

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C07K 15/00
C12P 21/08
A61K 39/375

(45) 공고일자 1994년03월 14일
(11) 공고번호 특1994-0002033

(21) 출원번호	특1990-0701945	(65) 공개번호	특1991-7000266
(22) 출원일자	1990년08월30일	(43) 공개일자	1991년03월14일
(86) 국제출원번호	PCT/US 89/005851	(87) 국제공개번호	WO 90/07524
(86) 국제출원일자	1989년12월28일	(87) 국제공개일자	1990년07월12일

(30) 우선권주장	07/292,447	1988년12월30일	미국(US)
(71) 출원인	오클라호마 메디칼 리써치 화운데이션 윌리엄 지. 투르만 미합중국 오클라호마 73104 오클라호마시, 13번가 825 엔. 이.		
(72) 발명자	에스몬, 찰스 티 미합중국 오클라호마 73111 오클라호마시, 5800 노스 스톤웰 에스몬, 나오미 엘 미합중국 오클라호마 73111 오클라호마시, 5800 노스 스톤웰		
(74) 대리인	문창화		

심사관 : 정상섭 (책자공보 제3564호)

(54) 단백질 C에 대해 특이성이 있는 단클론성 항체 및 항체의 분리방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

단백질 C에 대해 특이성이 있는 단클론성 항체 및 항체의 분리방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 단백질 C의 개략도로서 무거운 사슬과 가벼운 사슬이 하나의 디설피드(disulfide) 결합에 의해 결합되었음을 보여주고 Gla-영역, 성장인자-유사영역, 세린 단백질분해효소영역 및 활성펩티드 영역을 나타내고 있다.

제2도는 펩티드 P(6-17)가 존재할 때와 존재하지 않을 때 HPC-4의 고유형광의 금속이온에 의존하는 변화를 나타내는 그래프, 즉 F/Fo 대 금속 이온농도(mM)를 그린 것이다. 2μM P(6-17)의 존재 또는 부재하에서 1μM HPC-4를 금속이온들로 적정하였다. 트립토판 방출변화가 탐지되었다. Fo는 첨가 금속이 없을 때의 HPC-4 방출피크면적(±펩티드)을 나타낸다. ○와 ●는 각각 HPC-4나 HPC-4+펩티드를 Ca²⁺로 적정한 것이고, ■와 □는 각각 HPC-4나 HPC-4+펩티드를 Mg²⁺로 적정한 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 일반적으로 혈장단백질, 특히 단백질 C에 대한 항체와 그 사용방법에 관한 것이다.

단백질 C는 세린단백질분해효소에 대한 비타민 K-의존성 혈장단백질효소원(Zymogen)으로서, 활성화 되었을 때 강력한 항응고제로 된다. 활성화된 단백질 C는 응혈촉진제의 조인자들인 인자 VIIIa와 인자 Va를 특이적으로 분해한다. 이 활성화에는 또 다른 단백질 K-의존성 단백질인 단백질 S, 칼슘과 인지질(추축컨데 세포의) 표면의 존재가 요구된다. 제1도는 Hemostasis and Thrombosis : Basic Principles and Clinical Practice, 2nd, ed., Colman, R.W., 등 P.263(J.B. Lippincott, Philadelphia, PA 1987)에서 인용한 것으로 단백질 C는 2개-사슬 형태로 순환하는데, 더 크고 무거운 사슬은 더 작고 가벼운 사슬에 단일의 디설피드 결합으로 연결되어 있다. 단백질의 작은 일부도 역시 단일 사슬형태로 순환하는데, 여기서는 분자내 리신-아르기닌 디펩티드가 가벼운 사슬을 무거운 사슬에 직접 연결한다. 단백질 C는 활성화되어 활성화된 단백질 C(APC)가 된다. 트롬빈은 무거운 사슬내의 아르기닌¹²-리신¹³ 결합을 특이적으로 분할하여 단백질 C를 활성화시키는 능력이 있다. 칼슘

의 생리적 농도가 존재하는 생체내에서는, 트롬빈이 내피세포(endothelial cell) 조인자인 트롬보모듈린(thrombomodulin)과 결합되었을 때 이 활성화율은 현저하게 증가된다.

Matschiner 등, Current Advances in Vitamin K Research, PP. 135-140, John W. Suttie, ed.(Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1988)에는 응혈에 있어서 비타민 K 의존성 단백질의 역할에 관해서 좀 더 언급되어 있다. 단백질 C는 생체내에서 커다란 중요성을 지니고 있음을 보여준다. 단백질 C, 또는 그것의 조인자인 단백질 S가 결핍된 환자들은 현저한 혈전증적 경향들을 나타낸다. 단백질 C가 완전하게 결핍되어 출생한 신생아들은 광범위하게 퍼져있는 맥관내의 응혈현상(DIC) 및 치료되지 않으면 생후 수주일내에 죽음에 이르는 괴사 증후군(necrotic syndrome)을 나타낸다. 또한 테일러 등이 J. Clin Invest. 79, 918-825(1987)에 언급한 바와 같이, 활성화된 단백질 C는 내독소충격(endotoxin shock)의 응혈이상 증적 및 치사적 효과로부터 동물들을 보호하는 것으로 나타나고 있다.

키시엘이 J. Clin. Invest. 64, 761-769(1979)에서 처음 보고한 바와 같이, 단백질 C는 원래 바름시 트레이트 흡착과 용출, 황산암모늄 분별(fractionation), DEAE-세파덱스 크로마토그래피, 맥스트란 설페이트 아가로즈 크로마토그래피 및 에비폴리아크릴아미드겔 전기영동을 포함하는 고전적 단백질 정제기술을 이용해서 혈장으로부터 반-정제된 형태로 분리되었다. 이 방법은 스테아른즈 등이 J. Biol. Chem. 263(2), 826-832(1988)에서 설명한대로 HPC-4로 지정된 단백질 C에 대한 독특한 항체를 발견함으로써 해서 크게 개선되고 쉬워졌다. 1986년 호주, 멜보른 [Develop. Biol. Standard., 67, 51-57(S. Karger, Basel, 1987)에 보고됨]에서 개회된 응혈인자를 포함하는 혈액 분별에 있어서 표준화에 관한 연합 IABS/CSL 심포지움에서 에스몬 등에 의해서 상술된 바와 같이, 단백질 C는 희석된 헤파린화 혈장의 QAE 세파덱스(Sephadex)에 배치흡착, 완충된 0.15M NaCl로 세척, 0.5M NaCl로 용출, 칼슘 재첨가, HPC-4로 배치(batch) 흡착, Ca^{2+} 를 포함한 완충액으로 세척, 그리고 EDTA를 포함하는 완충액으로 단백질 C를 용출시키는 방법으로 인체 혈장으로부터 분리될 수 있다.

HPC-4는 인체 단백질 C에 대한 칼슘 의존성 단클론성 항체(monoclonal antibody)이다. 이 항체에 의해 인식되는 항원결정기(epitope)가 밝혀졌는데, 그것은 트롬빈 분해위치에 걸쳐있는 단백질 C 효소 원내의 아미노산의 배열에 해당한다. 활성화된 단백질 C는 HPC-4에 의해서 인식되지 않는다.

인체 단백질 C에 대한 몇가지 항체들이 보고되었는데 예를들면, 라우렐 등, FEBS Letts. 191(1), 75-81(1985); 와카바야시 등, J. Biol. Chem. 261, 11097-11105(1986); 슈고 등, Thromb. Hemost. Abstrs., Brussels, 229(1987); 그리고 올린 등, J. Biol. Chem. 262, 13798-13804(1988)에 보고되어 있다. 이들중 일부는 칼슘 의존성인데, 예를들면 라우렐등에 의해 보고된 항체들중의 하나가 그것이다.

그러나 공표된 보고서들로부터 판단하는 한, 이 의존성은 칼슘이 단백질 C의 가벼운 사슬에 결합해야 하는 조건에서 비롯되며, 그 항체들은 가벼운 사슬상의 항원 결정기를 인식한다. 다른 항체들은 무거운 사슬상의 트롬빈 분해위치 주변영역을 인식하는 반면, 칼슘의존성이 없는데 이들중에는 올린 등이 묘사한 HPC-4 항체도 포함된다. 올린등의 HPC-4 항체는 Ca^{2+} 의존성 및 활성부위에 대한 작용성 모두를 갖춘것은 아니기 때문에, 본 발명의 항체와는 다르다.

