

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C07K 16/26		(45) 공고일자 1999년06월01일	
		(11) 등록번호 10-0188245	
		(24) 등록일자 1999년01월11일	
(21) 출원번호	10-1990-0015060	(65) 공개번호	특1991-0005887
(22) 출원일자	1990년09월22일	(43) 공개일자	1991년04월27일
(30) 우선권주장	P39 31 787.0 1989년09월23일 독일(DE) P40 17 344.5 1990년05월30일 독일(DE)		
(73) 특허권자	핵스트 악티엔게젤샤프트 오일러 라피스 독일연방공화국 데-6230 프랑크푸르트 암 마인		
(72) 발명자	스테판 뵐러 독일연방공화국 데-6230 프랑크푸르트 암 마인 80 하임첸베크 80		
(74) 대리인	이병호, 최달용		

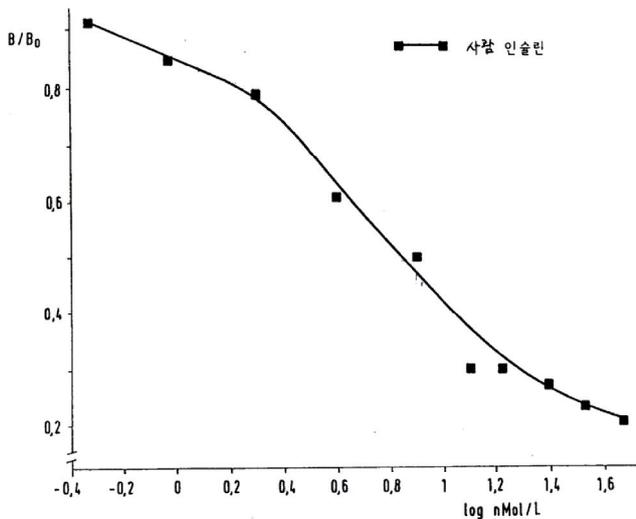
심사관 : 한현숙

(54) 면역원성 물질의 고도로 보존된 아미노산 서열에 대한 항체, 이의 제조 방법 및 이를 함유하는 면역검정물

요약

본 발명은 면역원성 물질의 고-보존된 아미노산 서열에 대한 항체, 이들 항체의 제조방법 및 면역검정에서의 이의 용도에 관한 것이다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

면역원성 물질의 고도로 보존된 아미노산 서열에 대한 항체, 이의 제조 방법 및 이를 함유하는 면역검정물

[도면의 간단한 설명]

제1도 내지 제13도는 본 발명에 따른 RIA에 있어서 각각 사람 인슐린, 돼지 인슐린, 소 인슐린, 양 인슐린, 닭 인슐린, 말 인슐린, 데-Phe-B<sub>1</sub>-돼지 인슐린, 디-Arg-B<sub>31</sub>-B<sub>32</sub>-사람 인슐린, 모노-Arg-B<sub>31</sub>-사람 인슐린, 돼지 프로 인슐린, 인슐린 A쇄 테트라설폰에이트, (14-21)옥타펩타이드 및 (16-21)헥사펩타이드의 민감-반응성을 나타내는 도이다.

제14도 및 제15도는 본 발명에 따른 RIA에 있어서 각각 칼시토닌 및 부세렐린의 비반응성을 나타내는 도이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 면역원성 물질의 고도로 보존된 아미노산 서열에 대한 항체, 이 항체의 제조방법 및 면역검정에서의 이의 용도에 관한 것이다.

면역측정 방법들이 항원과 같은 면역원성 물질의 적성 및 정량 측정을 위해 더욱 증가된 범위에서 사용된다는 것은 공지되어 있다. 이들 방법은 면역원성 물질과 하나 이상의 항체의 복합체, 면역원성 물질과 검출을 위해 표지된 결합 파트너중 하나의 복합체를 기초로 한다. 이에 의해 면역원성 물질과 하나 이상의 항체로부터 복합체의 형성 여부 및 형성된 양을 측정할 수 있다. 면역측정 방법은 밀스타인(Milstein) 및 코흘러(Kohler)에 의한 모노클로날 항체의 도입으로 현저히 개선되었으며, 면역측정 검정에 있어서 이들의 용도는 독일연방공화국 공개특허공보 제3,130,834호에 상세히 기술되어 있다. 특정 종의 인슐린 측정을 위한 면역측정법이 또한 이미 문헌에 기술되어 있다[참조: J. Havrankova et al., Journal of Immunoassay, 5(182), 131-144 (1984)]. 이들 항체는 면역원으로서 다양한 인슐린을 사용하여 면역화시킴으로써 수득된다. 천연 단백질의 동정은 관련 단백질(항원)의 단편으로 면역화시켜 수득한 안티-펩타이드 항체의 사용으로 보편적인 면역 측정 결정법에 대한 개선이 가능해졌다. 오늘에 이르러, 이와 같은 안티펩타이드 항체는 펩타이드의 동정 및 이에 따른 유전자 서열 분석의 중요한 도구가 되었다.

완전한 단백질로서 주입되는 경우, 예를 들어 펩타이드 호르몬 또는 뉴로펩타이드와 같이 단백질은 요구되는 농도에서 너무나 고도로 활성적이거나, 디프테리아 독소, 바이러스 및 기타 미생물과 같은 단백질은 요구되는 농도에서 매우 유독하므로, 이들 항체는 통상적인 방법으로는 단지 제한된 정도로만 생성될 수 있는 항혈청에 대한 물질을 측정하는데 특히 중요하다. 마찬가지로, 합성 백신의 개발에 이와 같은 안티펩타이드 항체를 성공적으로 사용할 수 있다 [참조: J.G. Sutcliff et al., Science, Vol. 219,660 (1983)]. 펩타이드 서열에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 항체가 문헌에 공지된 방법으로 수득되는 상기 펩타이드 서열의 선별은 이들 서열중 한 부분 이상이 천연 단백질의 표면에 위치(즉, 노출)되어 다중 하전된 또는 극성이 강한 작용성 그룹을 포함한다는 점이 유리한 것으로 여겨진다. 그러나, 당해 분야에서는 이와 관련하여 진화 과정에서 고도로-보존된 아미노산 서열을 나타내는 펩타이드 단편이 매우 불량한 면역원이라는 것을 상세히 기술하고 있다 [참조: G. Walter, J. Immunol. Med. 88, (1986), 149-161]. 진화과정에서 고도로-보존된 아미노산 서열은 이와 관련하여 주어진 단백질의 이러한 서열이 진화 과정에서 단지 약간 변화되거나 전혀 변화되지 않는 것으로 이해된다. 따라서, 예를 들어 말 및 래비트 사이토크롬 C는 약간의 아미노산 서열이 상이하다. 그러나, 상기 두 동물 종의 이러한 단백질의 다른 서열은 동일하다. 동물 종중 하나의 면역 시스템은 다른 종의 사이토크롬 C의 동일한 영역에 대한 항체를 생성하지 않는다는 것이 관찰되었는데, 이는 상기 서열이 결국 내인성 사이토크롬 C내에 존재하기 때문이다. 항원에 대한 면역 반응은 면역화 단백질 및 관련된 내인성 단백질 사이의 진화상 거리의 정도에 따라 향상되는 것으로 여겨진다.

