

단일클론성 항체를 이용한 용모막 성선자극 호르몬의 효소 면역측정법

차상훈 · 김학주 · 김원배 · 양중익

동아제약(주) 연구소

(Received February 19, 1986)

Enzyme Immunoassay for Human Chorionic Gonadotropin Using Monoclonal Antibodies

Sang Hoon Cha, Hack Joo Kim, Won Bae Kim and Jung Ik Yang

Research Lab., Dong-A Pharm. Co., Ltd. Seoul 131, Korea

Abstract—Monoclonal antibodies against human chorionic gonadotropin (hCG) were prepared and characterized by examining isotype, epitope binding, cross reactivity and affinity constants. And a sandwich type enzyme immunoassay for native hCG was developed with solid phase monoclonal antibody against the conformational determinant expressed only on native hCG and horseradish peroxidase conjugated monoclonal antibody against the β -subunit of hCG. The assay was sensitive to 1 mIU hCG/ml and shown a linear response up to 200 mIU hCG/ml. The cross reactivity for luteinizing hormone and β -subunit of hCG were 1% and 0.18%, respectively.

용모막성선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, hCH)은 분자량 38,000 정도의 당단백질 호르몬으로 30% 정도의 탄수화물을 함유하고 있으며 α 와 β subunit로 구성되어 있다.^{1,2)}

96개의 아미노산으로 구성되어있는 α -subunit (α -hCG)는 황체호르몬, 갑상선자극 호르몬 및 난포호르몬의 α -subunit와 탄수화물함량이 다른 것이외에는 구조적으로 면역학적으로 거의 유사하다. 또한 145개의 아미노산으로 구성되어있는 β -subunit(β -hCG)는 121개의 아미노산으로 구성되어 있는 황체호르몬의 β -subunit와 비교해 볼때 N말단으로부터 115개의 아미노산중 83.5%(96개)가 동일하며 β -hCG에만 특이하게 존재하는 부분은 C말단으로부터 30개 정도에 불과하다. 따라서 동물의 항혈청을 이용하는 종래의 방법으로는 hCG에 대한 특이한 항체를 얻기가 어렵다.

한편 hCG는 수정란의 착상이 이루어진 후 분비되어 초기 3개월간 급증한 후 차츰 감소하는 경향을 나타내는 호르몬으로써 이를 측정함으로써 조기에 임신진단을 할 수 있으며 자궁의 임

신(ectopic pregnancy)과 자연유산(spontaneous abortion) 같은 비정상임신을 판별할 수 있다.³⁾ 또한 hCG는 trophoblastic tumor 및 몇 종류의 non-trophoblastic tumor 환자에서 검출되어져 hCG를 분비하는 tumor의 진단 및 경과추적의 marker로 이용되고 있다.^{4,5)}

임신의 경우에 있어서 혈중내 hCG는 거의 native한 형태로 존재하지만 tumor 환자에 있어서는 α -hCG, β -hCG 및 native한 hCG의 분비 비율이 경우에 따라 다르므로 hCG를 분비하는 tumor를 진단하는 경우에는 α -hCG, β -hCG 및 native한 hCG의 양을 자기 측정하는 것이 합리적이라는 보고가 있다.⁴⁻⁶⁾

본 연구에서는 hCG에 대한 단일클론성 항체를 제조하였으며 이를 이용하여 native한 hCG만을 측정할 수 있는 효소 면역측정법에 대하여 검토하였다.

실 험 방 법

재료—HCG(14,000IU/mg, Scripps Lab.), β -

hCG(7,755IU/mg, Calbiochem-Behring), Luteinizing hormone(5,000IU/mg), Follicle-stimulating hormone(5,650IU/mg), Thyroid-stimulating hormone(8IU/mg), Polyethylene glycol, O-phenylenediamine · 2 HCl(이상 Sigma Chem. Co.), Horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG(Miles Lab.), Immunoplate(Nunc), Polystyrene bead(5/16", Clifton), Hydroxylapatite(BRL), Ultrogel AcA34(LKB), ^{125}I -hCG(89.7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, NEN), 기타 시약은 1급 이상의 순도를 가진 것을 사용하였다.