단백질 C의 Ca^{2+} 결합영역에 결합하는 다른 항체들중에는 단백질 C만을 인식하고, 활성화된 형태는 인식하지 않는 것은 아무것도 없다. 활성화된 단백질 C에 의해 오염되지 않은 순수한 단백질 C만이 요구되는 상황도 있을 수 있는 바, 특히 단백질 C의 활성화를 억제하기 위해 항체를 치료학적으로 사용하는 경우가 그러하다.

본 발명의 항체의 사용과 더욱 최근에 와서는 그들의 성질들이 문헌상에 보고되어 있지만, 불행하게도 이 항체는 분리, 진단상 또는 치료학적 방법론에서 공공연히 이용할 수는 없는 실정이다.

그러므로, 본 발명의 목적은 단백질 C의 활성부위에 결합하는 Ca^{2+} 의존성 항체를 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 금속의존성 친화 크로마토그래피에 의하여, 금속과 결합되지 않은 다른 펩티드 또는 단백질의 분리용으로 Ca^{2+} 의존성 항체의 영역을 사용하기 위한 방법과 수단들을 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 이 Ca^{2+} 의존성 항체를 치료학적 목적으로 사용하기 위한 방법과 수단을 제공하는 것이다.

본 발명의 마지막 목적은 이 Ca^{2+} 의존성 항체들, 이들의 유도체들 및 결합체들(conjugates)을 진단 목적으로 제공하는 것이다.

본 발명을 간추리면 다음과 같다.

본 발명의 Ca^{2+} 의존성 단클론성 항체는 사람, 돼지, 비비 및 개과의 단백질 C를 포함한 비우형(non-bovine)의 단백질 C의 활성부위에 있는 특정의 12개 펩티드 배열(E D Q V D P R L I D G K)과 특이적으로 결합한다. 이 항체는 활성화된 단백질 C와 결합하지 않으며, 트롬빈-트롬보모듈린에 의해서 단백질 C가 활성화되는 것을 억제하는데 사용될 수 있다. 이 항체는 고정된 기질에 상기의 펩티드 배열을 결합시킨 친화 크로마토그래피를 사용하여, 세포배양 또는 복수액으로부터 대량으로 분리시킬 수 있다.

이 항체는 진단제로서 그리고 단백질 C의 활성을 예방하는 치료제로서, 단백질 C의 분리와 특성파악에 있어서 특별한 용도를 많이 지니고 있다. 단백질 C는 자연적으로 생산되거나 또는 재조합 유전자의 발현으로 제조될 수 있다. 단백질 C의 정제에 있어서 이 항체의 잇점들로는, 단백질 C에 대한 특이성이 있으나 활성화된 단백질 C에 대해서는 특이성이 없다는 점 및 크로마토그래피의 지지물

(support)에 항체를 고정화시킬 때 밝혀진 항원결정기 및 칼슘을 이용하여 항체에 있는 항원결합 위치를 보호할 수 있다는 점이 포함된다.

생체내에서 이 항체는 중앙성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 더 나아가, 이 항체, 단백질 S 항체들, C4B 결합단백질들은 단독으로 또는 서로 조합하면 높은 수준의 인자 VIII 억제물들, 혈우병, 혈소판 결핍증(혈소판 감소증)을 가진 환자들 및 혈액응고의 증가가 요구되는 다른 응혈질환들에 있어 혈액응고를 촉진시키는데 효과적일 수 있다.

뿐만 아니라, 상기에 정의된 항원결정기를 대규모적인 항체의 정제에 사용하는 것 및 바이러스성 불활성화 공정들에 대한 항체의 안정성은 이전에 밝혀진바가 없다.

본 발명을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

단클론성 항체, HPC-4를 독특한 유용성이 있게 만드는 성질로는 다음과 같은 것이 있다.

이 항체는 단백질 C와는 결합하지만 활성화된 단백질 C(APC)와는 결합하지 않되 오직 칼슘의 존재하에서만 결합한다. 따라서, 친화지시물상에 항체가 고정되면 단백질 C는 혈장-유도 원(plasma-derived sources) 또는 조직배양 발현 시스템으로부터 매우 순한 조건하에서 분리될 수 있다. 이는 생성물의 생물학적인 활성 및 고품 지지체 수지의 안정화 유지에 중요하다. 활성화된 단백질 C는 어떠한 조건하에서도 결합되지 않기 때문에 최종 생성물에는 APC가 전혀 존재하지 않는다.

이 항체는 생체내에서 단백질 C상의 활성위치에 결합하므로 항 응혈 단백질 APC의 생성을 방지하는데 사용될 수 있다. 이것은 APC와 결합하지도 않고 이를 억제하지도 않기 때문에, 생체 내에서 억제 효과는 APC의 투여에 의해 반대로 될 수 있다.

이 항체는 무거운 사슬의 6과 17 사이의 잔기를 안에 있는 단백질 C의 정의된 영역, 상세히 말하면 E D Q V D P R L I D G K에 결합한다. 이 펩티드는 고품 지지수지상에 직접 고정될 수 있고, 생쥐 복수 또는 조직배양 상정액으로부터 항체를 고농도로 분리하는데 사용될 수 있다. 이런 접근은 항체를 매우 희박한 용액에서조차 높은 수율 및 극히 순수한 형태로 분리할 수 있게 한다.

항체를 고품 지지 펩티드로부터 분리하는 방법으로는 칼슘이온을 제거하거나, 필요하다면 1.5M 구아니딘을 사용함으로써 정제된 단클론성 항체의 기능을 손상시키지 않는 방법이 있다. 구아니딘은 관리기관에 의해 합당한 바이러스 불활성화제인 것으로 인식되기 때문에 이것은 중요할지 모른다. 이 시약으로 용출 또는 처리한 후의 이 항체는, 단클론성 항체 생산에 사용된 생쥐들로부터 얻은 복수액 또는 하이브리도마(hybridoma)의 조직배양이 사용되었을 경우의 배양의 상정액에 존재할지 모르는 어떤 살아있는 바이러스도 포함하지 않을 것이다. 따라서, 단백질 C를 제조하는데 사용된 항체로부터 단백질 C 생성물 내로 바이러스가 도입되지는 않을 것이다.

이 항체는 사람, 돼지 그리고 개에서 기원된 단백질 C는 인식하지만 소에서 기원된 경우는 인식하지 못한다. 따라서, 송아지 태아혈청에 존재하는 단백질 C는, 인체의 단백질 C 생산물을 오염시키지 않으면서도 재조합 기술을 통해 단백질 C를 생산하는 세포들을 성장시키는데 사용될 수 있다.

본 발명의 단클론성 항체는 하이브리도마 HPC-4에 의해 분비되고, 이는 아래와 같이 생산된다 :

[단클론성 항체의 생산]

BALB/c 생쥐들에게 완전한 프로인트 보조제(Freund's adjuvant)내의 정제된 인체단백질 C(HuPC) 50-100 μ g를 복강내로 주사한다. 3주 후에 이 생쥐들을 불완전한 프로인트 보조액에 유화시킨 HuPC로, 그리고 6주후에 TBS(0.1M NaCl 0.02M Tris-HCl, PH 7.5)내의 HuPC로 다시 면역시킨다. 4일이 더 지나면 가장 세포들은 35% 폴리에틸렌 글리콜 1450을 사용하고, 표준기술들[라울렐, M., K. 이케다, S. 린드그렌, J. 스텐폴로, FEBS Letters 191, 75-81(1985); 와카바야시, K., Y. 사카다, N. 아오끼, J. Biol. Chem. 261, 11097-11105(1986); 보레백, C.A.K., M.E. 에트즐러, J. Biol. Chem. 256, 4723-4725(1981); 콜러, G., C. 밀스테인, Nature 256, 495-497(1975) 참조]에 따라 생쥐 골수종 세포주(mouse myeloma cell line) P3X63AG8-653과 융합시킨다. 세포들은 하이브리도마들을 선택하기 위해 HAT 배지에서 성장시킨다. 4주 후에, 융합된 세포의 상정액(supernatant)은, 5mM Ca²⁺ 존재하 그리고 부재하에서 고체상의 효소결합 면역흡착 시료분석방법(solid-phase enzyme-linked immunoadsorbent assay)에 의해서 항체 생산을 위한 선별(screen)을 한다.

