

Hybridoma와 細胞融合 技術

김 원 배

(동아제약(주) 책임 연구원)

I. 서 론

1975년 Köhler와 Milstein의 hybridoma technique의 발견은 biotechnology를 급속하게 발전시키는 계기의 하나가 되어 현재 이의 실용화가 활발히 추진되고 있다.

Hybridoma technique은 specific antibody를 생산하는 plasma cell과 영원히 분열증식할 수 있는 myeloma의 유전자를 공유하는 잡종세포를 만들어냄으로써 단일 항원결정기에 대한 specific antibody를 대량으로 만들 수 있는 길을 열었다.

현재 세포융합기술을 이용하여 수많은 hybridoma cell이 수립되었고 여기서 얻은 monoclonal antibody (McAb)는 immunoassay를 이용한 질병의 진단, 미량 생리활성물질의 정제, drug targeting 및 receptor의 화학구조규명, cancer의 치료등에 유력한 수단으로 그 응용범위를 넓혀가고 있다.

본 글에서는 McAb를 만들기 위한 hybridoma technique의 기술적 배경 전반을 고찰하고 아울러 McAb의 약학적 이용의 실례에 대하여 기술하고자 한다.

II. Hybridoma 이론 및 practical technique

(1) Hybridoma의 제조

1. Myeloma cell lines

대부분의 hybridoma technique은 주로 mouse system 내에서 이루어지고 있으며, human hybridoma technique의 경우에는 적당한 myeloma cell line의 개발이 초기단계이며 이제 시작단계라고 할 수 있다.

Hybridoma의 지속적인 분열성장은 myeloma

cell의 성질에서 유래되며, myeloma cell 중 hybridoma technique에 이용하려면 크게 두 가지의 성질을 가져야 우수한 cell line이라 할 수 있다.

첫째로 선택적 marker를 가져야 한다. 즉, 세포융합후 hybrid cell만을 선택적으로 선별하기 위해서는 융합되지 않은 myeloma는 선택적으로 사멸시키는 것이 간편하고도 유리하다. Marker로는 약제내성세포주가 사용되고 있으며 대표적인 것이 8-azaguanine 내성 (HPRT⁻) 및 2,6-diaminopurine 내성 (ARRT⁻) 세포주이다^(1,2).

둘째로 immunoglobulin을 생산하지 않아야 한다. 만약 myeloma 자체에서 immunoglobulin을 생산한다면 hybridoma cell에서 원하는 specific antibody 이외에 hybrid immunoglobulin이나 myeloma 자체의 immunoglobulin을 생산하게 되므로 Ab정제시 specific Ab를 정제해야 되는 번거로움이 따르기 때문이다. 주로 많이 쓰이는 myeloma cell line은 Table 1에 나타내었다.

2. Spleen cell

lymphoid cell은 spleen, lymph node, 골수 등에 분포되어 있으며, lymphoid cell 중 Ab를 생산할 수 있는 능력을 가진 것은 B lymphocyte이다. Ag에 의하여 자극을 받은 B lymphocyte는 blastoid cell 상태로 된 후 분열을 시작하게 되며 이때 각각의 세포는 한 종류의 specific Ab를 생산하기 시작한다.

수 차례의 분열후 B lymphocyte는 memory cell과 plasma cell로 변하게 된다. 세포융합에 가장 적절한 세포는 blast형의 plasma cell이며, 세포를 준비하는 과정에서 이들 세포의 viability를 높여야 높은 빈도의 융합을 유도할

Table 1. Mouse and Rat myeloma lines used for cell fusion.

Name	Parental tumor	Derived from	Phenotype	
			Ig	Drug resistance
Mouse lines				
4TO. 2	MPC-11	45. 6TG1. 7	IgG2b(K)	6-Thioguanine 1.0-mM ouabain
P3-X63/Ag8	MOPC 21	P3K	IgG1(K)	8-Azaguanine
NS1/1.Ag4.1	MOPC 21	P3-X63/Ag8	(K) Non-secreted	8-Azaguanine
FOX-NY	MOPC 21	NS-1	None	8-Azaguanine 2.6-Diaminopurine
SP2/0	MOPC 21	P3-X63/Ag8	None	8-azaguanine
X63-Ag8.653	MOPC 21	P3-X63/Ag8	None	8-Azaguanine
Rat lines				
Y3-Ag1.2.3	SR 210	210.RCy3.Ag1	(K)	8-Azaguanine
IR938F	SR 210	Y3.Ag1.2.3	None	8-Azaguanine

수 있다. Plasma cell로는 lymph node, 골수 등을 사용할 수도 있지만 spleen에는 많은 B cell이 존재하며 취급이 용이하여 가장 많이 이용되고 있다.

Hybridoma cell이 Ab를 생산하는 능력은 plasma cell에 의존하므로 면역조작후 항체가 최고치에 달하였을 때 spleen cell을 수집하는 것이 좋다. 따라서 융합실시 3~4일 전에 정맥내로 항원을 주사하여 spleen내의 lymphocytes를 자극시키는 방법이 많이 이용된다⁽³⁾. 면역조작시에는 항원의 양, 주사시기등이 결정되어야 하는데 사용되는 항원의 양은 항원의 종류 및 실험자에 따라 다르나 너무 많은 양을 투입시에는 immunotolerance가 유발될 수 있으므로 고려하여야 한다. 항체생산을 촉진하기 위하여 Adjuvant가 사용되는데, 처음 면역시에는 Complete Freund's adjuvant를 그 이후에는 Incomplete Freund's adjuvant를 사용하는 것이 효과적이며 정맥주사시에는 adjuvant를 사용하지 않는 것이 원칙이다.

위와 같은 생체내 면역조작이외에 생체외에서도 면역조작을 행할 수 있다. 생체외에서의 면역조작시 primary response는 극소량의 Ag에 의하여 유도될 수 있으며, 이 방법은 원하는

isotype, 적당한 specificity, affinity의 Ab를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다⁽⁴⁾.

이 방법을 간략히 살펴보면, 쥐의 thymus cell의 단세포현탁액을 supplemented DMEM 배지상에서 약 2일 정도 배양후 세포를 제거하여 thymus cell conditioned medium (TCCM)을 만들고, 면역조작을 하지않은 쥐의 spleen을 분리후 단세포현탁액으로 만들어 적당량의 Ag이 들어있는 50% TCCM, 50% supplemented DMEM 배지상에서 2~4일 정도 배양후 fusin에 이용한다. 생체의 면역조작에서 얻을 수 있는 McAb는 거의 IgM type으로 보고되어 있다⁽⁴⁾. 최근에 hybridoma 효율을 높이기 위한 새로운 면역조작방법이 소개되었다⁽⁵⁾.

첫째로 면역된 쥐의 spleen을 단세포 현탁액으로 만든후, 이를 X-ray를 조사한 syngenic mouse의 꼬리정맥에 adoptive transfer를 한 후 즉시 항원을 복강주사하고 4일정도후 spleen을 제거하여 융합에 사용하는 방법과, 둘째로 면역된 쥐의 spleen을 제거한 후 융합전에 Ag이 들어있는 배지에서 2~3일간 배양후에 융합에 사용하거나 polyclonal activator인 lipopolysaccharide가 함유된 배지에서 spleen cell을 3~4일간 배양하여 lymphoblast의 숫자를 증가

시켜서 융합에 사용하는 방법이 있다.

위와같은 조작에 의하여 Ag에 대한 specific Ab를 생산하는 hybridoma의 비율이 10~50 배 증가되는 것으로 보고되고 있다.

3. 세포융합방법

cell fusion은 자연적으로 일어나기도 하지만 10^{-6} ~ 10^{-7} 정도로 효율이 극히 낮기 때문에 fusion효율을 높이기 위하여 여러방법이 시도되었다. 초기에는 fusion을 유도하는 물질로써 sendai virus가 사용되었으나 1974년 Kao등⁽⁶⁾에 의하여 식물세포융합시 polyethylene glycol (PEG)이 사용된후, 1975년 Pontecorvo에 의하여 동물세포융합시에도 PEG가 효과적이라는 것이 밝혀진후 현재 거의 모든 cell fusion에는 PEG가 주로 쓰이고 있다.

PEG의 작용기작은 정확히 밝혀져 있지 않지만 융합효율에 미치는 영향에 대하여서는 많이 연구되어져 있다⁽⁸⁾. 일반적으로 융합효율은 PEG의 분자량, 농도, 처리시간등에 의하여 영향을 받는다고 보고되어 있다.

PEG의 최적 농도는 40~50%이며 이 경우 physical free water는 거의 없는 상태이다. 그러나 PEG농도가 높은 경우에는 삼투압이 높아지므로 이를 낮추기 위하여 PEG용액에 Dimethyl sulphoxide (DMSO)를 첨가해준다⁽⁹⁾.

DMSO가 과량 들어 가는 경우에는 bicellular fusion이외에 다수의 세포간에 융합이 일어나게 되므로 적당한 농도는 bicellular fusion 효율이 높고 multicellular fusion 효율이 낮은 점이다.

보편적으로 40~50% PEG와 5~10%의 DMSO가 사용되고 있다.

본 연구실에서 확립한 fusion 방법은 아래와 같다.