따라서, 본 발명의 목적은 천연 단백질 및 유도체, 돌연변이체, 변성 단백질, 단편 또는 (합성) 전구체 둘다와 면역 복합체를 형성할 수 있는 항체를 제공하는 것이다.

이 목적은 특히 광범위한 종의 유전공학적으로 제조된 생성물 및 이의 유도체, 이의 변성 전구체 및 단편과 면역 복합체를 형성하는 항체를 제공한다. 인슐린과 같이 유전공학적으로 제조된 단백질은 이와 관련하여 특히 중요하다.

추가 목적은 미생물에서 난용성 봉입체로서 생성되고(당해 분야에 따른 면역학적 검정물로서는 현재까지 불가능하다)동시에 동일한 검정물을 사용하여 개개의 프로세싱 단계에서 단백질 농도를 측정할 수 있는 유전공학적으로 제조된 생성물의 초기 수율을 측정 가능케하는 면역측정 검정법을 개발하는 것이다. 초기 수율이란 발효 직후 실제로 존재하는 수율로 이해된다. 이 수율은 샘플 프로세싱 중의 손실에 의해 및 프로세싱 단계에 의해 변화되지 않는다.

놀랍게도, 본 발명에 이르러 관련된 천연 단백질의 고도로 보존된 펩타이드 단편으로 면역화시켜 수득한 항체가 상술한 목적을 달성한다는 것이 밝혀졌다.

따라서, 본 발명은 천연 단백질의 고도로 보존된 아미노산 서열을 나타내는 펩타이드 단편으로 면역화시켜 수득한 항체에 관한 것이다.

본 발명은 특히 인슐린의 고도로 보존된 펩타이드 단편으로 면역화시켜 수득한 항체에 관한 것이다.

본 발명은 또한 상술한 항체의 제조방법 및 면역 측정 검정에서의 이의 용도에 관한 것이다.

상기 및 하기에 고도로 보존된 아미노산 서열은 몇몇 종에서 존재하며(다소 약간 변형되었다해도) 진화 과정에서 미약하게만 변화되거나, 경우에 따라 전혀 변화되지 않은 주어진 단백질의 단백질 단편으로 이해된다. 본원에서 언급될 수 있는 예는 사람, 돼지, 양, 말, 소, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 악어, 방울뱀, 콜루브리드 뱀(colubrid snake), 세이 고래, 코끼리, 염소, 개, 원숭이, 스펀 고래(sperm whale), 핀 고래(fin whale), 랫트, 마우스, 햄스터 및 래비트 인슐린과 같은 공지된 많은 인슐린에 어떠한 변화 없이 존재하는 인슐린 A 쇠의 옥타펩타이드 (14-21)(Tyr-Glu-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn)이다.

천연 단백질은 천연적으로 존재하는 단백질로서 이해된다.

펩타이드 단편 및 단백질 단편은 관련된 펩타이드/단백질의 천연 성분인 이 펩타이드/단백질의 부분으로 이해된다. 이들 단편은 펩타이드/단백질의 부분 또는 개시 또는 말단을 나타내는 연결된 아미노산(소위 아미노산 서열)이다.

천연 단백질의 고도로 보존된 아미노산 서열에 대한 본 발명에 따른 항체의 제조는 하기 방법으로 가장 잘 수행된다.

1. 하기 기준에 따르는 관련된 아미노산 서열의 선택 :

a) 관련된 서열은 바람직하게는 노출되어 있어야 하며, 즉 바람직하게는 서열이 다중 하전되거나 극성이

강한 작용성 그룹을 포함하는 경우 또는 단백질의 2차 구조가 바람직하게는 분자로부터 돌출된 루프(loop)를 포함하는 경우, 천연 단백질의 표면에 위치해야만 한다. 대부분의 경우에, 상기 조건은 예를 들면, 아스파라긴(Asn), 아스파르트산(Asp), 프로린(Pro), 글루타민(Gln), 글루탐산(Glu) 및/또는 글리신(Gly) 등이 관련된 서열내에 다수로 존재할 때 성립된다.

b) 한편으로, 선택된 펩타이드 단편상의 잠재적인 에피토프의 수는 가능한 한 적어야 하지만, 다른 한편으로, 이 펩타이드 단편은 면역 반응을 위해 충분히 커야한다. 선택된 서열의 아미노산 수는 20개, 바람직하게는 12개, 특히 바람직하게는 10개, 매우 특히 바람직하게는 8개 이하이어야 하고, 아미노산 수가 4개, 바람직하게는 5개, 특히 바람직하게는 6개보다 짧아서는 안된다. 아미노산 수가 6개 내지 13개, 바람직하게는 7개 내지 11개, 특히 8개 내지 10개인 펩타이드 단편이 적합한 것으로 입증되었다.

c) 선택된 서열은 바람직하게는 관련된 천연 단백질의 N 또는 C 말단에 존재하지 않아야 하며, 본원에서의 N 및 C 말단은 완전한 천연 단백질의 상응하는 말단인 것으로 이해된다. 상기의 완전한 단백질이 서로 연결된 몇몇 단백질로 구성되어 있는 경우, 이 서열은 물론 상기 통합된 단백질의 내부 N 또는 C 말단에 존재할 수 있다.

2. 관련 아미노산 서열의 제조 :

선택된 단백질 단편을 제조하는데 있어, 예를 들면, 문헌에 공지되어 있는 메리필드(Merrifield) 펩타이드 합성법이 적합하다. 그러나, 천연 단백질의 효소적 또는 화학적 절단으로부터 적합한 단편을 수득하는 것도 완전히 가능하다. 짧은 서열들은 또한 순수한 화학적 방법으로 합성할 수 있다.

3. 담체에의 커플링(임의 공정):

특히, 면역 반응을 단지 불충분하게 일으키거나 면역 반응을 전혀 일으키지는 않는 짧은 단백질 단편 자체, 및 면역원성 단편의 경우, 선택된 단백질 단편 상에 담체를 커플링시키는 것이 바람직하다. 이 커플링은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 제조방법에 의해, 예를 들면 글루타르알데히드 또는 N-말레이미도-6-카프로일 1-하이드록시-2-니트로벤젠-4-설포네이트 나트륨 염(mal-sac-HNSA)과 같은 커플링 시약을 통해 이루어진다. 사용될 수 있는 담체의 예로는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아크릴아미드 또는 폴리-d-글루탐산-d-라이신과 같은 중합체 또는 PAM-3-Cys(PAM=팔미토일)과 같은 지방산 유도체 또는 소 혈청 알부민(BSA) 또는 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole limpet hemocyanin(KLH))과 같은 단백질이 있다.

바람직하게는, 단백질 단편의 몇몇 분자들이 담체에 커플링된다.

4. 단백질 단편 또는 담체-결합된 단백질 단편에 의한 종의 면역화 :

단백질 단편 또는 담체가 결합된 단백질 단편에 의한 종의 면역화는 문헌으로부터 공지된 방법에 의해, 예를 들면 면역원을 경우에 따라 CFA(완전한 프로인트 보조제) 또는 IFA(불완전한 프로인트 보조제)과 함께 근육내 주사함으로써 달성된다. 필요한 경우, 1회 이상의 부스팅 용량을 면역 반응이 발생한 후 투여할 수 있다. 종의 선택은 중요하지 않으며; 예를 들면 마우스, 랫트, 래비트, 양 또는 염소가 적합하다. 그러나, 다량의 항체-함유 혈청을 제조하는데 있어서는 양 또는 염소와 같은 큰 동물을 사용하는 것이 유리하다.