배지조성—2 mM L-glutamine, 100 IU/ml의 penicillin, 0.1 mg/ml의 streptomycin과 10% fetal bovine serum을 함유한 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 세포배양용 기본배지로 사용하였다.

면역—50 μg 의 hCG(3,326IU/mg, Sigma Chem. Co.)를 0.2 ml의 생리식염수에 녹인 후 동량의 Complete Freund's adjuvant와 혼합하여 3주간격으로 생후 6주 정도의 Balb/c 마우스 복강에 3~5회 주사하였다. 세포융합 3일 전에는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 hCG를 0.2 ml의 생리식염수에 용해하여 꼬리정맥을 통하여 주사하였다.

세포융합—면역조작이 끝난 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 단세포로 만든다. 비장세포(10^8 개)와 형질세포종인 SP2/0-Ag 14(10^7 개)를 섞어 원심분리하여 침전물을 얻은 후 7.5% dimethylsulfoxide과 40%(w/v) polyethylene glycol 4,000을 함유한 DMEM을 이용하여 Zola 등⁷⁾의 방법에 따라 세포융합을 실시하였다. 융합세포의 선별에는 100 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine 및 0.4 μM aminopterin이 첨가된 기본배지(HAT배지)를 이용하였다.

융합세포의 검색—Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 융합세포를 검색하였다. HCG 또는 β -hCG를 0.05M carbonate buffer(pH 9.6)에 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하여 Immunoplate에 well당 100 μl 씩 분주하고 37°C에서 2시간 방치한 후 phosphate buffered saline(0.01M PO_4 buffer pH 7.2 : 0.15M NaCl, PBC)으로 세척하고 검색에 사용하였다. 배양액을

100 μl 씩 각 well에 가하고 37°C에서 2시간 반응시키고 PBS로 세척한다. 1% BSA를 함유한 PBS(1% BSA-PBS)로 500배 희석한 horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG를 100 μl 씩 각 well에 가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 PBS로 세척하고 효소기질용액으로써 5 mM H_2O_2 을 14.5 mM O-phenylenediamine · 2 HCl을 함유한 0.1M sodium citrate buffer(pH 5.3)를 100 μl 씩 가한다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 2N H_2SO_4 를 100 μl 씩 가하고 492 nm에서 흡광도를 측정한다. 측정결과 강한 양성반응을 나타내는 well은 limiting dilution법⁷⁾에 의하여 cloning 하였다.

단일크론성 항체의 특성검토—유사당단백질 호르몬에 대한 교차반응성은 1차적으로 competitive ELISA를 사용하여 비교측정하였으며 2차적으로는 Wang 등⁸⁾의 방법에 따라 ^{125}I -hCG를 사용한 competitive RIA를 이용하여 교차반응성(%)를 구하였다. 항원친화성은 Competitive RIA 결과를 이용한 Scatchard plot analysis에 의하여 결정하였다. Isotype은 immunodiffusion법으로 확인하였다.

Competitive ELISA—융합세포 검색시 사용한 방법과 동일하나 반응 첫단계에서 100 μl 의 배양액대신에 1% BSA-PBS로 희석한 50 μl 의 배양액과 50 μl 의 황체호르몬용액(5 IU/ml)을 각 well에 가한다. 대조실험으로는 황체호르몬용액 대신에 50 μl 의 1% BSA-PBS를 사용하였다.

단일크론성 항체의 대량생산—0.5 ml의 pristane을 Balb/c 마우스 복강에 주사하고 14일 후에 융합세포를 3×10^6 cells/mouse의 양으로 복강에 주사한다. 10~15일 경과 후 복수액을 취하여 hydroxylapatite를 이용한 Stanker 등⁹⁾의 방법에 따라 단일크론성 항체를 정제하였다.

항체흡착비드의 제조— α -1201이나 C-3301을 0.1M glycine buffer(pH 8.2)에 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하고 폴리스티렌 비드를 1 ml에 3개의 비율로 넣은 후 40°C에서 3시간 반응시킨다. PBS로 2회 세척하고 1% BSA-PBS를 비드 3개당 1 ml의 비율로 가한다. 40°C에서 1시간 반응시키고 PBS로 3회 세척한 뒤 50°C 이하에서 승

풍건조하여 사용하였다.

