



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월30일  
(11) 등록번호 10-1302218  
(24) 등록일자 2013년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/08 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2006-0030309  
(22) 출원일자 2006년04월03일  
심사청구일자 2011년03월02일  
(65) 공개번호 10-2007-0099214  
(43) 공개일자 2007년10월09일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020040095291 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(72) 발명자  
홍효정  
대전광역시 서구 둔산로 155, 크로바아파트 117동 201호 (둔산동)  
김상직  
대전시 유성구 공동 자연아파트 1003호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

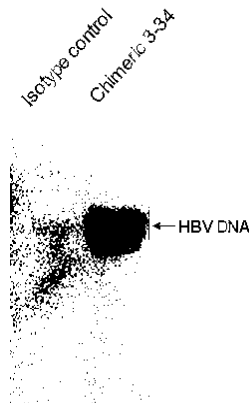
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 B형 간염바이러스의 표면항원 p r e S 1 에 특이적인단일클론항체

**(57) 요약**

본 발명은 B형 간염 바이러스의 pre-S1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 항체의 중쇄(Heavy chain) 및 경쇄(Light chain) 가변 영역 유전자, 이를 포함하는 발현 벡터, 발현 벡터에 의해 형질 전환된 형질 전환체 및 B형 간염 바이러스의 검출 키트에 관한 것이다.

**대표도** - 도5



(72) 발명자

**류춘제**

대전광역시 유성구 어은로 57, 133동 1104호 (어은동, 한빛아파트)

**안현주**

경상남도 창원시 진해구 충장로 575, 115동 705호 (풍호동, 우성아파트)

**장명희**

대전광역시 서구 계룡로264번길 28-29, 나동 402호 (월평동, 자연빌리지)

**김진홍**

대전광역시 대덕구 송촌북로32번길 28 (송촌동)

**임지혜**

대전광역시 서구 신갈마로 231-9, 301호 (갈마동, 드림빌라)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

중쇄 가변영역의 아미노산 서열이 서열번호 19로 기재되고, 경쇄 가변영역의 아미노산 서열이 서열번호 20로 기재되는 것을 특징으로 하는 HBV의 표면항원 pre-S1의 37 내지 47 아미노산 서열로 구성되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 키메라 항체.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

서열번호 19로 기재되는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 서열번호 20로 기재되는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자 및 인간 IgG 항체의 불변영역을 코딩하는 키메라 항체를 포함하는 발현 벡터.

### 청구항 6

생쥐 Fab 항체 3-34의 가변 영역과 인간 항체의 불변영역을 포함하는 키메라 항체 발현 벡터 pdCMV-dhfrC-3-34(기탁번호: KCTC 10914BP).

### 청구항 7

제5항 또는 제6항의 발현 벡터를 포함하는 형질전환체.

### 청구항 8

제5항 또는 제6항의 발현 벡터에 의해 발현된 키메라 항체.

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

제1항에 기재된 항체를 포함하는 B형 간염 바이러스의 검출 키트.

### 청구항 11

제8항에 기재된 항체를 포함하는 B형 간염 바이러스의 검출 키트.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

