



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

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

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관

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

1991. 7.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소

총괄연구책임자 : 정태화 (유전공학연구소 책임연구원)

연 구 원 : 최인성 (유전공학연구소 책임연구원)

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 문제점중의 하나는 IL-2의 생체내 활성을 적절히 조절할 수 있는 방법이 많지 않기 때문에 IL-2의 활성을 조절하는 방법중의 하나로 세포막에 존재하는 IL-2수용체를 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. 그러

나 장기이식의 경우와 같이 의도적으로 외부기관을 도입한 경우 면역반응의 결과로 나타나는 외부반응은 억제되어야만 성공적인 장기이식을 보장할 수 있다. 그러한 면역반응을 억제하기 위한 방법으로서는 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.

본 연구에서는 IL-2와 IL-2 수용체에 대한 단일클론 항체를 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.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. IL-2 수용체에 대한 단일클론 항체의 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 최적배양 농도를 결정한다.
2. IL-2 수용체의 발현을 증가시킨 Hut102c11 세포를 mouse

에 주사하여 hydridoma 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 단일클론 항체를 분리정제한다.
4. 일반적으로 순수분리정제가 어려운 세포표면 단백질인 IL-2 수용체를 부분정제하기 위해 분리정제한 항체를 CNBr-activated Sepharose 4B bead에 결합시켜 affinity column을 제작한다. Hut102cl1 세포표면 단백질을 용해시켜 lysate를 만든 후 affinity column을 통과시켜 IL-2 수용체를 부분정제한다.
5. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 측정하기 위해 flow cytometer를 이용하여 competitive inhibition 측정법이나 IL-2 수용체의 측정을 위해 immunoblotting 방법을 이용한다. 또한, Soluble IL-2 수용체의 농도를 측정하기 위해 분리정제된 단일클론항체를 이용 면역측정법을 개발한다.

IV. 연구개발의 결과 및 활용에 대한견의

IL-2 수용체의 단일클론항체를 개발하기 위해 먼저 IL-2 수용체에 대한 최대발현효과를 유도하여 최적배양 조건을 확립하였다. Hut102c11 세포에 mitogen 과 lymphokine 들을 처리한 결과 rIL-2 를 50 u/ml 의 농도로 IMDM 배지에 첨가했을때 최대 발현효과를 유도할수 있었다. 이 조건을 이용하여 Hut102c11 세포를 자극하여 세포사체를 직접 항원으로 사용하였으며 hybridoma 기법을 이용하여 276 개의 well 중 274 개의 clone 이 형성되어 99.2 %의 높은 융합효율로 나타났다. 그중 25 개의 well 만이 mouse-IgG 에 강한 양성반응을 나타냈으며 이들을 flow cytometer 로 competitive inhibition 측정법으로 분석한결과 1 개의 clone(8F9)만이 IL-2 수용체만을 인식하였다. 이것을 다시 limiting dilution 방법으로 subcloning 을 하여 3 개의 clone (8F9-48, 8F9-96, 8F9-141)을 얻을수 있었으며 subtyping test 결과 모두 IgG₁ 인 단일클론항체를 생산하였다. 또한 hybridoma 세포로 ascitic fluid 를 만들어 8F9-141 을 분리정제하여 CNBr-activated Sepharose-4B bead 에 결합시켜 8F9-141 affinity column 을 제작하여 IL-2 수용체를 부분정제하였으며 flow cytometer 와 immunoblotting 방법으로 IL-2 수용체 (m.w. 55 KD) 를 확인하였다. 3 종의 단일클론항체가 IL-2 수용체에 특이반응을 나타내는지의 여부를 조사한결과 B 258, Jurkat 세포에는 거의 반응을 하지 않았으며 세포표면에 많은 양의 IL-2 수용체를 가지고 있는 Hut102c11 세포에는 뚜렷한 반응을 나

타냈다. IL-2에 의한 PBL의 증식효과에 8F9-141이 미치는 영향을 조사한 결과, 8F9-141의 농도가 증가할수록 PBL의 증식 억제 효과를 볼수있는데 IL-2 수용체에 결합하여 IL-2에 의한 생리활성을 억제하는것을 확인하였다. 한편 human PBL을 이용한 mixed lymphocyte reaction(MLR)에 대한 억제작용을 측정해본 결과, 8F9-141에 의해 MLR이 현저하게 억제됨을 관찰할수 있었다.

본 연구에서 개발한 8F9-141 항체는 생체내에서 IL-2가 IL-2 수용체에 결합하여 면역반응을 유발하는것을 억제하는 효과가 있으므로 장차 면역억제제로서 임상적응용이 가능할것으로 생각되며, 다른 세포 표면 단백질에 대한 항체생산에 있어서 중요한 기초적 자료가 될것으로 생각된다. 또한 이 결과를 바탕으로 IL-2 수용체의 β -chain에 대한 항체의 개발과 SLE환자의 B 림파구를 이용한 mouse-human heterohybridoma의 개발을 위해 계속적으로 연구가 진행되어야 할것으로 생각된다.

S U M M A R Y

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 $\sim 10\text{pM}$) 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 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 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 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 present study, monoclonal antibodies reactive with IL-2 receptor were developed by hybridoma technique, and established was a competitive inhibition assay method for IL-2 receptor by using the flow cytometer.

To stimulate the expression of IL-2 receptor, IL-2 was added to the culture medium of Hut102c11 cells. The harvested cells were resuspended in the extraction buffer to solubilize the cell membrane containing IL-2 receptor. From this suspension, IL-2 receptor was partially purified using such column; monoclonal antibody for IL-2 receptor was purified and coupled to the bead of CNBr-activated Sepharose 4B for anti-Tac affinity column.

We also studied modulation and suppression of IL-2 receptor on human peripheral blood lymphocyte by IL-2 and 8F9-141 antibodies. The PBL was incubated in IMDM medium containing various concentration of human recombinant IL-2 for investigation of the optimal condition to induce the proliferation and expression of IL-2 receptor.

8F9-141 antibody suppressed IL-2 induced proliferation of PBL in vitro. The suppression seemed due to competition with IL-2 molecule for the receptor, although further investigations are necessary for the precise mechanism. The antibody also suppressed mixed lymphocyte reaction (MLR) of human PBL. Hence, the monoclonal antibody 8F9-141 turned out to be immunosuppressive to IL-2 induced proliferation and MLR of human PBL, which suggests that the antibody could be a strong candidate for immunosuppressive agent.

C O N T E N T S

I. Introduction	19
II. Materials and Methods	23
1. Materials and instrument	23
2. Experimental methods	24
A. Development of anti IL-2 receptor monoclonal antibodies	24
(1) Immunization of Hut102c11 cells against the mice	24
(2) Culture of myeloma cells	25
(3) Cell fusion	25
(4) Selection of hybridoma cells	26
(5) Cloning of hybridoma cells	27
B. Purification of anti IL-2 receptor antibodies....	27
(1) Mass production of antibodies	27
(2) Purification of antibodies from ascitic fluids	28
C. Measurement of anti IL-2 receptor antibodies....	28
(1) Preparation of conjugate	28
(2) Optimization of 8F9-141 FITC conjugate	29

(3) Measurement of antibodies by competitive inhibition assay	29
D. Purification and characterization of 8F9-141 antibody	30
(1) Development of qualitative assay of IL-2 receptor	30
(2) Expression of IL-2 receptor on T-cell line by IL-2	30
(3) Measurement of soluble IL-2 receptor in culture supernatants	30
(4) Analysis of IL-2 receptor by immunoblotting method	31
(5) Partial purification of IL-2 receptor.....	31
E. Characterization of anti IL-2 receptor antibodies	32
(1) Effect on PBL proliferation	32
(2) Effect on suppression by mixed lymphocyte reaction (MLR)	33
(3) Effect on IL-2 receptor expression induced by IL-2	33
III. Results and Discussion	34
1. Production of anti IL-2 receptor monoclonal	

antibodies	34
2. Purification of anti IL-2 receptor monoclonal antibodies	35
3. Measurement of antibodies by flow cytometer	37
4. Comparison of binding effect on 8F9-141 and anti-Tac	41
5. Partial purification of IL-2 receptor	48
6. Immunological characterization of 8F9-141 monoclonal antibody	50
IV. Conclusions and Remarks	57
References	60

목 차

제 1 장 서 론	19
제 2 장 실험재료 및 방법	23
제 1 절 실험재료 및 기기	23
제 2 절 실험방법	24
1. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 개발	24
가. Mouse 의 면역화	24
나. Myeloma 세포배양	25
다. 세포융합	25
라. Hybridoma 의 선별	26
마. Hybridoma 세포의 cloning	27
2. IL-2 수용체에 대한 항체의 분리정제	27
가. 단일 클론항체의 대량생산	27
나. 단일 클론항체의 분리정제	28
3. IL-2 수용체에 대한 항체의 측정	28
가. Conjugate 의 제조	28
나. 8F9-141 FITC 의 최적농도조사	29
다. Flow cytometer 를 이용한 항체의 측정	29
4. IL-2 수용체의 특성 및 분리정제	30
가. IL-2 수용체양의 측정	30
나. IL-2 수용체의 expression	30

다. 세포배양액내의 IL-2 수용체양 분석	30
라. Immunoblotting에 의한 IL-2 수용체의 분석	31
마. IL-2 수용체의 분리정제	31
5. IL-2 수용체에 대한 항체의 특성	32
가. PBL의 증식에 미치는 효과	32
나. 항체에 의한 MLR의 증식억제효과	33
다. IL-2와 8F9이 IL-2 수용체의 발현에 미치는 영향	33
제 3 장 결과 및 고찰	34
제 1 절 단일클론 항체의 생산	34
제 2 절 단일클론 항체의 분리정제	35
제 3 절 Flow cytometer를 이용한 항체의 측정	37
제 4 절 8F9-141과 anti-Tac의 비교분석	41
제 5 절 IL-2 수용체의 분리정제	48
제 6 절 8F9-141 단일클론항체의 면역학적 특성	50
제 4 장 결론 및 건의사항	57
참 고 문 헌	60

제 1 장 서 론

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

Interleukine-2는 여러 lymphokine 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 갖고있다. 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-2와의 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 단일 클론항체와 반응하는 수용체는 251개의 아미노산으로 이루어졌으며 33K dalton 의 펩타이드가 당과 결합 55K dalton 의 당단백질로 저친

화력을 갖고 있다.⁵⁾ 그런데 anti-Tac 는 55K dalton 단백질 (p 55) 과만 반응하고 β -chain 으로 불리는 다른 IL-2 수용체인 75K dalton 단백질 (p75) 과는 반응하지 않는다.⁶⁾ T세포의 세포막에서 p 55와 p75 는 서로 독립적으로 존재하며 IL-2 와 반응하여 저친화력과 증친화력을 나타내는 데 두 chain이 비공유결합하여 고친화력을 나타낸다.^{7,8)} 최근 세번째의 chain으로서 IL-2 와 반응하는 단백질 이 발견되었는데 분자량이 90K~100K dalton 으로서 p75 처럼 anti-Tac 과는 반응하지 않는다.⁹⁾

IL-2 수용체는 T세포를 비롯해서 다른 여러 종류의 세포들에서도 존재한다. p 55는 휴지상태의 T세포, B세포 단핵세포등에서는 매우 적은 수가 존재하나³³⁾ 이들 세포들을 lectin 이나 항원 또는 mitogen 등으로 자극시켰을 경우, 보다 많은 수의 p55가 세포막에 발현된다.³²⁾ 그리고 종양세포, HTLV-I 유전자를 갖고 있는 세포들도 많은 수의 p 55가 세포막에 발현되며¹⁰⁾ 활성화된 말초혈액내 단핵세포와 HTLV-1에 감염된 leukemia 세포들의 p 55는 수용성 형태로도 분비된다. p 75도 역시 p 55와 마찬가지로 mitogen 등으로 활성화된 T세포, B세포, 단핵세포 등에서도 발현되며,³⁴⁾ phytohemagglutinin(PHA) 나 phorbol myristate acetate(PMA)으로 처리된 T세포, HTLV-I에 감염된 T세포에서 많이 존재한다.¹¹⁾ 휴지기의 B세포를 cowan-I로 처리하거나¹²⁾ 단핵세포를 LPS 나 LPS 와 α -interferon 을¹³⁾ 함께 처리했을 때에도 p 75는 발현되며 대과립 림프구(LGL)는 p 75가 발현되나 p 55는 발현하지 않는다.¹⁴⁾ p 55와 p75는 세포의 세포막에 독립

적 또는 결합체로서 존재하지만 IL-2의 신호전달에는 차이가 나고 있다. p 55의 경우 세포질내로 불과 13개의 아미노산이 뻗어 있는데 이것은 IL-2에 의한 신호전달에 충분하지 못하므로 결과적으로 세포의 증식작용을 유도하지 못한다.¹⁵⁾ 반대로 p 75는 p55의 존재없이 충분한 IL-2의 존재하에 독자적인 신호전달을 이룰 수 있다. 그러나 p 55와 p 75의 결합체는 고친화수용체를 형성함으로써 저 농도의 IL-2와 반응해서도 충분한 신호전달을 이룰 수 있다.

