(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[4]
C12N 5/00

(45) 공고일자 1987년07월30일
(11) 공고번호 특1987-0001417

(21) 출원번호	특1984-0004484	(65) 공개번호	특1986-0001184
(22) 출원일자	1984년07월27일	(43) 공개일자	1986년02월24일

(71) 출원인 학교법인 연세대학교 이천환
서울특별시 서대문구 신촌동 134

(72) 발명자 이원영
서울특별시 강남구 대치동 610 청실아파트 17동 803

(74) 대리인 임석재

심사관 : 박병석 (책자공보 제1320호)

(54) PTA-210 세포주를 이용한 인간 성장호르몬의 생산방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

PTA-210 세포주를 이용한 인간 성장호르몬의 생산방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 PTA-210 세포주(KFCC-10311)를 이용하여 인간의 성장에 필요한 호르몬을 생산하는 방법에 관한 것이다. 인간의 성장 호르몬은 성장기에 있는 인간의 정상적인 성장을 좌우하는 불가결의 호르몬으로, 성장 호르몬은 뇌하수체에서 분비되는 단백질로서 그 화학적 구조는 이미 잘 알려져 있다.

현재까지의 연구보고에 의하면 인간성장 호르몬의 생화학적 특성은 기타의 동물과 서로 다르므로 (G.H.L: Perspective Biology and Medicine 11, 1968) 생물학적 효능에도 그 차이가 있다는 것이다.

사람의 경우에는 인간 성장호르몬 외에 원숭이로 부터 추출한 성장 호르몬에만 반응을 하나 쥐는 여러 다른 종의 동물 유래성장 호르몬에도 반응을 잘한다.

성장이라 함은 여러갖지 요인과 과정의 복합적 결과에 의한 것이기 때문에 인간 성장호르몬만의 작용기전을 명확히 규정하기에는 매우 어려운 실정이다.

지금까지 밝혀진 바에 의하면 성장 호르몬은 단백질 합성의 촉진, 전해질의 대사촉진, 저장지질의 분비촉진 및 탄수화물 대사에 영향을 주어 혈중당농도를 높여주고 이는 다시 인슐린의 분비를 야기시킨다.

성장호르몬의 체외 공급수단은 우선 동물성장 호르몬을 둘 수 있으나, 동물의 그것중에도 단지 유인원인 원숭이에서 추출한 성장호르몬만이 사람에게 인간본래의 성장호르몬과 비슷한 효능을 갖는다는 보고가 있으나 이의 사용은 각종 면역학적으로 문제가 야기되므로 실제로 사용이 불가능한 것이다.

인간 성장호르몬의 체외 생산 방법으로는 첫째, 사람의 뇌하수체 세포를 체외 배양하여 성장호르몬 분비세포를 고정하는 것으로 현재 보고된 바에 의하면 쥐의 뇌하수체 세포의 성립에 관한 성공예 밖에 없다.

그외에 근래 유전자 조작에 의하여 효모나 세균으로 하여금 인간성장 호르몬을 생산하는 방법이 여러기관에서 연구되고 있으나 실용화 단계에는 거의 미치지 못하고 있을 뿐 아니라, 인체 적용에 세심한 조사가 필요하다. 따라서 현재 유일하게 이용되는 방법은 사체에서 뇌하수체를 적출하여 성장호르몬을 정제하는 방법 뿐으로 이 방법은 가격이 매우 고가일 뿐 아니라 공급에 커다란 제한이 있다.

그러므로 인체 성장 호르몬은 희귀성 및 고가로 성장기로 있으면서도 성장호르몬 결핍 아동들에게는 투여가 제한적일 수 밖에 없으며 이와같은 현상은 우리나라의 경우 더욱 심해 현재 성장호르몬을 투여받는 예는 한 두명에 불과하다.

인간 성장호르몬의 희귀성은 성장에 대한 연구자체도 제한되어 호르몬 결핍아동 이외에 대한 효과도 보고된 바가 극히 드물다. 그러나 Gail Shiner(Research Resources Reporter. Vol. IV, No. 12, 1980)등의 5년 동안의 연구 결과에 의하면, 성장호르몬 결핍 아동은 물론 정상이지만 표준키에 미달하는 아동을 대상으로 하였을 때 24명중 10명이 강력한 반응을 보여 정상수준의 성장에 도달하였고 이는 성장호르몬의 공급이 가능하다면 인간 성장 호르몬의 주입 필요 대상은 건강한 아이일지라도

정상 수준에 미달하는 모든 아동에게 적용시킬 수 있다는 것이다.

이와같은 사실은 인간 성장호르몬의 생산 방법의 개발에 관한 긴요성을 더욱 강조한 것으로, 이에 본 발명자는 인간의 뇌하수체 세포의 정립에 착수하여 이중 한 세포주에서 인간 성장 호르몬을 생산하는 세포주 고정에 성공하므로써 이를 이용한 인간 성장 호르몬의 체외 생산을 가능케한 본 발명을 완성하였다.

