

## 사람 線維芽細胞 인터페론 (Hu IFN- $\beta$ )에 대한 단 Clone성 항체 생산세포의 조작과 그 성질에 관한 연구

김현수 · 현형환 · 최경희\* · 문홍모\* · 유무영

제일제당 (주) 종합연구소,  
\*유진텍인터내셔널 연구소  
(1986년 3월 5일 수리)

## Preparation and Characterization of Cell Hybrids Producing a Monoclonal Antibody to Human Fibroblast Interferon (Hu IFN- $\beta$ )

H. S. Kim, H. H. Hyun, K. H. Choi\*, H. M. Moon\* and M. Y. Yoo

Cheil Sugar R & D Center Kyong Ki, Korea  
\*Eugene Tech International Co., New Jersey, U. S. A.

(Received March 5, 1986)

In order to prepare the hybridoma cells which produce a monoclonal antibody to human fibroblast interferon (Hu IFN- $\beta$ ), spleen cells from BALB/c mice immunized with the purified Hu IFN- $\beta$  were fused with NS-O cells, a myeloma cell line. Forty hybrids with high titer among 1300 hybrids isolated by an ELISA screening method were subcloned using the soft agarose cloning and limiting dilution methods, and 11 hybrids were selected. As a result of iso-typing the hybrids using the mouse monoclonal typing kit, two hybridomas were found to produce IgG 2a type of monoclonal antibodies. The ascites fluid from nude mice inoculated intraperitoneally with the above hybridomas was removed and purified using a protein A - Sepharose CL - 4B. Monoclonal antibody was proven to have only the heavy and light chains on SDS - polyacrylamide gel electrophoresis.

1975년 Köhler와 Milstein<sup>(1)</sup>에 의하여 밝혀진 hybridoma 기법은 오늘날 고도의 특이성을 갖는 단 clone성 항체를 대량생산할 수 있는 길을 마련하였다.

일반적으로 인터페론의 정제에는 수지 흡착 또는 gel 분획 등의 방법<sup>(2-11)</sup>이 사용되어 왔으나 분자량, 등전점이 유사한 이종 단백질의 혼입을 제거하기가 어려워 치료용 고순도 정제 인터페론의 사용을 어렵게 하여왔다.

본 연구는 항암 및 항바이러스 물질로 효과<sup>(12-17)</sup>가 기대되는 human fibroblastoid interferon (이하 HuIFN- $\beta$ ) 정제에 특이적으로 작용하는 단일항체 생산 세포주를 세포융합법으로 조작하고 그 성질을 조사하여 HuIFN- $\beta$ 의 정제에 사용키 위한 기초 실험 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 면역조작

부분정제된 HuIFN- $\beta$  (specific activity;  $2 \times 10^8$  I. U/mg. protein ← Eugene Tech Int.) 약 1 mg (마리당)을 순계배양된 BALB/c mouse (Eugene Tech Int. ← Albert Einstein Med. school) 5 마리를 사용하여 복강과 꼬리정맥에 Fig. 1 과 같은 방법으로 6 회 투여하고 항체가 (serum titer)가 높은 mouse를 선별하여 그 spleen 세포를 세포융합에 사용하였다.

#### 세포주

Myeloma 세포주는 그 자신의 항체 (Ig)을 생산하지 않는 NS-O 세포주 (Eugene Tech. Int. ← Albert Einstein Med. school ← C. Milstein's Lab.)를 사

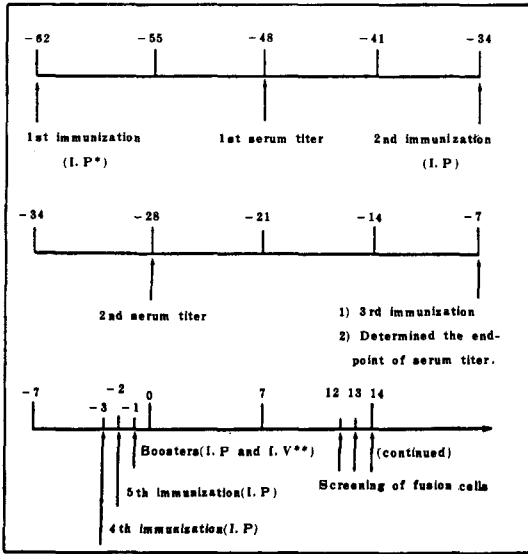


Fig. 1. Time schedule to make hybridoma producing a monoclonal antibody against human interferon.