Spleen cell과 myeloma cell을 10 : 1 에서 5 : 1 정도로 섞어 원심분리후 침전물을 얻고 여기에 37°C로 가온된 PEG 40% (PEG 1450, DMSO 10%) 1 ml 을 1 ml/min 의 속도로 가한후 DMEM배지 1 ml을 같은 속도로 가하고 5분간에 걸쳐 15 ml의 DMEM배지를 첨가하며 서서히 흔들어 준다. 그후에 37°C 항온수조에서 5분간 방치한 다음 원심분리하고 상등액을 버린

후 침전물에 conditioned HT배지를 첨가하여 현탁시킨후 96 well에 분주한다.

한편 최근에 새로운 융합방법으로 electric field-induced fusion법이 소개되었다^(10,11). 이 방법의 장점은 효율이 높고 융합과정을 현미경 상에서 추적할 수 있기 때문에 hybrid cell 을 쉽게 동정할 수 있으며 결손 변이주의 사용이 불필요하다는 것이다. 융합조작이 끝나면 20% fetal bovine serum이 함유된 배지로 희석하여 96 well에 분주하는데 이때 96 well은 전날 미리 동종의 쥐의 macrophage를 분리, 분주배양 후 상등액을 제거한 상태에서 사용한다.

4. Hybridoma 선별

세포융합후 배지내에는 여러종류의 세포가 존재하게 된다. 따라서 융합되지 않은 cell, 원하는 hybrid cell과 원하는 hybridoma가 혼재되어 있는데서 원하는 hybridoma만을 선별하여야 한다. 융합되지 않은 spleen cell은 세포분열을 할 수 없으므로 배양상에서 사멸하게 되지만 융합되지 않은 myeloma는 계속 생육하므로 선택 marker를 이용하여 선별하여야 한다.

많이 쓰이는 myeloma는 일반적으로 Ouabain 내성⁽¹²⁾, 8-azaguanine 내성, 6-thioguanine 내성⁽³⁾ 및 2,6-diaminopurine 내성변이주⁽²⁾이며 이 특성을 이용하여 융합되지 않은 myeloma를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 8-azaguanine 과 6-thioguanine에 내성인 cell은 hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT)가 결핍된 세포이므로 이들의 선별에는 HAT(hypoxanthine, aminopterin, thymidine)배지를 사용할 수 있다. 즉, 세포융합후 24시간 정도는 20% FBS가 함유된 DMEM 또는 RPMI배지상에서 배양하고 그후부터는 HAT 성분이 들어있는 배지로 2~3일 간격으로 갈아주면 HAT 성분중 aminopterin은 folic acid reductase의 활성을 저해하는 물질로써 purine의 생합성 경로인 de novo 경로를 억제한다. HPRT를 가진 세포는 salvage 경로를 통해서 배지내의 hypoxanthine을 이용하여 nucleic acid를 생산하여 생존할 수 있으나 HPRT가 없는 myeloma는 hypoxanthine을 이용할 수 없으므로 nucleic acid

를 생산하지 못하게 되어 결국 사멸하게 된다. 따라서 HPRT를 지닌 plasma cell의 성격과 계속 분열증식할 수 있는 myeloma cell의 성격을 동시에 지닌 hybrid cell만이 살아남게 된다.

2. 6-diaminopurine 내성인 변이주의 경우에는 adenine phosphoribosyl transferase (APRT) 결핍주이다⁽²⁾. 이 세포는 azaserine을 함유한 배지에서는 purine을 생성하지 못하고 사멸된다. 따라서 이 경우에는 AAT (adenine, azaserine, thymidine) 배지를 사용하면 hybrid cell 만을 선별할 수 있다. Taggart 등은 NS-1의 자연변이주인 FoX-NY를 분리하였는데 이 세포주는 HPRT⁻, APRT⁻인 double mutant이었다. 이 myeloma를 이용하여 hybridoma 선별시에 APRT에 의한 선별과 HPRT에 의한 선별방법을 비교하였다.

이 결과에 의하면 AAT 배지를 이용한 경우에 HAT 배지를 이용한 경우보다 더 많은 안정된 hybridoma를 얻을 수 있다고 보고하였다⁽²⁾. 이 밖에 ouabain은 plasma membrane의 Na⁺-K⁺ activated ATPase의 저해제이며 이것에 대한 sensitivity는 species에 따라 다르다. 이 현상을 이용하여 Kozbor⁽¹²⁾는 murine myeloma cell과 human B cell을 융합하였다.

최근에 Feit 등⁽¹³⁾은 hybridoma 선별시 HAT 배지만을 사용하는 것보다는 HAT 배지에 insulin을 10⁻¹~10⁻³u/ml 정도 첨가하여 사용한 경우 hybridoma clone의 숫자 및 크기가 상당히 증가되며, Ab를 생산하는 clone의 총 수도 HAT를 사용한 경우보다 약 7배정도 증가했다고 보고하였다. 이들은 이러한 insulin의 효과는 glucose 대사가 향상됨에 따라 생기는 것으로 추측하였다.

선택 marker에 의하여 선별된 hybrid cell 중에서 원하는 specific Ab를 생산하는 clone 만을 선별하여야 한다. 이 경우 immunoassay를 통하여 항체를 측정하여야 하는데 측정방법의 선택기준은 가능한 짧은 시간에 손쉽게 많은 검체를 처리할 수 있어야 하며 미량의 항체를 검출할 수 있는 측정법이어야 한다. 주로 많이 쓰이는 방법에는 ELISA와 RIA법이 있다. 그러나 방사성 동위원소를 이용하는 RIA는 사용

상 단점이 많으므로 주로 ELISA법이 많이 사용되고 있다⁽¹⁴⁾.

ELISA의 원리는 항원이 부착된 plate에 배양액을 가하고 일정시간 반응후 세척하고 여기에 효소로 표지되어 있는 anti-mouse immunoglobulin을 첨가하여 반응후 세척하고 기질을 가하여 발색정도를 비교하는 것이다.

5. Cloning

Hybrid cell은 분열을 거치는 동안 염색체수의 변화가 일어나서 polyclonality를 나타내게 되거나, 혹은 원하지 않은 hybrid cell과 목적의 hybrid cell간에 경쟁이 일어날 위험성이 존재하므로, specific Ab를 생산하는 well이 결정되면 가능한 빨리 단세포로 분리하는 과정을 행하여야 하며 이 과정을 cloning이라 한다. 이 방법에는 하나의 세포를 하나의 well에 증식시키는 limiting dilution법⁽³⁾과 agar plate 상에서 분산, 배양하는 soft agar cloning법^(3,15)이 있다. 이러한 cloning과정을 거쳐서 하나의 세포가 증식하여 형성한 것이 monoclonal이며 이것이 생산하는 Ab가 monoclonal antibody이다. 그러나 전자의 경우에는 항상 진정한 의미의 McAb가 생산되는 것은 아니며 후자의 경우 cell의존성이 있으며 overlapping의 문제점을 포함하고 있다.

최근에 suction 장치를 부착한 모세관을 이용하여 cloning하는 새로운 방법이 소개되었다⁽¹⁶⁾. 이 방법의 장점은 많은 수의 cell을 효과적으로 cloning할 수 있고 단세포의 transfer가 눈으로 확인되며 overlapping의 문제점이 생기지 않는 데 있다. 그러나 기술습득에 다소 어려움이 있고 cloning할 때 시간이 많이 걸리는 단점이 있다.

(2) McAb의 characterization

Hybridoma가 얻어지면 목적이 맞는 이상적인 clone을 선정해야 하므로 각각의 clone이 생산하는 McAb의 titer, affinity, specificity, isotype 등을 검토하여야 한다.

1. Titer

Titer의 정의는 측정방법에 따라 조금씩 다르다. RIA 경우에는 labeled Ag의 50% binding을 나타내는 antiserum의 희석배수를 나타

내며 HA (Hemagglutination)의 경우에는 응집이 일어나는 최대 희석배수를 나타낸다. EIA 경우에는 음성대조액의 값이상을 나타내는 최대 희석배수로 결정하는 end-point titer와 표준곡선을 가지고 결정하는 standard curve titer의 2가지로 구분된다¹⁷⁾. 그러나 후자의 경우에 항원을 측정할 때는 문제점이 없으나 항체량을 측정시 Ab affinity에 따른 변화때문에 부적합하므로 항체측정시에는 end-point titer를 사용하는 것이 좋다. Ab titer 자체는 큰 의미를 가지지는 않지만 cloning 과정중 항체생성 정도의 측도로, 또한 hybridoma 배양시 Ab 생성량을 측정하는데 이용된다.

2. Affinity

일반적으로 Ab의 affinity는 큰 것이 좋지만 immunoaffinity purification과 같은 경우에는 affinity가 다소 낮은 것이 유리하다. 이러한 affinity는 Ag-Ab 반응의 평형상수로써 식(1)로 표현된다.

$$\frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag][Ab]} = \frac{K_1}{K_2} = Keq \quad (1)$$

[Ag] : Concentration of free antigen

[Ab] : Concentration of free antibody

[Ag·Ab] : Concentration of Ag-Ab complex

K_1, K_2 : The rate of association and dissociation

Keq : The equilibrium constant or affinity of the Ab.

이때 Keq값은 competitive RIA에 의한 결과를 가지고 식(1)로부터 변형된 식(2)에 대입하고 Scatchard plot에 의하여 구할 수 있다.

$$\frac{B}{F} = Keq (q - B) \quad (2)$$

B : Concentration of bound Ag

F : Concentration of free Ag

q : Total concentration of Ab binding sites.