- [0006] 본 발명은 B형 간염바이러스 (hepatitis B virus, 이하 “HBV” 로 약칭함)에 특이적인 단일클론 항체 및 이 항체의 가변영역을 포함하는 키메라항체 (Chimeric antibody)에 관한 것으로, 구체적으로는 HBV의 표면항원 pre-S1에 대한 생쥐 Fab 가변영역 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하여 이 유전자를 인간 면역글로블린 IgG1의 중쇄 및 경쇄의 불변영역이 포함된 발현 벡터에 클로닝하여 키메라항체를 제조하는 것에 관한 것이다.
- [0007] HBV는 사람에 침입하여 만성 및 급성 간염을 일으키며, 악화될 경우 간경화와 간암의 원인이 되는 병원체로, 환자로써 전세계적으로 3억명에 이르는 것으로 추산하고 있다 (Tiollais & Buendia, *Sci. Am.*, 264, 48, 1991). HBV에 의해 감염된 경우, 예를 들어 HBV 양성인 모친으로부터 태어나는 신생아나 HBV에 노출된 의료기관 종사자들 또는 HBV관련 간질환으로 인한 간이식 수술환자의 HBV 감염을 방지하기 위해 HB 면역글로블린 (HBIG)를 사용하였다 (Beasley et al., *Lancet*, 2, 1099, 1983; Todo et al., *Hepatology*, 13, 619, 1991). 그러나 현재 사용되고 있는 HBIG는 혈장으로부터 추출되기 때문에 특이도 (specificity)가 낮고, 오염원에 노출될 수 있으며, 사람 혈액의 지속적인 공급이 필요하다는 단점이 있다. 따라서, HBV의 표면항원에 대한 단일클론항체를 사용하는 것이 더 유리하다.
- [0008] 생쥐 단일클론항체는 일반적으로 항원에 대한 친화도가 높고 대량생산이 가능하지만, 사람에게 주사하였을 때 체내에서 면역반응을 유발한다는 단점이 있었다 (Shawler et al., *J. Immunol.*, 135, 1530, 1985).
- [0009] 상기 문제점을 해결하고자 사람의 단일클론항체를 사용하는 기술이 보고되었으나, 아직까지는 HBV 표면항원 프리-S1에 대한 친화도가 높은 사람의 단일클론항체의 생산기술은 실용화되어 있지 않다.
- [0010] 생쥐유래 단일클론항체의 높은 친화도와 특이성을 유지한 채 인체 내에서의 면역유발능을 줄일 수 있는 방법으로 “키메라항체”가 개발되었다. 키메라항체는 생쥐항체의 항원결합부위를 인간항체 불변영역에 융합시킨 것으로, 유전공학적으로 대량생산이 가능하고, 유전자의 대부분을 인간화 하였으므로 인체 내에서의 면역반응을 대폭 줄일수 있게 되었다는 장점이 있다 (Morrison, et al., *PNAS*, 81, 6851-6855, 1984)
- [0011] HBV의 피막은 3개의 단백질로 구성되는데, 구체적으로 S 항원을 포함하는 주(major) 단백질, S항원과 프리 S2 항원을 포함하는 중(middle) 단백질 및 S항원, 프리 S2 항원과 프리 S1 항원을 포함하는 대(large) 단백질로 구성된다. (Neurath, A.R. and Kent, S.B.H., *Adv. Vir. Res.* 34: 65-142, 1988). 이 모든 표면항원 단백질들은 HBV를 중화시키고 무력화하는 항체를 유도하며, 특히 프리 S 부위에 의해 유도되는 항체는 바이러스의 제거 및 급성 HBV 감염에서의 회복과 관련이 있고 S항원에 대한 무면역반응(Non-responsiveness)을 극복할 수 있다.(Iwarson, S. et al., *J. Med. Virol.* 16: 89-96, 1985; Itoh, Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9174-9178, 1986; Neurath, A.R. et al., *Vaccine* 7: 234-236, 1989; Budkowska, A. et al., *J. Med. Virol.* 20: 111-125, 1986; Milich D. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8168-8172, 1985; Neurath, A.R. et al., *J. Med. Virol.* 17: 119-125, 1985; Milich D. R. et al., *J. Immunol.* 137. 315-322, 1986). 특히 프리-S1 단백질의 21-47 아미노산 부위는 사람 간세포의 HBV 수용체와 결합하여 바이러스가 간세포에 감염하는데 결정적인 역할하므로, 이 부위에 특이한 단일클론항체는 바이러스 중화에 핵심적인 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다 (Neurath et al., *Cell*, 46, 429, 1986; Pontisso, et al., *Virology*, 173. 533 1989; Neurath et al., *Vaccine*, 7, 234, 1989).
- [0012] 본 발명자들은 프리-S1 (pre-S1)의 37-47번 아미노산 (NSNPDWDFNP)을 포함하는 에피토프를 트롬보포이에틴 (Thrombopoietin:(TPO)) 유전자 뒤에 융합시켜 대장균에서 수용성 융합단백질 형태로 TPO-preS1 단백질을 발현시킨 바 있고, 이 단백질을 Balb/c mice에 주사하여 면역시키고 여기서 뽑은 RNA로 생쥐면역 Fab library를 제조하여 여기서 상기 37-47 아미노산 에피토프를 인식하는 Fab 항체 3-34를 선별하여 이를 항체 발현 벡터에서 키메라 항체로 발현함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- [0013] 본 발명의 하나의 목적은 중쇄 가변영역의 아미노산 서열이 서열번호 19로 기재되는 것을 특징으로 하는 HBV의 표면항원 pre-S1에 대한 인간화 항체를 제공하기 위함이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 경쇄 가변영역의 아미노산 서열이 서열번호 20로 기재되는 것을 특징으로 하는 HBV의 표면항원 pre-S1에 대한 인간화 항체를 제공하기 위함이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 19로 기재되는 상기 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 제공하기 위함이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 20으로 기재되는 상기 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 제공하기 위함이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 HBV의 표면항원 pre-S1에 특이적인 생쥐 Fab 항체 의 가변 영역을 코딩하는 유전자와 인간 항체의 불변영역을 코딩하는 유전자를 포함하는 키메라 항체 발현 벡터를 제공하기 위함이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하기 위함이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터에 의해 발현된 키메라 항체를 제공하기 위함이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 B형 간염의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공하기 위함이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체에서 하나 이상 선택되는 항체를 포함하는, B형 간염 바이러스의 검출 키트를 제공하기 위함이다.

**발명의 구성 및 작용**

- [0022] 본 발명자는 B형 간염 바이러스에 대한 키메라 항체를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.
- [0023] Thrombopoietin에 HBV pre-S1 37-47번 아미노산을 포함하는 에피토프를 융합한 TPO-preS1 50 $\mu$ g을 BALB/C 생쥐에 면역화시키고, 면역화된 생쥐의 비장으로부터 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하였다. 만들어진 cDNA를 주형으로 사용하여 Mouse 항체 유전자를 증폭하였고 생쥐면역 Fab library의 phage display를 위해서 새로운 phagemid 벡터(pC3-na)를 제조하였다(도 1참조).
- [0024] 상기 유전자 증폭에 의해 얻은 경쇄 가변 영역(VK) 유전자와 중쇄 가변 영역(VH) 유전자를 벡터에 삽입하여 *E. coli* TG1 cell에 형질전환하여 라이브러리 파지만을 수거하였다. 그리고 preS1에 특이적인 신규한 생쥐면역 키메라 항체를 선별하기 위하여 라이브러리 파지에 대해 페닝(panning)과 검색(screening)을 실시하였다. 이에 의해, preS1 항원에 선택적으로 결합하는 4개의 클론을 선별하였고, indirect ELISA를 수행하여 4가지 Fab 항체 중에서 3-34 항체가 가장 높은 항원결합능을 보임을 확인하였다. 이 클론을 pC3-na3-34로 명명하였고, pC3-na3-34의 경쇄 및 중쇄의 가변영역의 염기서열을 T7 Sdquenase V2.0 DNA 시퀀싱 키트로 결정된 결과, 각각 서열번호 19, 서열번호 20으로 기재되는 아미노산 서열을 코딩하는 서열번호 21 내지 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 코딩하고 있음을 확인할 수 있었다.
- [0025] 상기의 항 preS1 Fab 클론의 완전한 IgG 형태의 항체를 제조하기 위하여, 인간화 항체 AKA의 발현벡터 pdCMV-dhfr-AKA/HzK(대한민국 특허출원 제 2001-47737)의 경쇄 및 중쇄 유전자의 클로닝 위치에 상기 항 preS1 항체의 생쥐 경쇄 및 중쇄 가변 영역 유전자를 클로닝하여 본 발명의 발현 플라스미드 'pdCMV-dhfrC-3-34'를 제조하였다. 항 preS1 키메라 항체는 Cos7 세포를 사용하여 발현하였다.
- [0026] 발현된 키메라 항체는 B형 간염 바이러스 환자에서 얻은 혈청에 섞어서 반응시켜, 이로부터 분리한 DNA로 Southern blotting을 수행하였을 때, B형 간염 바이러스 DNA 밴드를 확인할 수 있었다.
- [0027] 따라서 하나의 양태로서, 본 발명은 2006년 3월 3일자로 생명공학연구원 유전자 은행에 기탁된 수탁번호 KCTC 10914BP의 발현 벡터 및 이 벡터에 의해 발현된 키메라 항체를 제공한다.