IL-2 수용체를 가진 세포들은 정상인의 체내에서는 거의 발견할 수 없지만 면역결핍증 림프종양, 자가면역질환과 장기이식 거부 반응을 일으킨 환자에서는 높은 빈도로 T세포, B세포 등의 세포막에서 발현된다. 면역결핍증 환자는 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 p 55가 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 T세포보다 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-2보다는 IL-2수용체를 이용하는 방법이 보다 더 주목되고 있다.

본 연구에서는 이미 IL-2수용체의 발현을 증가시키는 최적 배양조건을 확립하였으며 IL-2와 IL-2수용체에 대한 단일클론항체를 개발하여 그 각각의 특성을 조사하였다. 단일클론항체를 이용하여 IL-2수용체를 부분 정제하여 그 특성들을 연구하고 있으며 앞으로의 연구성과에 따라 면역체계내에서의 역할과 세포표면 단백질에 대한 화학적 및 면역학적 특성들을 밝혀낼 수 있을 것이며 또한 단일클론항체를 임상에 응용할 경우 면역학적 치료법의 임상적 응용에도 많은 기여를 하게 될 것으로 생각된다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 사용기기

본 연구에 사용된 쥐는 Balb/c로써 유전공학연구소 특수사업부에서 분양받은 것을 사용하였으며 하이브리도마 세포주를 개발하기 위해 사용한 cell line 은 P3 × 63 Ag 8.653 을 사용하였다. 정제된 human rIL- 2 는 Boehringer Mannheim 제품을 구입하였으며, IL- 2 수용체를 갖고 있는 Hut102cll cell line 은 California Institute of Technology(U.S.A) 의 Dr G.Y. Kim 으로 부터 분양받았다. IL-2 수용체에 대한 단일클론항체 (Anti-Tac) 와 Anti-Tac FITC conjugate 는 Dako 와 Becton/ Dickinson 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 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

(ConA), 등은 Sigma 제품 (U.S.A) 을 사용하였다. [³H] Thymidine 은 Amersham (England) 에서 구입하였으며 Protein-A Sepharose CL6B와 CNBr-activated 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 titertek 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/ Dickinson 사의 FACScan 을 사용하였다.

제 2 절 실험 방법

1. IL - 2 수용체에 대한 단일클론항체의 개발

가. Mouse 의 면역화

Hut102c11 세포배양액내에 rIL-2 (50 μ /ml) 를 넣어 IL-

-2 수용체의 발현을 증가시킨 Hut102 cll 세포 (5×10^5 cells) 를 생후 6~8 주된 Balb/c 의 복강내에 1주간격으로 3회 주사하였다. 세포융합을 하기 3일전 다시 Hut 102 cll 세포를 booster 로 복강내에 주사하였다. 항혈청내의 항체는 쥐의 안하정맥에서 채혈하여 flow cytometer 로 측정하였다.

나. Myeloma 세포 배양

세포 (P3 \times 63 Ag 8.653) 배양에 필요한 배지는 glucose 함량 (13.38 g/l)이 고농도로 포함되어 있는 DMEM media 에 0.1% Fetal bovine Serum(FBS) 과 Gentamicin(50 mg/l) 이 첨가된 것을 사용하였으며 37°C에서 5%의 CO₂ 가 유지되는 항온기 내에서 세포수가 1×10^6 /ml 이 넘지 않도록 계대배양 하였다. 5×10^5 /ml 정도로 자란 세포는 원심분리 (400 \times g) 하여 세포를 모아 10% DMSO 와 50% FBS 가 첨가된 cryomedia 에 현탁시켜 사용하기 전까지 액체 질소에 냉동보관하였다.

다. 세포융합

최종 booster 후 3일 후에 항체의 생성여부를 flow cytometer 로 확인한 후 Balb/c mouse 를 ether 로 마취시킨 후 비장을 적출하였다. 이 비장을 tissue grinder 로 갈아서 비장세포를 얻어 HBSS 로 현탁액을 만들고 이때 얻어진 비장세포를 15 ml 의 원심분리관에 넣어 원심분리 시켰으며, 이 방법을 2회 반복하여 비장세포를 충분히 세척하였다. 한편, myeloma 세

포인 P3 × 63 Ag 8.653 도 같은 방법으로 세척한 후 incomplete media 를 넣어주어 10 : 1의 비율로 섞어 원심분리하여 상층액을 완전히 제거한 다음 50% Polyethyleneglycol(PEG) 1 ml 을 한방울씩 넣어 1분간 흔들며 반응시키고 HAT media 를 넣어주어 96 -well plate 에서 약 10 ~ 15 일간 배양한 후 hybridoma clone 형성이 확인되면 HT media 로 바꾸어 증식을 촉진시켰다.

라. Hybridoma 의 선별

HAT 배지에서 형성된 clone 의 배양상층액을 100 μ l 씩 채취하여 indirect ELISA 방법에 의하여 항체의 역가를 측정하였으며 96 -well plate 에 신선한 HT 배지를 공급해 주었다.

측정은 96-well plate 에 goat anti-mouse IgG 를 1 μ g /well 의 농도로 실온에서 2 시간동안 반응시킨후 PBST 로 3 번 세척하고 배양상층액 100 μ l 를 각 well 에 가하여 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. goat-anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate 를 PBS 에 1 : 1000 으로 희석하여 100 μ l 씩을 가하였다. 실온에서 1 시간동안 반응시켜 PBST 로 세척한 후, 10% diethanolamine 용액에 P-Nitrophenyl phosphate 를 넣은 AP 기질 용액 200 μ l /well 을 가하여 30 분후에 측정하였다. 강한 양성으로 측정된 clone 들을 24 -well plate 로 옮겨서 배양한 후에 상층액 100 μ l 씩을 취하여 항체의 역가를 재 확인하였다.

IL-2 수용체에 대한 항체를 생산하는 hybridoma의 선별은 ELISA 측정법에 의해 항체의 생산이 강한 양성을 나타내는 clone들의 상층액 500 μ l 씩을 채취하여 Hut 102 cell 세포 (2×10^5 cells/tube)에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 PBS(pH 7.4)로 3번 세척한후 anti-Tac FITC conjugate(B/D)를 tube당 20 μ l 씩 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 flow cytometer로 측정하여 IL-2 수용체만을 인식하는 clone을 선별하였다.

마. Hybridoma 세포의 cloning

flow cytometer로 측정한 결과 IL-2 수용체에 강한 양성을 나타내는 hybridoma 세포군을 선택하여 limiting dilution에 의해 단일클론을 얻기위한 cloning을 실시하였다.

Feeder cell인 macrophage들이 분주되어 있는 96-well plate에 hybridoma 세포가 well당 1~2개씩 분주되도록 하였으며 10~15일사이에 96-wellplate에서 clone이 형성된 세포들을 다시 1~2번 cloning을 반복하여 완전한 단일클론이 되도록 하였다.

2. IL-2 수용체에 대한 항체의 분리정제

가. 단일클론항체의 대량생산

flow cytometer로 측정하여 IL-2 수용체에 강한 양성을 나타내는 well의 세포를 선별하여 T-flask에 배양한 후 상

등액을 취하는 in-vitro 법과 FIA Pristane 이 감작된 Balb/c mouse 에 하이브리도마 세포를 주사한후 생성된 복수를 취하는 in-vivo 법을 이용하여 항체를 생산하였다. 복수를 이용하는 경우 복강내 암 유발을 Priming agent 인 FIA 를 0.5 ml 씩 Balb/c 의 복강내에 주사하고 일주일후 1×10^6 개의 하이브리도마 세포를 다시 복강내에 주사하여 생성된 복수를 취하였다. 얻어진 복수는 4 °C 에서 $1,400 \times g$ 으로 30 분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 사용하기 전까지 -20 °C 에 보관하였다.

나. 단일클론항체의 분리정제

Ascitic fluid 에 NaOH 를 넣어 pH 를 8.0 으로 조절하였다. 항체의 분리는 Protein-G Sepharose 4B bead 를 column ($1.5 \times 7 \text{ cm}$) 에 packing 하고 PBS(pH7.4) 용액으로 충분히 평형시킨후 ascitic fluid 를 1시간당 약 5 ml 의 속도로 흘려주어 항체가 protein-G bead 에 결합하도록 하였다. 그후 같은 용액으로 결합하지 않은 단백질을 제거하고 결합된 항체 단백질은 0.1 M glycine-HCl (pH 2.7) 용액으로 항체를 분리하였다. 용출된 항체용액은 4 °C 에서 PBS 로 충분히 투석하여 5 % glycerol 을 첨가하여 -70 °C 에 보관하였다.

3. IL-2 수용체에 대한 항체의 측정

가. Conjugate 의 제조

분리정제된 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 0.1 M Sod-

ium carbonate (pH 8.5) 용액에 투석하여 2 mg/ml 의 항체 용액과 10% FITC 를 실온에서 90 분간 반응시킨후 Sephadex G-25 column (1 × 50 cm) 을 통과시켜 8F9-141 FITC conjugate 를 제조하였다.

나. 8F9-141 FITC 의 최적농도조사

Hut 102 cll 세포를 한 tube 당 2×10^5 cells/ml 로 넣어준후 $400 \times g$ 에서 원심분리하여 상층액을 버리고 제조한 8F9-141 FITC conjugate 를 2-fold 로 1~ 2048 배까지 희석하여 그 각각을 20 μ l 씩 넣어 4 °C 에서 30 분간 반응시켜 IL-2 수용체에 대한 반응성의 차이를 조사하였다.

다. Flow cytometer 를 이용한 항체의 측정

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 측정은 competitive inhibition 측정법을 이용하였다. 먼저 한 tube 당 Hut 102 cll 세포 (2×10^5) 를 넣어 $400 \times g$ 에서 원심분리한후 상층액을 버리고 분리정제한 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 20 μ l 씩 넣어준후 4 °C 에서 30 분간 반응시키고 PBS 로 3 번 세척하였다. 8F9-141 FITC conjugate 용액을 20 μ l 씩 넣어 4 °C 에서 30 분간 반응시켜 flow cytometer 로 측정하였다.

4. IL-2 수용체의 특성 및 분리정제

가. IL-2 수용체의 측정

여러 종류의 leukemia T-cell line 의 세포표면에 있는 IL-2 수용체의 양을 측정하기 위해 anti-Tac FITC conjugate 20 μ l씩을 세포들에 결합시켜 flow cytometer 를 이용하여 IL-2 수용체의 양을 조사하였다.