즉 B/F와 [B]를 plot할 때 나타나는 기울기가 Keq (unit: l/M)이며 x축과 만나는 점이 q (unit: M/l)이다. 그러나 많은 hybridoma가 생긴 경우 각각의 affinity를 측정하는 것은 복잡한 일이다. 최근에 손쉽게 많은 McAb의 af-

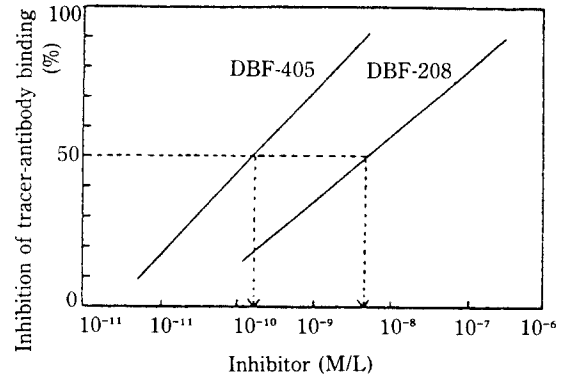


Fig. 1. Determination of the 50% inhibition value for hCG in the competitive radioimmunoassay. The [I] for monoclonal antibody DBF405 and DBF208 is $1.8 \times 10^{-10} M$ and $5.5 \times 10^{-9} M$. Thus the affinity constants of DBF405 and DBF208 is 1.5×10^{10} and 4.8×10^8 . At then, total tracer concentration is $5 \times 10^{-12} M$.

finity를 구하는 방법이 소개되었다¹⁸⁾. 이 방법은 ascitic fluid나 culture supernatant를 정제하지 않고서 사용할 수 있으며 competitive RIA를 확립하면 바로 affinity를 구할 수 있는 장점이 있다. 즉 Fig. 1에서 보는 바와 같이 50% inhibition을 나타내는 inhibitor의 농도 [It]가 구해지면 식(3)에 의하여 Keq를 구할수 있다.

$$Keq = \frac{8}{3([It] - [Tt])} \quad (3)$$

[Tt] : Total amount of tracer

특히 이 방법은 Scatchard plot시 직선을 구하기 어려운 경우에 유용하게 사용할 수 있다.

3. Specificity

Affinity가 우수하여도 specificity가 좋지 않은 McAb는 사용상에 문제가 많다. 따라서 McAb를 선별하는 작업중에서 가장 큰 비중을 차지하는 것이 specificity면이라 할 수 있다.

Cross reaction 정도는 specificity를 나타내는 측도로써 competitive RIA를 이용하여 측정하는 것이 일반적이다. 이때 cross reactivity (%)는 labeled Ag을 50% displacement할 수 있는 Ag과 유사물질(cross reactant)의 무게 백분율로써 표시된다. 그러나 cross reactivity는 assay system에 따라 다른 양상으로 나타날 수 있다. 실례로 Wada등¹⁹⁾은 Anti- β hCG

no 5003 McAb를 사용한 경우 competitive RIA에서는 1%미만의 cross reaction이 일어나지만 sandwich EIA에서는 8.3%의 cross reaction이 일어났다고 보고하였으며, 이는 sandwich법은 competition법과 달리 1st Ab (coating 용)가 과량이므로 생기는 것이라고 설명하고 있다. 따라서 sandwich법의 경우에 specificity가 우수한 McAb를 사용하지 않으면 competition법을 적용할 때보다 심각한 문제점이 생기므로 clone선정에 세심한 주의가 필요하다.

4. Ab의 isotype 결정

얻어진 McAb의 monoclonality를 알아보는 방법중의 한가지가 isotype을 결정하는 것이다. Mouse Ab의 isotype으로는 IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA, IgE등이 존재한다. 보고된 mouse McAb의 isotype은 주로 IgG이며 그중 특히 IgG₁이 많다. 한예로 Reimer등⁽²⁰⁾은 human IgG에 대한 31개의 McAb를 얻었는데 IgG_{2a}가 8개 IgG_{2b}가 3개, IgG₃와 IgM이 1개씩이었고 IgG₁이 19개였다.

Ab의 isotyping 방법으로는 RIA, EIA, immunodiffusion등이 사용되고 있으며 kit 화되어 시판되는 것도 있다. 이 중에서 ELISA에 의한 방법을 소개하면, 우선 96 well을 Ag으로 coating한 후 ascitic fluid나 배양액을 가한후 37°C에서 4~6시간 반응후 PBS로 세척한다. Rabbit anti-mouse subclass specific antiserum을 가하고 2시간 반응후 PBS로 세척하고 peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG를 가하고 37°C에서 30분반응후 기질용액을 가하여 반응시킨다. 30분간 반응후 반응을 중지 시키고 흡광도를 읽는다. 이때 양성반응으로 나타나는 것이 subclass가 되는 것이다.

본 연구실에서 제조한 hCG specific McAb인 DBF의 경우 8개의 McAb중 6개가 IgG₁이고 2개는 IgG_{2a}이었다.

[3] McAb의 대량생산

Hybridoma cell의 배양방법은 필요에 의하여 결정되는 것이 이상적이다. 진단용이나 보편적인 연구용으로는 mouse ascites를 이용하

는 것이 간편하지만 치료제로써의 McAb의 경우에는 정제시 따르는 오염물질에 의한 allergic reaction때문에 cell culture (in vitro)를 이용해야 한다. 특히 많은 양이 필요한 경우에는 효율적인 cell culture system이 요구된다.

1. 생체내 배양

사용한 myeloma cell이 자랄 수 있는 개체를 쓰는 것이 일반적이다. 주로 mouse cell line이 많이 사용되므로 mouse ascites가 많이 사용되고 있다. Ascites에 hybridoma cell을 이식하기 전에 mineral oil을 주입하면 tumor 형성물이 향상된다고⁽²¹⁾ 알려져 있으며 일반적으로 10일 전쯤 pristane을 복강내에 주사하고 5×10^5 정도의 hybridoma cell을 복강내 주입하는 방법이 많이 쓰이고 있다. 이때 얻어지는 ascitic fluids에는 보통 1~20mg/ml의 Ab가 포함되어 있다. 그러나 이때 얻어진 immunoglobulin은 Ab이외에 정상취의 peritoneal, serum immunoglobulin등이 섞여 있으므로 엄밀한 의미에서 McAb로 보기는 어렵다. 한편 ascites에서 얻어지는 titer는 배양액의 titer보다 100-1000배가량 높다고 알려져 있다. 본 연구실에서 얻은 HBsAg specific hybridoma인 H₄-5D의 경우 ascitic fluid의 titer는 8×10^7 (PNA titer)로써 배양액 titer의 1000배 가량 되었다.

2. 생체외 배양

생체외 배양시에는 배양액중 보통 1~100 µg/ml의 Ab를 얻을 수 있으며 이때 생산량은 배양조건에 크게 좌우된다. 특히 계대가 지연되는 경우에는 염색체의 손실이 생겨서 변이 hybridoma가 생길 수 있으므로 주의하여야 한다.

Table 2에서 보는 바와같이 생체외 배양시에는 ascites를 이용한 경우에 비해 몇가지 단점이 있지만 대량의 Ab가 필요할 때 따르는 동물관리 및 쥐형질의 동일성 유지등 문제점 때문에 생체외 배양이 많이 이용되고 있다. 생체외 배양시 작은 규모에서는 flask, roller bottle, microcarrier bead등이 사용되나 Ab 필요량이 1g 이상일 경우에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다. 따라서 대량생산시에는 다음과 같은 효율적인 배양기술이 필요하게 된다.

Table 2. Comparison of various cell culture technique.

Property	Mouse ascites	Roller bottle	Micro carrier bead	Micro encapsulation	Hollow fiber
Cells/ml medium	10^7 - 10^9	7.5×10^5	10×10^5	10^7 - 10^8	10^7 - 10^8
Operation mode	Batch	Batch	Batch	Batch	Continuous
Culture life time	1-2 weeks	5-10 day	5-10 day	5-10 day	up to, 2 months
Cell/medium separation	No	No	No	Yes	Yes
Irrelevant Ig	0.5-1mg/ml	None	None	None	None
Labor intensity	++	++	+	+	+

(1) Microencapsulation⁽²³⁾

Hybridoma cell을 semipermeable membrane에 encapsulation하여 controlled condition에서 2~3주간 배양하면 total cell수가 증가하여 3×10^8 cell/ml 정도가 되며, 배양하는 동안 Ab농도가 capsule ml 당 10mg에 이르게 된다. 이 농도는 전래의 배양법에 의해 얻는 양의 50~100배가 된다. 이때 영양성분은 capsule을 통하여 안으로 들어갈 수 있으며 생산된 Ab는 microcapsule안에 남아 있게 된다. Microencapsulation법에 의해 생산되는 Ab는 높은 농도를 가지면서도 40~75%의 Ab순도를 갖게 되며 ion exchange chromatography같은 간단한 분리법으로도 95%이상의 순도로 Ab를 얻을 수 있고 90%이상의 specific activity를 갖는다. 따라서 이 방법은 고농도의 Ab를 얻을 수 있으며 정제가 용이할뿐 아니라 동물의 관리가 불필요한 것이 장점이다.