효소표지항체의 제조—Sodium m-periodate를 이용한 Nakane 등¹⁰⁾의 방법에 따라 β -2405에 horseradish peroxidase를 결합시킨 후 Ultrogel AcA 34를 이용한 gel filtration chromatography로 효소표지항체를 정제하였다. 정제한 효소표지항체를 25% calf serum이 함유된 PBS로 희석하여 효소표지항체액을 제조하였다.

효소 면역측정법—300 μ l의 검체를 반응시험관 (12 \times 75mm)에 가하고 항체 흡착비드를 넣는다. 40°C 항온수조에서 20분간 반응시킨 후 증류수로 2회 세척한 뒤 300 μ l의 효소표지항체액을 가한다. 40°C 항온수조에서 20분간 반응시킨 뒤 증류수로 3회 세척하고 300 μ l의 효소기질용액을 가한다. 효소기질용액 조성은 전술한 바와 같다. 20°C에서 30분간 반응시킨 후 1ml의 1N H₂SO₄를 가하고 492nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 standard 용 호르몬의 희석액으로는 25% calf serum이 함유된 PBS를 사용하였다.

실험결과 및 고찰

세포융합—4회의 세포융합을 실시한 결과, Table I에서와 같이 89%의 융합세포율을 보였으며 융합세포군중에서 hCG와 반응성을 나타내는 것은 7% 정도였다. Limiting dilution법으로 cloning하여 23종의 세포주를 확립하였다.

Competitive ELISA를 이용한 교차반응성조사—HCG는 황체호르몬과 구조적으로 매우 유사하므로 hCG를 면역원으로 사용하였을 때 얻어

Table I—Summary of the production of hybridomas secreting monoclonal antibody against human chorionic gonadotropin

Fusion number	No. of wells seeded with fused cells	No. of wells showing growth of hybrids (% of total)	No. of positive wells for anti-hCG	No. of established hybridomas
I	576	529(92)	37	3
II	576	478(83)	22	4
III	576	501(87)	29	7
IV	576	541(94)	49	9

지는 단일클론성 항체중에는 황체호르몬과 교차반응성을 나타내는 것이 많이 존재하게 된다. β -hCG에 특이한 단일클론성 항체를 생산하는 융합세포주를 선별하기 위하여 hCG 및 β -hCG를 이용한 ELISA에서 동시에 반응성을 보이는 융합세포주에 대하여 1차적으로 competitive ELISA를 이용하여 황체호르몬과 교차반응성이 작은 단일클론성 항체를 생산하는 융합세포주를 선별한 후 최종적으로 competitive RIA를 이용하여 교차반응성을 측정하였다. Competitive ELISA에 의한 교차반응성검사의 타당성을 검토하기 위하여 hCG 및 β -hCG에 반응성을 보이는 β -2408과 β -2411 배양액을 여러농도로 희석하여 5IU/ml의 황체호르몬과 섞어 competitive ELISA를 실시한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양액의 희석비율에 따라 저해정도가 다르게 나타나지만 순실험 교차반응성을 상대비교할 수 있었다. 이들 단일클론성 항체의 교차반응성을 competitive RIA로 확인한 결과 β -2408은 1.5%, β -2411은 55%의 황체호르몬에 대한 교차반응성을 나타내었다.

