldman C.K. (1986) Progress in Immunology VI, ed. B. Cinider, R.G. Miller, p.553, 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 Leonard W.J. (1986) Science 234:859
- (10) Depper J.M., Leonard W.J., Drogula C., Kronke M.J. and Waldmann T.A. (1985) J. Cell. Biochem. 27:267

- (11) Try 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 Fitz Gerald 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
- (32) Hern-ku Lee., Xing Xia and Yung Sung Choi. (1990) J. Immunol. 144:3431
- (33) Marcelo B. Sztejn, Washington R. CunA., And Felipe Kierszenbaum (1990) J. Immunol. 144:3558
- (34) Masakazu Hattori., Hitoaki Okazaki, Yasumasa Ishida., Misao Onuma., Shogo Kano, Tasuku, Honjo and Nagahiro Minto (1990) J. Immunol. 144:3809
- (35) Masanori Hatakeyama, Mitsuru Tsudo, Seijiro Minamoto, Takeshi Kono, Takeshi Doi, Takashi Miyata, Masayuki Miyasaka, Tadatsugu Taniguchi (1989) Science. 244:551
- (36) Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.