\* Intraperitoneal, \*\* Intravenous.

용하였다.

**세포융합**

Fazekas등<sup>(18)</sup>이 사용한 방법에 따라 세포융합 하였으며 이때의 spleen 세포농도는 ml당  $1 \times 10^8$  cells, NS-O 세포농도는  $1 \times 10^7$  cells이었으며 50% PEG 4000 (Sigma Chemical Co.)을 가하여 융합시켰다.

**배양배지**

Dulbecco's modified eagle's (Gibco Lab.) 배지를 기본배지로, 10~15% fetal calf serum (Hybridoma Serum, Zeta sera-D; Biological Diagnostic products Co.)을 첨가 사용하였다.

**Soft agarose 배양기**

먼저 monolayer 세포인 MRC-5 세포주(ATCC C-CL 171)를  $\phi$  35 mm 프라스틱 배양기에 약 72시간 배양한 다음 무균적으로 배양액을 제거하고 Table 2에서와 같은 조성의 배지 5 ml씩 분주하여 만든 under layer에 1차 선별된 hybrid를  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  배로 soft agarose 배지에 희석하고 점적한뒤 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 각 clones를 배양하였다.

**ELISA에 의한 항체가 측정**

Alkaline phosphatase가 conjugated된 rabbit anti-mouse 항체 (IgG+IgA+IgM; Zymed Lab. Inc.)를 이용하여 indirect 방법<sup>(19)</sup>으로 반응시키고 Fig. 2에서와 같이 항체를 측정하였으며 microplate auto

reader (MR-600, Dymatech products, U. S. A) 를 이용하여 O. D<sub>400 nm</sub> 에서 O. D치가 1.0 이상인 well 만을 선별하였다.

**Mouse Ig의 형 (type) 결정**

Subcloning이 끝난 hybridoma 생산항체를 각각 iso-typing 하기 위하여 mouse monoclonal iso-typing kit (Hyclone Lab. U. S. A)를 사용하여 각 hybridoma가 생산하는 항체형을 결정하였다.

**Ascites fluid의 생산**

Ascites fluid의 생성을 높이기 위하여 먼저 mineral oil인 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane (Aldrich Chem. Co.)을 1주일 간격으로 2 차에 걸쳐 mouse (Nude (nu/nu) 및 BALB/c) 당 0.25 ml씩 복강에 pretreatment시키고 2 차주사 다음날 10% fetal calf serum이 포함된 DME 배지에서 배양된 cloned cells을 serum free DME로 washing하여 serum free DME 배지 ml당 약  $2.5 \times 10^7$  cells가 되도록 조절한뒤 21gauge 주사기로 마리당 0.25ml씩 접종한 이후 약 7 일째 부터 ascites fluid를 채취하였다.

**Ascites fluid의 준비**

Mouse 복강으로부터 먼저 1 ml 정도의 ascites fluid를 주사기로 뽑고난후 0.2 M-sodium citrate 가 100  $\mu$ l씩 들어있는 plastic tube로 계속 받아서 1차로 4 $^{\circ}$ C, 1200 rpm으로 10분간 원심분리하고 상등액을 다시19000rpm, 30~60분간 원심분리시킨 상등액만을 -70 $^{\circ}$ C에 저장시켜 필요시 사용하였다.

**단일항체의 정제**

Protein A sepharose CL-4B (Pharmacia Co.) 1.5~3 g을 10~20 ml의 TBS 완충액에 넣어 실온에서 1시간 숙성시킨후 TBS 완충액으로 3회 gel 을 washing 하고 5 ml의 gel volume에 충전하여 fraction collector (FRAC-100, Pharmacia Fine Chem. Co)에 장치한 후 전처리한 ascites fluid 5 ml을 TBS 완충액 5 배량에 희석하여 flow rate가 10분

Table 1. Composition of soft agarose medium for cell cloning.