(2) Hollow fiber⁽²³⁾

Hollow fiber culture unit는 cartridge의 원통 양끝에 연결되어 뾰뾰히 꼬여져 있는 수백, 수천의 fiber 묶음으로 구성되어 있으며 이 cartridge내에서 hybridoma cell이 모세관벽에 근접, 고착하여 존재하게 됨으로써 hybridoma

cells과 배지사이에서 효율적인 상호 교환 현상이 일어나게 된다. 배지 용액이 pumping에 의해 cartridge내에 주입되면 모세관벽을 관통하여 extracapillary chamber로 스며들어 hybridoma cell을 거쳐 흐른 후 fiber wall을 통해 lumina로 돌아가게 된다. 결국 이러한 과정을 통해 gas와 영양분이 직접 cell에 공급이 된다.

한편 각 fiber의 lumen에 배열되어 있는 ultrafiltration layer는 hybridoma cell과 배지사이의 물리적 방벽역할을 하면서 cell이 분비하는 Ab가 extracapillary chamber에 잔류할 수 있도록 조절한다. 따라서 제한된 공간내에 Ab가 농축되어 존재하게 됨으로 손쉽게 대량의 McAb를 생산할 수 있다. Hollow fiber culture bioreactor 10개를 자동조절장치에 부착하여 McAb를 생산할 때 하루에 0.3~4.0g의 Ab를 생산할 수 있다는 보고⁽²⁴⁾가 있다. 보통 bioreactor에 10^8 cells을 접종하여 6~15일 배양하면 10^8 cells/ml 이상이 되며, 이때 2ml/hr/bioreactor의 속도로 연속적으로 배양액을 모을 수 있다. 이때 Ab농도는 0.5~6.7mg/ml 정도이고 50~90%의 순도를 갖는다. 또한 media를 효율적으로 조절하여 serum사용량을 줄일수도 있다.

이상으로 McAb의 생산을 위한 몇가지 배양

기술에 대해 알아보았으며 각각의 장단점과 특성을 Table 2에 나타내었다.

[4] McAb의 정제

앞에서 서술한 여러 배양기술에 의해 생산되는 McAb는 그 생산방법에 관계없이 불순물을 함유하고 있으므로 목적하는 순도로 정제를 하여야 한다. Ascitic fluid나 culture supernatant로부터 McAb의 정제시에는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전, ion exchange chromatography, protein A를 이용한 affinity chromatography 등을 이용할 수 있다. 본 실험에서 사용되는 방법을 예로 들어 보기로 한다.

1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전⁽²⁵⁾

Ascitic fluid나 배양액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하면 단백질의 침전이 생기게 되며, 이때 농도를 조절함으로써 필요한 단백질의 회분을 분리할 수 있다. Ab가 포함되어 있는 배양액에 포화된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (33%, pH 7.2)을 한 방울씩 동량을 넣어 주면서 교반해 주고, 이를 2000g 이상으로 원심분리하여 침전을 얻는다. 이를 적당량의 PBS에 용해하고 위의 과정을 한번더 반복한 후에 투석을 행하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 제거한다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 대신에 Na_2SO_4 가 사용되는 예도 있으나 후자는 전자에 비해 용해도가 온도의존성을 많이 나타내므로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 널리 사용되고 있다.

2. Protein A를 이용한 affinity chromatography

Protein A는 Staphylococcus aureus의 배양액으로부터 분리해 낸 단백질의 일종으로 IgG의 Fc region에 강하게 결합하는 특성을 갖는다^(26, 27). 따라서 고정화시킨 protein A를 IgG 정제에 이용할 경우 간편한 조작으로 분리효율을 높일 수 있다는 장점을 갖는다. 일반적으로 1mg의 protein A는 약 10mg 정도의 IgG와 결합할 수 있으며 protein A의 재사용은 50회 이상까지도 가능한 것으로 알려져 있다.

본 연구실에서는 protein A를 Sepharose CL-4B에 고정화시킨 column을 제조하여 McAb를 정제하는데 사용하고 있다. 1차로 정제된 ascitic fluid를 protein A-Sepharose CL-4B

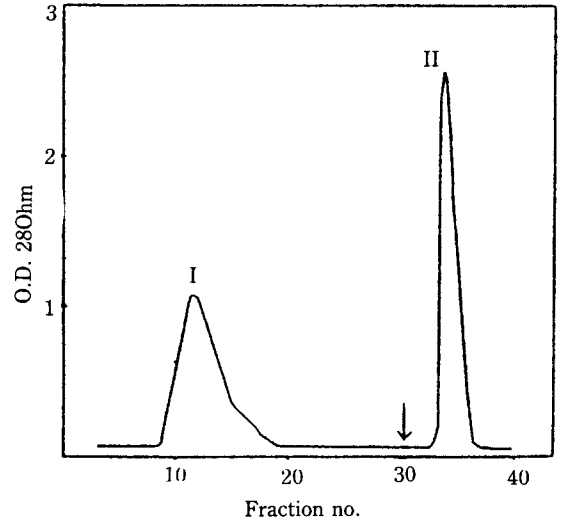


Fig. 2. Affinity chromatography on Protein A-Sepharose CL-4B of specific McAb to β -hCG from crude specific McAb to β -hCG prepared by ammonium sulfate precipitation. Unbound proteins (I) were washed with 0.01M PBS (pH 7.2) Fractions containing specific McAb to β -hCG (II) were eluted with 0.1M Glycine-HCl buffer (pH 2.8).

에 loading하고 0.01M PBS (pH 7.2)로 세척을 충분히 한후 0.1M glycine-HCl buffer (pH 2.8)로써 Ab를 용출시켰다. Fig. 2는 본 연구실에서 행한 hCG specific McAb를 정제하기 위해 수행한 affinity chromatography의 chromatogram이다. Elution buffer로 바꾼후에 단일 peak가 나타나며, 이것이 원하는 hCG specific McAb이다.

III. McAb의 응용성

[1] McAb를 이용한 Immunoassay

생체내의 hormone과 같은 미량물질을 측정하는 수단으로서 최근에 immunoassay가 많이 이용되고 있다. Immunoassay에서 가장 중요시 되는 것은 Ab의 특성이다. 종래에 immunoassay에 이용되왔던 PcAb는 cross reaction을 유발하는 경우가 대부분이었으나 monospecificity를 갖는 McAb를 이용함에 의해 이러한 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 PcAb를 이용할 때는 곤란했던 새로운 assay system의 개

발도 가능해졌다.

(1) McAb의 monospecificity

사용한 Ab의 specificity는 immunoassay system에서 결정적인 역할을 하는 경우가 많다. 임신의 지표로서 이용되는 hCG의 경우는 α , β 의 2개의 subunit로 구성되어 있는 glycoprotein이다. hCG의 α -subunit의 경우는 생체내 다른 hormone인 LH, TSH, FSH의 α -subunit와 거의 유사한 구조로 되어 있으며, β -subunit의 경우도 LH의 β -subunit의 80% 정도는 구조적 유사성을 갖고 있다⁽²⁸⁾. 따라서 hCG를 항원으로 하여 얻은 PcAb를 assay에 이용할 경우는 LH, TSH, FSH와의 교차반응을 피할 수 없다. PcAb를 이용하여 hCG의 진단시약을 상품화한 경우는 이러한 교차반응을 최소화시키기 위하여 hCG의 β -subunit에 친화성이 있는 Ab만을 affinity chromatography로 분리하여 사용하고 있지만 이렇게 했을 경우도 LH와의 교차반응을 완전히 배제시킬 수 없다. 그러나 McAb의 경우는 β -subunit의 구조 유사성이 없는 부분만을 인식하는 항체를 선별함으로써 이러한 교차반응의 문제를 용이하게 해결할 수 있는 장점이 있다. 실제로 본 연구실에서 whole-hCG로 면역한 spleen cell과 myeloma cell을 융합시켜 hybridoma cell을 얻고 hCG의 β -subunit를 사용하여 선별한 McAb에 대해 교차반응을 측정할 결과 LH와는 0.5% 미만, FSH, TSH와는 0.1% 미만의 cross reactivity를 나타내는 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 여기서 얻은

McAb를 실제 58명의 환자의 시료에 적용했을 경우도 PcAb를 이용한 assay system에서 나타나는 교차반응이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. Table 3에서 보면 McAb를 이용한 assay에서도 종래의 PcAb를 이용한 결과와 유사성을 나타내고 있으나, 특이한 사항은 patient 4번과 9번은 이용한 Ab에 따라 결과가 다르게 나타난다는 사실이다. 따라서 교차반응에 의한 결과인지를 검토하기 위해서 LH, FSH, TSH농도를 측정할 결과, 4번은 LH가 380 mIU/ml, FSH가 210mIU/ml이 검출되었고 9번은 LH가 450mIU/ml이 검출되었으며, 이 두 환자는 임신이 되지 않은 상태이며 난소 제거수술을 받은 환자임이 판명되었다. 따라서 위의 두 환자의 경우 hCG가 있는 것으로 나온 결과는 PcAb를 이용하는 경우에 LH와 FSH가 PcAb와 반응하기 때문에 나온 결과로 해석된다. McAb의 monospecificity의 장점은 HBsAg를 측정하고자 할 때도 잘 나타난다. HBsAg는 여러가지 subtype이 존재하는 것으로 보고⁽²⁹⁾되어 있고 지역에 따라 분포를 달리하고 있다. 우리나라를 포함한 동양권에서는 주로 ad type이 많으며 ay type은 희귀한 것으로 알려져 있다⁽³⁰⁾ PcAb를 이용한 assay에서는 만일 PcAb가 ad type으로 면역하여 얻은 것이라면 ad type에 대해서는 높은 특이성을 나타내지만 ay type에 대해서는 그보다는 훨씬 민감도가 떨어지게 되며 진단에 혼돈을 가져올 수 있다. 따라서 PcAb를 이용한 경우는 지역의 특성을 고려하여 assay system을 만들지 않으면 안되는 불편한 점이 있다. 이러한 문제점도 McAb를 이용할 경우는 용이하게 해결될 수 있다. HBsAg에는 subtype과 무관한 common antigenic site (a)이 존재하며 이 부분만을 인식하는 McAb를 제조, 사용할 경우 subtype에 관계없이 거의 균일한 측정치를 얻을 수 있다.

