

## Thyroglobulin에 대한 단일클론항체의 제작 및 특성

남경수\* · 손윤희 · 백태선 · 김철호<sup>1</sup> · 임종국<sup>2</sup> · 황철원<sup>3</sup>

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터  
동국대학교 한의과대학 생화학교실<sup>1</sup> 및 경혈학교실<sup>2</sup>  
한동대학교 환경미생물학교실<sup>3</sup>

### Production and characterization of anti-thyroglobulin monoclonal antibodies

Kyung-Soo Nam\*, Yun-Hee Shon, Tae-Seon Baek, Cheorl-Ho Kim<sup>1</sup>,  
Jong-Kook Lim<sup>2</sup> and Cher-Won Hwang<sup>3</sup>

*Department of Pharmacology, College of Medicine and Intractable Disease Research Center,<sup>1</sup> Department of Biochemistry<sup>1</sup> and AM-Pointology<sup>2</sup>, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea  
Department of Enviromental Microbiology<sup>3</sup>, Handong University, Pohang, 791-708, Korea*

#### Abstract

Twelve clones of monoclonal antibodies (mAbs) against thyroglobulin were produced and characterized. Among them, three mAbs (TN-1, TN-2 and TN-3) showed high binding affinity to thyroglobulin. From ELISA inhibition assay, TN-2 showed considerable reactivity with soluble thyroglobulin. TN-2 also reacted with phosphatidylserine which has a negative charge in aqueous condition. These results suggest that TN-2 has characteristics of autoantibody concerned with thyroiditis.

**Key words** – Thyroglobulin, autoantigen, autoimmune disease, anti-thyroglobulin monoclonal antibody

#### 서 론

만성갑상선염(Hashimoto disease)뿐만 아니라 rheumatoid arthritis, 혈전성혈소판감소증자반병(idiopathic thrombocytopenic purpura), SLE (systemic lupus erythematosus) 등은 대표적인 자가면역질환(autoimmune diseases)으로 혈중 자가항체(autoantibody) 혹은 세포성 자가항체가 생성되어 이 항체가 조직에 결합하여 조직장해를 유발하는 매우 무서운 질환이다[8]. 또한 이 질환은 생성된 자가항체가

혈액을 따라 순환하면서 어떤 조직에 가서 자가항원과 결합하여 침착되는가에 따라 뇌손상, 신장결손, 유산, 관절염 및 피부질환등 다양한 병변을 나타내고 있으며 임상적 모든 분야에서 그 발생빈도가 높아져 문제시되어지고 있는 실정이다[1]. 그러나 이 질환의 사회적 심각성 및 발생빈도 증가에 비추어 볼 때 아직 발병원인 및 진단법과 함께 특이적인 치료에 대한 연구는 미약한 실정이다.

Thyroglobulin은 갑상선 상피세포내에 존재하는 단백질로 자가면역성 갑상선염의 경우 혈중 anti-thyroglobulin antibody 혹은 thyroglobulin이 증가하는 autoantigen으로 알려져 있다[3]. 따라서 자가항원인 thyroglobulin에 대한 monoclonal antibody (mAb)를 제작하여 특성을 연구하고

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 054-770-2412, Fax : 054-770-2477  
E-mail : namks@dongguk.ac.kr

이를 이용해서 갑상선염의 진단 및 치료에 응용하는 노력은 매우 중요한 일이다.

본 연구에서는 갑상선기능저하증을 중심으로 한 자가면역질환의 치료에 미치는 복합생약처방의 효과를 규명하기 위한 연구의 일환으로 먼저 자가면역성 갑상선질환시 나타나는 anti-thyroglobulin mAbs를 제작하고 그 특성을 살펴 보았다.

## 재료 및 방법

### 시약

실험에 사용한 RPMI-1640, antibiotic/antimycotics, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, phosphatidylcholine, phosphatidylserine 및 phosphatidylethanolamine, bovine serum albumin, thyroglobulin (bovine)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA), fetal bovine serum은 제일생명공학서비스(대구, 한국)에서, biotinylated anti-mouse Igs 및 HRP-streptavidin는 ZYMED사(San Francisco, CA, USA), 그리고 기타 필요한 모든 시약은 특급제품을 사용하였다.