나. IL-2 수용체의 expression

Hut102 c11 세포의 표면에 있는 IL-2 수용체의 발현을 위한 최적조건을 조사하기 위해 Hut102 c11 세포에 mitogen 과 lymphokine 의 농도변화를 주어 배양하였다. PHA, PMA, ConA sup, Ionomycin 과 IL-2 또는 이들을 혼합으로 처리하여 24시간에서 92시간까지 배양하여 얻은 Hut 102 c11 세포를 anti-Tac FITC conjugate 를 투여하여 IL-2 수용체의 증식에 미치는 효과를 flow cytometer 로 측정하였다.

다. 세포배양액내의 IL-2 수용체 양 분석

Hut 102 c11 세포의 배양상층액내의 IL-2 수용체 양을 측정하기 위해 inhibition assay 를 하였다. Hut102 c11 세포를 배양하여 증식이 현저하게 관찰되었을 때 원심분리하여 얻은 상층액을 농축하여 Hut102 c11 세포에 첨가시켜 반응시킨 후 anti-Tac FITC conjugate 를 반응시켜 flow cytometer 으로 분

석하여 억제되는 것을 관찰하였다.

라. Immunoblotting 에 의한 IL-2 수용체의 분석

Protein G-Sepharose 4B bead 에 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 붙인 후 다시 Hut102 cll 세포의 표면 단백질을 분리한 것을 처리하여 IL-2 수용체를 protein G-Sepharose bead 에 Immunoprecipitation 시킨다. 이것을 SDS-PAGE sample buffer 에 넣고 끓인 후 전기영동을 하여 nitrocellulose membrane 에 protein 을 이동시켜 goat anti-mouse IgG HRP conjugate 와 반응시켜 기질 용액 (4-chloro-1-naphthol) 을 넣어 발색시켜 IL-2 수용체 band 를 확인하였다.

마. IL-2 수용체의 분리정제

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체 (8F9-141) 를 분리 정제하여 CNBr-activated Sepharose 4B 에 coupling 시켜 Immunoaffinity column 을 제작하였다. Hut102 cll 세포에 rIL-2 (500 u/ml) 를 첨가시켜 48 시간 배양하여 IL-2 수용체의 발현을 증가시킨 후 Hut102 cll 세포 (5×10^8 cell/total) 를 모아 PBS (pH7.4) 로 충분히 세척하였다. 10 ml 의 extraction (10 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.15 M NaCl, PMSF 100 μ g/ml, 0.5 % NP-40) 을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C 에서 30 분간 강력히 흔들어 준 후 1400 \times g 에서 30 분간 원심분리하여 침전을 제거하고 extraction 용액으로 미리 평형시킨 affinity column 에 상층액을 3 ml/hr 의 속도로 통과

시킨후 NP-40을 제거한 extraction 용액으로 column 을 세척하여 결합하지 않는 단백질들을 제거하고 3 M Potassium thiocyanate 를 통과시켜 결합되었던 항원을 회수하였다. 이것을 PBS 용액으로 투석하여 사용하기 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

5. IL-2 수용체에 대한 항체의 면역학적 특성

가. PBL 의 증식에 미치는 효과

말초혈액 (peripheral blood) 으로부터 PBL 의 분리는 heparin 이 처리된 정상인의 혈액을 동량의 HBSS 로 희석하고 이를 동량의 Ficoll-Hypaque (비중 : 1.077 g/cm^3 , Sigma) 위에 중층하여 $900 \times g$ 에서 20 분간 원심분리한 후, Ficoll 의 위층인 PBL 층을 얻어 RPMI 1640 배지로 $400 \times g$ 에서 10 분간 3 회 세척하여 PBL 을 분리하였다. 정제된 PBL 을 complete media (RPMI 1640, NaHCO_3 2 g/l , 10 mM HEPES, 2mM glutamine, 2-Mercaptoethanol 5×10^{-5} mM, gentamicin 50 mg/l , 10 % FBS) 로 CO_2 incubator (5%) 의 37°C 에서 rIL-2 (50 ~ 200 u) 와 IL-2 수용체에 대한 항체 (0 ~ 100 μg) 를 농도별로 첨가하여 배양하였으며 48 시간후 PBL 의 증식효과를 현미경으로 관찰하였으며 16 시간동안 [^3H] thymidine 으로 Pulse 한후 세포를 harvest 하고 60°C 에서 건조시킨 것을 scintillation cocktail 을 넣어 β - counter (Beckman) 를 사용하여 cpm 값을 측정하였다.

나. 항체에 의한 MLR 의 증식억제효과

서로 다른 3 종류의 PBL 을 분리하여 한 well(5×10^5 cell /total) 에 2 종류의 PBL 을 2.5×10^5 씩 서로 혼합하여 분주하고 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 농도별로 (0 ~ 50 μ g) 첨가하여 5% CO₂ incubator 에서 72시간 배양하여 [³H]thymidine incorporation 으로 mixed lymphocyte reaction (MLR) 의 반응에 의한 PBL 의 증식을 cpm 값으로 측정하였다.

다. IL-2 와 8F9-141 이 IL-2 수용체의 발현에 미치는 영향

IL-2 수용체에 대한 IL-2 와 8F9-141 의 competition 결합반응을 조사하기 위해 rIL-2 (5000 u/ 0.5 ml) 와 8F9-141 (2 mg / 1ml) 각각에 FITC 를 붙여 conjugate 를 제조하였다. 먼저 Hut 102 cl1 세포에 rIL-2 와 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체인 8F9-141 을 50 μ l 씩 넣어 4°C 에서 30 분간 반응시켜 PBS (pH 7.4) 로 3 번 세척한 후 각각의 conjugate 를 처리하여 Hut 102 cl1 세포에 존재하는 IL-2 수용체에 대한 상호작용을 비교 분석하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 단일클론항체의 생산

IL-2 수용체에 대한 항체를 개발하기 위해 세포표면에 IL-2 수용체를 가지고 있는 Hut 102 c11 세포자체를 항원으로 사용하여 항체를 개발하였다. 일반적으로 세포표면 단백질은 순수 분리정제가 매우 어렵고 그중 IL-2 수용체의 양은 매우 적기때문에 분리정제하여 항원으로 사용하기에는 매우 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 세포자체에 존재하는 IL-2 수용체의 발현을 유도하여 수용체의 양을 조절하는 최적배양조건을 확립한바, IMDM 배지에 human rIL-2 (50 u/ml) 를 첨가하여 48시간 배양한 다음 flow cytometer 로 측정하여 IL-2 수용체의 양이 최대로 증가된 것을 확인한 후에 Hut 102 c11 세포자체를 항원으로 사용하였다. 그후 항체의 생성여부를 확인한 후에 hybridoma 기법을 이용 세포융합을 실시하였다.

세포 융합과정에서 총 276개의 well 중 274개의 hybridoma clone 이 형성되어 99.2%의 높은 융합효율을 나타냈으며 이 hybridoma 세포들을 배양하여 항체의 분비여부를 ELISA 방법으로 1차적인 선별을 한 결과 약 11%인 25개의 hybridoma clone 들만이 mouse IgG 에 양성반응을 나타냈으며 그중 강한 양성반응을 나타내는 5종의 hybridoma clone 을 골라내었다.

2 차분석 방법으로 flow cytometer 를 이용하여 competitive inhibition 측정법으로 분석하였는데 이것은 IL-2 수용체를 가지고 있는 Hut 102 c11 세포에 hybridoma 세포배양액을 반응시키고 anti-Tac FITC conjugate(CD25) 를 처리하여 IL-2 수용체에 서로 competition 을 하는지를 관찰하여 IL-2 수용체에 대한 항체를 분비하는 clone 을 선별하였다. 그결과 한개의 clone (8F9) 만이 IL-2 수용체를 인식하였으며 double diffusion 방법으로 8F9 에 대한 subtype 을 측정한 결과 IgG₁ 만을 생산하는 것으로 나타났다. 따라서 IL-2 수용체에 대한 항체를 분비할 가능성이 높은 8F9 clone 을 limiting dilution 방법으로 cloning 을 실시하였으며 competitive inhibition 측정법으로 단일클론항체를 생산하는 3종의 hybridoma cell line(8F9-48, 8F9-96, 8F9-141) 을 개발하였다. 그러나 이 측정법은 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 측정에 있어서 anti-Tac(CD 25) 과 같은 epitope 을 가지고 있어야만 inhibition 이 된다는 문제점이 있으며 항체간에 서로다른 epitope 을 가지고 있다면 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체들 일지라도 서로 competition 을 하지않아 측정이 불가능하기 때문에 현재의 측정법으로는 한계성이 있는 것으로 생각되어지며, 따라서 다른 assay system 의 개발이 시급한 것으로 판단된다.

제 2 절 단일클론항체의 분리정제

IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 특성과 IL-2 수용체의

분리를 위해 항체의 대량생산이 필요하며 이에 따라 8F9-48, 8F9-96, 8F9-141 에 대한 ascitic fluid 를 생산하였다. 일반적으로 ascitic fluid 에서 생산되는 항체의 양은 세포배양에 의해 생산되는 항체의 양보다 훨씬 많으나 ascitic fluid 에 생성된 항체의 양은 총 단백질의 10~20% 정도에 지나지 않는다. 특히 장기보존시 protease 의 작용으로 인하여 항체의 안정도에 영향을 미치므로 효율적인 항체의 분리정제를 위해서는 빠른시간 내에 처리해 주어야하며 보관이나 분리정제에 매우 조심해야 한다.

본 연구에서는 항체가 double diffusion 방법의해 IgG₁ 을 생산한다는 것을 확인하였기 때문에 protein-G column 을 이용하여 항체를 분리정제하였다. 먼저 ascitic fluid 에 NaOH 로 pH 를 8.0으로 조절한 후에 protein-G column(1.5×7 cm) 을 통과시켜 그림 1 과 같은 결과를 얻었다. 첫번째 peak 는 protein-G bead 에 결합하지 않은 단백질을 세척한 것이며 두번째 peak 는 glycine-HCl 용액 (pH2.7)으로 bead 에 결합된 항체 (IgG₁) 를 분리한 것이다. 분리된 peak 를 inhibition 측정법으로 조사한 결과 첫번째 peak 에서는 activity 가 전혀 없었으며 2번째 peak 에서 inhibition 되는 것으로 보아 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체가 분리되었음을 확인할 수 있었으며 분리된 단백질은 0.7 mg/ml 로서 비교적 낮은 수준이었으며 전기영동법으로 단백질 band 를 확인한 결과 순수하게 분리되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 Protein-G Sepharose 4B 를 사용한 것은 이

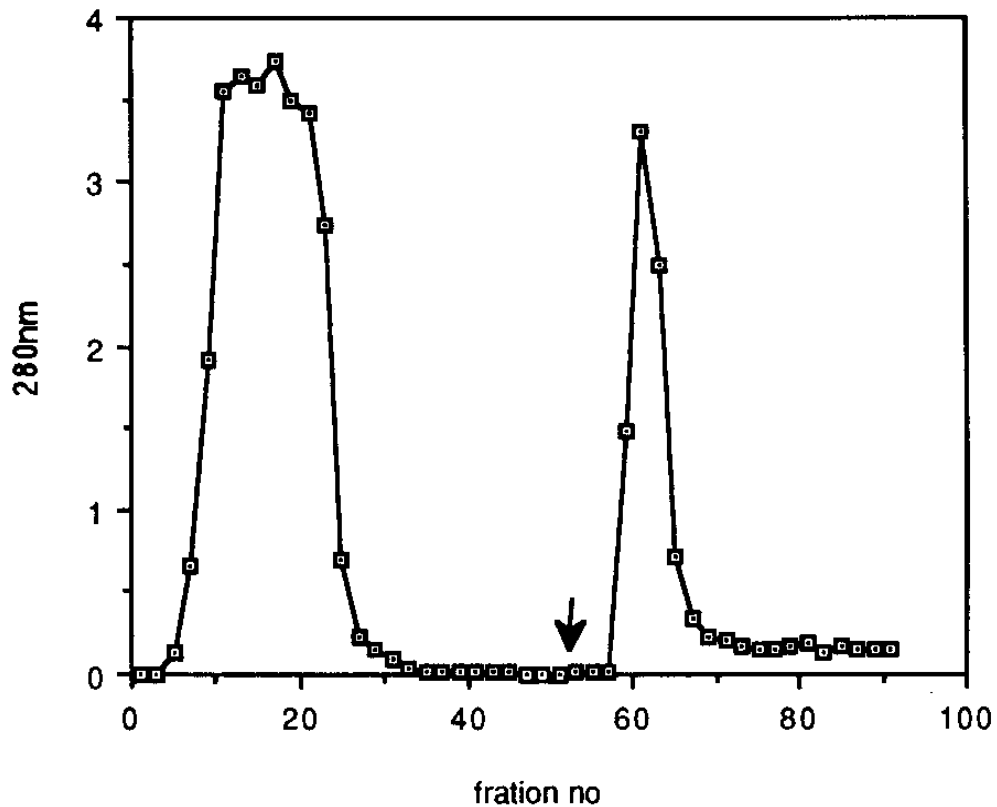


Fig.1. Purification of IL-2 receptor monoclonal antibody by Protein-G Sepharose 4B affinity chromatography. The absorbed protein was eluted 0.1M glycine-HCl, pH 2.7

미 double diffusion 방법에 의해 단일클론항체의 subtype 이 IgG₁ 이라는 것을 알고있기 때문에 Protein-A Sepharose 에 비해 IgG₁의 결합능력이 뛰어난 Protein-G Sepharose bead 를 사용하여 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 분리하였다.