이상의 예 이외에도 McAb의 장점으로는 solid phase 2-site immunoassay에 의해 면역학적 활성이 있는 intact한 물질만을 측정할 수 있는 점이다. two-site immunoassay는 PcAb에 의해서도 행할 수 있으나 PcAb는 수 많은 antigenic determinants에 대한 항체의 복합물

Table 3. Clinical results of Monoclonal and Polyclonal hCG Enzyme Immunoassay.

McAb PcAb	Negative	Weekly Positive	Positive	Strong Positive	Total
Negative	5	0	0	0	5
Weekly Positive	2*	14	0	0	16
Positive	0	1	25	1	27
Strong Positive	0	0	2	8	10
Total	7	15	27	9	58

*: patient 4, patient 9.

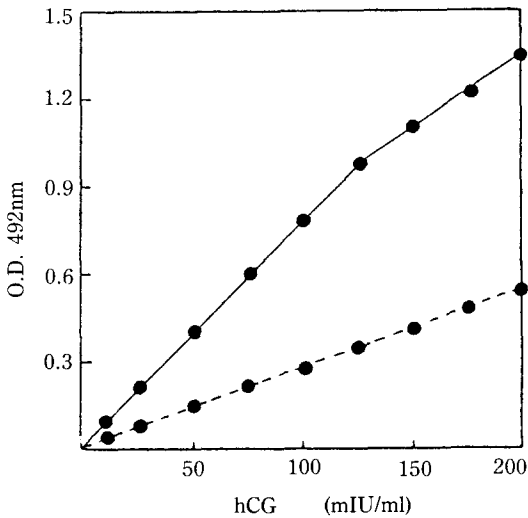


Fig. 3. A Calibration curve for measurement of hCG (mIU/ml) by solid-phase EIA using different combination of monoclonal antibodies. ●—●: DBF405, DBF202 ●---●: DBF333, DBF202.

이므로 precauser, fragment 및 intact 한 물질이 구별없이 측정된다. 이에 반하여 각 subunit에 대한 McAb를 적절히 조합하여 two-site immunoassay를 행하면 intact 한 물질만의 검출이 가능해진다. 단 이 경우에 있어서 McAb의 선정은 sensitivity에 영향을 미치므로 충분한 검토가 있어야 한다. Fig. 3은 본 실험에서 hCG검출에 있어서 McAb의 서로 다른 조합이 sensitivity에 어떠한 영향을 미치는가를 본 것이다. DBF-405와 202를 조합한 경우는 최소 검출량이 10mIU/ml이고, DBF-333과 202를 조합한 경우는 40mIU/ml이었다. Sensitivity에 차이를 보이는 원인은 DBF-333과 202는 인접 부위를 인식하는 항체로 steric hinderance에 의해 sensitivity가 저해되는 것으로 추측된다. 따라서 two-site immunoassay system을 개발할 경우는 antigenic determinants가 서로 멀리 떨어져 있는 McAb를 선정하는 과정이 포함되어야 한다.

(2) McAb의 Affinity

Immunoassay의 정확성은 전술한 바와 같이 Ab의 specificity에 의존하는 반면, 민감도는 Ab의 affinity에 따라게 된다. 즉 affinity가 우

수한 Ab를 사용하는 경우 좀더 감도가 우수한 assay system을 만들 수 있으며 낮은 affinity를 이용할 때에 비하여 같은 감도를 나타내는데 걸리는 반응시간이 줄어들므로 좀더 신속한 진단을 할 수 있다. 일반적으로 McAb는 PcAb보다 affinity가 작다고 보고되어 있으며, 이는 McAb를 이용한 Immunoassay개발에 큰 장애 요소가 되고 있다. 또한 affinity가 낮은 Ab를 사용한 sandwich assay에서는 competitive assay system에서 보다 더 심각한 영향을 준다고 보고하고 있다⁽¹⁷⁾. 그 이유는 competitive assay와는 달리 sandwich assay에서는 세척 과정이 있게 되는데, 이 때 affinity가 작은 Ab를 쓰는 경우 세척에 의해 결합되어 있던 Ag이 떨어져 나가게 되므로 정확한 assay를 할 수 없다고 한다. 따라서 McAb를 이용한 immunoassay개발에는 affinity가 좋은 McAb의 선정이 필수적이라 할 수 있다. McAb를 이용한 assay에서 PcAb를 이용한 assay에 필적하는 감도를 얻을 수 있다면 이론적으로 PcAb에 포함되어 있는 항체 중 최고의 친화성이 있는 Ab에 상당하는 affinity를 가진 McAb를 이용하면 된다. 그러나 실제 얻어지고 있는 McAb의 affinity상수는 10^{10} 정도에 불과하다. 실례로 hCG의 McAb의 경우 $10^7 \sim 10^{10}$ 정도의 affinity를 나타낸다고 보고되어 있으며 이를 이용한 immunoassay는 PcAb를 이용한 것 보다 뒤진다고 보고되어 있다. PcAb를 이용한 immunoassay에서는 비록 affinity가 높더라도 포함된 비특이적 항체와 affinity가 낮은 항체의 공존으로 비특이적 반응이 일어나 측정의 효율을 저하시킬 수 있다. Ehrlich의 보고⁽³¹⁾에 따르면 2 종류의 McAb를 혼합하는 경우 affinity가 최고로 약 10배가량 상승되었다고 한다. 본 실험에서 β -hCG에 대한 McAb를 얻어 혼합하였을 경우에도 비슷한 결과를 얻고 있다. Fig. 4에서 보는 바와같이 B 101과 B 102를 혼합하여 immunoassay를 행하는 경우에는 단독으로 사용하는 경우보다 sensitivity가 10~100배 가량 증가하게 된다. 이때 B 101의 affinity는 5.1×10^8 , B 102는 1.9×10^7 이며, B 101과 102를 섞은 경우에는 5.4×10^9 으로 나타난다. 이러한 현상은 Ab의 Fc 부분이

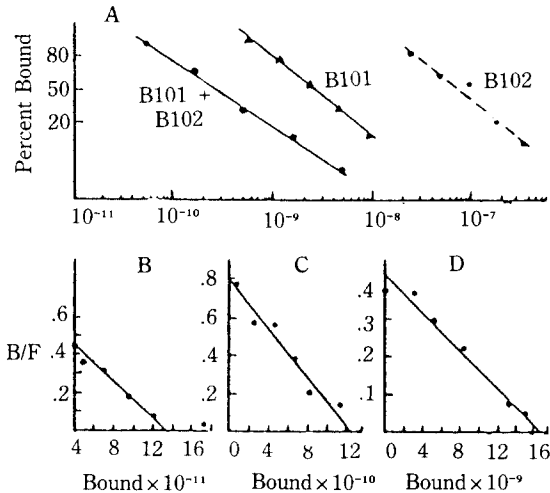


Fig. 4. A, radioimmunoassay for hCG by double antibody liquid-phase assay. The ED_{50} (effective displacement of 50% bound radiolabeled hCG) for the mixture of B101 and B102 is $2.44 \pm 0.74 \times 10^{-10}M$, B101 $2.88 \pm 0.74 \times 10^{-9}M$, B102 $1.058 \pm 0.995 \times 10^{-7}M$. B, C, D Scatchard analysis of the binding to hCG OF B, mixture of B101 and B102, C, B101, and D, B102. The equilibrium binding constants are B, 5.4×10^9 , C, 5.1×10^8 , D, 1.9×10^7 . (from ref. 31)

중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있으며, Moyle의 해석⁽³²⁾은 Ab 1 분자가 2 분자의 hCG와 결합하여 cycle 상의 안정한 immune complex가 형성되고 이 때문에 affinity가 상승된다고 해석하고 있다. McAb는 PcAb에 비해 affinity가 낮다고 하더라도 적당한 McAb를 혼합하여 affinity를 상승시킴으로서 기존의 PcAb를 이용한 assay system과 같은 정도의 sensitivity를 갖는 assay system을 개발할 수 있다.