5. 혈청으로부터 항체의 분리 :

원칙적으로, 항혈청은 제1면역 반응이 일어난 후에 수거할 수 있다. 그러나, 사용된 동물종에 따라, 관련된 면역원을 1회 이상의 부스팅 용량으로 투여한 후에만 더욱 높은 역가가 수득된다. 사용 목적에 따라, 혈청을 정제 및 농축하거나, 또한 검정 배지내에서 추가의 정제 없이 즉시 희석하여 사용한다. 혈청의 정제 및 농축은 특히 샌드위치 검정물의 제조에 적합하다. 이것은 예를 들면, 황산 암모늄 침전에 이어 관련된 항원이 고정되는 친화성 칼럼 상에서의 분획화에 의해 수행 될 수 있다. 이 과정에서, 고정 단백질과 어떠한 상호작용도 나타내지 않는 모든 단백질이 분리 제거된다. 이후 관련된 단백질을 인식하여 고정된 단백질에 결합하는 항체를 칼럼으로부터 용출시킬 수 있다.

상기 5에 기술된 폴리클로날 항체를 수득하기 위한 다른 방법으로서, 물론 모노클로날 항체를 또한 제조할 수 있다. 이것은 예를 들어, 상기 4에 기술된 바와 같이, 마우스의 면역화에 이은 마우스 비장 세포, 예를 들면, NS 1 골수종 세포의 융합 및 적합한 세포의 클로닝에 의해 수행된다. 경우에 따라, 이렇게 수득된 모노클로날 항체는 예를 들면, 누드 마우스 내에 주입함으로써 증식시킬 수 있다. 원칙적으로, 이러한 모노클로날 항체의 제조방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있고 문헌에 기술되어 있다. 이어서, 후처리 및 정제는 상기 5하에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다.

본 발명에 따른 항체는 면역검정물의 제조에 사용될 수 있다. 이와 같은 면역검정에서, 본 발명에 따른 항체 또는 항원은 예를 들어, 고체상 위에 고정시킬 수 있다. 튜브, 비드 또는 미세역가 플레이트와 같은 다양한 기하학적 양태로서 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVC 또는 라텍스와 같은 합성 또는 천연 중합체와 같은 고체상에 항원 및 항체를 고정화시키는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 면역검정은 예를 들면, 경쟁 검정 또는 샌드위치 검정일 수 있다. 이러한 경우, 한 성분, 즉 항원 또는 항체를 검출용으로 표지시킨다. 표지는 통상적으로 방사성, 화학발광성 또는 효소적 표지를 통하여 수행한다. 항원 및 항체를 표지하는 상기 형태의 방법은 또한 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 본 발명에 따른 항체는 한 종의 천연 단백질 및 다른 종의 상응하는 천연 단백질 및 심지어 이들 단백질 유도체, 단편, 합성 및 천연 전구체 또는 변성 생성물 모두를 인식 할 수 있기 때문에, 이들이 면역화에 사용된 펩타이드 단편 또는 면역화에 사용된 펩타이드 단편의 60 내지 80% 이상에 상응하는 최소한의 이의 아단편을 함유하는 경우, 많은 종의 면역 검정물의 제조를 위해 본 발명에 따른 항체를 표지하여 문헌에 공지된 방법에 의해 RIA(방사성면역검정), CIA/LIA((화학)-발광성 면역검정) 또는 EIA(효소 면역검정)를 설계하는 것이 유리하다.

미생물중의 난용성 봉입체로서 생성되는, 유전공학적으로 제조된 생성물을 RIA로 측정하는데 특히 유리한 것으로 입증된 완충액 시스템은 인산염 완충액(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 트리스 완충액(트리스(하이드록시메

틸)아미노메탄) 또는 바비투레이트 완충액(예를 들면, 나트륨 디에틸바비투레이트)와 같은 통상적인 완충액 시스템외에 소 혈청 알부민(BSA), 락토알부민, 오브알부민, 난 알부민, 탈지유 분말(skim milk powder) 또는 젤라틴과 같은 하나 이상의 단백질 및 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 핵사데실트리메틸암모늄 브로마이드 또는 담즙산염과 같은 하나 이상의 이온성 세척제 및/또는 노니데트 P40<sup>®</sup> (Nonidet P40), 트리톤 X100<sup>®</sup> (Triton X100) 또는 트윈 20<sup>®</sup> (Tween 20)과 같은 하나 이상의 비이온성 세척제를 함유하는 것이다.

특정의 양태에서, 본 발명은 상이한 종의 인슐린 및 인슐린 유도체, 단편, 합성 및 천연의 변성된 인슐린 전구체 및 이들 변성된 인슐린 전구체의 유도체 모두와 면역 복합체를 형성하는 항체에 관한 것이다. 이들 다수종 인슐린 항체의 제조를 위해, 인슐린 단편을 상술한 기준 1a 내지 b에 따른 면역원으로서 선택한다. 적절한 예들은 인슐린 A 쇠의 A<sub>1</sub> 내지 A<sub>7</sub> 또는 A<sub>11</sub> 내지 A<sub>17</sub> 또는 A<sub>11</sub> 내지 A<sub>21</sub>서열 및 B 쇠의 시스테인 주변 영역이다. 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드 Tyr-Glu-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn가 특히 적합한 것으로 입증되었다. 이 옥타펩타이드는 문헌[참조: W. Koning, K. Kernebeck, Liebig's Ann. Chem., 1979, 227-247]으로부터 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 담체상의 커플링, 면역화 및 항체의 분리는 상술한 제조 단계 3 내지 5에 의해 수행된다. 수득된 인슐린 항체를 추가적인 가공 및 정제없이 다수종의 인슐린 검정물의 제조를 위해 사용할 수 있다.

이와 같은 다수종의 인슐린 검정물은 예를 들면, 문헌으로부터 공지된 방법에 따르는 RIA, CIA/LIA 또는 EIA로서 설계될 수 있다. 본 발명에 따른 인슐린 항체는 용제 중에 유리되어 있거나(예를 들면 침전 RIA 중에서), 고체상에 결합(고정)되어 존재할 수 있다. 침전 LIA의 경우에는 예를 들면 방사성 표지된-바람직하게는 방사성 요오드로 표지된-인슐린, 인슐린 단편, 인슐린 유도체, 천연 또는 합성 인슐린 전구체 또는 예를 들면, 본 발명에 따른 인슐린 항체의 생성에 사용되는 방사성 표지된 펩타이드 단편, 특히 방사성 요오드-표지된 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드가 적합하다. 샌드위치 면역 검정물의 제조를 위해서는 2개의 항체가 사용되며, 이중에서 일반적으로 고체상에 결합되지 않은 항체 하나를 표지한다. 2개의 항체는 인슐린의 동일한 에피토프에 대해서 유도될 수 있으나, 바람직하게는 인슐린의 상이한 에피토프에 대해 유도된다. 사용된 2개의 항체가 상이한 에피토프에 대해 유도되는 이러한 유형의 샌드위치 면역 검정물의 경우, 친화성 정제되고 방사성 요오드로 표지된 폴리클로날 또는 모노클로날 항체가 바람직하게 사용된다. 항체 또는 항원(인슐린, 인슐린 단편, 인슐린 유도체, 천연 또는 합성 전구체)을 문헌으로부터 공지된 방법에 따라 표지하며; 예를 들면 Iodo-Gen 방법이 방사성 요오드 표지를 위해 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 다수종 인슐린 검정물은 다양한 종의 인슐린 및 인슐린 유도체, 인슐린 단편, 합성 및 천연의 변성된 인슐린 전구체 및 이들 변성된 인슐린 전구체의 유도체 모두를 측정하여 결정하는데 사용될 수 있는, 현재 당해 분야에 따르는 인슐린 검정법에 비해 유리하다.