제 3 절 flow cytometer 를 이용한 항체의 측정

IL-2 수용체에 대한 항체를 분리정제하여 IL-2 수용체와 IL-2 수용체만을 인식하는 단일클론항체인지의 여부를 확인하기 위해

Protein-G Sepharose 4B chromatography 에 의해 정제된 단일클론항체인 8F9-141(IgG₁) 를 sodium bicarbonate 용액 (pH 8.5)에 투석시킨후 fluorescein isothiocyanate(FITC)를 붙여 conjugate 를 제조하였다. 이방법은 비교적 폭넓게 사용되고 있는 방법으로 매우 손쉽게 만들수 있으며 sensitivity도 뛰어나 본 연구에 사용하였다.

그림 2는 8F9-141 conjugate 의 농도를 변화시켜 IL-2 수용체에 대한 결합능력을 측정한 것으로 conjugate 의 희석배수에 따른 반응이 잘 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이 방법은 Hut102 cll 세포에 8F9-141 conjugate 를 농도별로 가하여 4℃에서 30분간 반응시킨후 측정한 것으로 그림 2의 결과와 같이 1 : 256 과 1 : 64 의 희석배수가 fluorescence intensity 에 적당한 것으로 관찰되었으며 이것을 이용하여 IL-2 수용체와 항체의 특성들을 조사하였다.

그림 3은 분리 정제한 8F9-141 단일클론항체가 IL-2수용체에 특이적으로 반응하는지를 알기위해 anti-Tac phycoerythrin (PE) conjugate 를 사용하여 flow cytometer 로 fluorescence intersity 를 관찰한 결과로 peak1 은 Hut102 cll 세포만을 측정하였으며 peak 2는 Hut102 cll 세포에 anti-Tac PE conjugate 만을 처리하여 이 실험의 control 로써 사용하였다. peak 3은 Hut 102 cll 세포에 8F9-141 단일클론항체를 처리하여 IL-2 수용체와 반응하여 anti-Tac PE conjugate 와 서로 competition 반응을 하는지를 관찰한 것이고 peak 4는 peak3과

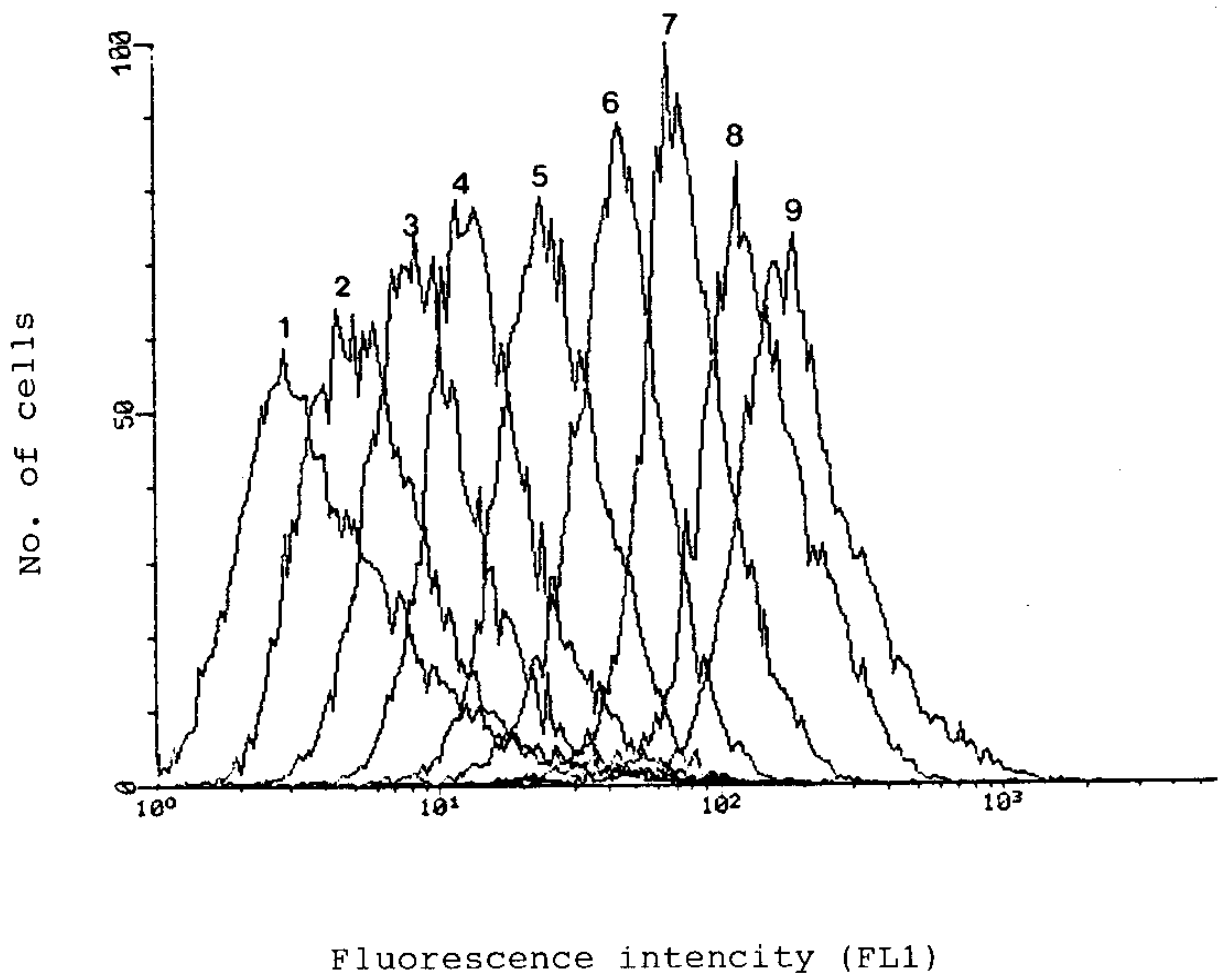


Fig.2. The effects of FITC-Mab 8F9-141 conjugate concentration of the binding affinity to Hut102c11 cell which measured as fluorescence intensity

- | | |
|------------------------|-----------|
| 1: Hut102c11 cell only | 2: 1/2048 |
| 3: 1/1024 | 4: 1/512 |
| 5: 1/256 | 6: 1/256 |
| 7: 1/64 | 8: 1/32 |
| 9: 1/16 | |

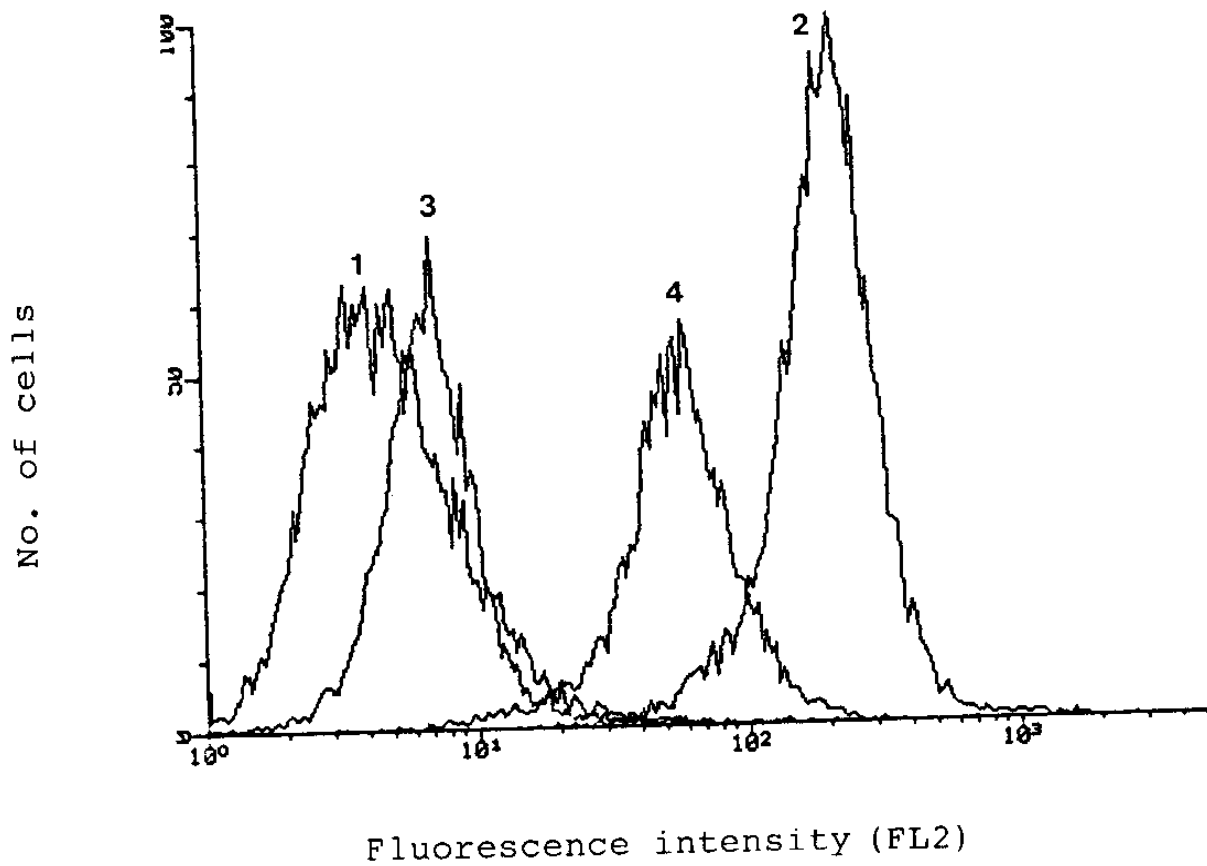


Fig.3. Determination of the amount of IL-2 receptor, which was estimated by the inhibition assay and measured by flow cytometer

- 1: Hut102c11 cell only
- 2: Hut102c11 cell+anti-Tac PE-conjugate
- 3: Hut102c11 cell+8F9-141+anti-Tac PE-conjugate
- 4: Hut102c11 cell+(affinity purified culture sup. of Hut102c11 cell+anti-Tac PE-conjugate)

유사한 반응으로 IL-2 수용체를 conjugate 와 먼저 반응시켜 Hut102 cll 세포에 처리하여 anti-Tac 과 반응하여 Hut102 cll 세포표면에 있는 IL-2 수용체에 competitive inhibition 반응을 하는지를 알기위해 처리한 것으로 그림 3의 결과에서 따라 8F9-141 단일클론항체가 완전히 inhibition 되는 것을 볼수있으며 peak 4는 peak 3과 거의 유사한 반응으로 inhibition 측정 에 있어 IL-2 수용체와 anti-Tac 이 서로 작용하여 IL-2 수용체에 competition 을 한다는 것을 확실하게 보여주는 실험이다. 이들의 결과에 따라서 8F9-141은 anti-Tac 과 거의 같거나 유사한 epitope 을 가지고 있는 것으로 생각되며 거의 확실한 IL-2 수용체의 단일클론항체일 가능성이 매우 크다는 것을 증명할 수 있는 결과이다.