배양 상정액은 분석을 위해서 5mM CaCl₂ 또는 5mM EDTA를 포함하는 완충액을 첨가시켜 1 : 4로 희석시킨다. 모든 시약들(항원, 세척용 완충액, 검출항체들)은 적당한 칼슘 또는 EDTA 농도를 가진다.

단백질 C와의 반응성을 근거로 해서 결정된 대로, 관심있는 양성클론은 희석을 제한함으로써 쥐 복막 내장세척 공급세포들 상으로 적어도 2번, 재클론된다.

BALB/c 생쥐에 복수생성을 유도하기 위해서 처음으로 프리스탄(pristane)을 주입시키고, 14일 후에 이 동물들의 면역을 저하시키기 위해서 10mg/ml 사이클로포스파미드 0.1ml을 복강내로 주사한다. 74시간 후, 3-6 $\times 10^6$ 세포들이 복강내로 주사된다. 7-10일 후, 복수가 수집되고, HPC-4 단클론성 항체들이 복수로부터 정제된다. 보통 복수 ml당 항체 8-15mg이 존재한다. 3가지 다른 방법들이 이 항체를 정제하는데 사용될 수 있는데, (1) NH₄SO₄ 분별 후 QAE-세파덱스 크로마토그래피; (2) 인체 단백질 C에 대한 아피-겔(Affi-Gel) 15 친화 크로마토그래피; 또는 (3) HPC-4가 인식하는 펩티드 즉, E D Q V D P R L I D G K(글루탐산-아스파르트산-글루타민-발린-아스파르트산-프롤린-아르기닌-류신-이소류신-아스파르트산-글리신-리신)에 대한 친화 크로마토그래피이다.

대체적 방법으로, 선택된 하이브리도마는 실험실 배양용기 내의 실험관 속에서 증식시킬 수 있으며, 선택된 항원에 대한 단클론성 항체는 데칸테이션(decantation)으로 수확하고 복수에 대해 설명한 것과 같은 방식으로 정제될 수 있다. 항원결정기 친화수지도 역시 하이브리도마 조직배양 상정액으로부터 HPC-4를 분리하는데 사용될 수 있다. 이 물질은 직접 컬럼에 적용된다. 지수적으로 증가하는

배양에 있어서 이 항체의 농도는 약 25 μ g/ml이다.

단클론성 항체 HPC-4는, 복수액으로 부터 NH₄SO₄ 분별(복수를 물로 1 : 1로 희석시킨 다음, 동등한 부피의 포화된 NH₄SO₄ 를 첨가해서 침전시킴)을 행하고, QAE-세파덱스 Q-50상에서 크로마토그래피(황산 암모늄 침전물을 원심분리로 수집해서, pH 6.3인 0.027M 트리스 PO₄ 속에서 염분을 제거시키고, 1ml수지/ml 복수의 비율로 컬럼상에서 크로마토그래피를 행하는데, pH 6.3인 0.027M 트리스 PO₄ 에서 평형상태(equilibration)로 유지시키고, 농도구배가 0에서 0.4M인 NaCl을 컬럼부피의 5배로 하여 약 8시간에 걸쳐 전개시킴)을 한 다음, 50% NH₄SO₄로 항체를 침전시키고 pH 7.5인 0.1M NaCl 1mM MOPS 속에서 세파덱스 G200 컬럼 크로마토그래피를 행하여 정제한다.

이 항체는 또한 HuPC-아피-겔(Affi-Gel) 또는 펩티드-아피-겔 친화 크로마토그래피로 분리시킬 수 있다. HPC-4에 의해 인식되는 항원결정기는 단백질 C의 무거운 사슬상의 활성영역내에 있는 12개의 펩티드 배열, E D Q V D P R L I D G K, 또는 면역학적으로 유사한 배열이다. 이 펩티드는 아피-겔 15와 결합해서 약 1.0mg/ml의 최종 농도로 된다. 항원결정기 펩티드의 결합은, 제조업자(Bio-Rad, 리치몬드, 캘리포니아)에 의해 설명된 바와 같이, 4 $^{\circ}$ C, 0.1M NaCl, 0.1M MOPS 속에서 이루어진다. 아피-겔은 사용되기 바로전에 얼음처럼 차가운 물로 세척하여 유기용제를 제거한다. 항원결정기 펩티드는 0.1M NaCl, 0.1M MOPS, pH 7.5인 용액 1ml당 1-2mg 농도로 준비되며, 충분한 아피-겔 15와 혼합시켜서, 펩티드 대 겔의 최종 비율이 1mg/ml가 되도록 한다. 펩티드와 겔을 완만한 락커(rocker)상에서 밤새도록(12-18시간) 혼합시켜서 겔에 펩티드를 결합시킨다. 결합반응이 종결된 후에 수지를 유리컬럼에 부어넣고, pH 7.5의 0.1M NaCl 0.01M MOPS로 세척한 100ml의 수지는 HPC-4를 최소한 1.5g 수용할 수 있다.

인체 단백질 C는 동일한 방법으로 아피-겔에 결합될 수 있다. 상기에서 언급된 3내지 5mg 단백질 C/ml의 완충액을 충분한 아피-겔 15와 혼합시켜서, 인체 단백질 C 대 겔의 최종비율이 3-5mg 단백질/ml 겔이 되도록 한다.

복수액으로 부터 염분을 제거시킨 황산 암모늄 부분을 항원결정기 친화 컬럼에 싣고 이 컬럼을 적어도 컬럼부피 4배의 0.4M NaCl, 0.02M 트리스 HCl, 1mM CaCl(pH 7.5)로 세척한다. 그 다음 HPC-4는 2M NaCl, 0.02M 트리스 HCl, 2mM EDTA 또는 2M NaCl, 1.5M 구아니딘 HCl, 0.02M 트리스 HCl, 2mM EDTA를 사용하여 컬럼에서 용출시킬 수 있다. 후자의 잇점은 보다 높은 농도로 훨씬 더 날카로운 피크로 용출된다는 것으로서, 200ml의 복수액이 100ml 컬럼의 수지에 적용되었을 때, 보다 높은 25mg/ml 농도를 보인다. 이 항체는 이들 조건하에서 용출된 후에는 항원결정기와 결합하는 능력의 95% 이상을 그대로 유지한다. 그 다음 HPC-4는 또다른 응용을 위해서 투석시키거나 적당한 완충액으로 염분을 제거한다. SDS 겔 전기영동을 해보면 HPC-4의 오염물질은 전혀 검출되지 않는다. 만약 컬럼이 용량보다도 과중하게 충전되었다면 돌파(break through) 물질을 컬럼에 다시 적용해서 부가적인 HPC-4를 얻을 수 있다.

HPC-4 항체는 22 $^{\circ}$ C에서 최소한 2.6M 까지의 구아니딘에 대해 또는 2M의 포타슘 티오시아네이트에 대해 최소한 2시간 동안은 안정하고, 이러한 조건들 아래 처리된 후에도 항원결정기에 결합하는 능력의 95% 이상을 그대로 유지하고 있다. 펩티드 친화컬럼에서 용출시킨 후 이들 시약들 중 어느 하나로 처리시키면 항체를 포함하는 출발용액에 존재할지 모르는 어떤 바이러스성 인자도 불활성화되고, 최종 단백질 C 생성물은 이것을 제조하는데 사용된 항체로 부터 유래된 바이러스에 오염되지 않도로 보장된다.

본 발명의 단클론성 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주는 HPC-4로 지정되었으며, 1988년 11월 2일 메릴랜드주 록크빌 소재의 American Type Culture Collection; ATCC번호 HB 9892로 기탁되었다. 특허가 허여되면 이 기탁물은 일반이 이용할 수 있다. 그러나, 이 기탁물을 이용할 수 있다고 하여도 정부에서 허여한 특허권을 훼손시켜도 좋다는 것을 의미하지는 않는다.