심지어 면역화(및 항체를 생성시키기 위해)에 사용되는 펩타이드 단편의 60내지 80%만을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 단백질도 검출하여 측정할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 단지 핵사펩타이드(16 내지 21)만을 함유하는 단백질조차도 예를 들면, 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드로 면역화시켜 수득한 항체를 함유하는 다수종 인슐린 검정물로 결정할 수 있다. 하기의 인슐린, 인슐린 유도체 또는 인슐린으로부터 유도된 단백질을 예를 들면 본 발명에 따르는 다수종 인슐린 검정물로 결정할 수 있다:

1. 이.콜라이(E.coli)내에서 발현되는 β-갈락토시다제/인슐린 융합체:  
P1, P6, P1-트리머-데-Met-데-Cys, P1-트리머-데-Met, P1-폴리-Gly-데-Met, P1-폴리-Gly-데-Met-데-Cys, P-Lz-감마;
  2. 이.콜라이내에서 발현되는 인터루킨-2/인슐린 융합체:  
pB40, pK52, pGF12, pIK10, pSW3, pSW2, pSW3<sup>+</sup>M;
  3. 이.콜라이내에서 발현되는 trp/인슐린 융합체:  
pB70, pINT14, pINT30, PINT41, pSL27, pINT91;
  4. 다양한 종으로부터의 인슐린:  
사람 인슐린, 돼지 인슐린, 양 인슐린, 말 인슐린, 소 인슐린, 닭 인슐린, 오리 인슐린, 칠면조 인슐린, 거위 인슐린, 악어 인슐린, 방울뱀 인슐린, 콜루브리드 뱀 인슐린, 세이 고래 인슐린, 코끼리 인슐린, 염소 인슐린, 개 인슐린, 원숭이 인슐린, 스펀 고래 인슐린, 핀 고래 인슐린, 랫트 인슐린, 햄스터 인슐린, 래비트 인슐린;
  5. 인슐린 유도체:  
B31-모노-Arg-사람 인슐린, B31, B32-디-Arg-사람 인슐린, B1-데-Phe-돼지 인슐린, A14-모노요오드-사람 인슐린;
  6. 인슐린 단편:  
인슐린 A 쇠 테트라설포네이트(소), 인슐린 A 쇠 테트라설포네이트(사람), 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드, 인슐린 A 쇠(16 내지 21) 핵사펩타이드;
  7. 인슐린 전구체:  
프레프로인슐린 S-설포네이트(P1), 프레프로인슐린(P1), 프레프로인슐린(pSW3), 프로인슐린(돼지).
- 또한, 본 발명에 따르는 다수종 인슐린 검정물은 이온성 및 비이온성 세제, 보조 단백질, 세제 혼합물

및 세제/보조 단백질 혼합물의 존재하에서도 측정이 가능하다는 장점이 있다. 사용될 수 있는 세제의 예로는 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 트리톤 X100<sup>Ⓢ</sup> (Triton X 100) 또는 노니데트 P40<sup>Ⓢ</sup> (Nonidet P40)이 있으며, 보조 단백질의 예로는 소 혈청 알부민(BSA), sks 알부민, 오브알부민 또는 이.콜라이 단백질이 있다. 이온성 세제는 바람직하게는 0 내지 0.3% 범위내에서 사용되고, 비이온성 세제는 바람직하게는 0 내지 2% 범위로 사용되며, 보조 단백질은 바람직하게는 0 내지 3% 범위(w/v에서의 %는 중량/용적임)에서 사용될 수 있다. 이들 물질의 존재하에서의 측정은 예를 들면, 유전공학적으로 제조된, 당해 분야에 따르는 면역측정 방법으로선 지금까지 불가능했던, 난용성 생성물도 실질적으로 검정을 방해하지 않고서 측정가능하다는 장점이 있다. 보조 단백질 또는 칼시토닌 또는 노나펩타이드 부세렐린과 같은 외래 단백질뿐만 아니라 통상적인 완충액 시스템은 모두 실질적으로 다수종 검정을 방해하지 않는다. 따라서, 예를 들어 미생물 내에서 난용성 봉입체로서 생성되는 유전공학적으로 제조된 생성물의 방사면역학적측정(RIA 측정)을 위해 매우 적합하다고 입증된 완충액 시스템은 인산염 완충액(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 트리스 완충액(트리스(하이드록시메틸)아미노메탄) 또는 바비투레이트 완충액(예를 들면, 나트륨 디에틸바비투레이트)과 같은 통상적인 완충 물질 외에, 소 혈청 알부민(BSA), 락토알부민 또는 오브알부민과 같은 단백질 하나 이상 및 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드 또는 담즙산염과 같은 이온성 세제 하나 이상 및/또는 노니데트 P40, 트리톤 X 100 또는 트윈 20<sup>Ⓢ</sup> (Tween 20)과 같은 비이온성 세제 하나 이상을 함유한다.

본 발명에 따르는 인슐린 항체는 상당히 상이한 항원성 인슐린의 상응하는 측정에 사용될 수 있으므로, 이들은 또한 이미 공지된 고 특이적 인슐린 항체와 배합시켜 인슐린 분자내 4차 구조 및 필수적인 구조적 특징 및 덜 필수적인 구조적 특징 부분의 연구에 적합하다.

[실시예]

[실시예 1]

인슐린 A-쇄(14 내지 21) 옥타펩타이드의 BSA로의 커플링

보호된 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드를 문헌[참조: W. Konig, K. Kernebeck, Liebigs Ann. Chem. 1979, 227-247]의 방법에 의해 합성한다. 담체 분자로서의 BSA에 결합시키기 위해, 보호된 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드Ddz-Tyr(tBu)-Gln-Leu-Glu(OtBu)-Asn-Tyr(tBu)-Cys(Trt)-AsnOtBu를 트리플루오로아세트산 및 에탄티올의 혼합물로 처리하여 모든 보호 그룹을 제거한다[참조: W. Konig, K. Kernebeck, Liebigs Ann. Chem., 1979, 227-247]. 이어서, 수득된 생성물을 이작용성 커플링 시약 N-말레이미도-6-카프로일 1-하이드록시-2-니트로벤젠-4-설포네이트 나트륨 염(mal-sac-HNSA)의 보조하에 BSA에 공유결합시킨다. 이 목적을 위해 mal-sac-HNSA 55mg을 pH 7.4의 0.1M 인산염 완충액 10ml중 BSA 111mg의 용액(라이신 95당량에 상응)에 가한다. 실온에서 60분 동안 교반한 후, 이 반응 혼합물을 세파덱스 G 25상에서 pH 6.2의 0.1M 인산염 완충액 중에서 크로마토그래피하고, 처음에 용출되는 피크를 수집한다. 인슐린 A 쇠(14 내지 21) 옥타펩타이드 67mg(65 μmol)을 이 용액에 가한다. 이어서, 이 혼합물을 실온에서 밤새 방치한다. 반응 혼합물을 물에 대해 투석하여 생성된 용액을 동결건조시킨다.