(3) McAb를 이용한 새로운 방법의 Immuno-assay

a. Simultaneous two-site method

Sandwich 방법은 2 단계로 행하는 것이 일반적이다. 즉 검체와의 반응, labelled Ab와의 반응의 2 단계로 구분되며 PcAb를 이용하는 경우에 사용되고 있다. 만약 1 단계로 하기 위하여 검체와 labelled Ab를 동시에 첨가하면 두 종류의 PcAb가 Ag에 대하여 경쟁적 반응을 일으켜 측정 효율을 저하시키게 된다. 그러나 서

로 다른 항원 부위를 인식하는 2 종류의 McAb를 사용하게 되면 이러한 현상은 없어지게 된다. 또한 simultaneous two-site 방법은 sandwich 방법과 달리 1 단계 반응이므로 반응시간을 줄일 수 있으며 측정 조작이 간편하다는 장점을 지니게 된다. 이러한 방법을 이용하여 α -feto-protein^(33, 34), HBsAg⁽³⁵⁾, hCG^(19, 36), LH⁽¹⁹⁾, TSH⁽¹⁹⁾ 등을 측정하 보고가 있다.

b. Proximal linked immunoassay⁽³⁷⁾

서로 다른 항원 부위를 인식하는 2 종류의 McAb에 2 가지 종류(R_1 , R_2)를 표지하여 Ag과 반응시키면 R_1 과 R_2 가 근접한 위치에 있게 되면 기질이 중간단계를 거쳐 산물로 변하는 과정이 효과적으로 진행하게 된다. 한 예로 R_1 에 hexokinase, R_2 는 Glucose-6-phosphate dehydrogenase를 이용한다. 반응 용액중에 존재하는 2 종류의 McAb가 동일 항원분자에 결합하여 그 결과 R_1 과 R_2 가 상호 접근한다. 반응 용액에 Glucose, ATP, NAD^+ 가 존재하고, 2 가지 효소가 효과적으로 공역 반응을 진행한다. 최종적으로 생성되는 NADH양이 항원 양을 나타내게 된다. 이러한 proximal linked immunoassay는 결합하지 않은 Ag을 분리하지 않는 homogeneous immunoassay의 한가지이다.

Proximal linked immunoassay의 측정

system중 다른 예로는 R_1 에 형광물질 fluoresceine, R_2 에 rodamine을 이용하는 것이다. 반응 용액에 340nm의 빛을 조사하면 fluoresceine이 발기하여 460nm의 형광을 발생시킨다. 2 가지의 항체가 항원에 결합하면 fluoresceine 근방에 rodamine이 존재하고, 460 nm의 빛이 rodamine에 작용하여 발기시킨다. 최종적으로 발생하는 520nm의 rodamine 형광의 강도가 항원량을 표시하게 된다. Fluoresceine과 rodamine을 이용한 측정법의 원리는 fluorescent excitation transfer immunoassay⁽³⁸⁾라고 불리고, 이 방법은 실용화 단계에 있다. Proximal linked immunoassay는 고분자 항원 측정의 homogeneous immunoassay로써 실용화되고 있는 저분자 항원의 homogeneous immunoassay⁽³⁹⁾와 비슷하며 단시간 안에 측정이 가능하다. 또

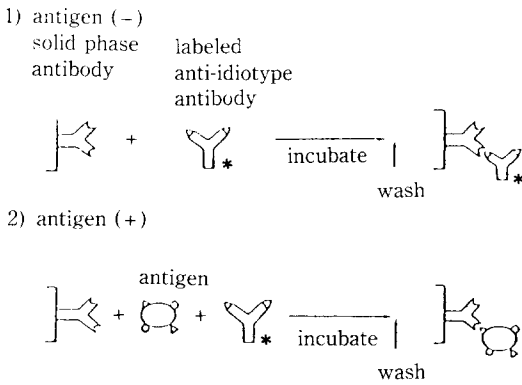


Fig. 5. Inhibition of idiotype-anti-idiotype interaction for detection of antigen. The concentration of an unknown antigen is determined by measuring its ability to compete with a fixed amount of labeled anti-idiotype antibody for a limiting quantity of antibody.

한 자동화도 가능할 것으로 생각되며 실용적인 측정계의 확립이 이루어 질 것이다.

이런 측정 system은 그 원리에서 PcAb로는 곤란하며 표지물질로 isotope는 사용할 수 없다.

c. Idiotype-anti-idiotype interaction의 저해 이용법

이 방법은 Fig. 5에서 보는 바와같이 idiotype과 anti-idiotype Ab의 반응을 Ag이 저해하는 원리에 기초를 둔다⁽⁴⁰⁾. Solid phase에 특정 McAb를 흡착시키고, 또한 이 McAb의 idiotype에 특이적인 McAb를 만들어 I¹²⁵를 표지한다. 위의 두가지를 반응시킬 때 측정대상의 Ag이 존재하게 되면 labelled Ab와 경쟁을 하게 되므로 Ag이 없을 때보다 cpm이 적게 된다. 즉 cpm이 감소하는 정도로 Ag의 양을 알아내는 것으로서 일반적인 competitive RIA와 유사한 원리이다. Idiotype과 anti-idiotype Ab의 affinity는 2nM⁻¹로 보고되어 있다. 이 방법의 장점으로서는 정제가 곤란한 Ag이나 희소 Ag에 대하여 competitive method를 적용할 수 있다는 데에 있다.

[2] McAb를 이용한 Immunopurification

적당한 solid phase에 고정시킨 McAb를 이용한 affinity chromatography는 specific anti-

gen을 분리하는 효율적인 수단이다. PcAb를 ligand로 이용하는 경우에는 전술한 바와 같이 specificity가 좋지 못하므로 어느 특정물질만을 분리하기 곤란하나 McAb를 사용하는 경우에는 monospecificity의 특징으로 특정물질만을 분리할 수 있으며, 생리 활성을 지닌 물질의 정제시에는 활성을 나타내는 물질만을 선택적으로 얻을 수 있다. Immunopurification을 수행할 때 low affinity의 Ab를 사용하는 것이 유리하다. High affinity를 갖는 PcAb를 사용할 경우에는 Ag을 용출할 때 많은 양의 Ag을 얻기 위해서는 strong denaturing conditions으로 Antigen-Antibody를 분리시켜 용출시켜야 하기 때문에 용출되는 Ag이 변성될 수 있으며 solid phase의 Ab활성을 저하시켜 column의 사용 횟수를 줄이게 된다. Hybridoma technique을 이용해서 특정한 antigenic site에 대한 결합능력을 갖는 low affinity의 McAb를 얻을 수 있으며, 이 Ab를 ligand로 사용하면 보다 mild한 조건으로 용출시켜 분리하는 Ag의 변성을 방지할 수 있다. 또한 McAb는 용액의 pH에 따라 binding affinity가 다르므로 이를 이용하여 특정한 Ag의 변성을 일으키지 않고 용출시킬 수 있다. Fig. 6은 McAb와 PcAb를 ligand로 이용하여 α -fetoprotein(AFP)을 정제한 chromatogram을 나타내고 있다⁽⁴¹⁾. A의 경우에 McAb 21.1을 ligand로, 용출용액으로는 2 M MgCl₂를 사용하여 loading한 AFP의 90%를 회수한 이상적인 immunopurification 형태를 보여준다. 이때 회수한 AFP는 homogeneous하며 농축된 형태로 얻을 수 있다. 2 M MgCl₂는 AFP에 거의 영향을 주지 않는다. 그러나 high affinity를 갖는 McAb 21.2를 사용한 B나 PcAb를 ligand로 사용한 D의 경우에는 사용한 용출조건(2M MgCl₂)에서 각각 loading량의 6.6%, 37%로 작은 양이 용출되며, affinity가 매우 낮은 McAb 22.4를 ligand로 하였을 경우(C)에는 용출되는 양은 많으나(107%), 같은 조건으로 Antigen-Antibody complex를 형성시키고, washing하였을 때 많은 양의 α -fetoprotein이 binding하지 않고 protein과 섞여 나오며 washing과정에서 용출되어 나온다.

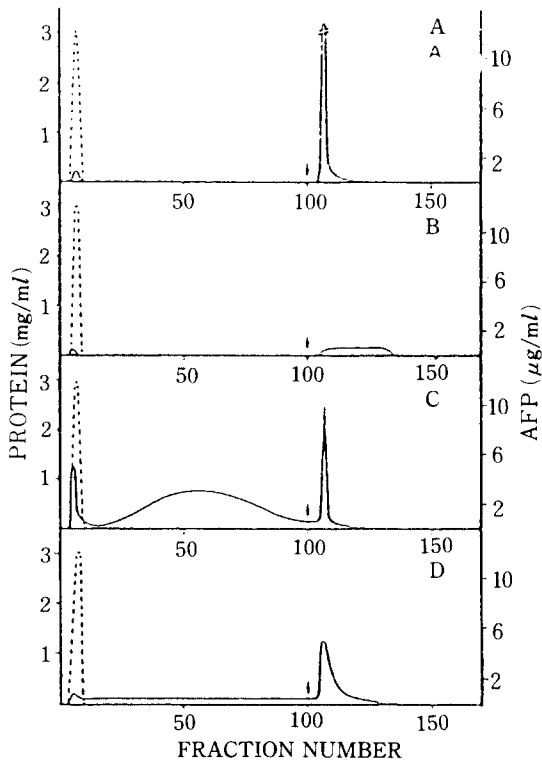


Fig. 6. The elution of AFP from immunoaffinity columns. Distribution of protein and AFP in eluates from four column bearing antibody A: 21.1 (91%) B: 21.2 (6.6%) C:22.4 (107%) and D: conventional antiserum-derived immunoglobulin (37%) Arrow indicate the point at which 2M MgCl₂ was added after washing each 3ml column with 150ml PBS. (from ref. 41)

현재 hybridoma technique과 cell culture technique의 발전으로 항원에 특이성이 있는 McAb를 대량 생산할 수 있게 되어, 체내에 미량 존재하는 물질을 McAb가 고정화된 immunoabsorbent를 이용하여 고순도로 분리할 수 있게 되었다. 종래의 방법으로는 1%의 순도 밖에 얻지 못하던 interferon의 경우 McAb를 ligand로 사용하여 5,000배 정도 순도를 높여 대량으로 얻을 수 있으며⁽⁴²⁾, 오줌 1l에서 1μg밖에 얻지 못하던 urogastone을 1l당 20μg을 얻을 수 있다⁽⁴³⁾. 또한 Randle등은 Epstein-Barr Virus Membrane Antigen, gp 340에 대한 McAb를 생산하여 고정화시킨 immunoabsorbent로 gp 340을 고순도로 정제하여, Epstein-Barr

Virus 감염에 대한 vaccine 연구를 진행중이라고 보고한 바 있다. McAb를 이용한 immunopurification은 최근에 각광을 받고 있는 유전자 조작을 거친 미생물이 생산하는 단백질의 정제에 큰 도구가 될 수 있다. 즉 미생물에서 생산되는 유전공학 산물은 그 정제도에 따라 이용가치가 달라질 수 있는데, immunopurification을 통해 고순도로 대량 분리함으로써 이용가치를 높일 수 있다.