[수지(Resin)에 단백질 C 단클론성 항체의 결합(coupling)]

항체의 결합은 제조업자(Bio-Rad, Richmond, CA)에 의해 설명된 바와 같이 0.1M NaCl, 0.1M MOPS, pH 7.5, 4 $^{\circ}$ C에서 수행된다. 아피-겔은 유기용매를 제거하기 위해서 사용하기 직전에 얼음처럼 차가운 물로 세척한다. HPC-4는 0.1M NaCl, 0.1M MOPS, pH 7.5 속에서 3-5mg/ml의 농도로 준비되고, 충분한 양의 아피-겔 10과 혼합시켜서 HPC-4대 겔의 최종비율이 5mg/ml가 되게 한다. 결합반응을 시키기 위해 완만한 락커상에서 밤새(12-18시간)동안 항체와 겔을 혼합한다. 대개 90% 이상의 항체가 결합된다. 결합반응이 종결된 후, 수지를 유리컬럼에 부어넣고 pH 7.5인 0.1M NaCl 0.01M MOPS로 세척한다. 이 수지는 4 $^{\circ}$ C의 상기의 조건하에서는 적어도 1년동안은 안정하다.

[단클론성 항체의 특성화]

HPC-4 단클론성 항체의 특성에 대한 상세한 분석이 스테아른즈, "Ca²⁺ 의존 단클론성 항체와 단백질 C 활성펩티드 영역과의 상호작용", J. Biol. Chem. 263, 826-832(1988)에 기술되어 있다.

상기에서 기술된 바와 같이 생산된 HPC-4 단클론성 항체들은 단백질 C의 무거운 사슬내 활성영역에 있는 펩티드 배열 및 Ca²⁺에 대해 특이성이 있다. 이 항체는 펩티드 결합위치외에 적어도 1개의 금속 결합위치를 가진 것으로 보인다. 이 펩티드 결합활성은 금속이온 결합위치에 금속이 결합하였는지 여부에 따라 변한다. 이 금속이온결합 위치는 칼슘등과 같은 2가 금속 양이온, 또는 Tb³⁺와 같이 이와 유사한 이온반경 및 배위특성을 지닌 금속과 결합할 수 있다.

칼슘이 금속이온 결합위치에 결합하면 단클론성 항체는 펩티드와 결합성이 현저하게 좋아진다. 단클론성 항체의 금속이온 결합위치에 금속이온이 결합되지 않았을 때에는 항원결합위치의 항원과 결합성은 상대적으로 떨어진다. 따라서, 항원-항체 결합은 항체를 둘러싼 매질내의 여러가지 금속이온의 농도를 변화시켜서 조절될 수 있을 것이다. 단클론성 항체의 이러한 특성은 아래에 언급된 바와

같이 많은 잇점을 지닌다.

단백질 C에 대한 HPC-4의 결합은 HPC-4 및 단백질 C 양자의 칼슘이온 결합위치에 칼슘이온들의 존재에 의해서 조절된다. 인체단백질 C(HuPC)의 어느 부분이 HPC-4 결합위치를 포함하고 있는지를 결정하기 위해서, 에스몬 등, J. Biol. Chem. 258, 554-556(1983)에서의 방법을 사용하여 HuPC를 환원시키고 카르복시메틸화(RCM)시켜서 RCM-무거운 사슬과 RCM-가벼운 사슬을 만들었다. 이 사슬들은 0.1M NaCl, 0.02M 트리스 HCl, 2mM CaCl₂ (pH 7.5)에 대해 투석시키고 똑같은 완충액으로 평형화된 HPC-4-아피-겔 10 컬럼[1.5×18cm, 0.2ml/min, 2ml 분별(fraction)]에 적용시킨다. 결합된 단백질은 2mM CaCl₂ 대신에 2mM EDTA를 사용한 것을 제외하고는 동일한 완충액으로 용출시킨다. 단백질이 포함된 부분은 10% 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동으로 분석한다.

이 결과는 칼슘과 결합하는 사슬인 단백질 C의 가벼운 사슬은 컬럼에 정착되지 않으나, 그 자체가 칼슘과 결합할 수 없는 무거운 사슬은 정착되어서 완충액을 포함하는 EDTA로 용출됨을 보여준다.

활성 펩티드 영역의 역할은 HPC-4 아피-겔 10 컬럼상에 친화 크로마토그래피를 함으로써 조사되었다. 0.1M NaCl 2mM CaCl₂ 0.1M MOPS(pH 7.5)인 용액속의 HuPC와 RCM 무거운 사슬은 0.2 흡광단위(absorbance unit)/ml까지 희석시키고, 1ml 시료를 취하여 동일한 완충액으로 평형시킨 HPC-4-아피-겔 10 컬럼(0.5cm×6cm)에 적용시켰다. 결합된 단백질은 0.1M NaCl 2mM EDTA 0.1M MOPS(pH 7.5)로 0.7ml씩 분별(fraction)하여 용출시킨다. 용출된 HuPC 또는 RCM 무거운 사슬의 23-25 분별을 모으고 활성펩티드는 트롬빈 단백질 분해(10%, w/w, 4시간 37°C)에 의해 방출시킨다. 과량의 항트롬빈 III를 첨가하여 반응을 중단시키고 용액은 5mM CaCl₂이 되게 칼슘재침착(recalcified)시킨 후, 동일한 컬럼에 적용시킨다. 각 크로마토그램에 대한 단백질의 흡수는 A₂₈₀ 흡광물질의 흡수를 기초로한 것의 98% 이상이었다.

이 결과들은 단백질 C상의 HPC-4 결합위치가 활성위치에 또는 그 근처에 있으며, HuPC는 Ca²⁺ 의존방식으로 항체 컬럼에 결합하고, APC로 활성화되면 HuPC는 더 이상 HPC-4와 결합하지 않는다는 사실을 보여준다. 이 RCM 무거운 사슬 또한 Ca²⁺의 존재하에서 HPC-4 컬럼에 결합하고, EDTA로 용출시킬 수 있었다. 활성 펩티드를 방출시키기 위해서 용출액을 트롬빈으로 처리한 후 HPC-4 컬럼에 재적용했을 때에는 이 RCM-무거운 사슬은 더 이상 HPC-4와 결합하지 않았다.

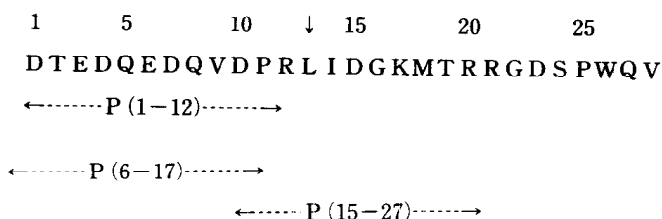
이 HPC-4-항원 결합의 Ca²⁺ 의존성은 ¹²⁵I-표지 항원들을 배양시켜서 검사되었다. RCM 무거운 사슬, HuPC 및 감마카르복시 글루탐산 영역(HuGDPC)이 없는 HuPC와 이유노비드(Immunobeads : Bio-rad)상에 고정된 HPC-4의 결합성이 고정되었다. 이유노비드들과 결합한 HPC-4를 pH 7.5인 TBS 0.1% 젤라틴 1mM EDTA에서 4°C로 밤새 배양시킨 후, pH 7.5인 TBS 0.1% 젤라틴(Cheles-처리된 것)으로 광범위하게 세척한다. 방사성 원소로 표지된 단백질들을 pH 7.5인 TBS 0.1% 젤라틴내의 Ca²⁺ 농도를 점차 증가시키면서 HPC-4가 결합된 비드들(beads) 100μl에 첨가시켰다. 전체부피는 200μl이었다. 이 용액을 혼합시키면서 2시간동안 25°C에서 배양시키고 적당한 양의 Ca²⁺가 포함된 젤라틴 완충액으로 세척한 후, NE 1600 감마카운터(Nuclear Enterprises, Ltd.)로 이 비드들의 수를 계산했다.

대조구 시료에는 각각 Ca²⁺가 첨가되지 않은 용액 그리고 1mM EDTA를 지닌 용액이 포함되었다. 최종의 항원농도는 0.04에서 0.1 μM까지의 범위인데, 이것은 항체결합위치가 과다하도록 보장해 줄 정도로 충분히 낮은 농도이다. 1mM EDTA의 존재하에서 결정된 베이스라인 측정값/분(첨가한 총 측정값의 5~15%)은 결합된 측정값/분에서 공제되었다.