수득량 : 122mg

단백질 함량 : 83%

BSA 1M당 옥타펩타이드 15M(아미노산 분석에 의해 측정)

[실시예 2]

면역화

3가지 동물종, 즉 잡종의 사육된 래비트(마리수=3) 및 양 1마리 및 염소 1마리를 면역화에 사용한다. 각 래비트에게 CFA(완전한 프로인트 보조제, Dif co 제품)중의 실시예 1로부터의 옥타펩타이드/BSA 접합체 0.1mg, 양 및 염소에게 CFA중의 옥타펩타이드/BSA 접합체 각각 2.5mg을 초기 용량으로서 근육내 투여하여 모든 동물의 면역화를 동시에 개시한다. 최초 투여 후 3주에서, 동물에게 IFA(불완전한 프로인트 보조제, 베링거 제품)중의 동량의 옥타펩타이드/BSA 접합체의 부스팅 용량을 투여하고, 이 과정을 4, 8, 13, 18 및 25주에서 반복한다. 27, 32 및 37주째에, IFA중의 동량의 순수한 비-BSA-접합된 옥타펩타이드의 부스팅 용량을 투여한다. 항혈청은 각 경우에서 10주째에 처음으로 뽑아내고, 그후 각각의 부스팅 용량 투여 후 10일 경과하여 뽑아낸다. 역가는 문헌[참조: T. Chard, An introduction to Radioimmunosassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1987), PP. 101-102]에 기술된 바와 같이 측정한다. 이를 위하여, MSTB 완충액(완충액 조성에 대해서는 실시예 3 참조)에서 뽑아낸 혈청을 연속 희석(1:10 내지 1:10<sup>6</sup>)하고, 각 경우에서 결합된 트레이서(tracer)의 양을 검정 조건(실시예 3참조)하에 측정한다. 역가는 희석된 특수 혈청의 항체가 사용된 트레이서의 50%와 결합하는 값이다. 이 역가는 역수로서 기록된다. 상술한 면역화된 동물들의 혈청에 대한 역가는 1:500 내지 1:10,000이다.

[실시예 3]

방사면역검정물의 제조 및 수행

사용된 물질

항혈청

방사면역검정물의 제조를 위해, 역가가 1:500인 양 항혈청(S 239)을 사용한다. 사용된 항혈청은 더 이상의 정제없이 직접 사용한다. 혈청의 희석비는 1:30이며(MSTB 완충액중); 이것을 -20°C에 저장한다. 사용되는 희석비는 1:500(MSTB 완충액중)이다.

**MSTB 완충액**

사용된 MSTB 완충액의 조성:

1M NaOH를 사용하여 pH 7.5로 조절한 0.1M 모르폴리노프로판설폰산(MOPS)

2.5%(w/v) 소 혈청 알부민

0.2%(w/v) 나트륨 도데실 설페이트

0.2%(w/v) 트리톤 X-100

0.04%(w/v) 나트륨 아지드

면역글로불린 용액

이중 희석수의 농도가 10mg/ml인 면역글로불린 용액을 사용하여 검정을 수행한다.

트레이서

<sup>125</sup>I-표지된 돼지 인슐린(Behringwerke AG, Marburg, prod. no. 0CSM)을 트레이서로서 사용한다(10ng 74 KBq 동결건조물). 시험 튜브 1개당 총 활성 20,000 내지 30,000 계수가 사용된다.

표준물

표준물의 단백질 함량을 먼저 측정한다. 이어서, RIA중에서 마지막에 측정될 물질(다양한 종의 인슐린, 16개 인슐린 유도체, 인슐린 전구체 등)의 함량을 측정한다. 이어서, 표준물을 MSTB 완충액 중 2,000ng/ml의 농도를 조정한다. 표준플롯(Plot)을 기록하기 위해, 각 경우에 농도가 하기와 같은 기하학적 연속 희석물을 제조한다: 3.71; 7.5; 15; 30; 60; 120; 240; 480; 960; 1,920.

표준 플롯의 기록(검정 조건)

표준 플롯을 측정하기 위해, 표준물 100 μl, 트레이서 100 μl 및 항혈청 100 μl를 각 튜브(Sarstedt사 제품, 제품 번호 55 내지 535)내로 피펫팅한다. 샘플을 잘 혼합하고, 실온(18 내지 25°C)에서 밤새(18시간) 방치한다. 폴리에틸렌 글리콜(분자량 약 4,000) 100 μl로 침전시키기 전에, 면역글로불린 용액 50 μl를 가하고 이 혼합물을 잘 혼합한다. 20분 후에, 1,500 x g에서 원심분리를 수행하고 상층액을 버린다. 이어서, 침전물을 r-계수기[감마 계수기(gamma counter) 1277, Pharmacia LKB 제품]내에서 1분간 측정한다. 각 경우에 평가를 위해 2회 측정한다.

블랭크(blank) 측정

상기 표준 플롯의 기록하에 기술된 공정을 블랭크 측정에 사용한다. 그러나, 여기서는 표준물 대신 MSTB 완충액 100 μl를 사용한다.

[실시에 4]

RIA에서 다양한 인슐린 및 이로부터 유도된 단백질의 측정

항량이 이미 측정된 인슐린 또는 인슐린으로부터 유도된 단백질을 갖는 표준물(실시에 3: 표준물 참조)을 기준으로 하여, 표준 플롯을 하기 인슐린에 대해 기록한다:

사람 인슐린(제1도), 돼지 인슐린(제2도), 소 인슐린(제3도), 양 인슐린(제4도), 닭 인슐린(제5도) 및 말 인슐린(제6도), 유도체 데-Phe-B1-돼지 인슐린(제7도), 디-Arg-B<sub>31</sub>-B<sub>22</sub>-사람 인슐린(제8도), 모노-Arg-B<sub>31</sub>-사람 인슐린(제9도), 돼지 프로인슐린(제10도) 및 인슐린 A쇄 테트라설포네이트(제11도) 및 (14 내지 21) 옥타펩타이드(제12도) 및 (16 내지 21) 헥사펩타이드(제13도).

도면에서 나타난 B/Bo 값은 측정된 활성 B 및 최대 활성 Bo(트레이서에 의한 항체의 완전 포화)의 비율을 나타낸다. 제1도 내지 제13도에서 나타난 표준 플롯은 다수의 인슐린에 대한 민감한 측정 방법이 본 발명에 따르는 항체를 사용한 본 발명에 따르는 RIA에 의해 제공된다는 것을 명백히 입증하고 있다.