### 항체의 제작

대한실험동물센터(충북, 음성)에서 구입한 Balb/c 마우스(6wk · ♂)를 사용하였으며, 마우스 한 마리당 20 µg씩 thyroglobulin을 complete Freund's adjuvant와 충분히 혼합한 뒤 복강내로 주사하였다. 추가면역(20 µg/mouse)은 incomplete Freund's adjuvant로 2주 간격으로 2번 행한 뒤 세포융합 3일 전 마지막으로 추가 면역을 하였다(10 µg/mouse). 그 후, Balb/c 생쥐에서 비장을 적출 한 다음 Balb/c 마우스계의 myeloma cell line인 PAI세포와 융합하였다. 이하 자세한 방법은 Milstein 및 Kohler의 원법을 비교적 온화한 방법으로 변조한 Nam등의 방법[4]에 따라 행하였다.

### 항체의 스크리닝

항체의 검출은 먼저 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)법으로 행하였다[10]. 항원(thyroglobulin, 5 µg/ml)을 96 well plate (Nunc. Inter Med.사)에 4℃에서 밤새 흡착시키고 3% BSA-PBS로 2시간 blocking하였다. Plate를 세

척한 뒤 배양상층액을 넣어 2시간 실온에서 배양하고 다시 biotin화 된 anti-mouse Igs (ZYMED Lab.) 로 2시간 및 HRP-streptavidin (ZYMED Lab.)으로 1시간 반응시킨 다음 o-phenylenediamine을 기질로 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 세척 완충액으로는 PBS-Tween (0.05%)을 사용하였다.

### ELISA 저해시험

기본적인 방법[5]은 ELISA와 동일하나 미리 실온에서 항체와 수용액 상태의 thyroglobulin을 농도별로 2시간 반응시킨다. 반응 후 이 반응액을 thyroglobulin (5 µg/ml)를 흡착시켜 놓은 96 well plate에 넣어서 ELISA법과 동일한 방법으로 행한다. 이때 동일 농도로 희석시킨 항체만을 넣은 well의 흡광도를 0%로 하여 각 well의 흡광도를 % inhibition으로 계산하여 나타내었다.

### 인지질에 대한 교차반응성 측정

Phosphatidylcholine, phosphatidylserine 및 phosphatidylethanolamine을 absolute EtOH에 녹이고(10 µM) 각 50 µl씩 96 well microtiter plate에 넣은 다음 밤새 방치한다. 그 후 3% BSA-PBS로 2시간 blocking시키고 위에서 동정한 3클론의 배양상층액을 50 µl씩 가한 다음 이하 반응은 위 ELISA법과 동일한 방법으로 진행하였다.

## 결과 및 고찰

2번의 세포융합을 통해 thyroglobulin과 반응하는 클론 12개를 얻을 수 있었다. ELISA 결과 항원으로 사용한 thyroglobulin과 반응하는 3 클론(TN-1, TN-2 및 TN-3)을 얻었으며 이들 clone 모두 다 비교적 thyroglobulin과 높은 친화성을 가짐을 알 수 있었다. 그중 비교적 반응성이 강한 3클론에 대한 반응성을 Fig. 1에 나타내었다.

이들 clone중 thyroglobulin의 3차원적인 구조를 인식할 수 있는 결합특이성을 가진 클론을 찾기 위해 항원-항체와의 반응을 soluble thyroglobulin이 어느정도 저해하는가를 알아보기 위해 ELISA 억제실험을 행하였다. 그 결과 3 clone 중 1 clone (TN-2)이 soluble thyroglobulin의 농도에 비례해서 plate 바닥에 흡착된 항원과의 결합이 억제됨을

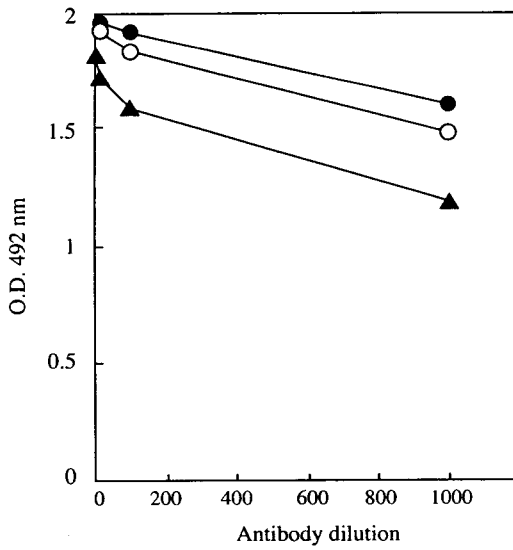


Fig. 1. Reactivities of TN-1, TN-2 and TN-3 with thyroglobulin.