¹²⁵I-표지 RCM 무거운 사슬의 최대결합은 첨가된 전체량의 80~90%이고, 첨가된 ¹²⁵I-표지 HuPC 또는 HuGDPC의 60~70%이다. HPC-4와의 반-최대결합을 가져오는 Ca²⁺의 농도는, RCM 무거운 사슬에 대해서는 약 36(±5) μM이며, HuGDPC에 대해서는 110(±29) μM이고, HuPC에 대해서는 205(±23) μM이다.

⁴⁵Ca²⁺ 평형투석실험을 HPC-4(50 μM) 또는 RCM 무거운 사슬(35 μM)과 함께 수행시켰을 때, 친화성이 높은 Ca²⁺ 결합부위는 어떤 단백질에서도 검출되지 아니하였다. 그러나, 30 μM 무거운 사슬, 15 μM HPC-4를 함께 투석시켰을 때 결과는, 2mM Ca²⁺에서 착물의 몰당 2~3몰의 Ca²⁺가 결합됨을 나타내어, 복합체안에서 RCM 무거운 사슬과 HPC-4는 2 : 1 화학양론임을 추측케 한다.

항체결합에도 활성펩티드 영역이 필요하므로, 이 영역이 포함되도록 3개의 중첩되는 합성펩티드들을 준비하였다.



상기에서 D는 아스파르트산, T는 트레오닌, E는 글루탐산, Q는 글루타민, V는 발린, P는 프롤린, R은 아르기닌, L은 류신, I는 이소류신, G는 글리신, K는 리신, M은 메티오닌, S는 세린 그리고 W는 트립토판이다. 화살표(↓)는 트롬빈 분할위치를 표시한다. 이 합성 펩티드는, 오클라호마시의 오클라호마 헬스사이언스 센터 대학에 톨사 메디칼 리써치 인스티튜트내 세이트 프란시스 병원의 베니스 잭슨에 의한 t-부톡시카르보닐 화학을 이용해서 Applied Bisystems 430A 펩티드 합성기기로 수행한

고상 합성법에 의해 제조되었다. 펩티드는 무수 불화수소로 처리하여 분할되었다. 이 펩티드들의 순도는 역상 고압 액체 크로마토그래피에 의해서 측정하면 90% 이상이었다. 이 펩티드들의 분자량은 각 무수아미노산 분자량의 총합에서 펩티드 결합형성으로 인한 값을 교정하여 계산된다. 펩티드 농도는, 깨끗한 물속의 1mM 펩티드 용액에 대한 220nm에서의 흡광도를 표준으로 하여 측정될 수 있다.

이 세개의 펩티드들은, ¹²⁵I-표지 HPC-4가 고체-상 HuPC에 결합하는데 어떻게 영향을 미치는지 분석되었는데, 여기서 HuPC는 미량적정판(microtiter plate)의 오목한 부분위에 코팅되었다.

P(1-12)는 HPC-4가 HuPC에 결합하는 것을 방해하지 않으며, P(15-27)은 HPC-4 결합을 30% 정도 방해하나, P(6-17)은 HuPC에 대한 HPC-4의 결합을 방해하며 반-최대 방해는 약 0.5 μM 펩티드에서 일어난다.

HPC-4와 3개의 합성 펩티드와의 상호작용은, [벨리크 등, Proc.Nat.Acad.Sci.USA46, 1470-1482(1960)과, 스투워드 등, Antibody Affinity : Thermodynamic Aspects and Biological

Significance, 76-77(1983)]의 방법에 따라, Ca²⁺가 존재 및 부재하에서 내재성 단백질의 형광을 검사함으로써도 연구되었다.

내재성의 형광연구를 위해, 2 μM P(6-17)의 존재 또는 부재하에서 TBS, pH 7.5(Chelex-처리)내의 1 μM HPC-4 항체를 동일한 완충액으로 희석된 CaCl₂ 또는 MgCl₂로 적정시켰다.

합성 펩티드 P(1-12), P(6-17) 또는 P(15-27)로 적정된 HPC-4는 펩티드 추가전에 1mM EDTA 또는 1M CaCl₂를 포함하는 용액내에서, 최종 농도가 5 μM이었다. 각각의 적정물질을 가하고 5분후의 방출강도(305-400nm)가 기록되었다. 모든 실험조건하에서, 적정물질의 첨가에 기인하는 시료의 희석이 관찰된 시그널 변화에 미치는 효과는 4% 이하이다. 결합하는 펩티드들은 방향성 아미노산을 포함하지 않기 때문에, 관찰된 내재성 형광의 어떤 변화에 대해서도 펩티드 결합의 결과로 나타나는 항체에서의 변화가 직접적인 원인이 된다고 할 수 있다. HPC-4의 내재성 형광은 1mM Ca²⁺의 존재하에서 P(6-17)로 적정하면 증가하는데, 예상된대로 펩티드 대 항체가 2 : 1로 비율인 때 최고조에 달한다. 1mM EDTA에서도 형광이 역시 증가하지만, 이때는 높은 펩티드 농도를 필요로 한다. 합성 펩티드 P(1-12)와 P(15-27)는 Ca²⁺의 존재하에서 HPC-4의 형광을 현저하게 변화시키지는 않았다.

HPC-4-P(6-17) 결합의 Ca²⁺ 의존성도 또한 형광방법을 사용해서 연구되었다. P(6-17)의 존재하에서 HPC-4의 내재성 형광은 Ca²⁺로 적정시켰을때 증가되는데, 반-최고변화는 6.5 ± 1.2 μM Ca²⁺ 일 때 일어났다. 1 μM HPC-4가, 2 μM P(6-17)의 존재 또는 부재하에서 금속이온으로 적정되었다. 트립토판 방출변화가 상기에서 언급된 바와 같이 탐지되었다. Mg²⁺는 펩티드의 존재 또는 부재하에서 HPC-4의 내재성 형광에 아무런 영향을 미치지 못했다.

펩티드의 부재하에서 항체를 Ca²⁺로 적정하였을 때 내재성 형광의 5%만이 감소되었는데 이는 항체와 Ca²⁺의 친화성이 낮을 가능성을 나타낸다. Ca²⁺ 결합위치를 연구하기 위해 Tb³⁺가 사용되었는데 이는 Tb³⁺가 트립토판이나 티로신 잔기에 충분히 가까운 단백질 위치에 결합함으로써 싱글렛-싱글렛 전이가 일어날 수 있을때는 Tb³⁺의 형광방출이 급격히 증가하기 때문이다.

P(6-17)는 형광을 강화시키는 도너(doner) 방향성 아미노산을 포함하지 않는 반면 HPC-4는 포함한다. 0.1M MES 0.1% 젤라틴 0.02% NaNO₃ (pH 6.0)내의 1 μM HPC-4를, 4 μM P(6-17)의 존재 또는 부재하에서 Tb³⁺로 적정하였다. HPC-4 트립토판은, 여기로(excitation path)에서 SB 300UV 대역(band-pass) 필터(Oriel)를 이용하여 285nm에서 여기되었다. Tb³⁺이온방출강도가 2-nm 간격들로 기록되고, 538nm에서 552nm까지 적분되었다. 570-580nm에서 기록된 여기-파장의 고조파(harmonic of the excitation wavelength)로서 빛의 산란이 기여하는 양이 측정되었다. 각 Tb³⁺농도에 대해서, 용매 블랭크(blank)의 방출강도를 시료와 동시에 적정하고, 이를 단백질 용액의 방출강도에서 공제시켜서 단백질-의존성 Tb³⁺형광만을 얻는다. HPC-4를 Tb³⁺로 적정한 결과 Tb³⁺형광이 증가하는데 자유 Tb³⁺농도가 34 ± 11 μM일 때 반-최대가 된다. P(6-17) 존재하에서 HPC-4에 대한 Tb³⁺적정도 Tb³⁺형광을 강화시키나, 반-최대 Tb³⁺농도는 2 ± 0.9 μM으로 감소한다. 동일한 조건하에서 펩티드를 적정한 대조실험들은 Tb³⁺형광강화를 보이지 않았는데 이는 펩티드가 단독으로는 형광의 변화를 줄 수 없음을 보여준다. 펩티드-HPC-4 복합체에 의한 Tb³⁺친화성이 17배가 증가한 것은, HPC-4내의 친화성이 낮은 금속이온 결합위치가 친화성이 높은 위치로 변형(transformation)됨을 설명한다.