측정시 외래 단백질 및 완충액 시스템의 영향을 조사한 결과, 고농도의 BSA 또는 이.콜라이 단백질 중 어느 것도 검정을 전혀 방해하지 않음이 밝혀졌다. 음성대조군으로서 칼시토닌 및 부세렐린을 옥타펩타이드와 동일한 용량으로 검정 혼합물에 가하여 소형 펩타이드 구조물과의 교차-반응성의 부재를 입증한다. 어떤 교차-반응성도 관찰되지 않았다(제14도 및 제15도 참조).

**(57) 청구의 범위**

**청구항 1**

천연 단백질의 고도로 보존된 아미노산 서열을 나타내는 펩타이드 단편인 인슐린 A-쇄의 A<sub>14</sub> 내지 A<sub>21</sub> 옥타펩타이드로 면역화시킴으로써 수득된 항체.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 아미노산 서열이 천연 단백질의 표면상에 위치하는 항체.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 아미노산 서열이 하전되거나 극성이 강한 작용성 그룹을 포함하는 항체.

**청구항 4**

제1항 또는 제2항에 있어서, 아미노산 서열이 Asn, Asp, Pro, Gly, Gln 및 Glu로부터 선택된 아미노산 하나 이상을 포함하는 항체.

**청구항 5**

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역화에 사용된 펩타이드 단편의 아미노산 서열과 60 내지 80% 이상 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 교차-반응하는 항체.

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서, 인슐린 A-쇄의 A<sub>14</sub> 내지 A<sub>21</sub> 옥타펩타이드를 포함하는 단백질과 교차-반응하는 항체.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서, 인슐린 A-쇄의 A<sub>16</sub> 내지 A<sub>21</sub> 헥사펩타이드를 포함하는 단백질과 교차-반응하는 항체.

**청구항 8**

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리클로날 항체인 항체.

**청구항 9**

제1항 또는 제2항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

**청구항 10**

인슐린 A-쇄의 A<sub>14</sub> 내지 A<sub>21</sub> 옥타펩타이드로 적합한 동물종을 면역화시킨 후, 동물종의 혈청으로부터 항체를 분리함을 포함하는, 제1항에 따른 항체의 제조방법.

**청구항 11**

천연 단백질의 고도로 보존된 아미노산 서열을 나타내는 펩타이드 단편인 인슐린 A-쇄의 A<sub>14</sub> 내지 A<sub>21</sub> 옥타펩타이드로 면역화시키고, 이러한 면역화된 동물종의 비장 세포를 NS1 골수종 세포와 융합시킨 다음 면역화에 사용된 펩타이드 단편에 대한 모노클로날 항체를 분비시키는 하이브리도마를 선별함을 포함하는, 제9항에 따른 항체의 제조방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 면역화에 사용된 펩타이드 단편이 담체에 커플링되는 방법.

**청구항 13**

제1항에 따른 하나 이상의 항체를 함유하는 면역검정물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 항체 또는 항체들과 면역 복합체를 형성하는 표지된 항원을 함유하는 면역검정물.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 하나 이상의 항체가 표지된 면역검정물.

**청구항 16**

제14항 또는 제15항에 있어서, 표지화가 방사성 표지물, 화학발광성 표지물 또는 효소적 표지물로 수행된 면역검정물.

**청구항 17**

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 고체상에 고정된 면역검정물.

**청구항 18**

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세제, 보조 단백질 또는 이들 모두가 함유된 면역검정물.

**청구항 19**

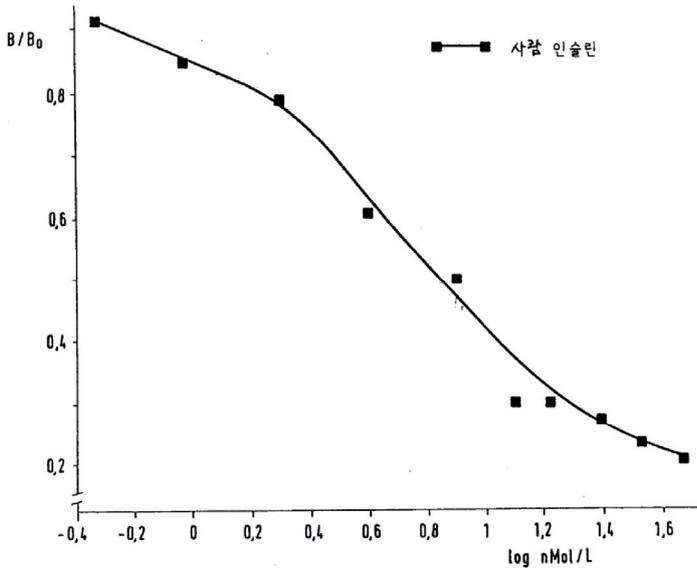
제18항에 있어서, 하나 이상의 이온성 세제 및 하나 이상의 비이온성 세제가 함유된 면역검정물.

**청구항 20**

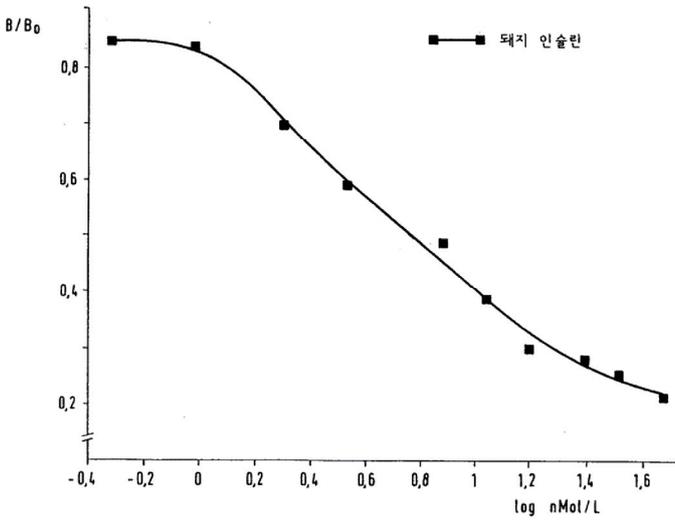
제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 고특이적 인슐린 항체가 추가로 함유된 면역검정물.