Microtiter plates were coated with 5 $\mu$ g of thyroglobulin. TN-1 (○), TN-2 (●) and TN-3 (▲) were detected with biotinylated anti-mouse Igs and streptavidin-conjugated peroxidase.

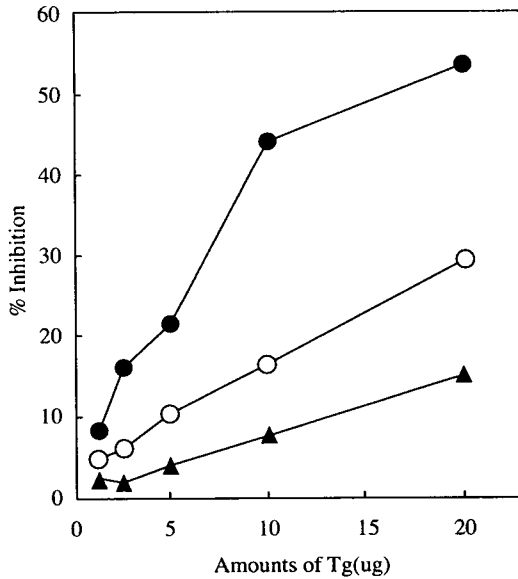


Fig. 2. ELISA inhibition assay of TN-2 by soluble thyroglobulin.

The antibodies, TN-1 (○), TN-2 (●) and TN-3 (▲), were preincubated with serial diluted thyroglobulin(Tg, 20 $\mu$ g~/ml) and the mixtures were transferred to the microtiter wells coated with thyroglobulin. After incubation, the monoclonal antibodies bound was detected with biotinylated anti-mouse Igs and streptavidin-conjugated peroxidase.

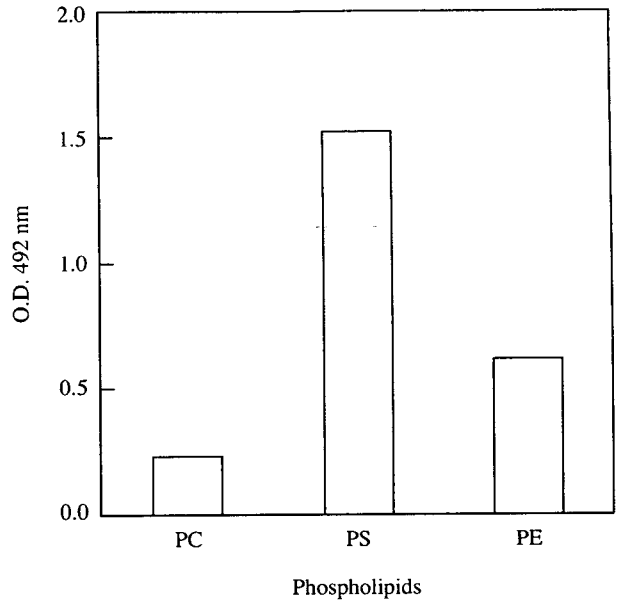


Fig. 3. Cross reactivity of TN-2 with phospholipids

The wells of microtiter plates were respectively coated with 50 $\mu$ l of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) in ethanol (10 $\mu$ M) by evaporation at room temperature. The antibody bound was detected by biotinylated anti-mouse Igs and streptavidin-conjugated peroxidase.

알았다(Fig. 2). 이는 TN-2가 thyroglobulin을 인식하는 항체를 더욱 시사하고 있다.

TN-2의 자가항원 결합특성을 알아보기 위해 자가항원으로 알려진 phosphatidylcholine, phosphatidylserine 및 phosphatidylethanolamine과의 반응성을 검토하였다(Fig. 3). 그 결과 3종류의 인지질중 phosphatidylserine과는 교차반응성을 나타내었다. 이러한 사실은 TN-2가 thyroglobulin을 포함한 자가항원과 반응하는 항체로 나타났으며, 단백질인 thyroglobulin 과 phosphatidylserine과의 구조유사성이 전혀 없는 점으로 미루어 보아 본 항체는 단백질 및 phosphatidylserine구조 중 전하를 띠는 부분을 공통적으로 인식할 것으로 판단되어진다[6].