제 4 절 8F9-141 과 anti-Tac 의 비교분석

8F9-141 FITC conjugate 는 현재 우리가 개발한 단일클론항체인 8F9-141 에 FITC 를 붙여서 제작한 conjugate 이고, anti-Tac 에 phycoerythrin 이 처리되어 있는 제품을 구입하여 8F9-141 과 anti-Tac 을 비교 분석하였다. 다량의 IL-2 수용체를 세포표면에 가지고 있는 Hut102 cll 세포와 T세포인 Jurkat 그리고 B세포인 B258 세포에 각각의 conjugate 를 처리하여 그림 4와 같은 결과를 얻었다. IL-2 수용체가 거의 존재하지 않는 Jurkat 과 B258 세포에는 거의 반응을 하지 않는

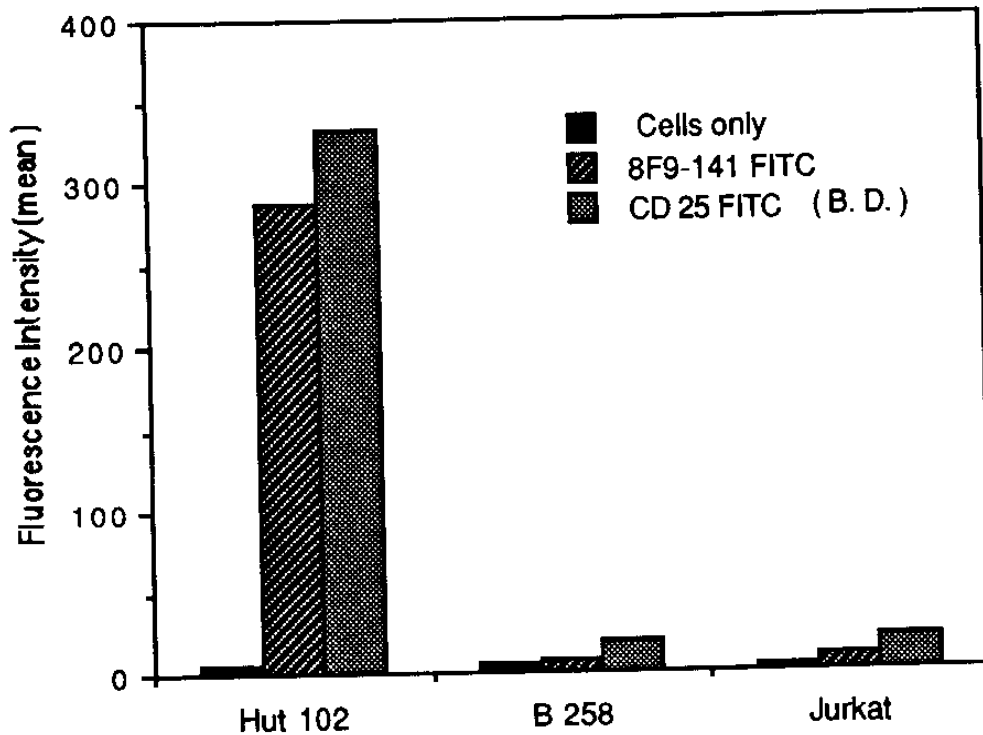


Fig.4. Comparison of reactivity of 8F9-141 with commercial antibody

다는 것을 확인할 수 있으며 Hut102 cell 세포에만 특이적으로 반응하는 것을 알 수 있다. 따라서 이 결과는 8F9-141이 IL-2 수용체만을 인식하는 항체라는 것을 단편적으로 보여주는 것으로서 anti-Tac 과 비교하여 거의 비슷한 반응을 일으키므로, 8F9-141 항체는 anti-Tac 과 같이 IL-2 수용체에 특이적으로 반응하며 anti-Tac 과 같은 epitope 을 가지고 있거나 또는 매우 유사한 epitope 을 갖고 있는 항체라는 것을 확인할 수 있다.

그림 5는 그림 3, 4 와 거의 비슷한 실험으로 8F9-141 conjugate 를 사용하여 competitive inhibition 측정법으로 IL-2 수용체와는 관련이 없는 HCG 에 대한 단일클론항체 (A4B) 가

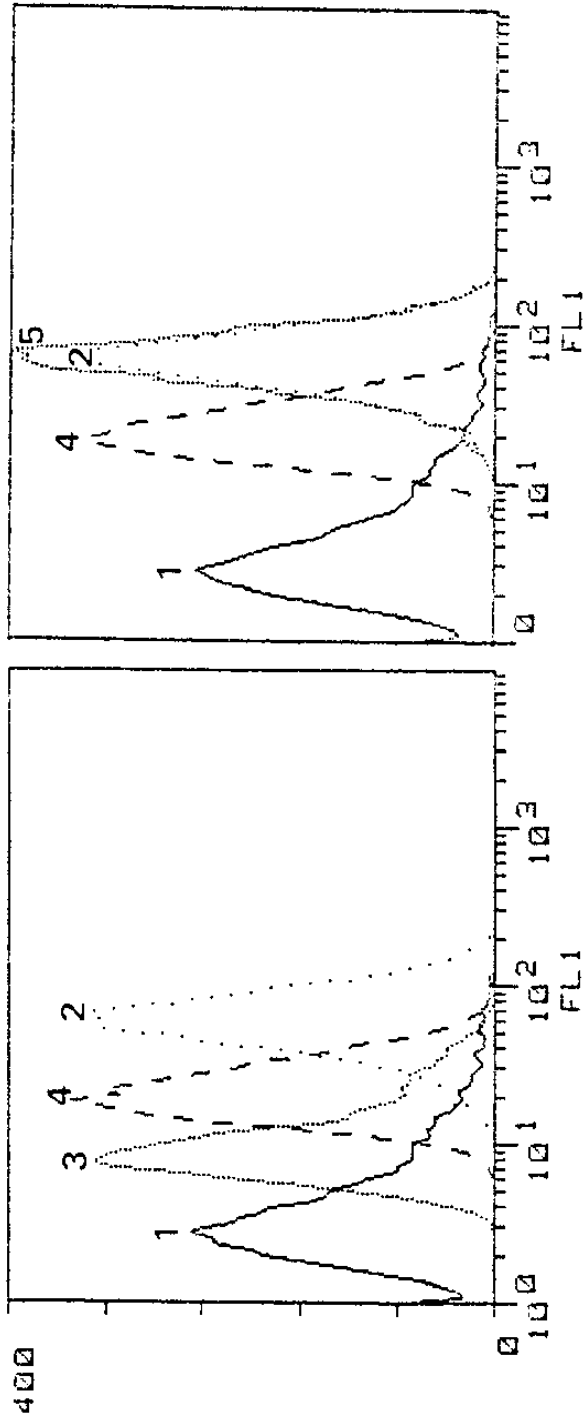


Fig.5. Binding of 8F9-141 is competitively inhibited by other antibodies.

- 1: Hut102c11 cells only
- 2: 8F9-141 FITC
- 3: 8F9-141 FITC+anti-CD25 (DAKO)
- 4: 8F9-141 FITC+8F9-141
- 5: 8F9-141 FITC+anti-HCG

8F9-141에 competitive inhibition 반응을 하는지를 관찰한 실험으로 그림 5에 나타난 peak 3,4는 8F9-141과 anti-Tac이 서로 competition을 하여 inhibition된 것을 확인할 수 있었으며 peak 5에서와 같이 Hut 102 cll 세포에 hybridoma 세포인 A4B로 부터 얻은 HCG에 대한 단일클론항체를 반응시켜 8F9-141 conjugate를 처리한 것으로 8F9-141과는 전혀 inhibition을 하지 않는다는 것을 알 수 있다. 이런 결과로서 8F9-141은 IL-2 수용체만을 인식하며 anti-HCG와는 서로 competition을 하지 않으므로 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체라는 것을 알 수 있다.

그림 6은 Hut102 cll 세포에 8F9-141과 anti-Tac conjugate를 세포에 직접 반응시켜 IL-2 수용체의 결합부위에 각각의 conjugate가 서로 같은 부위에 결합되는지를 관찰한 실험으로 그림 6의 B와 C는 각각의 conjugate Hut102cll 세포에 처리하여 분석한 결과로 모두 IL-2 수용체와 반응하였으며 D의 그림은 동량의 8F9-141 FITC와 anti-Tac PE conjugate를 서로 섞어 Hut 102 cll 세포에 처리한 것으로 8F9-141과 anti-Tac 모두 서로 같은 부위에서 양성으로 나타났다. 이것은 8F9-141과 anti-Tac이 IL-2 수용체에 대한 결합부위가 서로 같다는 것을 의미하고 있다. 그림 7은 위와같은 방법으로 Hut102cll 세포 대신에 human PBL을 사용하였다. 그결과 그림 6과는 다른 양상을 볼수 있었는데 PBL에 대한 conjugate 각각의 결합효과는 매우 좋은 결과로 나타났으나 동량의 conjugate를 서로