단일클론성 항체의 특성—제조한 단일클론성 항체들 중에서 hCG에 특이한 반응성을 보이기

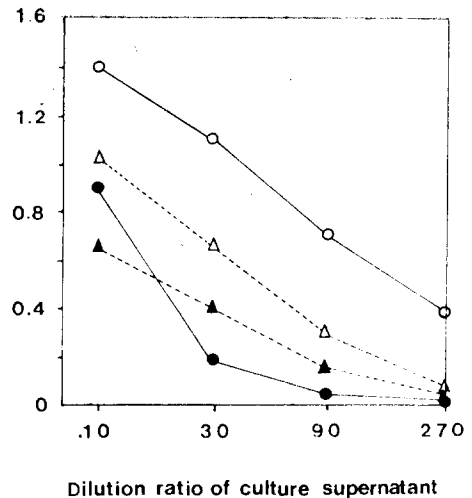


Fig. 1—Titration curve of monoclonal antibodies in the presence (●, ▲) and absence (○, △) of luteinizing hormone in the competitive ELISA system.
○, ●; β -2411, △, ▲; β -2408

Table II-Characteristics of monoclonal antibodies used

Antibody	Affinity constant ^a Ka, L/M	Isotype ^b	% Cross reactivity ^c				
			HCG	β -hCG	LH	FSH	TSH
α -1201	4×10^9	IgG ₁	100	<0.5	100	100	120
β -2405	2.7×10^{10}	IgG ₁	100	82	<0.5	<0.5	<0.5
C-3301	2.8×10^9	IgG ₁	100	<0.5	3.5	<0.5	<0.5

a; Affinity constants were calculated by Scatchard plot analysis, b; Isotyping was done by immunodiffusion, c; Cross reactivity was determined as the ratio of hCG to the other cross reactants required for 50% inhibition of monoclonal antibody binding to ¹²⁵I-hCG, HCG; human chorionic gonadotropin, LH; Leuteinizing hormone, FSH; Follicle-stimulating hormone, TSH; Thyroid-stimulating hormone.

나 항원친화성이 높은 3종류의 단일크론성 항체의 특성을 Table II에 나타내었다. α -hCG에 대한 단일크론성 항체인 α -1201은 hCG 및 유사당단백질 호르몬과 잘 반응하였으며 β -hCG와의 교차반응성은 0.5% 미만이었다. β -hCG에 대한 단일크론성 항체인 β -2405는 2.7×10^{10} L/M의 높은 항원친화성을 보였으며 유사당단백질 호르몬들과는 0.5% 미만의 낮은 교차반응성을 나타내었다. 한편 C-3301은 Mizuchi 등¹¹⁾이 제조한 21-D-6과 유사하게 hCG와는 높은 반응성을 보이는 반면에 β -hCG 및 유사당단백질 호르몬들과는 3.5% 미만의 낮은 교차반응성을 나타내는 것으로 보아 native한 hCG에서만 나타나는 conformational determinant에 대한 단일크론성 항체로 판단된다.

효소 면역측정법에 의한 hCG 정량—측단일크론성 항체를 이용한 sandwich형의 면역측정법에 의하여 hCG를 측정할 때는 단일크론성 항체의 조합에 따라서 측정대상물질이 달라진다.⁶⁾ 따라서 native한 hCG만을 측정할 수 있는 system을 만들기 위하여 비드흡착용으로써 α -hCG에 대한 단일크론성 항체인 α -1201이나 native한 hCG의 conformational determinant에 대한 단일크론성 항체인 C-3301을 사용하고 효소접합체용으로는 β -hCG에 대한 단일크론성 항체인 β -2405를 사용하였다.

α -1201과 β -2405 및 C-3301과 β -2405를 이용하여 제조한 효소 면역측정법의 표준정량곡선은 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 200mIU/ml의 농도까지 거의 직선성을 나타내었으며 최소 검출

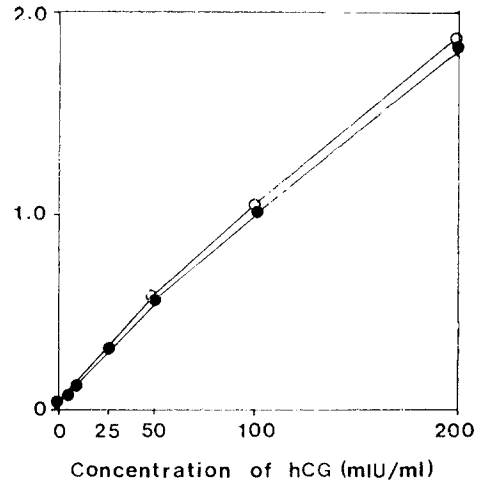


Fig. 2-Standard curve for human chorionic gonadotropin in the enzyme immunoassay. Polystyrene beads coated with α -1201(\circ) or C-3301(\bullet) were incubated with hCG standards followed by washing with distilled water and subsequent incubation with horseradish peroxidase conjugated β -2405.