즉, 본 발명은 인간 성장호르몬의 과다분비(29.79μg/mℓ of blood 이상) 환자의 뇌하수체조직 0.7g을 시험관내에서 계대 배양하여 세포주를 고정하는데 성공, 이를 직접 배양하여 인간성장 호르몬을 체외에서 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명에서 사용된 세포주는 성장 호르몬 생산에 불가결한 크로모포브(Chromophobe) 세포와 알파세포의 혼합집단으로서 방사선 면역학적 정량 분석에 의하여 10^5 세포의 일일 성장 호르몬의 생산량은 450μg 이상인 것으로 확인되었으며 이를 본 발명자는 PTA-210 세포주라고 명명하였다.

한편, 본 발명자는 PTA-210 세포주를 직접 배양하므로 해서 체외에서 인간 호르몬을 생산할 수 있음은 물론이고 PTA-210 세포주로 부터 유전자를 추출하므로써 유전공학적인 응용에도 사용할 수 있는 최적의 세포주임도 밝혀 내었다.

다음의 실시예에서 본 발명은 좀 더 구체적으로 설명한다. 본 실시예에서 사용된 세포는 성장호르몬 생성기관인 뇌하수체의 종양으로 성장 호르몬 생성세포의 비정상적인 증가와 성능의 강화로 성장호르몬의 지속적으로 과다하게 분비하는 뇌종양 환자로부터 적출한 조직으로 입원 당시 환자의 증세는 성장호르몬의 혈중농도가 정상인의 6배가 되는 29.79μg/mℓ이었고 외관상으로도 전형적인 성장호르몬의 과다분비에 의한 선단 거대증 환자였다. 수술시 적출된 조직의 병리학적 결과는 뇌하수체종양으로 확인되었고 조직의 일부(0.7g)를 무균적으로 수송 처리하였다.

[실시예 1]

세포주의 시험관내 적용

조직(0.7g)을 무균실에서 100mm의 직경을 가지는 소독된 페트리디쉬에 혈청이 함유되지 않은 RPMI-1640 (Flow.U.S.A.) 배지 5mℓ에 부유시키고 부유된 조직을 수술용칼(Noll)을 사용하여 크기 약 1㎣ 내외의 작은 조직절편을 만들었다.

다음에 조직절편을 실온인 50mℓ 원심 분리용 시험관에 정치하고 재분리하여, 상층액은 직접 100mm의 페트리디쉬에 넣고 RPMI-1640 배지에 20%의 송아지 혈청(Flow.U.S.A.)이 되도록 조정하였다.

항생제로는 페니실린, 스트렙토마이신, 항진균제로는 훤지존을 각 100 유니트와 100mcg/mℓ이 되도록 가하였다. 침전조직을 다시 0.75%트립신으로 처리하여 실온에서 30분간 트립신처리용기에서 단백분해하고 10mℓ짜리 원심용 시험관에 재분배(20개)하여 3번 세척한 후 RPMI-1640 배지에 넣었다.

이때 용기는 플라스택 플라스크(70mℓ)에 분주하였다.

배양된 세포를 습도가 포화된 배양기(배양기의 온도는 37℃로 탄산가스는 5%로 조정)에 넣고 24시간이 경과된 후 정착된 세포를 특수위상차 현미경으로 생장 여부를 관찰하였으며 분열 상태를 판정하여 새로운 배지로 교환하였다.

3 일후 시험관내에 적응된 세포와 정착이 불가능한 세포를 Ficoll/Hypage로 원심 분리하여 재분배 배양하였다.

[실시예 2]

세포주의 정립

실시예 1에서 설명한 과정을 1 개월 계속한 후 생존 세포의 특성과 생존 최소량의 측정을 위하여 24wells plastic배양 용기를 이용하여 정립 실험을 실시하였다.

생장된 세포는 부유상태로 생장하였기 때문에 계대나 분주에는 트립신 처리 과정이 필요치 않았다.

이들 세포를 세포염색 방법(dye exclusion)에 의해 그 수를 10^5 mℓ로 조정하여 24 well 배양용기에 10^4 well 및 10^5 well로 분주하였다.

이 결과 최소한 성장을 유지하기 위한 세포의 수는 10^4 well이었고 그 이하의 경우에도 세포는 괴사하지 않으나 분열 능력을 완전 소실됨을 알았다.

이와같이 분열 능력이 소실된 세포를 다시 원심 분리로 수를 조정하여 10^4 well이 되도록하고 송아지혈청의 농도를 15%에서 20%로 높여 주었을 때 분열 능력은 재생되었다.

이상과 같은 결과로 각 well 당 10^4 세포로 분주하여 각 well의 성장 형태와 수적 증가를 위상차 현미경으로 계속 확인하였고 각 상층 배지는 성장 호르몬의 측정을 위해 수거하여 20℃로 냉각하였다. 냉장된 수거 배양액은 방사선 면역방법(Radio immuno Assay)으로 호르몬의 정량 실험에 사용하였다. 방사선 물질로 표지된 인간 성장 호르몬에 대한 특히 항체를 이중으로 결합하는 방법으로 PTA-210 세포주가 인간성장 호르몬의 생산 능력이 있음을 확인하였음은 물론 그 생산량 또한 450μg/10^5/cell/24시간으로 지속적(6개월)이었음을 알았다.