- [0028] 본 발명에서 용어, "항체(antibody)"란 항원과 특이적으로 결합하는 분자이며, 이량체, 삼량체 및 다량체 항체, 제조합, 가공된 및 카멜화된 (camelized)항체를 포함한다. 또한, 항체는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편의 형태일 수 있다. 본 발명에서 용어, "기능적인 단편"이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, 다이아바디(diabody) 등을 포함한다. 상기한 각종 항체를 제조하고 사용하기 위한 기술은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고) 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0029] 본 발명자의 다른 양태에서는, 상기 생쥐 단일 클론 항체의 중쇄와 경쇄의 가변영역의 아미노산 서열 및 핵산 서열을 제공한다.
- [0030] 즉, 본 발명은 아미노산 서열이 서열번호 19로 기재되는 것을 특징으로 하는 생쥐 항체의 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자 및 아미노산 서열이 서열번호 20로 기재되는 것을 특징으로 하는 생쥐 항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0031] 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 핵산 서열은 목적에 따라 하나 이상의 핵산 염기가 첨가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환으로 변형될 수 있다.
- [0032] 상기 핵산 서열은 이를 발현시키기 위해 벡터에 의해 삽입될 수 있다.
- [0033] 또 다른 양태로서 본 발명은 중쇄 가변영역의 아미노산 서열이 서열번호 19로 기재되는 것을 특징으로 하는 HBV의 표면항원 pre-S1에 대한 인간화 항체에 관한 것이다.
- [0034] 또 다른 양태로서 본 발명은 경쇄 가변영역의 아미노산 서열이 서열번호 20로 기재되는 것을 특징으로 하는 HBV의 표면항원 pre-S1에 대한 인간화 항체에 관한 것이다.
- [0035] 항체의 가변영역은 항원의 에피토프를 특이적으로 인식하여 항원-항체 복합체의 형성에 결정적인 기여를 하고, 고정 서열을 가지는 불변영역은 보체계를 활성화시키고 태반을 통과하는 능력을 부여하거나 각종 면역관련 세포가 가지는 수용체에 대한 리간드로 작용하는 등의 기능을 가진다. 항체의 항원에 대한 특이성이 가변영역의 아미노산 서열에 따른 구조 특이성에 의하여 결정되므로, 당 분야의 전문가가 밝힌 중쇄 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열을 바탕으로, 목적에 따라 다양한 형태의 제조합 항체를 제조할 수 있고 이에 의해 제조된 항체는 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0036] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 중쇄 및 경쇄 가변영역의 핵산서열을 포함하는 제조합 벡터에 관한 것이다. 바람직하게, 상기 제조합벡터는 인간 IgG 항체의 불변 영역을 코딩하는 핵산 서열을 더 포함한다.
- [0037] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함한다.
- [0038] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- [0039] 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법 (electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO<sub>4</sub>), 침전, 염화 칼슘(CaCl<sub>2</sub>) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 셀페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0040] 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스(Bacillus

subtilis), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.

[0041] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 키메라 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 B형 간염의 예방 또는 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

[0042] 본 발명의 조성물은 인간 뿐 아니라 B형 간염 바이러스가 감염될 수 있는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양 등의 가축의 B형 간염 예방 및 치료 조성물로 제공될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 투여에 의해 B형 간염 유발이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 항체 투여에 의해 B형 간염 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 치료용 항체로 사용될 경우, 항체는 기존의 치료제와 직접 또는 링커 등을 통하여 간접적으로 커플링(예를 들어, 공유결합)되어 항체-치료제 결합체 형태로 생체내로 투입하여 B형 간염 예방 또는 치료에 이용할 수 있다. 사용될 수 있는 치료제는 화학치료제, 면역치료제, 사이토킨, 케모킨, 항바이러스제, 생물작용제, 효소 저해물질 등을 포함한다. 유효한 치료제를 항원에 대해 매우 특이성이 있는 항체를 사용하여 투여함으로써 감염 부위에서는 높은 농도로 약효를 상승시킬 수 있다.