량은 두 경우 모두 1mIU/ml이었다.

β -hCG에 의한 교차반응성—Fig. 3은 2가지 형태의 조합에 있어서 β -hCG에 의한 교차반응성을 조사한 결과이다. 이때 교차반응성 %는 아래의 식으로 나타내었다.

% Cross reactivity

$$= \frac{\text{Assay concentration (mIU/ml)}}{\text{Actual concentration (mIU/ml)}} \times 100$$

α -1201과 β -2405의 조합시에는 약 0.22%, C-3301과 β -2405의 조합시에는 약 0.18%의 교차

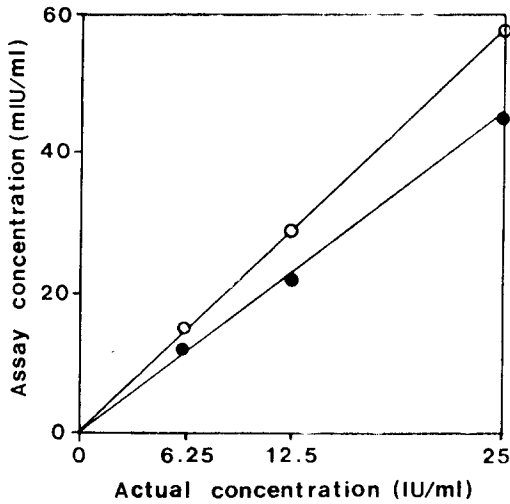


Fig. 3-Comparison of cross reactivity to β -subunit of hCG according to different combinations of monoclonal antibodies. Polystyrene beads coated with α -1201(○) or C-3301(●) were incubated with β -subunit of hCG standards followed by washing with distilled water and subsequent incubation with horseradish peroxidase conjugate β -2405.

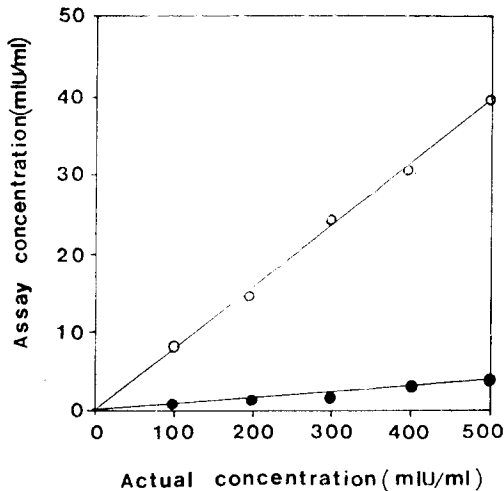


Fig. 4-Comparison of cross reactivity to leuteinizing hormone according to different combinations of monoclonal antibodies. Polystyrene beads coated with α -1201(○) or C-3301(●) were incubated with leuteinizing hormone standards followed by washing with distilled water and subsequent incubation with horseradish peroxidase conjugated β -2405.

반응성을 나타내었다.

황체호르몬에 의한 교차반응성—두가지 형태의 조합에 있어서 황체호르몬에 의한 교차반응성을 검토한 결과, 효소접합체용으로 사용된 β -2405의 경우 황체호르몬에 대한 교차반응성이 0.5% 미만임에도 불구하고 Fig. 4에서 보는 바와 같이 α -1201과 β -2405의 조합시에는 약 8%, C-3301과 β -2405의 조합시에는 약 1%의 교차반응성을 나타내었다. 이러한 현상을 Wada등¹²⁾은 미량의 항체를 사용하는 competitive RIA와는 달리 sandwich형의 효소 면역측정법에서는 항체가 과량으로 사용되기 때문인 것으로 설명하고 있다. 따라서 위의 결과로 미루어 보아 교차반응성이 작은 sandwich형의 효소 면역측정법을 만들기 위해서는 효소표지용 항체는 물론이고 고상에 흡착시키는 항체 역시 교차반응성이 작은 것을 사용하여야 된다고 판단된다.