이 결과들은 휴멜-드레이어 겔 여과기술[Biochem. Biophys. Act 63, 530-532(1962) 참조]를 사용해서 Ca²⁺의 항체 펩티드 복합체와의 결합에 관하여 확인되었다. P(6-17), HPC-4 및 이것의 혼합물의 컬럼에 적용되어서 Ca²⁺와의 결합능력이 결정되었다. P(6-17)은 Ca²⁺와 결합하지 않았다. HPC-4와 3.5 배 물의 과량의 P(6-17)은 Ca²⁺결합이 1.76몰의 Ca²⁺/1몰의 HPC-4로 증가함을 보여주었다. Mg²⁺는 HPC-4/P(6-17) 복합체(각각, 1.41 및 1.52몰 Ca²⁺/0.01mM 또는 0.02mM Ca²⁺중의 HPC-4몰)에 의한 Ca²⁺의 결합에 아무런 영향을 미치지 못했다.

본 발명은 항체 HPC-4와 결합하는 단백질 C의 면역학적 활성이 있는 부분(항원결정기)을 포함하는데, 그림 1의 무거운 사슬내 잔기 6-17에서 나타난 바와 같이 아미노산 배열 즉, 글루탐산-아스파르트산-글루타민-발린-아스파르트산-프롤린-아르기닌-류신-이소류신-아스파르트산-글리신-리신의 적어도 일부분을 포함한다.

상기한 바와 같이, 펩티드는 친화 크로마토그래피에 의한 HPC-4의 분리와 정제에 사용될 수 있다. 유사한 방법으로, 항체가 크로마토그래피 기질에 결합되는 과정동안 이 펩티드를 이용하여 결합위치를 일시적으로 "보호"함으로써 결합된 항체의 가능한 최대량을, 분리할 단백질에 결합시키는데 이용할 수 있다. 크로마토그래피 기질(아미노 말단, 리신 측쇄)과 반응할 수 있는 펩티드의 반응그룹들은 HPC-4에 의한 인지에 불필요한데, 이들 그룹들은 처음에는 당해분야의 통상의 지식을 가진자가 알고 있는 표준방법을 사용해서 펩티드를 아세트 무수물과 반응시킴으로써 블로킹(blocking)된다.

HPC-4를 수지에 결합시킨 후, 항체의 항원결합부위에 결합된 펩티드는 1.5M 구아니딘 HCl, 2mM EDTA, 0.02M 트리스 HCl(pH 7.5)로 수지를 세척해서 제거한다.

항체와 펩티드는 각각 단백질 C와 항체의 정제와 분리에 이용하기 위해, 아가로즈(agarose), 아크릴 아미드와 다른 유형의 재래식 크로마토그래피 수지들, 필터 등을 포함하는 다양한 기질에 결합시킬 수 있다. 이 물질들은 단백질을 이들과 붙이는 방법과 마찬가지로 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 알려져 있다. 이 물질들의 선택은, 생물학적 적합성 및 최종 생성물이 약제학적 사용을 위한 경우에 있어서의 정부기관의 승인과 마찬가지로 주로 정제규모나 분석될 시료에 의해 좌우될 것이다. 마찬가지로, 진단용으로 사용하기 위해 항체를 표지하는 방법들과 수단은 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진자에게 알려져 있으며, 이는 방사성 원소, 형광물질, 발광물질 또는 효소성 문자로 표지하는 것을 포함한다.

[금속-의존성 항원 결합위치를 지닌 고정된 항체들을 이용한 항원회수(Antigen Recovery)]

본 발명의 단클론성 항체는 항원결합위치와 적어도 1개의 금속이온 결합위치를 지니는 것으로 밝혀졌다. 항원이 고친화성으로 결합하기 위해서는 이온결합위치가 점유되어야 한다. 항체의 금속이온결합 영역의 아미노산 배열이 결정될 수 있으며, 또는 가변영역은 클로닝 및 cDNA 시퀀싱(sequencing) 방법으로 결정할 수 있다. cDNA의 이 부분(segment)은 다른 단백질들, 특히 항체들을 암호화하는 유전자에 삽입시킬 수 있는데, 그 결과 생성된 단백질은 금속 결합능력을 갖게 된다. 이 가공의 항체들은, 그들 자체는 금속 의존적 형상변화를 하지 않는 다른 분자들의 분리에 사용될 수 있다. 이것은 단백질 정제에 있어 대단한 장점을 갖는데, 이는 순한 용출조건을 갖는 단클론성 항체를 찾는 것은 극히 힘들기 때문에 관심있는 단백질의 기능을 유지하면서 용출시키는 것이 불가한 결과를 초래하기 때문이다. 이런 결과, 단백질 정제에 있어서 단클론성 항체의 잠재력은 충분히 실현되지 않았다. 항원 자체가 금속의존적 형상변화를 겪어야 할 것이 요구되기 때문에 보다는 항체의 금속과의 결합능력 때문에 금속-의존적 형식으로 항원과 결합하는 항체는, 매우 순한 조건하의 친화 크로마토그래피에 사용될 수 있으며, 이 항원은 킬레이트화물 또는 금속을 포함하는 용액으로 용출된다.

HPC-4의 금속결합 영역은, 항체의 작은 소편들을 만들어내는 제한된 단백질 분해기술을 사용하여 찾아낼 수 있다. 금속이온과 결합할 수 있는 소편은 그것의 Tb³⁺ 형광 강화능력에 의해서 밝혀질 수 있는데, Tb³⁺는 항원이 없을때 그것의 결합을 검출할 수 있을 정도로 항체에 대해서 충분한 친화력을 지니고 있기 때문이다. 항체의 Fab, Fab'와 Fc 소편들은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진자에 의해 펩신과 파파인 소화를 이용하여 표준방법으로 만들어질 수 있다. 보다 작은 소편들은 다른 단백질 분해효소에 의한 소화에 의한 것과 마찬가지로 CNBr 분해에 의해 항체의 적당한 부분으로부터 생산될 수 있는데, 구로사와, S. 등, J.Biol.Chem, 263 : 5993-5996, 1988; 올린, A-K와 J. 스텐플로, J.Biol.Chem., 263 : 7411-7417, 1988; 스테아른즈, D.J.등, J.Biol.Chem., "Microthrombomodulin; Residues 310-486 from the epidermal growth factor precursor-homology domain of thrombomodulin will accelerate protein C activation" 에 기술된 바와 같다. 분할은 이온결합 기능을 유지하고 있는 가장 작은 조각이 얻어질 때까지 행하여진다. HPC-4 cDNA는 당해분야에서 통상의 지식을 가진자에게 알려진 방법으로 클론되어지고, 배열(sequence)이 파악된다. cDNA는 하이브리도마 세포주 HPC-4(ATCC번호 9892)와 만들어진 람다(lambda) gt11 익스프레션 라이브러리(expression library)[T.V.허인(Huynh)등, In DNA cloning: a practical approach, vol.1, (D.M.클로버, ed), IRL press, 옥스포드, 1985, pp.49-78]로부터 제조될 수 있다.

이 라이브러리는 친화 정제된 염소 항-HPC-4 항체를 이용해서 선별될 수 있다. 적당한 클론들을 확장시키고, cDNA는 잘라내어 표준 DNA 시퀀싱을 위해 M13에 삽입한다.(M13 cloning and sequencing handbook, Amersham; Messing, J., "New M13 vectors for cloning" Methods in Enzymology--Recombinant DNA techniques, 101, part C : 20-78, 1983).

뿐만 아니라, 항-HPC-4와 양성적으로 반응하는 클론에 의해 표현된 소편들은, 정제되고 Tb³⁺와의 결합하는 능력에 대한 시험을 할 수 있으며, HPC-4 분자에서 관심있는 영역을 찾는 추가적인 방법을 제공한다. 일단, HPC-4 항체 유전자의 적당한 이온결합소편에 해당하는 DNA의 소편의 위치를 찾으면, EcoR1등과 같은 적당한 제한효소를 사용하여 이 소편을 잘라낸다. 가공의 유전자들은 만드는 방법이 공개되었는데 예를들면 Kobilka, B.K., et al. "Chimeric α2-, β2- Adrenergic Receptors : Delineation of Domains Involved in Effector Coupling and Ligand Binding Specificity" Science 240 : 1310-1316, 1988; Verhoeyen, M., C.Milstein, G.Winter, "Reshaping Human Antibodies : Grafting an Antilysozyme Activity," Science, 239-1534-1536, 1988; Riechmann, L., M.Clark, H Waldmann, G.Winter, "Reshaping human antibodies for therapy," Nature, 332 : 323-327, 1988)등의 문헌이 있다.