[0045] 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 인체 또는 수의용으로 제형화 될 수 있다. 경구 투여용의 약제학적 조성물은 별개의 단위, 예를 들면, 캡슐제 또는 정제; 산제 또는 과립제; 요에, 시럽 또는 현탁제(수성 또는 비-수성 액상물 중; 식용 발포제 또는 휘프(whip); 또는 에멀션)로 세지될 수 있다. 비경구 투여용의 약제학적 조성물에는 산화방지제, 완충제, 정균제(bacteriostat) 및 용질(수용자의 혈액과 실질적으로 등장성인)을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용제; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁제가 포함된다. 주사용 용제에 사용될 수 있는 부형제에는 예를 들어, 물, 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일이 포함된다. 이러한 조성물은 단위-용량(1회분) 또는 다중-용량(수회분)용기, 예를 들면, 밀봉된 앰플이알에 제시될 수 있고, 사용 직전에 멸균성 액상 담체, 예를 들면, 주사용수의 부가만을 요구하는 동결-건조 조건 하에 저장할 수 있다. 즉석의 주사 용제 및 현탁제는 멸균성 산제, 과립제 및 정제로부터 제조할 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 언급한 본 발명에 따른 항체 중 하나 이상의 항체를 포함하는, B형 간염 바이러스의 검출 키트를 제공하기 위함이다.

[0047] 상기의 항체를 포함하는 키트를 이용하여 생물학적 시료로부터 B형 간염 바이러스를 검출하여, B형 간염 바이러스의 감염여부를 쉽게 간단하게 진단할 수 있다. 본 발명의 항체를 생물학적 시료와 반응시키고 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 탄저균 감염 여부를 진단할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 용어, "B형 간염 바이러스의 검출"은 항원-항체 결합체와 결합한 검출 라벨(detection label)의 시그널 크기를 정성 또는 정량적으로 측정하여 방어항원의 존재 여부와 양을 확인하는 것을 의미한다.

[0049] 이러한 검정 키트에는 본 발명의 항체뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함된다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함하나 이로 제한되지 않는다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.

[0050] 항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), 웨스턴 블롯팅(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.



[0051] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는  $\beta$ -글루쿠로니다제,  $\beta$ -D-글루코시다제,  $\beta$ -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시퍼라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노 트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제,  $\beta$ -라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논,  $K_4W(CN)_8$ ,  $[Os(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[MO(CN)_8]^{4-}$  등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{36}Cl$ ,  $^{51}Cr$ ,  $^{57}Co$ ,  $^{58}Co$ ,  $^{59}Fe$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{186}Re$  등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예 1> Mouse immunization

[0054] HBV의 preS1에 대한 생쥐 면역 라이브러리를 제조하고자 BALB/C mice (Female) 한 마리당 Thrombopoietin에 HBV preS1 37-47번 아미노산 (NSNPDWDFNP)을 포함하는 에피토프를 융합한 TPO-preS1 50 $\mu$ g을 준비하여 이와 동일한 양의 Complete Freund's Adjuvant (CFA, Sigma)를 섞어 쥐의 복강에 주사하였다. 면역 주기는 2주마다 4회 면역을 하였고, 첫번째 면역 이외의 면역은 Incomplete Freund's Adjuvants (IFA, Sigma)를 사용하였고, 마지막 면역은 Adjuvants 없이 항원만을 꼬리 정맥에 주사하였다. ELISA를 통해서 preS1에 특이적인 면역반응의 존재를 확인하였다.

[0055] <실시예 2> Total RNA 분리 및 cDNA 합성

[0056] 실시예 1과 같이 면역한 후, 5일 된 쥐의 비장을 적출하여 균질화하였다. Splenocyte를 10분간 방치 후, 상층액만 새 tube에 옮겨 원심분리 (1200 rpm, 10 min)를 한 후에 RPMI (Gibco BRL)로 세척하였다. 여기에 5ml의 RBC lysis buffer (Sigma)를 첨가 한 후 37 $^{\circ}C$ 에서 5분간 방치하였고, 원심분리 (2000 rpm, 5 min)하여 상층액을 제거하였다. PBS (phosphate buffered saline, NaCl 8g, KCl 0.2g,  $Na_2HPO_4$  1.15g,  $KH_2PO_4$  0.2g / 1L, pH 7.4) 2ml을 첨가한 다음 얼음에 방치한 후, 원심분리 (12000 rpm, 2 min)하고 상층액을 제거하였다. 이 cell pellet에 RNA Zole B (TEL-TEST) 1 ml을 첨가한 후, 완전히 섞어주었다. 100  $\mu$ l의 chloroform (Junsei Chemical)를 첨가한 후 얼음에 5분간 방치하였다. 이를 원심분리 (12000 rpm, 15min, 4 $^{\circ}C$ )하여 상층액을 새 tube에 옮긴 후, 같은 부피의 isopropanol을 넣고 RNA를 침전시켰다. 이를 원심분리 (12000 rpm, 15min, 4 $^{\circ}C$ )하여 pellet을 얻은 후, 75% 에탄올로 세척하였다. 이 pellet을 건조한 다음, DEPC (Sigma)로 처리한 증류수 50 $\mu$ l를 넣어 RNA를 완전히 녹인 후, 280nm에서 흡광도를 측정하여 추출된 RNA의 농도를 결정하였다.

[0057] cDNA의 합성을 위하여, 10 $\mu$ g의 total RNA와 1 $\mu$ g의 oligo (dT) primer (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l GIBCO, BRL), 그리고 DEPC 증류수 8 $\mu$ l를 첨가하여 70 $^{\circ}C$ 에 10분간 반응한 후에 4 $^{\circ}C$ 에서 1분간 반응하였다. 위의 혼합물에 1 $\mu$ l의 RNase inhibitor (GIBCO, BRL), 1 $\mu$ l의 0.1M DTT (GIBCO, BRL), 1 $\mu$ l의 2.5 mM dNTP mix (GIBCO, BRL)와 역전사효소 (Superscript II, Gibco BRL)를 첨가하여 42 $^{\circ}C$ , 50분간 반응하고, 90 $^{\circ}C$ , 5분간 반응한 다음 4 $^{\circ}C$ 에 10분간 방치하였다.