그 외에도 이제까지 PcAb를 고정화시킨 immunoabsorbent를 이용하여 정제할 수 있었던 거의 모든 단백질에 대해서도 항원에 대한 특이성이 높은 McAb를 이용하여 간편하고 효율적으로 많은 양을 고순도로 얻을 수 있다. 따라서 McAb의 항원에 대한 친화력을 이용한 immunopurification은 면역학적 활성을 갖는 단백질을 고순도로 정제하는 분야에 획기적인 장을 열 수 있을 것으로 기대되고 있다.

(3) McAb를 이용한 Immunotoxin요법

B세포 hybridoma 기술이 확립됨에 따라 암세포 표면에 특이적으로 결합하는 McAb에 약물을 결합시켜 암세포에 선택적으로 장애를 일으키는 drug targeting이 시도되고 있다. 약물로서는 주로 daunomycin, methotrexate, chlorambucil 등의 화학요법제가 이용되고 있다. 그러나 표적항원이 소량이거나 항체-약물 복합체의 표적세포에 대한 침투율이 낮은 경우는 충분한 활성을 발휘하지 못하는 문제 때문에, 최근에는 화학요법제보다 미량으로 세포독성을 나타내는 ricin^(44, 45) 및 diphtheria toxin^(46, 47) 등을 이용하는 연구가 활발히 수행되고 있다. Diphtheria toxin은 trypsin 처리에 의해 ricin과 동일한 구조가 된다. Ricin은 A chain과 B chain이 disulfide 결합으로 되어 있으며, 표적세포 표면의 환원효소에 의해 혹은 세포내에 들어가서 disulfide 결합이 절단되어 A chain이 유리되고, 이 A chain이 세포독성을 나타낸다고 보고되어 있다⁽⁴⁸⁾. 이러한 사실로 해서 최근에는 McAb와 ricin A chain을 disulfide 결합으로 복합체를 만들어 cancer 치료에 응용하는 예가 많다. 복합체의 제조 방법은 여러가지가 있

으나 원리적으로는 동일하며 일반적으로 항체에 glutaraldehyde나 혹은 SPDP (N-succinyl-3-(2-pyridyl dithio)-propionate) 등을 가교제로 사용하여 SH기를 도입하고 이 SH기를 활성화 시킨 다음 ricin A chain의 유리 SH기와 disulfide결합을 만들어 제조하게 된다. 분실험에서는 McAb에 ricin A chain을 직접 결합시키는 대신에 McAb에 biotin을 도입하고, avidin에 ricin을 결합시켜 immunotoxin을 제조하고 있다. 여러가지 방법으로 제조된 immunotoxin의 표적세포, 특히 암세포에 대한 선택적 독성 여부에 대해서는 *in vitro*^(45, 46, 49) 및 *in vivo*^(50, 51)에서 조사되었다. Immunotoxin은 적어도 *in vitro* level에서는 선택적인 독성을 나타내는 것이 상식화 되어 있다. 그러나 실험 동물의 level에서는 만족할 결과를 보여 주지 못하고 있으며, 특히 solid cancer에서는 항체 단독 투여시와 동등의 항종양 효과를 보여 immunotoxin의 특성이 전혀 발휘되지 않는 결과를 얻고 있다. 이러한 원인으로는 투여된 복합체가 체내에 순환 중에 결합이 절단되거나 또는 ricin의 A chain이 불활성화 되는 가능성을 시사하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 liposome, encapsulation 등의 시도가 필요하다. Drug targeting에는 이 밖에도 표적세포에 immunotoxin의 침투율을 높이는 문제와 항 immunotoxin 항체 생성을 억제해야 하는 등 실용화를 위해서 해결해야 할 점들이 많다. 항체 생성의 문제는 사용되고 있는 McAb 대부분이 설치류 유래이기 때문이며 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위해 human-human McAb 제조 연구가 행해지고 있다. Human 유래 myeloma를 parent cell로 했을 경우는 세포 융합률이 낮고 분열 시간이 느리며 안정성 및 항체 생성율이 낮은 문제가 극복되지 않고 있으나 human 임파아구를 사용하거나 EB virus로 human-B cell을 transformation하여 항체를 지속적으로 생산하는 방법 또는 mouse myeloma와 human B cell을 융합시켜 human McAb를 얻으려는 연구가 활발히 진행되고 있어 human-McAb가 임상과 치료에 응용될 날도 머지 않으리라 기대된다.

이제까지 McAb를 이용한 drug targeting은 주로 cancer 치료에만 국한되어 연구되어 왔으나 어떤 장기에 선택적으로 약물을 보내기 위해서도 McAb는 효과적으로 이용될 수 있어 McAb의 약학적 응용에 폭을 넓혀 갈 수 있으리라 고 생각된다.

[4] McAb를 이용한 Receptor의 구조 규명

Acetylcholin Receptor (AChR)은 신경근 접합부인 synapsis 후막에 존재하는 분자량 약 25만 단백이다. 골격근의 AChR은 소량 밖에 존재하지 않지만 전기뱀장어의 발전기관 유래의 AChR은 다량으로 얻을 수 있으므로 이를 이용한 AChR에 대한 연구가 오래 전부터 수행되어 왔다. Torpedo californica 유래의 AChR은 α , α_1 , β , γ , δ 의 5개의 subunit로 구성된 산성단백으로 밝혀졌으며 Noda⁽⁵²⁾ 등에 의해 전 subunit의 아미노산 배열이 결정되었다. 어류의 AChR가 정제되고 이를 항원으로 해서 얻은 McAb는 human의 골격근 AChR과도 교차반응이 있다는 것이 확인됨으로써 이 McAb를 이용한 affinity chromatography로 human의 AChR의 정제가 가능해졌다. Human의 AChR도 어류의 AChR과 마찬가지로 5개의 polypeptide chain으로 구성된 것이 확인되었다. McAb에 의해 receptor의 정제가 가능해지면 곧 polypeptide의 sequence를 밝힐 수 있으며 여기서 얻은 정보로부터 DNA probe를 만들어 receptor에 대한 c-DNA cloning에 사용할 수 있어 결국 receptor의 일차 구조 규명이 가능해진다. 이러한 방법으로 최근 Genentech Inc.는 insulin receptor에 대한 c-DNA를 cloning하여 1370개의 아미노산으로 된 insulin receptor의 protein sequence를 밝혔다⁽⁵³⁾. Insulin 저항성을 나타내는 당뇨병에는 insulin receptor에 대한 항체가 존재한다고 보고된 것은 1975년의 일이다⁽⁵⁴⁾. 그 후 연구에서 insulin 저항성을 나타내는 당뇨병은 3가지 type으로 나뉘어져 insulin receptor 자체에 이상이 있는 것을 type A, insulin receptor에 대한 자기항체가 존재하는 것을 type B, insulin이 receptor에 결합된 후 signal 전달에 이상이 있는 것을 type C로 명명

되었다. Type B의 당뇨병에서는 자기항체가 insulin receptor 혹은 그 근처에 결합하여 insulin이 receptor와 결합하는 것을 저해함으로써 고 insulin혈증 또는 insulin 저항성 당뇨병을 일으킨다. Insulin receptor에 대한 McAb는 결국 insulin과 receptor간의 상호 작용을 분자 level에서 해석할 수 있는 길을 열게 될 것이며 더 나아가서는 더 좋은 당뇨병 치료제를 개발하기 위한 drug design에 결정적인 정보를 제공하게 될 것이다.

IV. 결 론

Hybridoma techniques는 방법론적으로 확립되어 일반화된 기술로서 이용 여하에 따라서는 약학의 발전에 유력한 도구로서의 가능성을 가지고 있다.

현재 실용화된 부분은 진단시약 일부에 지나지 않지만 약학적인 응용면에서 본다면 약물과 receptor의 상호 작용을 규명하여 더 합리적인 약물을 design하거나, 생체내에 미량 존재하는 생리 활성 물질을 정제하여 그 작용 기전을 연구하거나 치료제로 이용하는 등 활용 범위가 매우 넓다. 특히 약물을 특정 부위에 선택적으로 보내기 위한 수단으로서의 Ab의 이용은 일부 실용화 단계에 이르고 있어 약물의 부작용을 줄일 수 있는 새로운 투여법의 개발도 기대되고 있다. 이상과 같이 hybridoma technique의 다각적인 이용은 향후 약학 및 제약산업의 발전에 크게 기여하리라고 기대된다.