관심있는 단클론성 항체에 관한 유전자를 포함하는 표적 DNA는, cDNA 소편을 삽입할 수 있는 공간이 생기도록 제한효소를 가지고 근원(source) DNA와 유사하게 처리될 것이다.

양립성이 있는 말단들을 지닌 링커(Linker)들은 삽입물(예; Sal I)에 결합되어서 결합반응(ligation)이 완성된다. 이 가공의 cDNA는, Summers, M.D.와 G.E.Smith, "A manual of methods for Baculovirus vectors and insect cell culture procedures", Texas Agricultural Experimental Station(1987)에 기술된 절차에 따라 바굴로바이러스등과 같은 적당한 표현 벡터(expression

vector)에 클론될 수 있다.

재-조합 유전자의 발현은 상기에서 언급된 방법들에 의해서 이루어질 수 있다. 원하는 생성물의 선별은 ELISA 분석에 의해 달성되는데 여기서는 방출된 단백질은, 표적 면역글로블린이 금속 의존적 방식으로 특이성을 보이는 항원을 인식할 수 있는지 시험된다. 항체의 인식에 금속이온의 존재 또는 부재가 요구되는지 여부는 주로 특별한 항체-항원쌍에 의존하는 것 같다.

HPC-4의 금속 결합영역이 아미노산의 단일의 사슬내에 존재하지 않는 경우에 예를들어, 만약 면역글로블린의 무거운 사슬과 가벼운 사슬 양자의 일부분들이 금속결합위치와 관련되어 있다면, Verhoeyen, M., 등, Science, 1988; Riechmann, L., 등, 1988에 기술된 바와 같이, 각 사슬에 대하여 같은 절차를 반복하는 것이 필요할 것이다. 본 발명은, 상기에서 공개된 절차중의 어느 시점에서 특별한 분해효소들, 벡터들 또는 발현시스템의 사용에 국한되지 않으며, HPC-4로부터 오는 적당한 펩티드배열(들)을 삽입함으로써 궁극적으로 금속 의존성 방식으로 관심있는 항원과 결합할 수 있는 기능적 항체의 제조에 이르는 어떠한 조합도 포함한다는 것을 당해분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 쉽게 인식할 수 있을 것이다.

[HPC-4의 치료학적인 용도]

포유동물의 응혈과 항응혈 시스템은 혈액을 적당한 유체상태로 유지하는 미묘한 견제와 균형시스템을 이룬다. 이 시스템에서 어떤 요소 하나만 변화시켜도 항상성을 유지하기 위한 포유동물의 능력에 막대한 영향을 끼칠 수 있다. 단백질 C 시스템은 혈액의 응고를 저지하고 섬유소 용해를 자극하는 항응혈성 조절 시스템이다. 이 시스템은 응혈과정에서 피브리노겐을 피브린으로 전환하는 효소인 트롬빈에 의해서 활성화된다. 유리 또는 과잉의 트롬빈이 내피 세포상의 단백질인 트롬보모듈린과 결합한다. 트롬빈-트롬보모듈린 복합체는 혈병형성에 촉매작용을 하는 트롬빈의 능력을 감소시키고 트롬빈을 잠재적 단백질 C 활성화제로 전환시킨다. 활성화된 단백질 C는 차례로 단백질 S 및 막 표면과 조합되어서 제한된 단백질 분해를 통해서 인자 Va와 인자 VIIIa를 불활성화 시킨다. 불활성화 인자 Va는 효소인자 Xa 또는 기질 프로트롬빈과 효율적으로 상호작용하는 능력을 상실한다. 단백질 C에 항체의 첨가, 트롬보모듈린에 항체 첨가, 단백질 S 또는 단백질 S에 결합함으로써 단백질 S의 조인자로서의 작용을 불활성화 시키는 C4b 결합단백질에 항체의 첨가는, 필요한 경우 개체내에서 혈액응고를 촉진시키는데 사용될 수 있다. 이러한 환자군의 대표적인 것으로는 FVIII 억제인자들을 지닌 환자들을 들 수 있다. 인자 Va가 불활성화 되는 것을 억제함으로써 인자 VIII가 상대적으로 없는 경우에도 응혈과정이 이루어진다.

단백질 C 항응혈 시스템의 이들 억제인자들의 투여로 인한 효과는, 경로를 방해하는 인자에 따라 과량의 활성화된 단백질 C 또는 S를 투여함으로써 역전시킬 수 있다. 투여할 양은 혈액에 존재하는 단백질의 상대적 몰수와 관계있는 계산을 기초로 한다.

고 응혈가능 상태를 유발시키기 위한 이러한 접근의 실행 가능성은 HPC-4를 비비에 투여함으로써 실증되었다. [테일러 등, J.Clin.Invest., 79, 918-925(1987)] HPC-4가 존재했을 때, 이 동물들은 약간의 박테리아만 주입해도 전체 피브리노겐이 소비되는 것으로 특징화되는 대량적 응혈반응을 보였다. 그들은 항체가 없을 때는 이러한 반응을 나타내지 않았다. C4bBP 수준을 약 1mg/ml 혈장으로 높였을 때 도 실질적으로 동일한 결과가 얻어졌다.

이들 반응이 이 동물들에게는 치명적이지만 이들 방법의 어느 것이나 응혈시스템을 강화시킬 수 있다는 것을 예시한다. 이것은 정상적인 항상성이 훼손되었을 때 유익하다.

이 방법은 예를들면 헤파린 또는 방사선 치료에 의해 유발되는 간장병 및 출혈성 뇌일혈과 같은 혈소판 감소증을 포함하는, 다른 혈액응고인자 결핍상태에 대해서 적용하여 신속하면서도 급성발병 후 재출혈을 최소화 할 수 있다.

HPC-4는 또한 고형 종양조직의 지지구조(bed)에서 미세관 혈액응고를 유발시키는데 사용될 수 있다. 개과의 고형 종양모델에서 이것은 종양의 성장을 크게 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이 항체 및/또는 단백질 항응혈 과정의 기능을 방해할 수 있는 상기한 다른 인자들과 종양괴사인자나 방사선과 같이 현재 사용중인 치료법들을 조합하면 보다 효과적으로 고형 종양들을 치료할 수 있을 것이다. 이 물질들을 투여하기 위한 약제학적으로 수용가능한 담체들에는 생리적 pH의 살균한 정상 식염수가 포함된다.

투여의 바람직한 방법으로는 상기 물질을 목적물에 주사하는 것이며, 가장 바람직하게는 정맥내로 주사하는 것이다. 바람직한 투여량은 약 5 μ g 내지 20 μ g HPC-4/ml 혈장인데, 이것은 내인성(endogenous) 단백질 C의 90% 이상을 방해하는데 충분하다.

[실시에 1]

[혈장으로부터 단백질 C의 신속하고 대규모적인 분리]

단백질 C의 신속한 분리는 아래의 설명된 절차에 따라 이루어졌다. 단백질 C 그리고 다른 비타민 K-의존성 단백질은 0.02M Tris HCl, pH 7.5, 헤파린(1U/ml 최종부피) 및 벤자미딘 HCl(10mM 최종부피)로 1 : 1로 희석시킨 사람 혈장 30리터로부터 상온에서 1시간동안 QAE Sephadex Q50(0.1M NaCl, 0.02 Tris HCl, pH 7.5내에서 팽창된 30g)상에 배치 흡착을 시키고, 30~60분 동안 침전시킨 후 상정액을 사이폰 시킨다. 세파덱스를 10 \times 60cm 컬럼에 채우고, 단백질 C를 동일한 완충액내의 0.5M NaCl로 용출시키기 전에 1 ℓ 0.15M NaCl, 0.02M Tris HCl, 10mM 벤자미딘 HCl, pH 7.5로 세척한다.

이 풀(pool)의 부피는 약 600ml로 감소된다. 이 부피에 헤파린을 10U/ml까지, Ca²⁺를 10mM까지, DFP를 1mM까지 그리고 약 100ml HPC-4 아피-겔 10을 첨가시킨다.