[0058] <실시예 3> Mouse 항체 유전자의 증폭



[0059] Mouse 항체의 가변영역 (VK와 VH) 유전자를 증폭하기 위해 상기에서 만들어진 cDNA를 주형으로 사용하였다. 먼저, Mouse 항체의 Kappa 경쇄의 가변영역, VK를 증폭하기 위하여, 상기 cDNA를 주형으로 생쥐 경쇄의 Kappa 가변 부위(variable region)의 **서열번호 1** 으로 기재되는 5' 특이 프라이머 (MK1-1)와 **서열번호 2** 내지 **서열번호 4** 으로 기재되는 3' 특이 프라이머들 (MhybJK4-B NotI, MhybJK5-B NotI 및 MhybJK12-B NotI)을 각기 쌍으로 사용하여 생쥐항체 경쇄 유전자를 PCR을 이용하여 선택적으로 증폭하였다.

[0060] 또한, Mouse 항체의 중쇄의 가변영역, VH를 증폭하기 위하여, 상기 cDNA를 주형으로 생쥐 중쇄의 가변 부위의 **서열번호 5** 내지 **서열번호 11** 으로 기재되는 5' 특이 프라이머들 (VH1-1, VH2-1, VH3-1, VH4-1, VH5-1, VH6-1 및 VH7-1)과 **서열번호 12** 내지 **서열번호 14** 으로 기재되는 3' 특이 프라이머들 (MHylgGCH1-B2, MHylgGCH1-B3 및 MHylgGCH1-B4)을 각기 쌍으로 사용하여 생쥐항체 중쇄 유전자를 PCR을 이용하여 선택적으로 증폭하였다.

[0061] 상기 PCR에서 증폭된 각각의 VK와 VH 유전자를 주형으로 extension PCR을 행하였다. 먼저, VK 유전자의 extension PCR을 위하여, 상기 PCR에서 증폭된 100 ng의 VK 유전자와, **서열번호 15** 으로 기재되는 프라이머, MK1 ext와 **서열번호 16** 으로 기재되는 프라이머, MhybJK ext를 이용하였다. 또한, VH 유전자의 extension PCR을 위하여, 상기 PCR에서 증폭된 100 ng의 VH 유전자와, **서열번호 17** 으로 기재되는 프라이머, VH ext와 **서열번호 18** 으로 기재되는 프라이머, MHylgGCH1 ext를 이용하였다. 이 때, 이들 PCR 반응조건은 95℃에서 5분간 예비변성 후, 95℃에서 50초, 55℃에서 50초, 72℃에서 1분으로 *Taq* DNA 중합효소(polymerase)를 사용하여 30회 수행하였다.

[0062] <실시예 4> 생쥐면역 Fab library의 제조

[0063] 생쥐면역 Fab library의 phage display를 위해서 새로운 phagemid 벡터를 디자인하여 제조였다. 먼저, pC3Q phagemid 벡터의 gene III 유전자의 말미에 존재하는 NotI site를 제거하고, 인간경쇄의 불변영역 시작부분에 NotI site를 만들어 생쥐경쇄 가변영역 VK를 SfiI과 NotI으로 클로닝 할 수 있게 하였다. 또한, gene III 앞에 존재하는 SfiI site를 amber 코돈 (TAG)로 바꾸어 주어 Non-suppressor E.coli에서 soluble Fab의 발현이 가능하도록 하였다. 이렇게 만들어진 phagemid 벡터를 pC3-na라 명명하였고 (**도 1**), 생쥐면역 Fab library 제조에 이용하였다.

[0064] 실시예 3에서 PCR로 얻은 VK 유전자와 pC3-na 벡터를 각각 제한효소 SfiI과 NotI으로 절단한 후 정제하였고 절단된 두 DNA 단편을 16℃에서 하룻밤동안 방치하여 접합(ligation)시킨 후 70℃에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 그 후에 글리코겐(glycogen)과 3M 아세트산 나트륨(sodium acetate)을 첨가시키고, -20℃에서 에탄올을 가하여 DNA를 하룻밤 동안 침전시켰다. 침전된 DNA를 70%의 에탄올로 세척한 후 건조시켜 20 μl의 증류수에 현탁하였으며, 상기 library DNA를 *E. coli* XL1-Blue에 전기충격유전자전달법(electroporation)으로 형질 전환시켰다.

[0065] 이 형질전환 과정을 상세히 설명하면, *E. coli* XL1-Blue cell을 2×YT (17g Trypton, 10g Yeast Extract, 5g NaCl / L) 500 ml에서 37℃에서 OD (optical density)가 0.5 - 0.7 정도까지 진탕배양한 다음, 얼음 위에서 30분간 방치하였다. 4℃, 4000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 10% Glycerol 500 ml로 현탁하였다. 4℃, 5000 rpm에서 15분간 다시 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 침전된 세포를 10% Glycerol 250 ml로 현탁하고, 4℃, 5000 rpm에서 15분간 다시 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 침전된 세포를 10% Glycerol 20 ml로 현탁후 4℃, 4000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 세포를 10% Glycerol 1-2 ml로 현탁하였다. 상기의 Competent *E. coli* XL1-Blue cell 300 μl에 위의 라이브러리 DNA를 첨가한 후 잘 섞어주고, 얼음에서 1분간 정치한 뒤 Gene Pulser cuvette (Biorad)에 옮기고, 이를 electroporator (Biorad)에 장착하였다. 마지막으로 2.5kV, 200Ω으로 pulse를 가하였다.