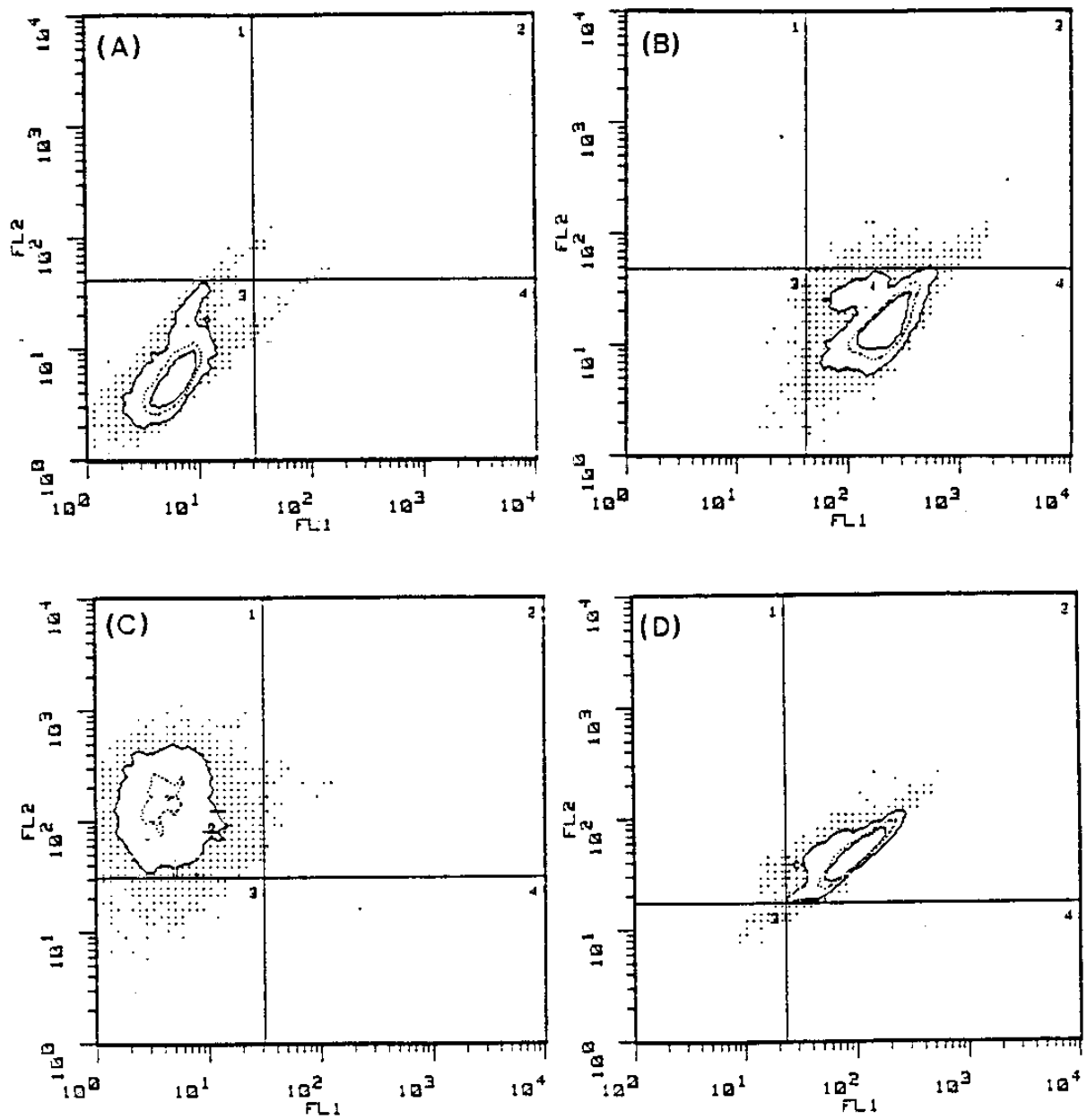


Fig.6. Comparison of binding effect of each conjugate to Hut102c11 cell
 A: Hut102c11 cell only
 B: Mab 8F9-141 FITC conjugate
 C: Mab IL-2R PE conjugate (B/D)
 D: FITC conjugate+PE conjugate

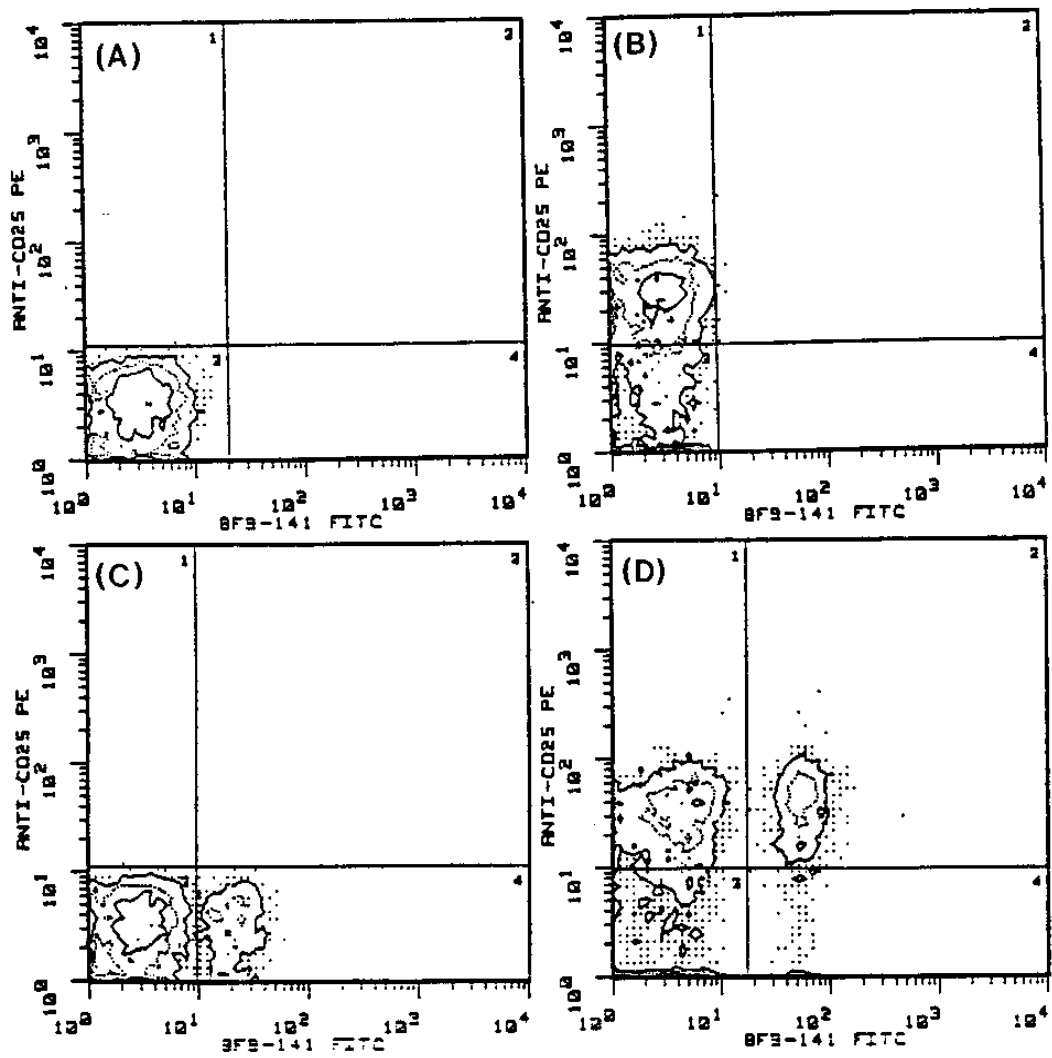


Fig.7. Comparison of binding effect of each conjugate to PBL

- A: PBL only
- B: Mab 8F9-141 FITC conjugate
- C: Mab IL-2R PE conjugate (B/D)
- D: FITC conjugate+PE conjugate

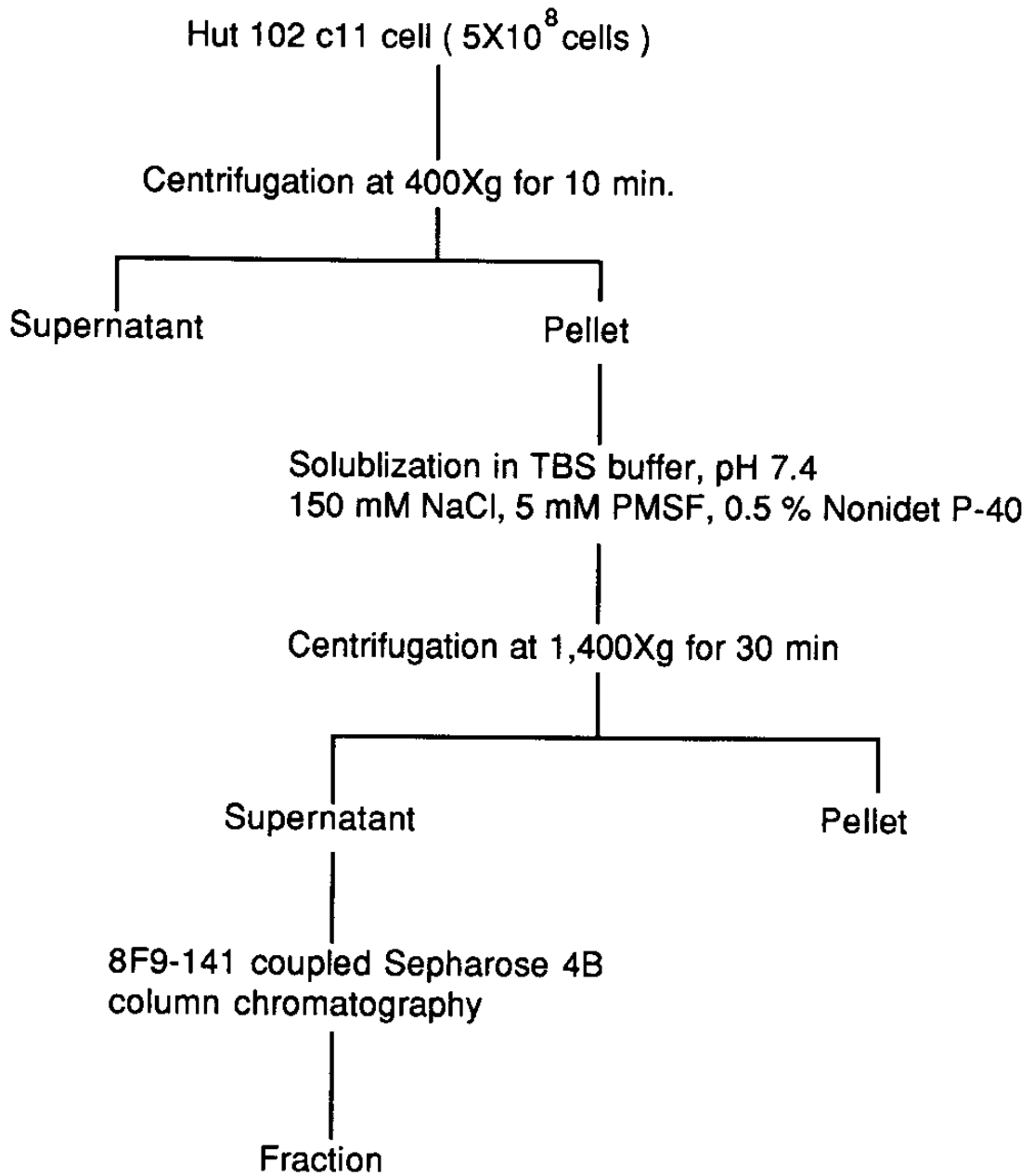


Fig.8. Protocol for partial purification of IL-2 receptor

섞어 반응시켰을 때, 8F9-141에 양성인 개체는 anti-Tac에도 양성 반응을 나타내나 반대로 anti-Tac에 양성인 집단은 8F9-141 반응하는 개체의 일부에만 반응을 보이고 있다. 따라서 이것은 명확한 결론을 내리기가 어려우나 그림 6의 B와 C에서 8F9-141의 농도가 anti-Tac 비해 상대적으로 농도가 낮기 때문에 생긴 결과일 수도 있으며 IL-2 수용체에 반응하는 결합부위가 서로 다르기 때문에 상대적으로 반응이 일어날 수도 있다. 그러나, 그림 6에서 Hut 102 cll 세포에 처리한 결과 같은 부위에서 반응이 일어난 것은 8F9-141이 PBL의 특정 개체에만 작용하는 것으로 생각되어지며 이것은 8F9-141이 T세포인 Hut102 cll 세포에 작용한 것에 따라 T세포에 특이성이 있는 것으로 추측할 수도 있다.

제 5 절 IL-2 수용체의 분리 정제

IL-2 수용체의 분리를 위해 8F9-141을 순수분리 정제하여 전기영동법으로 band를 확인한 후 2 ml의 CNBr-activated Sepharose 4B bead에 5 mg의 8F9-141을 결합시켜 immunoaffinity column을 제작하였다. Sample은 Hut102c11 세포에 rIL-2 (50 u/ml)를 첨가하여 IL-2 수용체의 양을 증가시킨 후에 세포를 모아 0.5% NP-40를 처리하여 세포표면 단백질을 분리하였다. IL-2 수용체의 분리과정은 그림 8의 방법을 사용하여 IL-2 수용체를 부분정제하였다. 일반적으로 세포표면단백질은 순수분리정제가 어렵고 미량이 존재하기 때문에 측정하기가 매우 까다롭다.