Fetal calf serum	20%
NCTC 109 (Gibco)	10%
Penicillin G (10,000 U/ml) + Streptomycin (10,000 mcg/ml)	1%
Non-essential amino acids (Gibco)	1%
HT	1%
With commercially prepared DME	q. s
Sea plaque agarose (3g/50ml H <sub>2</sub> O)	7.5%

Coat well with 50  $\mu$ l antigen at 1-10  $\mu$ g/ml in PBS  
 ↓  
 2 hrs room temperature.  
 ↓  
 Wash 3X with 0.05% Tween 20/PBS 4°  
 ↓  
 Fill well with 1% BSA/PBS  
 ↓  
 1 hr room temperature.  
 ↓  
 Wash 3X with 0.05% Tween 20/PBS 4°  
 ↓  
 Add 50  $\mu$ l of solution to be assayed and cover well with saran wrap or adhesive paper.  
 ↓  
 1-2 hrs 37° or 4° overnight.  
 ↓  
 Aspirate off liquid.  
 ↓  
 Wash as follows with 0.05% Tween 20/PBS 4°  
 - fill each well, let sit 3-5 minss, aspirate off wash  
 - Do this 3X  
 - Wash by filling and flicking Plate 2-3X (Step #10)  
 ↓  
 Add 50  $\mu$ l of diluted enzyme freshly made in 0.05% Tween 20/1% BSA/PBS.  
 ↓  
 Incubate 1-2 hrs at 37°  
 ↓  
 Wash was above in Step #10. Dry well.  
 ↓  
 Wash rapidly 1X with substrate buffer pH 9.8 (aspirate off buffer quickly as it will dissolve antigen-antibody complexes if left too long).  
 ↓  
 Add 50  $\mu$ l substrate in buffer pH 9.8  
 ↓  
 37° for 30 min-60 mins.  
 ↓  
 Add 50  $\mu$ l 3M NaOH to stop reaction.  
**Fig. 2. Indirect method for assay of antibody.**

당 3 ml 정도 affinity column을 통과하도록 조정하여 ion exchange chromatography 방법<sup>(20, 21)</sup>에 따라 flow-through와 Ig를 분획하였고 Lowry method<sup>(22)</sup>에 따라 분획물의 단백질 함량을 측정하였다.

**전기영동법에 의한 Ig의 확인시험**

SDS-polyacrylamide gel에 의한 전기영동법<sup>(23)</sup>에 따라 시험하였으며 표준 단백질은 Bio-Rad사의 PAGE standard protein을 사용하여 분자량을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**세포융합율**

Spleen 세포와 NS-O 세포를 융합시킨후 96-well

**Table 2. Measurement of antibody titer for hybridoma screening.**

Clome No.	O. D. <sub>410nm</sub>	Clone No.	O. D. <sub>410nm</sub>
4-1-19	1.936	504-3-6	1.801
177-3-59	1.906	551-4-1	OVER (2<)
206-4-3	1.835	761-3-2	1.709
474-4-17	1.481	842-1-16	1.614
479-5-9	1.201	1033-5-16	1.918
677-1-87	OVER (2<)	Control	0.006-0.034

plate 상에서 배양(HAT 함유 DME 배지상)된 hybrids는 1 plate당 58~79 well에서 양성으로 나타나 융합생존 비율은 약 60~80%가 되었다

**Antibody titer 측정**

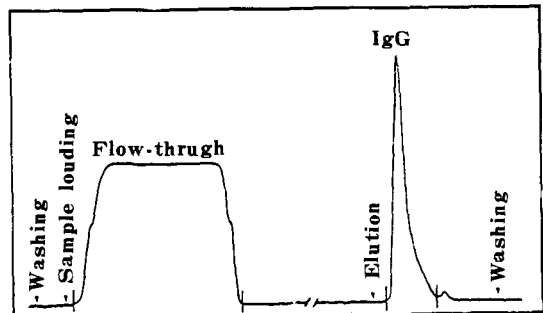
동일조건(배양일수 및 회석배수)에서 최종 선별된 11 clones의 배양 상등액을 ELISA 방법으로 anti HuIFN- $\beta$  항체 titer를 측정한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 전 clones가 높은 농도의 항체를 생성하고 있음을 알 수 있었으며  $5 \times 10^{-3}$ 배의 회석농도 에서도 O. D 치가 0.5 이상을 나타내었다.