[0066] 형질전환된 세포는 2×YTA (2×YT, Ampicillin) 배지를 첨가한 후 37℃에서 밤새 진탕배양하였고, 이 세포로부

터 plasmid DNA를 분리하였다. 이 인간경쇄 라이브러리 plasmid DNA와 상기 실시예 3에서 PCR로 증폭한 인간중쇄 유전자 단편을 제한효소 NcoI과 ApaI으로 절단하고 분리한 후, 상기한 방법대로 접합시킨 후, *E. coli* TG1 cell에 형질전환하였다.

[0067] 형질전환된 세포는 2×YTA 배지를 첨가한 후 37℃에서 1시간 진탕배양하였다. 상기 세포에  $4 \times 10^{10}$  PFU (plaque forming unit)의 VCSM13 헬퍼 파지(helper phage)를 접종한 후 37℃에서 30분간 정치하였고 다시 37℃에서 30분간 진탕배양하였다. 원심분리하여 세포를 침전시키고 침전된 세포를 2×YTAK (2×YT, Ampicillin, Kanamycin) 배지에 현탁한 후 30℃에서 하룻밤동안 진탕배양하였다. 다음날 배양액을 원심분리하여 세포를 침전시키고, 상층액에 있는 라이브러리 파지만을 수거하였다.

[0068] <실시예 5> 패닝 (panning) 및 검색 (screening)

[0069] 본 발명자들은 preS1에 특이한 신규한 생쥐면역 키메라 항체를 찾아내기 위하여 상기 실시예 4에서 제조한 라이브러리 파지에 대하여 패닝(panning)과 검색(screening)을 실시하였다. 이를 위하여, 먼저 항원 (GST-preS1, 1μg/well)을 Microtiter well에 넣고 4℃ 에서 밤새 방치하여 coating하였다. 이 well을 PBS로 2회 세척 후, 2% 탈지유 (skim milk)를 첨가하여 37℃에서 2시간 방치하였다. 탈지유를 제거한 후 생쥐면역 항체 라이브러리 파지를 그 well에 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 방치하여 preS1 항원과 결합하게 하였다. 결합하지 않은 파지를 제거하기 위해 0.05% Tween 20이 첨가된 PBS (PBST)로 5회 세척 후, preS1에 특이적으로 결합하여 남아있는 파지를 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.2)으로 용출한 다음 2 M Tris를 첨가하여 중화시키고, 이를 *E. coli* TG1 세포에 감염시켜 2×YTA 플레이트에 도말한 후 37℃에서 하룻밤 배양하였다.

[0070] 다음날 플레이트에 2×YT를 첨가하여 세포를 긁어모은 후, 이를 2×YTA에 접종하여 37℃에서 진탕배양하였다. 여기에  $4 \times 10^{10}$  PFU의 helper phage, M13K07을 접종한 후 37℃에서 30분간 정치시켰고, 다시 37℃에서 30분간 진탕배양하였다. 원심분리로 세포를 침전시키고 침전된 세포를 2×YTAK 용액에 현탁한 후 30℃에서 하룻밤동안 진탕배양하였다. 다음날 세포 배양액을 원심분리하여 세포를 침전시키고 파지만을 수거하였다. 첫 번째 패닝(panning)에서 증폭된 파지를 세척 횟수를 12번, 20번, 20번으로 늘리면서 PBST 용액으로 세척하여 2차, 3차 및 4차 패닝을 실시하였다.

[0071] 패닝을 거듭할수록 항원결합능이 강한 파지가 증폭되었는지는 ELISA로서 확인하였다. 먼저 ELISA 플레이트의 각 웰에 BSA (Bovine serum albumin)와 preS1 항원을 4℃에서 하룻밤 결합시키고 4% 탈지유로 2시간 블록(block)시킨 후 PBST 용액으로 4번 세척하였다. 1, 2, 3, 4차 패닝 후 용출한 파지를 동량 ( $1 \times 10^{11}$  CFU (colony forming unit)) 첨가하여 37℃에서 2시간동안 반응시킨 후 PBST 용액으로 세척하였다. 2% 탈지유로 2차 항체인 항-M13 파지-HRP를 희석하여 ELISA 플레이트에 첨가하고, ABTS (2',2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulphonic Acid) diammonium salt, Sigma)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 발색하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] 그 결과, 패닝을 거듭할수록 선택된 파지의 preS1 에 대한 항원결합능이 선택적으로 높아졌음을 확인하였다(도 2).

[0073] 3차와 4차 panning에 의해 선택된 phage pool을 *E. coli* TG1 cell에 감염하였고, 각각의 클론들은 ampicillin 이 포함된 plate에 키웠다. 약 120개의 클론들을 무작위로 선택하여 파지 ELISA를 행한 뒤, preS1 항원에 선택적으로 결합하는 4개의 클론들을 선별하였다.