이전에 Rauch등은 anti-cardiolipin mAb가 DNA와 결합함을 보고하였고[7] 또한 phosphatidylinositol phosphate 및 cholesterol에 대한 항체들이 각각 nucleic acid와 교차반응성을 나타냄을 보고한 적이 있다[9]. Igarashi등은 phosphatidylserine에 대한 단일클론 항체중 그 일부가

lupus anticoagulant 활성 및 DNA결합성을 가지는 이른바 병원체 항체(pathogenic antibody)와 같은 성질을 가지고 있음을 보고하였다[2].

그러므로 TN-2가 기존에 확립된 anti-phosphatidylcholine mAb[4] 및 anti-phosphatidylserine mAb[2]와의 공통성 및 자가항원에 대한 반응특이성을 알아보기 위해 single strand-DNA, double strand-DNA 및 다양한 전하를 가진 인지질들과의 반응성에 대해서도 검토 할 계획이다. 또한 갑상선기능저하증 치료법으로서 지금까지 본 연구실에서 연구하여 왔던 천연물(30여종)들중 항염증 효과를 기준으로 새로운 감공탕약침액을 처방하고, 갑상선기능저하증을 중심으로 한 자가면역질환의 치료에 미치는 효과를 규명하는데 본 항체를 도구로 사용할 수 있다고 생각된다. 안전성 평가 후 직접 자가면역성 갑상선기능저하증에 적용하여 치료효과를 병행 할 예정이다.

## 요 약

Thyroglobulin과 반응하는 monoclonal antibody를 3클론(TN-1, TN-2 및 TN-3)을 확립하였다. 이들 중 1클론(TN-2)은 thyroglobulin의 3차원적인 구조를 인식하면서 음전하를 띠는 자가항원의 일종인 phosphatidylserine과도 교차반응성을 나타내었다. 따라서 TN-2를 이용한 자가면역성 갑상선염의 진단 및 치료에의 적용효과가 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Harris, E.N., R.A. Asherson and G.R.V. Hughes. 1988. Antiphospholipid antibodies-autoantibodies with

a difference. *Ann. Rev. Med.* **39**, 261-271.

2. Igarashi, K., M. Umeda, S. Tokida, K.S. Nam and K. Inoue. 1991. Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse. *THROMBOSIS RESEARCH* **61**, 135-148.

3. Moriyama, K., T. Akamizu, M. Umemoto, M. Miura, M. Saijo, K. Taniguchi and K. Nakao. 1999. A case of Hashimoto's thyroiditis with markedly elevated serum thyroglobulin and evidence of its influence on the measurement of anti-thyroglobulin antibody by highly sensitive assay. *Endocr. J.* **46**, 687-693.

4. Nam, K.S., K. Igarashi, M. Umeda and K. Inoue. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies that specifically bind to phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **1046**, 89-96.

5. Nam, K.S., J.W. Kim, M.J. Choi, M.Y. Han, I.S. Choe and T.W. Chung. 1993. Production and characterization of monoclonal antibody that simultaneously recognizes methamphetamine and its major metabolite *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 490-492.

6. Nam, K.S. 1992. Production mechanism of anti-phospholipid antibody and analysis of its recognition profile. *Korean J. Immunol.* **14**, 187-192.

7. Rauch, J., H. Tannenbaum, B.D. Stollar and R.S. Schwartz. 1984. Monoclonal anti-cardiolipin antibodies bind to DNA. *Eur. J. Immunol.* **14**, 529-534.

8. Shlomchik, M.J., A.H. Aucoin, D.S. Pisetsky and M.G. Weigert. 1987. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9150-9154.

9. Stollar, B.D., T. Mcinerney, T. Gavron, N.M. Wassef, G.M. Swartz and C.R. Alving. 1989. Cross-reactions of nucleic acids with monoclonal antibodies to phosphatidylinositol phosphate and cholesterol. *Mol. Immunol.* **26**, 73-79.

10. Umeda, M., K. Igarashi, K.S. Nam and K. Inoue. 1989. Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine : stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody. *J. Immunol.* **143**, 2273-2279.

(Received June 15, 2002; Accepted August 19, 2002)