**Ig의 sub-typing**

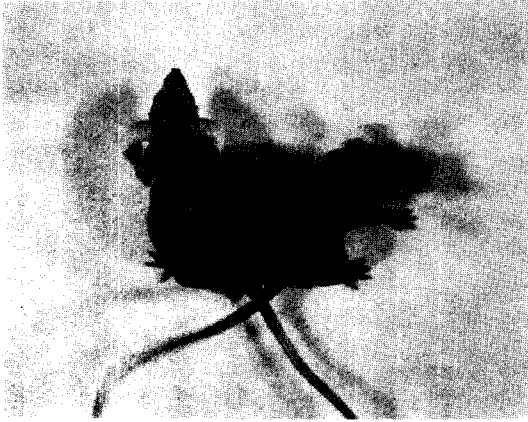
선별된 11 clones의 생산항체형을 결정하기 위하여 96-well plate에 6종의 mouse anti-Ig(IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> 및 IgA)를 각각 coated 시킨후 각 clone 배양 상등액을 반응(substrate에 대한 peroxidase 반응)시켜 확인한 결과 IgM 형이 1 clone, IgG<sub>1</sub> 형이 3 clones, IgG<sub>2a</sub> 형이 가장 많은 5 clones이었고 IgG<sub>2b</sub> 형이 1 clone, IgG<sub>3</sub> 및 IgA 형은 없었으며 IgG<sub>1</sub>과 IgG<sub>2a</sub>를 동시에 가진(nono clone이 아닌) 형으로 각각 분류되었다.

**Ascites fluid의 생산**

항체 생성량이 높은 IgG<sub>2a</sub>형의 clone #4-1-19와 #551-4-1 clone을 이용하여 mouse복강배양된 ascis-



**Fig. 3. Antibody isolation from mouse ascites by protein A-sepharose CL-4B column.**



**Fig. 4. Identification of monoclonal antibodies using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.**

Lanes 4, 5; purified Ig from clone #4-1-19  
Lanes 6, 7; purified Ig from clone #551-4-1  
SDS-PAGE ST; Molecular weight standards  
AS; Isolation from mouse ascites  
FT; Fraction flow-through on protein A affinity column.

tes fluid 량은 nude mouse (nu/nu) 경우 5~10 ml (1~2회 채취)의 ascites fluid를 생성하였으며 BALB/c mouse의 경우 5~8 ml의 (1~2회 채취) 조금 낮은 생성량을 나타내었고 각 clone간의 차이는 없었으며 nude mouse (nu/nu)가 BALB/c mouse 보다 ascites fluid를 양적으로 많이 생성함을 알 수 있었다.

#### 항체 (Ig) 의 정제

전기한 방법으로 protein A-sepharose column에 의하여 flow-through와 Ig 분획을 분리하여 단백질 정량한 결과 ascites fluid 1 ml 당 4~8 mg의 항체를 획득할 수 있었다 (Fig. 3 참조).

#### 전기영동법에 의한 Ig 확인시험

Clone #4-1-19 및 #551-4-1의 복강배양된 ascites fluid를 분획정제한 Ig를 15% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동시킨 결과 heavy chain의 경우 M.W (dalton)는 50000~55000이었고 light chain의 경우 20000~25000 dalton으로 Ig 전체 분자량은 14만~16만 dalton임이 확인되었으며 전기영동상에 타 단백질류가 거의 없는 것으로 보아 정제된 Ig임이 추정되었다 (Fig. 4 참조).