[0074] 선별된 4 개의 클론의 soluble Fab 발현을 위해, 각 클론의 DNA를 *E. coli* HB2151 에 형질전환하여 2×YTA plate에 plating하여 각 plate로부터 colony를 취해 5ml의 2×YTA 배지에 접종하여 37℃에서 OD (optical density) 0.5까지 배양한 후, 1 mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, Sigma)를 첨가해서 30℃에

서 하룻밤 배양한 후, 3500rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

[0075] 이렇게 얻어진 상등액의 soluble Fab 정량을 위해, Goat anti-human (Fab')<sub>2</sub> (Pierce)을 1 : 2000으로 coating buffer에 희석하여 Microtiter plate에 넣은 후, 4℃에서 하룻밤 동안 정치시켜 플레이트에 결합시키고, 1회 세척 후, 2% BSA로 37℃에서 1시간 블럭시켰다. PBST로 2번 세척 후, 상기에 준비된 4개 항체의 상등액을 Microtiter plate에 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후, PBST로 4회 세척하고 Goat anti-human Fab-HRP (Pierce)를 1 : 2000으로 희석하여 첨가하고 1시간 반응 후 세척하여 0.04% ortho-phenylene-dihydrochloride (OPD)와 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 0.2M citrate-PO<sub>4</sub> buffer (pH 5.0)로 발색하여 492nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

[0076] 4가지 Fab 항체의 항원결합능을 비교하기 위해 indirect ELISA를 수행하였다. preS1 (aa 1-56) 항원을 면역플레이트에 100ng으로 coating하고, 각 항체의 농도에 따라 항원과 얼마나 결합하는지 흡광도를 측정하였고, 그 결과 4가지 항체의 항원결합능에 차이가 있음을 확인하였다. 그 중 3-34 항체가 가장 높은 항원결합능을 보였다 (도 3). 이 클론을 pC3-na3-34로 명명하였고, pC3-na3-34의 인간경쇄 및 중쇄의 가변영역의 염기서열을 T7 Sequenase V2.0 DNA 시퀀싱 키트(Amersham)로 결정한 결과, 각각 **서열번호 19**, **서열번호 20** 으로 기재되는 아미노산 서열을 코딩하는 **서열번호 21** 내지 **서열번호 22**로 기재되는 염기서열을 코딩하고 있음을 확인하였다.

[0077] <실시예 6> 완전한(whole) IgG의 제조를 위한 발현플라스미드의 제조

[0078] 본 발명자들은 상기의 항 preS1 Fab 클론의 완전한 IgG 형태의 항체를 제조하기 위하여, 인간화항체 AKA의 발현벡터 pdCMV-dhfr-AKA/HzK(대한민국 특허출원 제 2001-47737)의 경쇄 및 중쇄 유전자의 클로닝 위치에 상기 항 preS1 항체의 생쥐 경쇄 및 중쇄 가변영역 유전자를 클로닝하였다.

[0079] 먼저, 경쇄 유전자의 신호 서열을 합성하기 위하여, pdCMV-dhfr-AKA/HzK(대한민국 특허출원 제 2001-47737)를 주형으로 하고 **서열번호 23**로 기재되는 LHS42 프라이머와 **서열번호 24**으로 기재되는 KCleaderBack 프라이머를 쌍으로 PCR을 수행하였다. 그리고 3-34 경쇄 가변영역을 증폭하기 위해 pC3-na-3-34를 주형으로 **서열번호 25**로 기재되는 Vk3-34 프라이머와 **서열번호 26**로 기재되는 KCBSiWIback 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0080] 다시, 신호서열과 3-34 경쇄 가변 영역을 연결하기 위해 **서열번호 23**로 기재되는 LHS42 프라이머와 **서열번호 26**로 기재되는 KCBSiWIback 프라이머를 이용하여 재조합 PCR을 수행하였다. 이 때, PCR 반응 조건은 95℃에서 5분간 예비변성 후, 94℃에서 50초, 52℃에서 50초, 72℃에서 1분으로 Taq DNA 중합효소 (polymerase)를 사용하여 30회 수행하였다. 상기 DNA 단편의 양끝을 제한효소 HindIII과 BsiWI으로 절단한 후 pdCMV-dhfrC-AKA/HzK의 HindIII-BsiWI 위치에 삽입하여 pdCMV-dhfrC-3-34-vk 를 제조하였다.

[0081] 다시, 중쇄 유전자의 신호 서열을 합성하기 위하여, pdCMV-dhfr-AKA/HzK(대한민국 특허출원 제 2001-47737)를 주형으로 하고 **서열번호 27**로 기재되는 LHS39 프라이머와 **서열번호 28**로 기재되는 HCleaderback 프라이머를 쌍으로 PCR을 수행하였다. 그리고 3-34 중쇄 가변영역을 증폭하기 위해 pC3-na-3-34를 주형으로 **서열번호 29**로 기재되는 VH3-34 프라이머와 **서열번호 30**로 기재되는 LHS11 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0082] 다시, 신호서열과 3-34 중쇄 가변 영역을 연결하기 위해 **서열번호 27**로 기재되는 LHS39 프라이머와 **서열번호 30**로 기재되는 LHS11 프라이머를 이용하여 재조합 PCR을 수행하였다. 이 때, PCR 반응 조건은 95℃에서 5분간 예비변성 후, 94℃에서 50초, 52℃에서 50초, 72℃에서 1분으로 Taq DNA 중합효소 (polymerase)를 사용하여 30회 수행하였다. 상기 DNA 단편의 양끝을 제한효소 EcoRI과 ApaI으로 절단한 후, 이미 제조된pdCMV-dhfrC-3-34-vk의 EcoRI-ApaI 위치에 삽입하여, 본 발명의 발현 플라스미드를 제조하였으며, 이를 'pdCMV-dhfrC-3-34' 라 명명하였고, 2006년 3월 3일자로 생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다 (수탁번호; KCTC 10914BP). 이 백

터는 따라서, 3-34의 생쥐 유래의 가변영역과 인간항체의 불변영역을 가진 키메라항체를 발현하게 된다.