**도면**

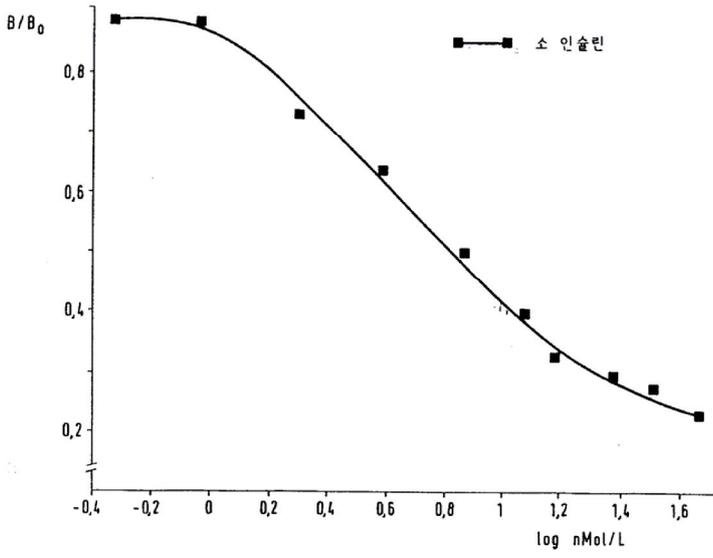
도면1



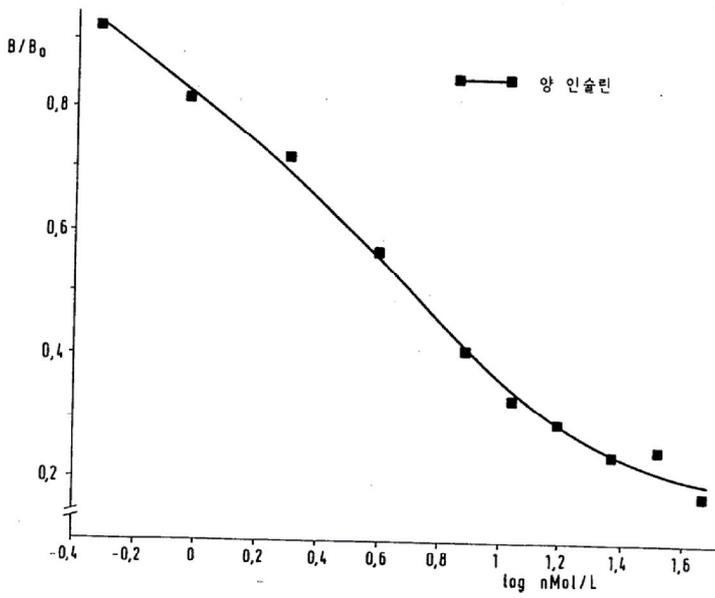
도면2



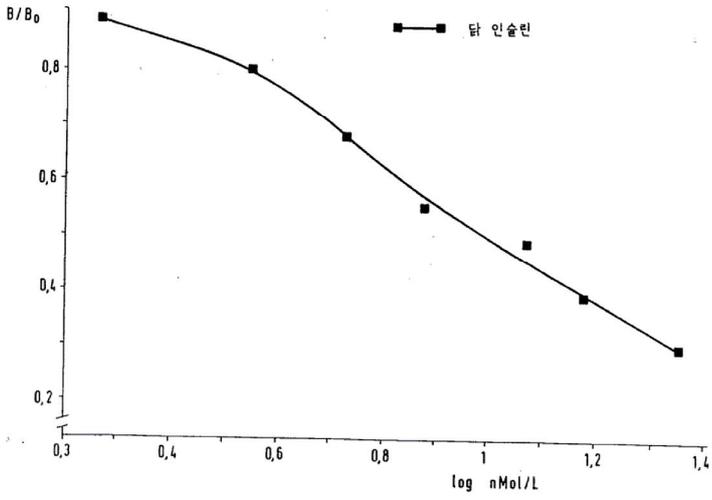
도면3



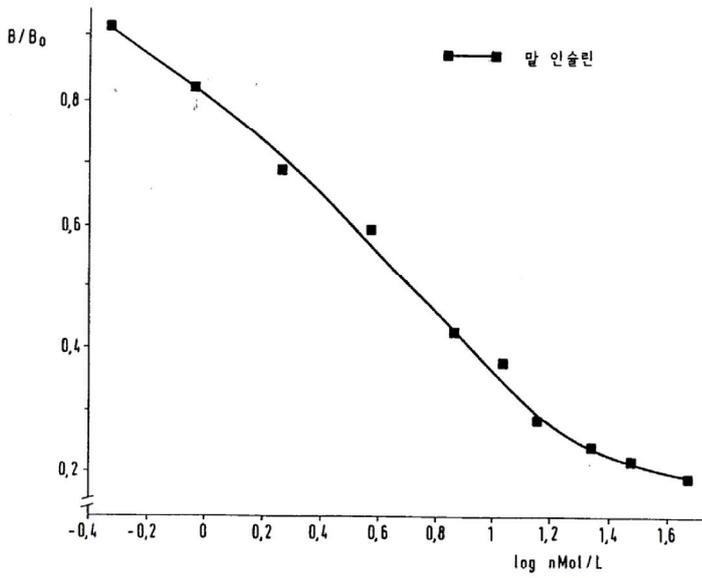
도면4



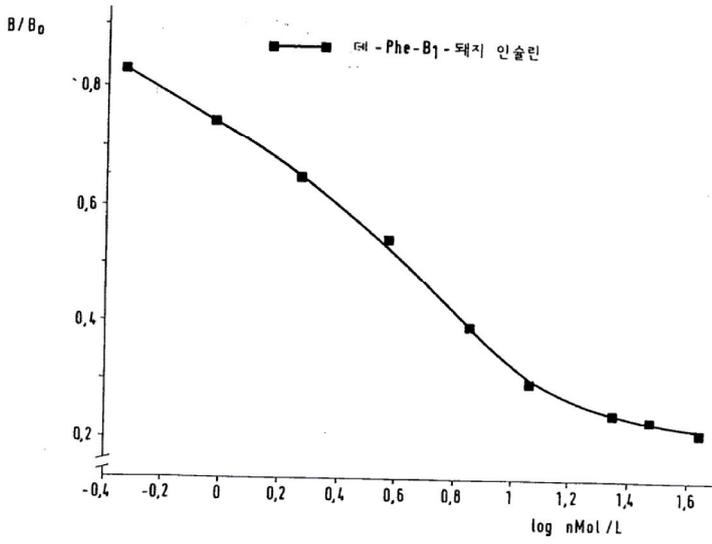
도면5



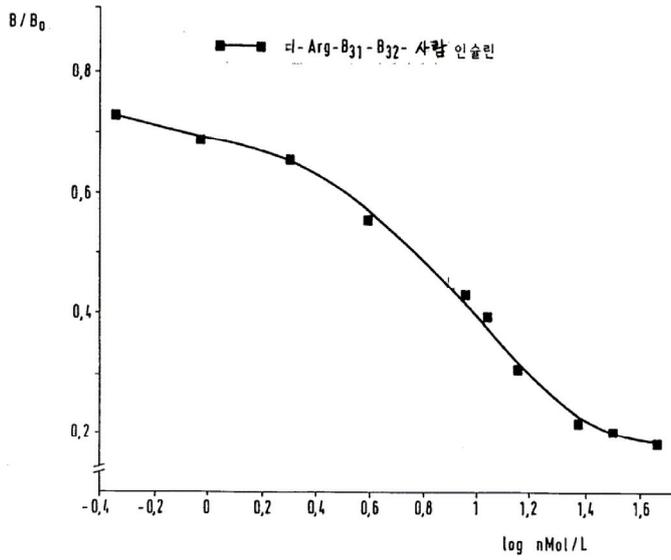
도면6