#### 요 약

사람 線維芽細胞 인터페론의 정제에 사용되는 단 clone 성 항체생산 세포주를 조작하기 위하여 BALB/c mouse의 복강과 꼬리정맥을 통하여 HuIFN

- $\beta$ 를 면역화시키고 그 비장세포 (spleen cells) 와 NS-O 세포주를 세포융합 시켰다.

융합된 1300 hybrids를 ELISA 방법으로 선별하고 soft agarose 방법과 limiting dilution 방법으로 subcloning하여 높은 항체를 생성하는 것으로 판명된 11 hybrids를 재선별 하였다. 재선별된 11 hybrids 각각의 항체형 (Ig type)을 조사하고 최종 protein A-sepharose와 친화성이 높은 IgG<sub>2a</sub>형의 clone #4-1-19와 clone #551-4-1을 선별하여 배양된 세포를 각각 nude (nu/nu) mouse 및 BALB/c mouse 복강에 접종배양 하였다. 이들 mouse 복강액으로 부터 얻은 ascites fluid를 protein A-sepharose를 이용한 affinity column 분획으로 항체를 정제하였으며 ascites fluid ml 당 약 4 mg의 정제된 항체를 얻을 수 있었고 SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동시킨 결과 분자량 14~16만 dalton으로 추정되는 항체를 확인할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Köhler G, Milstein C.: *Nature*, **256**, 495-497 (1975)
2. Rama J. Murthy, Albert Hercz: *FEBS Letter*, **2**, 243-246 (1973)
3. C.B. Anfinsen et al: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **8**, p. 3139-3142 (1974)
4. Ernest Knight: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **2**, p. 520-523 (1976)  
John E. Wilson: *Biochem and Biophys. Reserch Communication* **3**, 816-823 (1976)
5. Esa T. Torma, Kurt Paucker: *J. Biol. Chem., U.S.A.* **16**, p. 4810-4816 (1976)
6. G.D. Virca, J. Travis et al: *Anal. Biochem.*, **89**, 274-278 (1978)
7. Kathryn C. Zoon et al: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **11**, p. 5601-5605 (1979)
8. John S. Erickson, Kurt Paucker: *Anal. Biochem.*, **98**, 214-218 (1979)
9. Shin Yonehara et al: *J. Biol. Chem., U.S.A.* **8**, p. 3770-3775 (1981)
10. Thomas Leist, Richard M. Thomas: *Am. Chem. Society.*, **12**, 2541-2546 (1984)
11. H. Strander et al: *J. Clinical Micro.*, p. 116-117 (1975)
12. Suzuo Hash'ichi Nagao et al: *Japan J. Exp. Med.*, **53**, 77-85 (1983)
13. Nobutata Ida, Noriaki Uenishi et al: *Gann.*, **73**, 952-960 (1982)
14. Shin'ichi Nagao, Akiko Tohgo et al: *Gann.*, **74**, 452-458

- (1984)
15. Kazuo Oshimi, Yoko Oshimi et al: *Blood*, **61**, 790-798 (1983)
16. Kazuyuki Ishihara: *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.*, **18**, 41-53 (1983)
17. Shudo Yamajaki: *Japan J. Med. Biol.*, **37**, 209-223 (1984)
18. Fazekas S.G.S, Scheidegger D.: *J. of Immunological Methods*, **35**, 1-21 (1980)
19. Edward T, Maggio Eds: *Enzyme-Immunoassay*, p. 167-178, CRC press Inc., U.S.A. (1980)
20. Pharmacia Fine Chem. AB: *Ion exchange chromatography, principles and method.*, p. 27-54, Pahlms i Lund printed, Sweden (1980)
21. Millipore corporation: *Monoclonal antibody isolation*. p. 1-8, Waters Chroma. Divi. Millipore produ. Divi., printed, U.S.A. (1985)
22. Lowry, O.H., Rosebrugh et al: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
23. Bio-Rad Lab.: *Chromatography Electrophoresis Immunochemistry HPLC*, Bio-Rad catalogue K, p. 161-170, Eastern Region office, N.Y, U.S.A. (1985)