본 연구에서는 flow cytometer 를 이용한 inhibition 측정법과 immunoblotting 방법으로 IL-2 수용체를 측정하였다. 그림 9는 immunoblotting 결과로 lane 1은 8F9-141 항체만을 나타낸 것이며 lane 2,3은 8F9-141에 Hut 102 cell 세포의 lysate 를 처리하여 immunoprecipitation 시킨 Sample로서 lane 1과 비교하여 band 의 pattern 이 명확하게 구별됨을 알 수 있다. lane 4,5는 8F9-141 affinity column 에 lysate 를 처리하여 IL-2 수용체를 부분정제한 sample로서 lane 1의 8F9-141 항체만을 처리하여 나타난 heavy chain band 와 비교하여 약간 아래부분에 2개의 band 를 볼수 있는데 분자량 55 KD 부근에 있는 것으로 봐서 IL-2 수용체임을 추측할 수 있다. 또한 lane 4,5에서 맨위에 나타난 2개의 band 는 lane 3,4의 immunoprecipitation 시킨 sample에서 heavy chain의 바

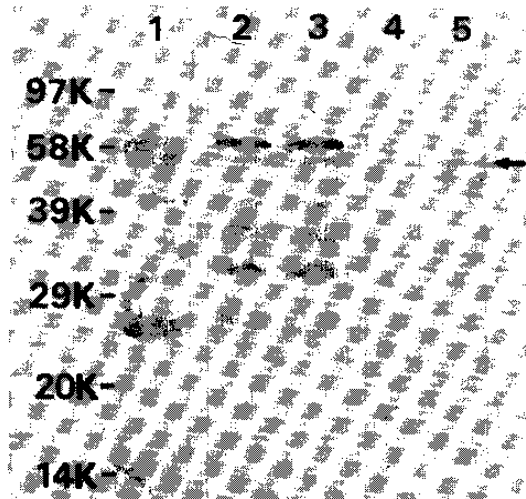


Fig.9. Immunoprecipitation of IL-2 receptor with 8F9-141

Lane 1. 8F9-141 alone

Lane 2 & 3. Precipitate complexed with antibody

Lane 4 & 5. Precipitate

로아래에 나타난 1개의 band가 lane 4,5의 위에있는 band와 일치하는 것으로봐서 IL-2 수용체라고 생각되며 바로 아래에 있는 band는 cytoplasm내에 immature 상태인 IL-2 수용체일 가능성도 배제할 수 없으며 IL-2 수용체의 분리과정에서 생긴 degradation form이라고 생각되어지나 확실한 결과는 알 수 없으며 앞으로 계속적인 실험을 통하여 IL-2 수용체를 순수하게 분리정제할 수 있을 것으로 생각된다.

제 6 절 8F9-141 단일클론항체의 특성연구

본 연구에서 개발된 8F9-141 단일클론항체의 면역반응을 알기 위한 실험으로 PBL의 증식을 유도하는 IL-2와 8F9-141을 농도별로 첨가한 후 [³H] thymidine incorporation으로 세포증식에 미치는 효과를 관찰하여 그림 10과 같은 결과를 얻었다. 일반적으로 IL-2를 세포에 처리하여 T세포의 활성화를 유도하고 IL-2 수용체가 세포표면에 급속히 증가되며 IL-2가 수용체에 작용하여 세포분열을 일으켜 증식을 유도하게 된다. 그결과 IL-2 첨가하지 않고 8F9-141만을 처리하였을때는 전혀 세포에 영향을 주지 않았으며 IL-2만을 처리하였을때 PBL의 현저한 증식효과를 볼수 있었는데 IL-2의 농도를 200 u/ml로 첨가한 것이 50u/ml로 첨가하여준 것보다 증식이 낮은 이유는 IL-2가 이미 활성화되어 반응의 범위를 넘어선 것으로 생각된다. 또한 IL-2와 8F9-141을 같이 처리했을때 IL-2에 의해 유도되는 세포의 증

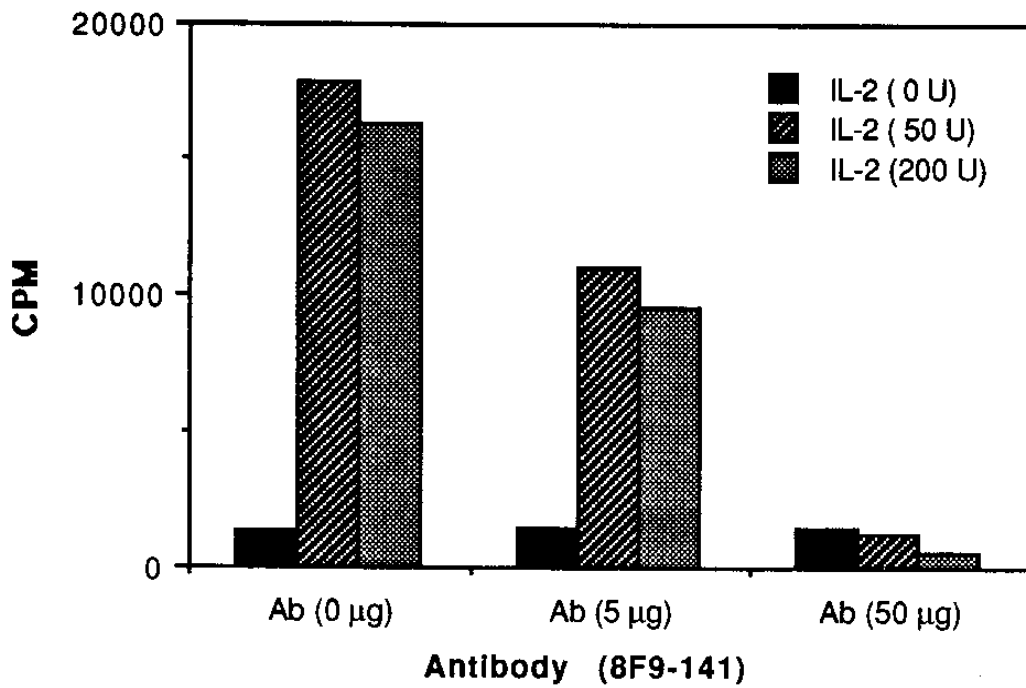


Fig.10. The antibody suppresses IL-2-induced proliferation of PBL

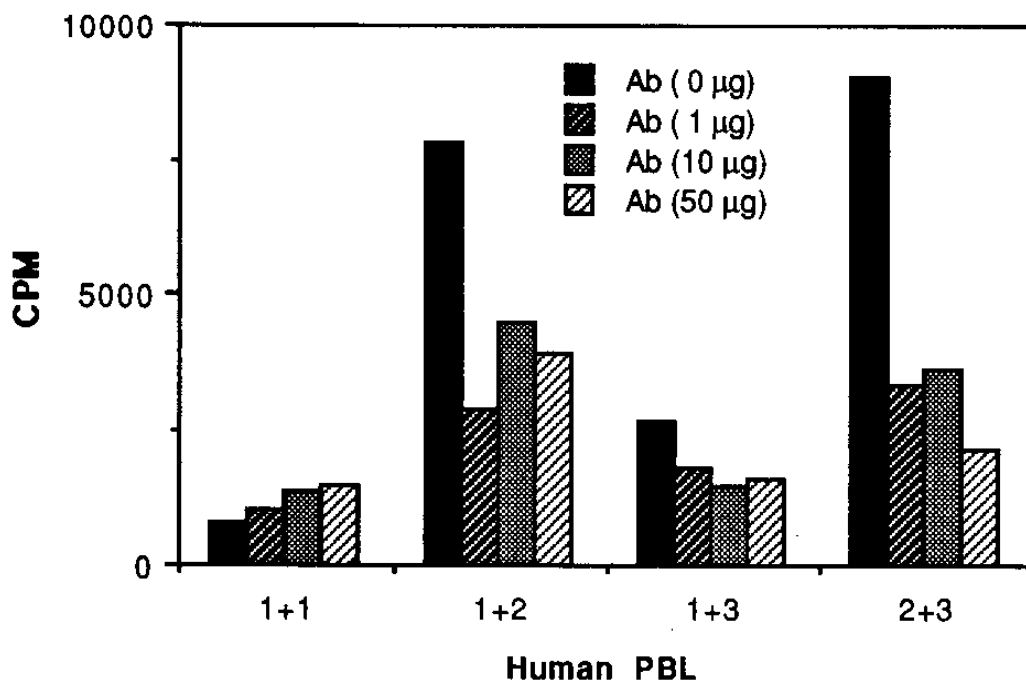


Fig.11. The antibody suppresses Mixed Lymphocyte Reaction

식을 매우 효과적으로 억제시키는 것을 알 수 있는데 이것은 8F9-141이 IL-2 수용체에 결합하여 IL-2의 활성을 억제하는 것으로 생각된다.

그림 11은 8F9-141을 처리하여 면역세포인 lymphocyte의 면역반응이 억제되는지를 관찰한 결과이다. T세포는 자신의 표면에 있는 수용체에 의해 항원을 인식하게 되는데 수용체가 항원을 인식함에 있어서 독자적으로 인식하지 못하고 반드시 자신이 유전적으로 보유하고 있는 major histocompatibility complex (MHC) 분자와 함께 인식하게 되어있다. 이 경우 서로다른 MHC background를 가지고 있는 면역세포(lymphocyte)들을 섞어주면 서로 이물질(non-self)로 인식하여 면역반응을 일으켜 세포증식이 일어나게 되는데 이것을 mixed lymphocyte reaction (MLR)이라한다. 이와같은 결과에 따라 같은 lymphocyte끼리의 반응(1+1)은 변화가 없었으며 서로다른 MHC 분자를 갖고있는 lymphocyte들은 면역반응을 일으켜 세포증식을 하였으나 8F9-141 단일클론항체를 농도별로 처리하였을 때는 면역반응이 억제되는 것을 알 수 있다. 그러나 확실히 억제는 되지만 농도에 비례하지 않는 것으로봐서 MLR(1+1)과 비교하여 이 8F9-141 단일클론항체가 수용체에 작용하여 면역반응을 억제시키는 기능을 가지고 있지만 다른 한편으로 확실한 원인은 알 수 없으나 정지상태인 T세포나 이미 활성화된 T세포에 stimulator로 작용하여 세포를 증식시키는 효과도 갖고있는 것으로 생각되며 앞으로 계속적인 실험을 통하여 보다 명확한 원인을 밝혀내고자 한다.

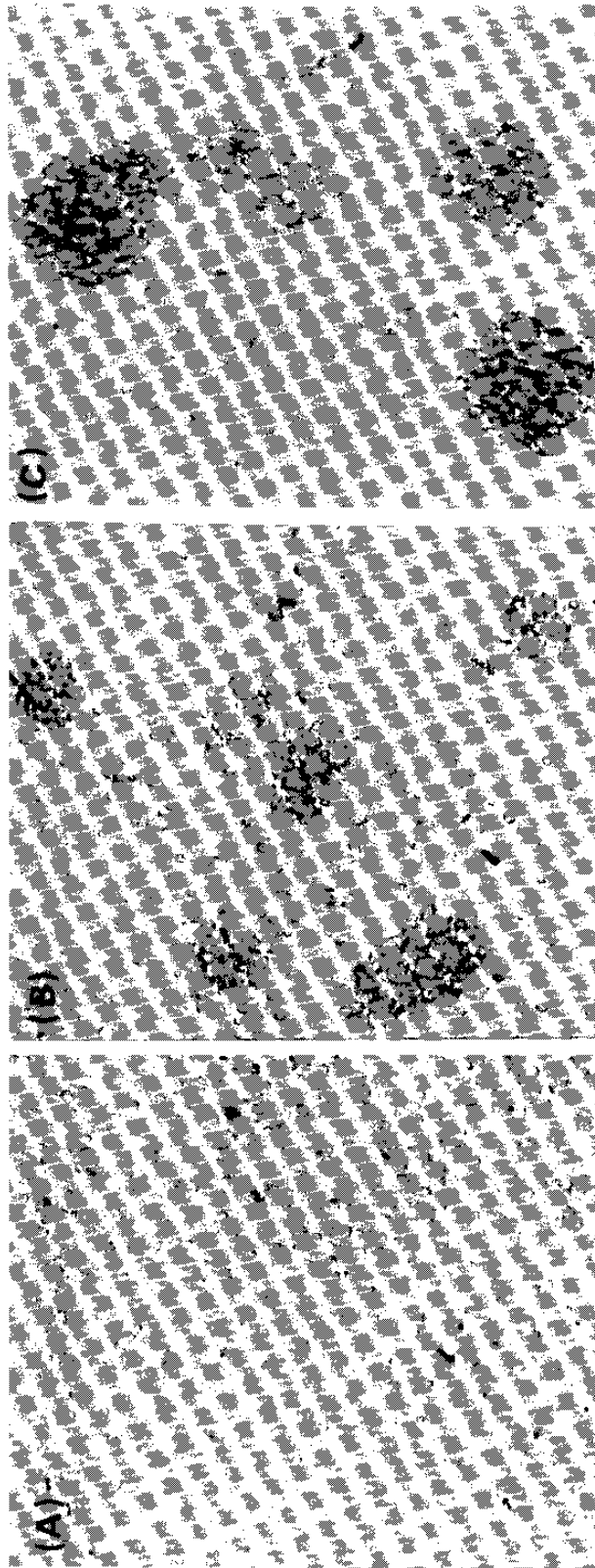


Fig.12. Proliferation of PBL induced by IL-2

(a) No IL-2

(B) IL-2 (50 unit/ml)