이 혼합액을 1시간동안 교반시키고, 침전시킨 후, 2.5 \times 20cm 컬럼에 채워넣고, 1 ℓ 의 0.5M NaCl, 0.02M 트리스 HCl, 5mM 벤자미딘 HCl, 2mM CaCl₂ (pH 7.5)로 세척한 후, 다음에 100ml 0.1M NaCl,

0.02M 트리스 HCl, 2mM CaCl₂ (pH 7.5)로 세척하고, Ca²⁺ 대신 2mM EDTA를 포함하는 동일 완충액으로 단백질 C를 용출시킨다. Ca²⁺의 존재하에서 세파덱스와 결합하는 단백질의 혈청 유전분체(amyloid) P에 의한 오염은, QAE 세파덱스 50상에서 이온교환 크로마토그래피에 의해서 제거될 수 있다.

이 컬럼(0.9×30cm)은 0.02M 트리스 HCl(pH 7.5)속의 0.1에서 0.6M에 이르는 농도 기울기는 갖는 NaCl로 전개시킨다. 단백질 C는 컬럼으로부터 최종 피크로서 용출된다. 이는 SDS겔 전기영동, 단백질 C 항원과 단백질 C 기능적 시료분석 방법으로 확인될 수 있다. 이 제조방법으로 인체 혈장에서 발견되는 것과 비슷한 비율로 한개의 사슬과 2개 사슬이 생산된다.

단백질 C 정제

헤파린을 가하고 회색시킨 혈장을 QAE 세파덱스 상에서의 배치(batch)흡착

완충된 0.15M NaCl로 세척

완충된 0.15M NaCl로 용출

칼슘 채침작과 HPC-4로 배치흡착

완충액을 포함하는 Ca²⁺로 세척

완충액을 포함하는 EDTA로 용출

혈장 대신에 예를들면 Konyne(Cutter Labs), Proplex(Hyland) 또는 FEIBA(IMMUNO, 오스트리아) 등과 같은 상업적으로 제조된 비타민 K 의존성 혈장 단백질 농축물이 사용되었을 때는, 이 농축물은 HPC-4의 단백질과의 결합에 양립 가능한 완충액[즉, 2mM CaCl₂, 5-10 units/ml의 헤파린과 항트롬빈 III (10-100µg/ml)등의 항응혈제 및 각각 1mM인 벤자미딘과 DFP 같은 단백질 분해효소 억제인자를 포함하고 pH 6과 pH 7.5 사이에서 완충된 것]으로 재구성되어 배치 혹은 컬럼속의 HPC-4-Affi-Gel 10 수지에 직접 적용된다.

사용된 세척과 용출조건들은 상기에서 상세하게 언급한 바와 같다.

HPC-4 수지로부터 단백질 C를 용출시킨 후의 QAE 크로마토그래피는, 오직 친화수지에 적용된 물질에 혈청 유전분 P가 존재할 경우만 필요하다. 혈장 또는 농축액 대신 인체 단백질 C를 생산하도록 유전자 조작된 조직배양세포의 상정액이 사용되었을때는, 이것은 2mM CaCl₂와 단백질 분해효소 억제인자의 첨가후 HPC-4 친화수지와 직접 혼합시키거나, 상기에서 상술된 바와 같이 HPC-4에 결합하는 단백질 C와 양립할 수 있는 완충액 속에서 농축시키고 재현탁 시킨 후에 직접 혼합시킬 수 있다. 이 상정액은 혈청에 대해서 전에 기술한 바와 같이 50% NH₄SO₄ 침전 또는 이온교환으로 농축시킬 수 있다. 단백질 C의 보통의 수율은 0.04mg 단백질 C/mg 항체이다.

[실시예 2]

[단백질 C의 진단용으로서 HPC-4의 사용]

HPC-4는 인체혈청에서 단백질 C를 분석하는데 사용될 수 있다. 단백질 C는 정량적으로 흡착될 수 있고, 고정된 HPC-4로부터 재현성 있게 용출된다. 결과로서 나타나는 단백질 C는 기능적인 특성들에 관해 분석될 수 있다. 이것은 회기성 혈전증과 비정상적 단백질 C 분자들을 지닌 선택된 환자들의 단백질 C 결핍을 명확하게 증명하는데 유용하다. 진단목적으로 단백질 C 항체들의 사용예가 드 안젤로, S, V 등이 저술한 J.Clin.Invest., 77 : 416-425, 1986과 파이오니, E 등이 저술한 Blood, 71 : 940-946, 1988에 설명되어 있다.

뿐만 아니라, 이 항체는 추적자(tracer)로 표지될 수 있는데, 추적자의 예로는 Enzymobeads(Bio-Rad), 비오틴(shattil, S, 등, Blood, 70 : 307-315, 1987) 또는 다른 표지로서, 임상 혈청시료중 단백질 c의 항체적 수준을 결정하기 위한 목적의 효소관련 면역분석방법(ELISA) 또는 방사선 면역분석방법(radioimmuno assay) 등과 같이 임상실험실에서 사용하기 위한 통상의 면역분석을 개발하기 위한 목적으로 적당하고 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 알려진 것을 들 수 있다.

그러나, 항체의 사용방법에 대한 묘사가 이미 공개되었지만 본 발명의 단클론성 항체는 공공연히 이용될 수 없었다는 사실에 주목해야 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

ATCC에 HB 9892로 기탁된 하이브리도마 세포주 HPC-4(기탁일 : 1988.11. 2)에 의해 생산되고, 단백질 C의 무거운 사슬 안의 활성 펩티드 영역에 있는 항원 결정기(epitope) 및 칼슘에 대해 특이성이 있는 칼슘 의존성 단클론성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기의 항체가 방사성 분자들, 화학발광 분자들, 형광분자들, 발광(luminescent) 분자들 및 효소들로 구성된 그룹으로부터 선택된 표지(label)를 포함하는 것을 특징으로 하는 칼슘 의존성 단클론성 항체.

청구항 3

ATCC에 HB 9892로 기탁된 하이브리도마 세포주 HPC-4(기탁일 : 1988.11. 2).

청구항 4

ATCC에 HB 9892로 기탁된 단클론성 항체 HPC-4(기탁일 : 1988.11.2)의 가변영역을 갖고 단백질 C의 무거운 사슬내 활성 펩티드 영역에 있는 항원 결정기에 대해 특이성이 있는 칼슘 의존성 단클론성 항체의 분리방법으로서,

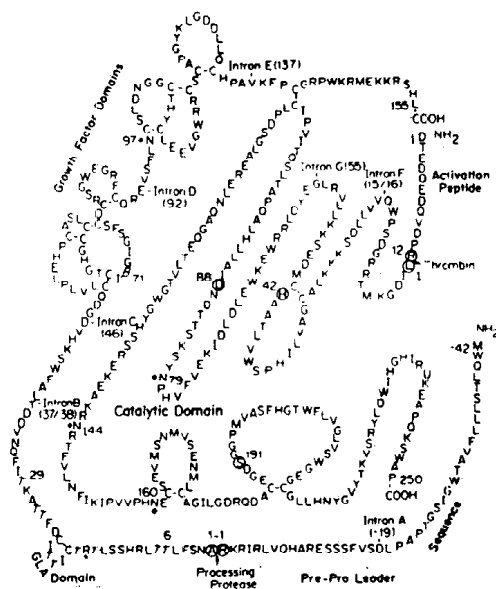
- 1) 칼슘과 결합하지 않고, 아미노산 배열로 글루탐산-아스파르트산-글루타민-발린-아스파르트산-프롤린-아르기닌-류신-이소류신-아스파르트산-글리신-리신으로된 배열, 또는 HPC-4에 의해 결합되는 면역학적으로 균등한 배열을 포함하는 고정된 폴리펩티드를 제공하고,
- 2) 분리하여야 할 항체 및 칼슘을 포함하는 용액을 제공하되, 상기 항체는 칼슘과 조합하여 펩티드에 결합하며,
- 3) 항체가 펩티드에 결합할 수 있는 조건하에서 인큐베이션(incubation) 시킨 후,
- 4) 칼슘을 제거함으로써 고정된 펩티드로부터 항체를 용리(elution)시키는 단계로 이루어진 칼슘 의존성 단클론성 항체의 분리방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 항체가 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주 HB 9892에 의해 생산된 HPC-4인 것을 특징으로 하는 칼슘 의존성 단클론성 항체의 분리방법.

도면

도면1



도면2