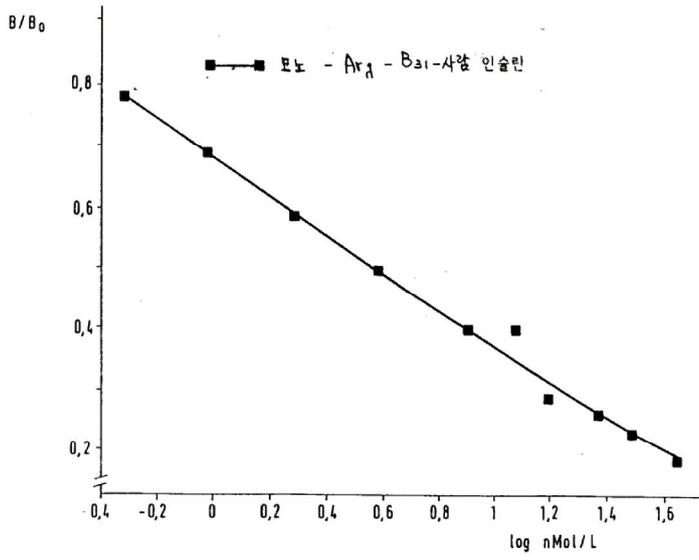
도면7



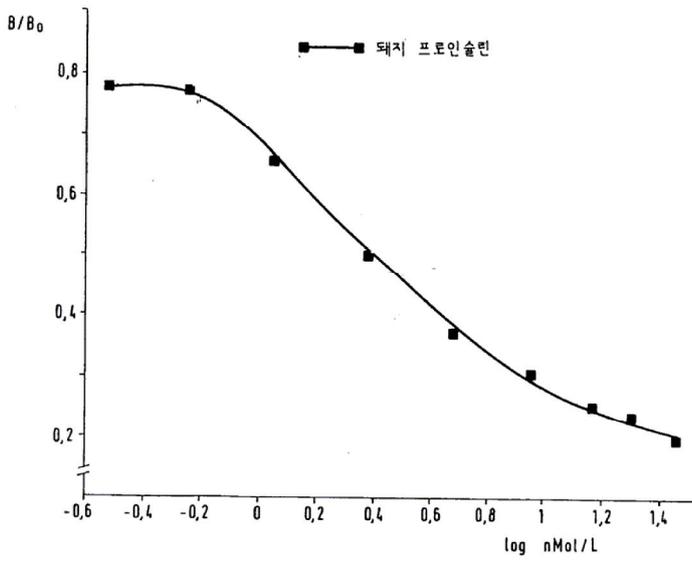
도면8



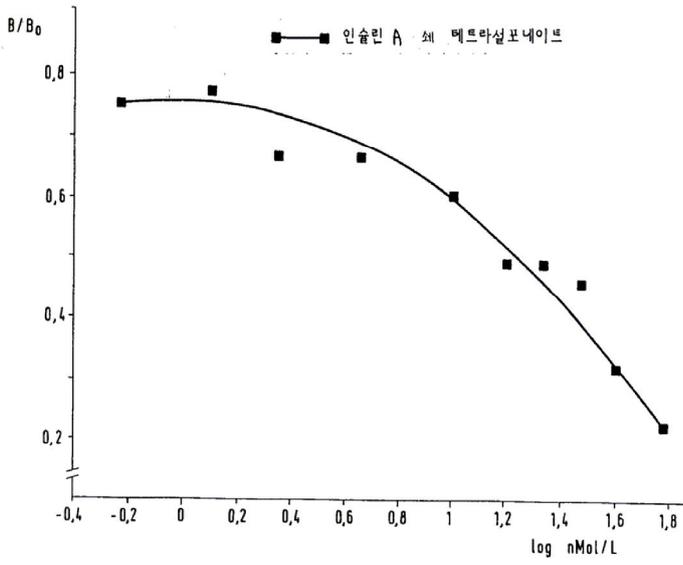
도면9



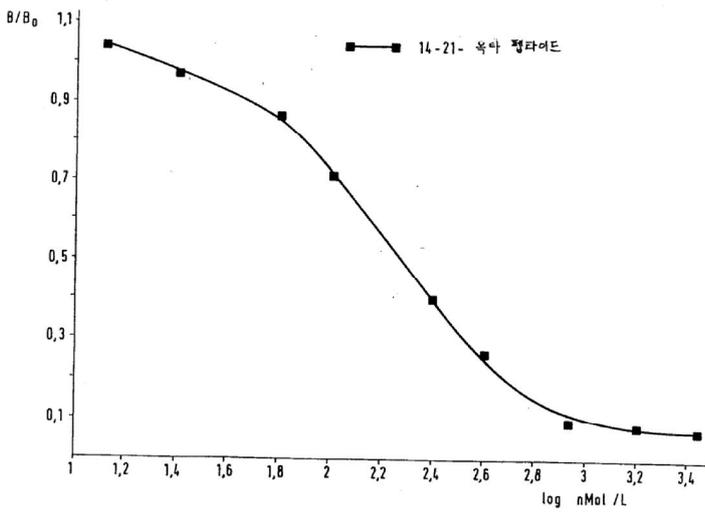
도면10



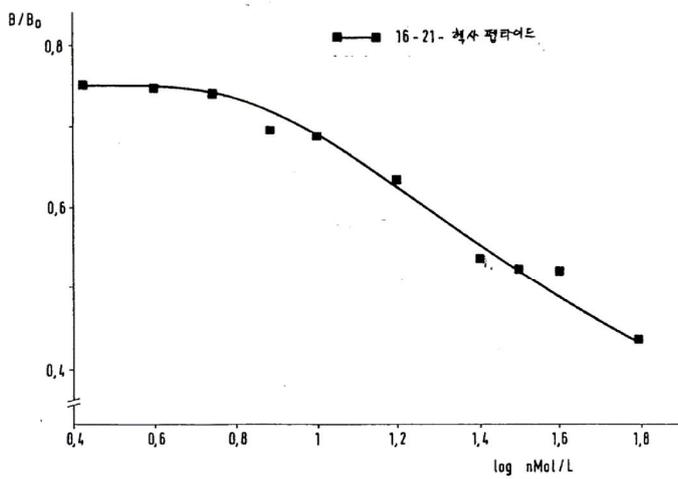
도면11



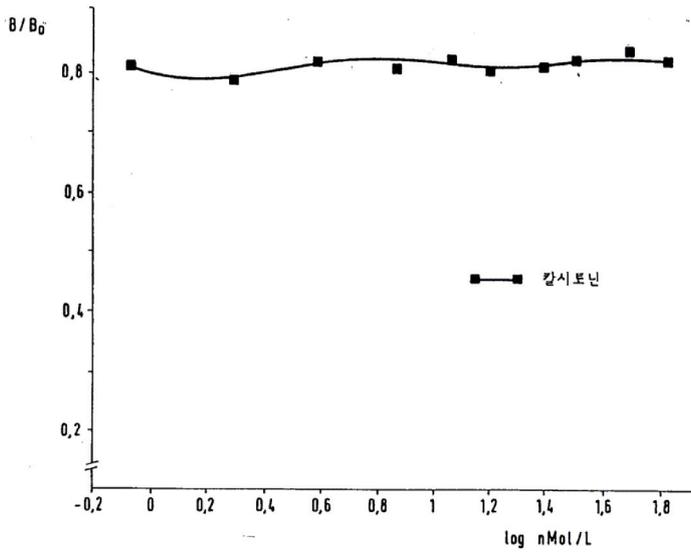
도면12



도면13



도면14



도면15