(C) IL-2 (50 unit/ml)+8F9-141

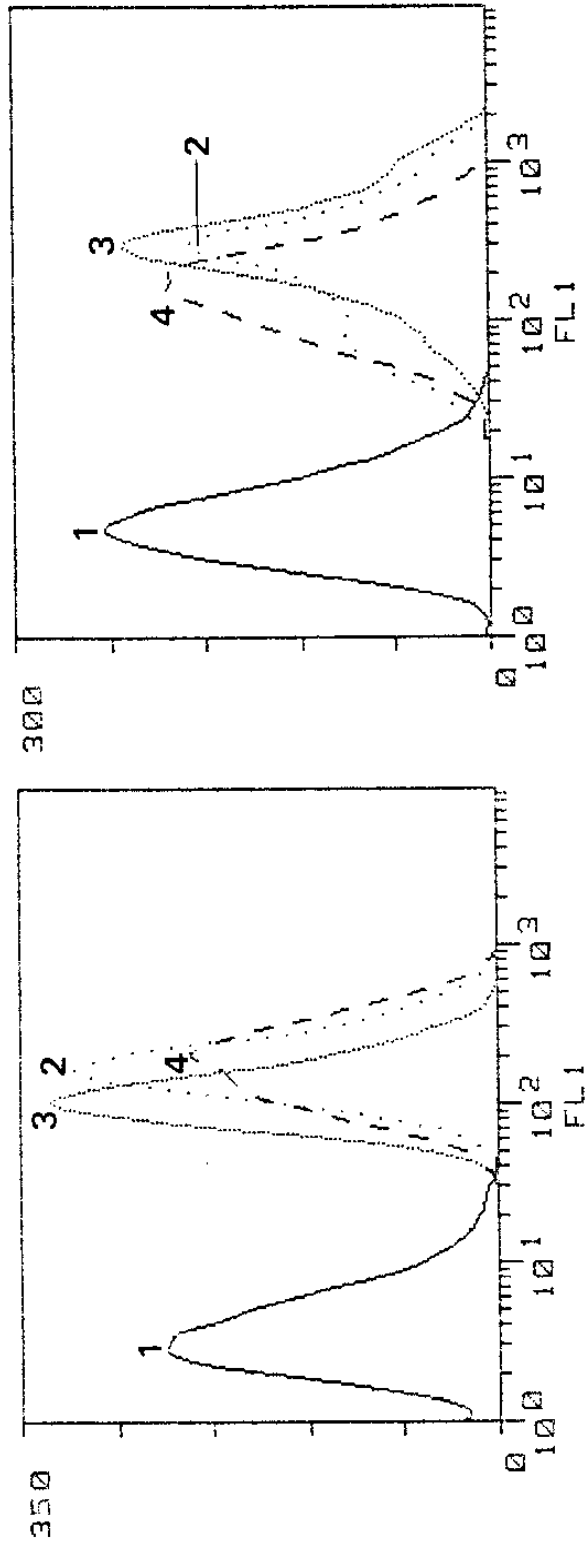


Fig.13. Competitive binding of IL-2 and 8F9-141 to IL-2 receptors on hut102c11

(A) Stained with IL-2 FITC

1. No staining
2. Stained in the presence of medium
3. Stained in the presence of IL-2
4. Stained in the presence of 8F9-141

(B) Stained with 8F9-141 FITC

1. No staining
2. Stained in the presence of medium
3. Stained in the presence of IL-2
4. Stained in the presence of 8F9-141

그림 12에서 PBL의 증식을 관찰한 결과 IL-2를 처리하여 48시간후 PBL의 증식이 최대로 관찰되었을때 8F9-141를 넣어 24시간 후에 현미경으로 관찰하였는데 IL-2만을 처리한 것보다 더 응집된 것으로 나타났다. 그러나 이것은 그림 10의 결과 [³H] thymidine을 처리하여 cpm값으로 세포의 증식을 측정한 결과, 억제시키는 것으로 나타났었다. 이 두결과를 비교하여 보면 현미경상으로 PBL이 응집되어 증식이 일어난 것처럼 보이나 [³H] thymidine의 uptake와는 연관이 없으며 현미경의 관찰만으로는 명확히 구별하기가 어렵다. 또한 원인은 알수 없으나 8F9-141 단일클론항체가 stimulator로도 작용하였다고 생각할 수 있다.

그림 13은 Hut102 cll 세포에 IL-2와 8F9-141을 처리하여 IL-2수용체에 결합하여 서로 competition을 하는지를 각각의 conjugate를 처리하여 flow cytometer로 측정한 결과 서로 inhibition을 하지않았으며 그림 14의 결과도 그림 13과 마찬가지로 PBL과 Hut102 cll 세포에 8F9-141을 농도별로 처리하여 IL-2 FITC conjugate를 반응시켜 IL-2와 8F9-141이 IL-2수용체에 대해 서로 competition 반응을 하는지를 측정한 결과 서로 inhibition하지 않았다. 이것은 IL-2수용체에 대한 결합부위가 서로 다르기 때문에 competition 반응을 하지 않는 것으로 생각되어진다.

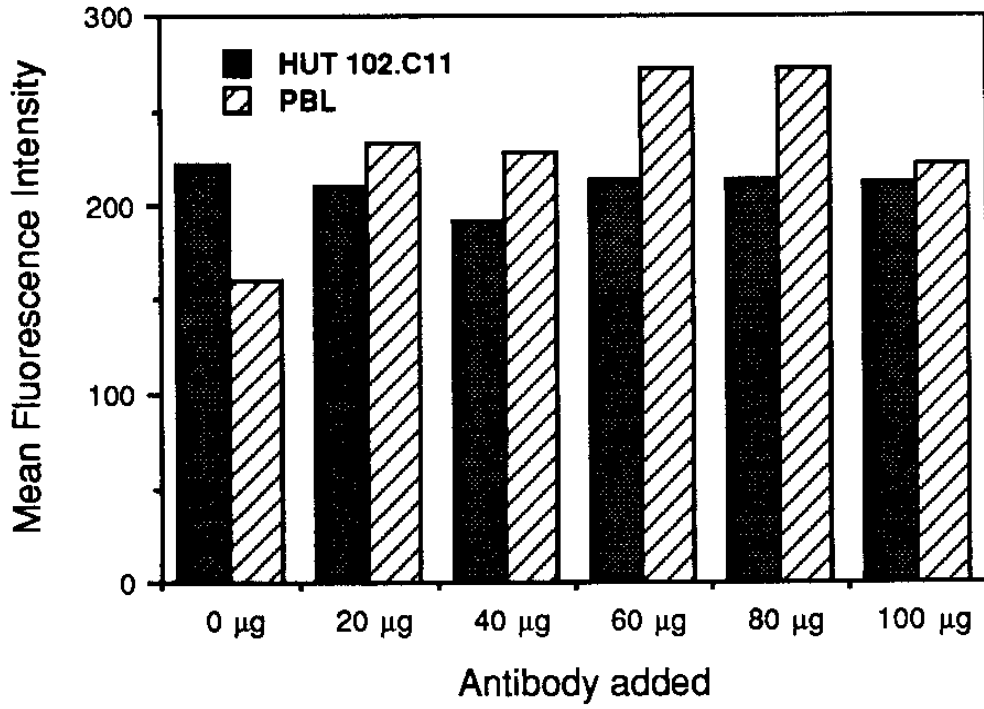


Fig.14. Competition of 8F9-141 with IL-2 FITC for IL-2 receptor

제 4 장 결론 및 건의사항

본 연구는 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체를 개발하여 장기이식 수술시 거부반응을 감소시키는 새로운 면역억제제로서 임상적 적용 및 응용에 이용함을 목적으로 진행하고 있다. 면역반응의 억제를 위해 고려되어야 할 것은 IL-2의 활성을 적절히 조절하는 방법인데 먼저 IL-2에 대한 항체를 사용하여 IL-2의 생체내 활성을 적절히 조절하거나 또는 IL-2수용체에 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-2수용체의 발현을 유도하는 배양조건의 확립과 단일클론항체의 생산 및 분리정제를 연구하기 위한 기초적인 자료를 마련하였다.

제 2차년도 연구결과 IL-2수용체의 발현을 증가시키는 최적 배양조건을 확립하였으며 IL-2수용체에 대한 단일클론항체를 생산하는 3종의 hybridoma cell line(8F9-48, 8F9-96, 8F9-141)들을 개발하여 double diffusion 방법으로 subtype을 측정한 결과 IgG₁을 생산하였다. IL-2수용체에 대한 항체의 대량생산을 위해 3종의 hybridoma cell line을 이용 각각의 ascitic fluid를 생산하였으며 IL-2수용체에 대한 단일클론항체를 순수

분리정제하였다. 본 연구를 통해 개발된 단일클론항체가 IL-2 수용체만을 인식하는지의 여부를 flow cytometer를 이용한 competitive inhibition 측정법으로 측정한 결과 IL-2 수용체의 활성을 억제시키는 것을 확인하였다.

IL-2 수용체의 분리는 8F9-141 항체를 CNBr-activated Sepharose 4B bead에 붙여 8F9-141 affinity column을 제작하여 세포표면에 존재하는 IL-2 수용체를 부분적으로 분리하였으며 immunoprecipitation시켜 immunoblotting 방법으로 IL-2 수용체 band를 확인하였다. IL-2 수용체는 측정방법이 부족하며 세포표면에 극소량으로 존재하기 때문에 측정하기가 매우 어려운 실정이다.

본 연구를 통한 IL-2와 IL-2 수용체에 대한 단일클론항체의 생산기술은 다른 세포표면 단백질에 대한 항체의 생산에 있어 기초적 자료로서 기술축적과 응용에 의한 파급효과가 클 것으로 생각된다. 일반적으로 순수분리정제가 어려운 세포표면 단백질은 부분정제한 단백질 혼합물이나 세포자체를 직접 항원으로 사용하는 것이 세계적인 추세이나, 현재 수행중인 연구에서는 먼저 DNA 서열로부터 얻은 IL-2 수용체의 β -chain에 대한 아미노산 서열을 기초로하여 폴리펩타이드를 합성하고 이 폴리펩타이드를 항원으로 이용하는 방법을 진행중에 있다. 다만, SLE 환자의 B임파구를 이용한 mouse-human heterohybridoma의 개발은 일반적인 제작기술자체의 어려움이 예상된다. Heterohybridoma의 개발은 부분적으로는 가능하나 항체를 지속적으로 생산케 하는데는

어려움이 있기 때문이며 이것은 현재 세계적인 기술 수준으로도 완전한 해결방안이 없는 것으로 1, 2차년도 연구결과를 토대로 앞으로 계속 연구를 진행하여 극복해야 할 과제이다.

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 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) 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
- (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. Sztein, 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

주 의

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