REFERENCES

- Little field, J.W.: Selection of hybrid from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinants. *Science* **145**:709, 1964.
- Taggart, R.T. and J.M. Samloff: Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science* **219**:1228, 1983.
- Zola, H and D. Brooks: Technique for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. *Monoclonal hybridoma antibodies: Technique and application.* ed, John G.R. Hurrell *CRC*. **1**. 1982.
- Buchman, D., D. Miller and G. Koch: Monoclonal antibodies to digoxin: comparison of in vitro and in vivo immunization. *Hybridoma* **4**, 173, 1985.
- Reuben P. Siraganian, Philip C. Fox and Elsa H. Berenstein: Methods of enhancing the frequency of antigen-specific hybridoma. *Methods Enzymol.* **92**, 17. 1983.
- Kao, N.N., and H.R. Michayluk: Method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**. 355. 1974.
- Pontecorvo, G.: Production of mammalian somatic Cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet.* **1**, 397, 1975.
- Blow A.M.J., G.M. Botham, D. Fisher, G.P.S. Goodall and J.A. Luck: Water and calcium ions in cell fusion induced by polyethylene glycol. *FEBS Lett.* **94**, 305, 1978.
- Norwood T.H., C.J Zeigler and G.M. Martin: Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. *Somatic Cell Genet.* **2**, 263, 1976.
- Vienken, J. and U. Zimmermann: Electric fieldinduced fusion: Electro-hydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high yield. *FEBS Lett.* **137**, 11, 1982.
- Bischoff, R., R.M. Eisert, I. Schedel, J. Vienken and U. Zimmermann: Human hybridoma cells produced by electro-fusion. *FEBS Lett.* **147**, 64, 1982.
- Kozbor, D., J.C. Roder, T.H. Chang, Z. Steplewski and H. Kroprowski: Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma. *Hybridoma* **1**, 323, 1982.
- Feit C., A.H. Bártal and Y. Hirshaut: Enhancement of hybridoma formation by addition of insulin to HAT medium. *Hybridoma* **3**, 377, 1984.
- Douillard J.Y. and T. Hoffman: Enzyme-linked immunosorbant assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods Enzymol.* **92**, 168, 1983.
- Roger H. Kennett: Cloning of hybridomas:

- cloning in semisolid agarose. Monoclonal antibodies: Hybridoma: A new dimension in biological analyses Pleuman 372, 1981.
16. Gaétan Gagnon and Yves Raymond: Cloning of hybridoma by single-cell transfer technique. *J. Immunol. Methods* **78**, 267, 1985.
 17. Michael W. Steward and Andrew M. Lew: The importance of antibody affinity in the performance of immunoassay for antibody. *J. Immunol. Methods*. **78**, 173, 1985.
 18. Rolf Müller: Determination of affinity and specificity of antihepten antibodies by competitive radiimmunoassay. *Methods Enzyme*. **92**, 589, 1983.
 19. Wada H.G., Panisch R.J., Baxter S.R., Federici M.M., Fraser R.C., Brownmiller L.J. and J.C. Lankford: Enzyme immunoassay of the glycoprotein tropic hormones-choriogonadotropin, Lutopin, Yhyrotropin-with solid-phase monoclonal antibody for the α -subunit and enzyme-coupled monoclonal antibody specific for the β -subunit. *Clin. Chem.* **28**, 1862, 1982.
 20. Reimer C.B., D.J. Phillips, C.A. Aloisio, D.D. Moore, G.G. Galland, T.W. Wells, C.M. Black and J.S. McDougal: Evaluation of thirty-one mouse monoclonal antibodies to human IgG. *Hybridoma* **3**, 263, 1984.
 21. Potter, M., J.G. Pumphrey and J.L. Walter: Growth of primary plasmacytomas in the mineral oil-conditioned peritoneal environment. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 305, 1972.
 22. Elizabeth G. Posillico: Large scale production of monoclonal antibody utilizing the EN-CAPCEL™ system. in "The second annual congress for automation, scale-up, and the economics of biological process engineering" Feb. 7, 1985.
 23. Hopkinson, J.: Hollow fiber cell culture systems for economical cell-product manufacturing. *Biotechnology*. **3**, 225, 1985.
 24. Micheal Gruenberg and Richard Schoenfeld: Use of automated hollow fiber technology for economical production of monoclonal antibodies, in "The second annual congress for automation, scale-up, and the economic of biological process engineering." Feb. 7, 1985.
 25. Zdenka L. Jonak: Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation: Monoclonal antibodies, hybridoma: A new dimension in biological analysis. plenum. 405, 1981.
 26. Kromall, G., U.S. Seal and S. Fintad: Phylogenetic insight into evolution of mammalian fragment of rG globulin using staphylococcal protein: A. *J. Immunol.* **104**, 140, 1970.
 27. Langone, J.J.: [^{125}I] protein A: a tracer for general use in immunoassay. *J. Immunol. Methods* **24**, 269, 1978.
 28. Donini, S., V. Olivieri, G. Ricci and P. Ponini: Subunit of human chorionic gonadotrophin: A immuno chemical study. *Acta. Endocrinologica* **73**, 133, 1973.
 29. Anne-Marie Couroucé-Pauty, Annie plancon and J.P. Soulier: Distribution of HBs Ag subtype in the world. *Vox Sang*, **44**, 197, 1983.
 30. Rho, H.M.: Development of hepatitis B vaccine by recombinant DNA techniques. MOST. 1985.
 31. Ehrlich, P.H., W.R. Moyle, Z.A. Mousetafa and R.E. Canfield: Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.* **128**, 2709, 1982.
 32. Moyle, W.R., C. Lin and R.L. Corson: Quantitative explanation for increased affinity shown by mixture of monoclonal antibodies: Importance of a circular complex. *Mol. Immunol.* **20**, 439, 1983.
 33. Uotila, M., E. Ruoslahti and E. Engvall: Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J. Immunol. Methods*. **42**, 11, 1981.
 34. Brock, D.J.H: Enzyme-linked immuno-specific assays for human alpha-fetoprotein using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta.* **122**, 353, 1982.
 35. Wands, J.R., R.I. Carlson, H. Schoemaker, K.J. Isselbacher and V.R. JR. Zurawski: Immunodiagnosis of hepatitis B with high affinity IgM monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1214, 1981.
 36. Shimizu, S.Y., W.A. Present, E.D. Sevier, R.

- Wang and R.L. Saunders: Choriogonadropin measured by use of monoclonal antibodies in a two-site immunometric assay. *Clin. Chem.* **28**, 546, 1982.
37. Sevier E.D., G.S. David, J. Martinis, W.J. Desmond, R.M. Bartholomew and R. Wang: *Monoclonal antibodies in Clinical immunology.* *Clin. Chem.* **27**, 1797, 1981.
 38. Ullmann, E.F.: Fluorescent excitation transfer immunoassay, A general method for determination of antigens. *J. Biol. Chem.* **251**, 4172, 1976.
 39. Rubenstein, K.E., R.S. Schneider and E.F. Ullmann: Homogeneous enzyme immunoassay, A new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 846, 1972.
 40. Potocnjak, P., F. Zavala, R. Nussenzweig and V. Nussenzweig: Inhibition of idiotype-antidiotypic interaction for detection of a parasite antigen: A new immunoassay. *Science* **215**, 1637, 1982.
 41. Heyningen, V.V., D.J.H. Brock and L. Barron: Monoclonal antibodies suitable for immunoassay: Immunoassay for clinical chemistry. Chap **11**, 4, 1982.
 42. Staehelin, T., D.S. Hobbs, H.F. Kung and S. Pestka: Purification of Recombinant human leukocyte interferon (IFLrA) with monoclonal antibodies. *Methods Enzymol.* **78**, 505, 1981.
 43. Hissey, P.H., K.J. Thompson and L. Bawder: Singlestep monoclonal antibody purification of human urogastrone from urine. *J. Immunol. Methods* **78**, 211, 1985.
 44. Krolick, K.A., C. Villemez, P. Isakson, J.W. Uhr and E.S. Vitetta: Selective killing of normal or neoplastic B cells by antibodies coupled to the A Chain of ricin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 5419, 1980.
 45. Raso, V: Monoclonal antibody-ricin A chain conjugate selectivity cytotoxic for cells bearing the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *Cancer Res.* **42**, 457, 1982.
 46. Gilliland, P.G.: Antibody-directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chain to colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 4539, 1980.
 47. Thowbridge, I.S. and D.L. Domingo: Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin antibody conjugate affect growth of human tumor cells. *Nature.* **294**, 171, 1981.
 48. Refsnes, K., S. Olsnes and A Pihl: On the toxic proteins abrin and ricin: Studies of their binding to and entry into ehrlich ascites cells. *J. Biol. Chem.* **249**, 3557, 1974.
 49. Youle, R.J. and D.M. Neville: Anti-thy 1, 2 monoclonal antibody linked to ricin is a potent cell-type-specific toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 5483, 1980.
 50. Blythman, H.E.: Immunotoxins: Hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specification kill tumour cells. *Nature.* **290**, 145, 1981.
 51. Bumol, T.F.: Monoclonal antibody and an antibody toxin conjugate to a cell surface proteoglycan of melanoma cells suppress in vivo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 529, 1983.
 52. Flier, J.S.: Antibodies that impair insulin receptor binding in an unusual diabetic syndrome with severe insulin resistance. *Science* **190**, 63, 1975.
 53. Noda, M: Structural homology of Torpeda californica acetylcholine receptor subunit. *Nature.* **302**, 528, 1983.
 54. Sloan Kettering-Genentech Research Team Sequences human insulin receptor protein: *Genetic Engineering news.* **5**, No 4. 1, 1985.