[실시예 3]

배양조건에 대한 PTA-210 세포주의 반응

1) 배양배지에 따른 효과

RPMI-1640 : 이 배지내의 PTA-210 세포주는 부유배양되었으며 모두 구형의 형태를 이루며 증식속도는 새로운 배지를 넣었을때 2 배화 속도는 24시간이었다.

McCoy's 5A : 부착배양되는 세포와 부유 배양되는 세포가 공존하며 부착된 세포의 형태 또한 다양하여 다각 및 구형의 형태를 확인하였다.

2배화 시간은 RPMI-1640 보다 길어서 약 30시간 내외였다.

2) 배지내 혈청량 및 종류에 따른 효과

송아지 혈청의 농도별 결과 최적 농도는 15%였다.

송아지 혈청보다는 인간의 태반 혈청의 효과가 15%에서 유효하였다.

3) 세포 밀도와 배양 용기의 면적에 관한 실험

실험에 이용된 용기는 모두 플라스틱으로 단지 표면적만 달리하였으며 최적 밀도는 전술한 바와같이 10^4-10^5 이었고 최적 용기 용량은 35mm 페트리디쉬이었다. 이상과 같은 실시예의 과정을 거쳐 생장 능력이 가장 우수하고 인간성장 호르몬 생산을 지속적으로 할 수 있는 PTA-210 세포주가 정립되었다.

다음은 PTA-210세포주의 특성에 관한 것이다.

1) 배양세포의 병리조직학적 특성

배양된 PTA-210 세포주를 마이크로 커버그라스에 고정하였다.

고정 → 에탄올 70%(30분, 실온) → 에탄올 95%(10분, 실온) → 에탄올 100%(10분, 실온) → Giemsa Azur 11 염색(실온 20분) → Oil emersion 검정

상술한 바와같이 고정 염색하여 관찰하였을때 세포의 주종은 조직 병리학적으로 2 종의 세포집단으로 그 특성은 다음과 같다.

① 크로모포브(Chromophobe)

전체세포의 25-30%를 차지하며 모두 구형으로 염색이 거의 되지 않는 세포질을 갖고, 그 크기는 약 4-6μ로서 염기성 염색상을 갖는 염색체의 응집현상을 관찰할 수 있다. 이 세포는 조직학적으로 성장호르몬 생산세포인 acidophil(Alpha) 세포의 전선으로 PTA-210 세포주에서도 계속 증식하였으며 존재율은 성숙된 Alpha Cell의 수에 따라 다소 차이가 있었다.

② Acidophil(Alpha Cell)

구형의 형태로 평균 14-20μ의 크기를 갖는 세포로 성장호르몬 분비특유의 산성염색입자를 세포질내 가득 갖고 있다.

각입자(성장호르몬입자)의 크기는 약 350mμ로서 완숙된 Alpha Cell에서 분비되어 배지에 축적된다.

2) PTA-210 세포주의 시험관내 성장 특성

① PTA-210 세포주는 배양고정 세포의 무한한 성장 특성을 지니고 있으며,

② Alpha Cell(성장호르몬 생성세포)은 세포질내에 위상차 현미경에서 쉽게 관찰되는 입자를 확인할 수 있으며 이들 입자는 배지내 분비된 상태로 배양 24시간 이내에 쉽게 관찰할 수 있다.

③ 최대 배양 최소밀도는 10^4/mℓ 이며,

④ 세포 분열은 신선한 배지로 교환 24시간 이내에 세포수는 두배로 증가되며 호르몬 입자의 분비를 확인할 수 있다. 배지를 교환하지 않으면 성장속도는 10%미만으로 성장속도와 호르몬 생산능력은 반비례관계에 있다.

정상적인 뇌하수체 세포의 경우와 마찬가지로 분열기 중의 세포 발견은 거의 불가능하여 뇌하수체 세포핵형 결정은 되어있는 것이 없었다.

⑤ 세포로 영하 190℃의 질소액에 냉동 저장되어 있으며 그 배지조성은, PRMI 1640 95%, 디메틸설폭사이드 5% 이다.

⑥ 생존율 약 70%(선택 염색법)

⑦ 최적배지 : RPMI 1640, Fetal Calf Serum 15%

⑧ Plating Efficiency : 30%

⑨ 모양 : Lymphoid이다.

상술한 바와같이 본 발명은 PTA-210 세포주를 사용하여 인간 성장호르몬의 체외 생산을 가능케한 것

으로 종래의 방법에서는 찾아볼 수 없는 신규의 발명인 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

인간성장 호르몬의 과다분비(27.79μg/㎖ of blood이상) 환자의 뇌하수체조직을 체외에서 계대 배양하여 얻은 PTA-210 세포주(KFCC 10311)를 배양하여 세포내에 인간 성장 호르몬을 축적시킴을 특징으로 하는 인간 성장 호르몬의 생산 방법.