한편 임상적인 측면에서 불태도 성장여성의 혈중내 황체호르몬 농도가 100mIU/ml까지도 상승하는 것과 α -hCG가 과량 분비되는 경우⁴⁾를 고려하면 sandwich형의 효소 면역측정법으로 native한 hCG만을 측정하기 위해서는 비드흡착용 항체로써 α -hCG에 대한 단일크론성 항체보다는 native한 hCG의 conformational determinant에 대한 단일크론성 항체를 이용하여야 된다고 생각된다.

결론

음모막성선자극 호르몬에 대한 단일크론성 항체를 제조하고 항원결합부위, isotype, 교차반응성 및 항원친화성을 조사하였다. 또한 solid phase에 native한 hCG에서만 나타나는 conformational determinant에 대한 단일크론성 항체를 흡착시키고 hCG의 β -subunit에 대한 단일크론성 항체에 horseradish peroxidase를 결합시켜 native한 hCG만을 측정하기 위한 sandwich형의 효소 면역측정법을 개발하였다. 이 측정법은 1mIUhCG/ml까지 검출할 수 있었으며 200mIU hCG/ml까지 직선성을 보였다. 황체호르몬과 hCG의 β -subunit에 대한 교차반응성은 각각 1%와 0.18%

이었다.

문 헌

- 1) Morgan, F.J., Birken, S., and Canfield, R.E.: The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* **250**, 5247 (1975)
- 2) Stevens, V.C.: Current status of anti-fertility vaccines using gonadotropin immunogens. *Immunology Today* **7**, 369 (1986)
- 3) Seppälä, M., Stenman, U.H., and Ranta, T.: Measurement of placental proteins hCG and SPI in gynaecological emergencies. In *Pregnancy proteins; biology, chemistry and clinical application*. ed. by J.G. Grudzinskas, B. Teisner and M. Seppälä, Academic press, pp.93-97 (1982)
- 4) Husa, R.O.: Clinical utility of α -subunit measurements. *Obstet. Gynecol.* **60**, 1(1982)
- 5) Hattori, M., Yoshimoto, Y., Matsukura, S., and Fujita, T.: Qualitative and quantitative analyses of human chorionic gonadotropin and its subunit produced by malignant tumors. *Cancer* **46**, 355 (1980)
- 6) Schwarz, S., Berger, P., and Wick, G.: Epitope-selective, monoclonal-antibody-based immunoradiometric assay of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits. *Clin. Chem.* **31**, 1322 (1985)
- 7) Zola, H., and Brooks, D.: Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. In *Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and application*. ed. by J. G.R. Hurrell, CRC press, pp.1-57 (1982)
- 8) Wang, L., Rahamin, N., Harpaz, N., Hexter, C.S., and Inbar, M.: Monoclonal antibodies against immunodeterminants associated with the alpha and beta subunits of human chorionic gonadotropin. *Hybridoma* **1**, 293(1982)
- 9) Stanker, L.H., Vanderlaan and Juarez-Salinas, H.: One-Step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxylapatite chromatography. *J. Immunol. Method* **76**, 157 (1985)
- 10) Nakane, P.K., and Kawaoi, A.: Peroxidase-labeled antibody; a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1084 (1974)
- 11) Mizuchi, A., Kitagawa, N., Miyachi, Y., and Iio, M.: Monoclonal antibodies to human chorionic gonadotropin and their application to two-site sandwich radioimmunoassay. *J. Immunol. Method* **74**, 369 (1984)
- 12) Wada, H.G., Panish, R.J., Baxter, S.R., Fedrici, M.M., Fraser, R.C., Brownmiller, L.J., and Lankford, J.C.: Enzyme immunoassay of the glycoprotein tropic hormones-choriogonadotropin, lutropin, thyrotropin-with solid-phase monoclonal antibody for the α -subunit and enzyme-coupled monoclonal antibody specific for the β -subunit. *Clin. Chem.* **28**, 1862 (1982)