[0083] <실시예 7> COS7 세포를 이용한 키메라 whole IgG 발현

[0084] 본 발명자들은 항 preS1 키메라 항체의 Transient 발현을 위해서 Cos7 세포를 사용하였다. 먼저, 100mm dish에 COS7 세포를  $5 \times 10^5$  개로 접종하였다. 그리고 다음날 두 개의 1.5ml tube에 Opti-MEM 배지를 각각  $500 \mu\text{l}$ 씩 넣은 후 한 tube에 Lipofectamine™ 2000  $60 \mu\text{l}$ 를 넣어 잘 섞고 또 다른 tube에 pdCMV-dhfrC-3-34 DNA  $20 \mu\text{g}$ 을 넣어 섞은 후 상온에서 5분 동안 배양 후 두 개의 tube를 섞어 다시 15분 동안 정치한다. 이때 COS7 세포를 Opti-MEM 배지로 3회 세척한다. 그리고나서, Lipofectamine™ 2000 과 섞어준 DNA를 COS7 세포 위에 뿌려준 후,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  에서 6시간 동안 정치한다. 그리고 다시 serum 과 antibiotic 가 들어있지 않은 DMEM 배지로 갈아주고 72시간 배양한 후, 배지로 분비된 Whole IgG type의 3-34 키메라 항체를 회수하였다.

[0085] <실시예 8> Affinity 결정을 위한 competition ELISA

[0086] 본 발명자들은 상기 실시예 7에서 얻은 배양액을 이용하여 3-34 항체의 항원결합친화도를 ELISA로 측정하였다. 먼저 상기에서 얻은 상등액에 존재하는 3-34 항체를 정량 하기위해, anti-human whole IgG 항원을 1 : 2000으로 coating buffer에 희석하여 Microtiter plate에 넣은 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 정치시켜 플레이트에 결합시키고, 1회 세척 후, 4% 탈지유로  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 블록시켰다. PBST로 2번 세척 후 3-34 항체의 상등액을 플레이트에 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후, PBST로 4번 세척하고 anti-human IgG-HRP (Fc specific, Pierce)를 1 : 2000 으로 희석하여 첨가하고 1시간 반응 후 세척하여 0.04% ortho-phenylene-dihydrochloride (OPD)와 0.02%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 포함된 0.2M citrate- $\text{PO}_4$  buffer (pH 5.0)로 발색하여 492nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

[0087] 3-34 항체의 항원결합친화도를 측정하기 위해 competition ELISA를 수행하였다. 먼저, Microtiter plate를 GST-preS1 항원으로 coating하였다. 상기에서 정량한 3-34 항체 50ng을 다양한 농도의 preS1 (aa 1-56) 항원 ( $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-11}$  M)과  $37^\circ\text{C}$ 에서 3시간 평형상태 (equilibrium)에 이를 때까지 미리 반응시켰다. preS1이 coating된 Microtiter plate를 4% skin-milk로 blocking시키고, 평형상태에 이른 반응물을 플레이트에 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분 반응시키고, anti-human IgG Fc-HRP (1 : 2000)를 1시간 반응시킨 후, 발색하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 3-34의 항원결합친화도는  $9.8 \times 10^{-10}$ 이었다(도 4).

[0088] <실시예9> 키메라 항체 3-34를 이용한 HBV 바이러스 면역침강

[0089] 키메라항체가 실제로 B형 간염바이러스에 결합하는지 보기위하여 B형 간염바이러스 환자에서 얻은 약 8000pg에 해당하는 혈청을 동일 양의 PBS로 희석한 후 약 10 ug의 키메라 3-34항체를 섞어주었다. 같은 바이러스 혈청에 사람 IgG 같은 양을 넣어서 음성 대조군으로 사용하였다. 밤새 섭씨 4도에서 흔들어주면서 반응시킨 후 다시 약 20 ul의 protein G Sepharose를 넣고 3시간 더 반응시켰다. 원심분리하여 침전물을 회수한 후 PBS로 10회 세척한 후 용해용액 (1% SDS, 20mM Tris-Cl(pH7.4), 10mM EDTA, 400 ug/ml proteinase K) 150 ul를 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 밤새 반응시켰다. 페놀/클로로포름 용액으로 3회 추출하고 상층액을 모아 10 ug의 대장균 tRNA를 넣고 15ul의 3M 소듐아세테이트를 넣고 3배의 에탄올을 넣은 다음 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 이 DNA를 1% 아가로스 겔에 전개한 후 Southern blotting을 수행하였다. 아가로스 겔을 변성용액 (0.4N NaOH, 1M NaCl)에 30분 반응시키고 다시 중화용액 (0.5M Tris-Cl (pH7.4), 1M NaCl)에서 30분 반응시키고 난후 10X SSC 용액에서 나일론 막으로 모세관 현상에 의해 DNA를 이동 부착시키고  $65^\circ\text{C}$ 에서 1시간 굽고 HBV DNA를 32P 방사성동위원소로 표지한 탐침으로 하이브리제이션 용액 (5X SSC, 5X Denhardt's 용액, 100 ug/ml 연어정자 DNA, 50% dextran sulfate)에서 하이브리제이션을 수행하였다. 세척용액(0.1XSSC, 0.5% SDS)으로  $68^\circ\text{C}$ 에서 세척한 후 이미지 분석기에서 분석하였다. 그 결과 음성대조군에서는 보이지 않지만 3-34항체가 B형 간염 바이러스를 면역침강하여 Southern blotting에서 B형 간염 바이러스 DNA 밴드를 볼 수 있었다 (도 5).

**발명의 효과**

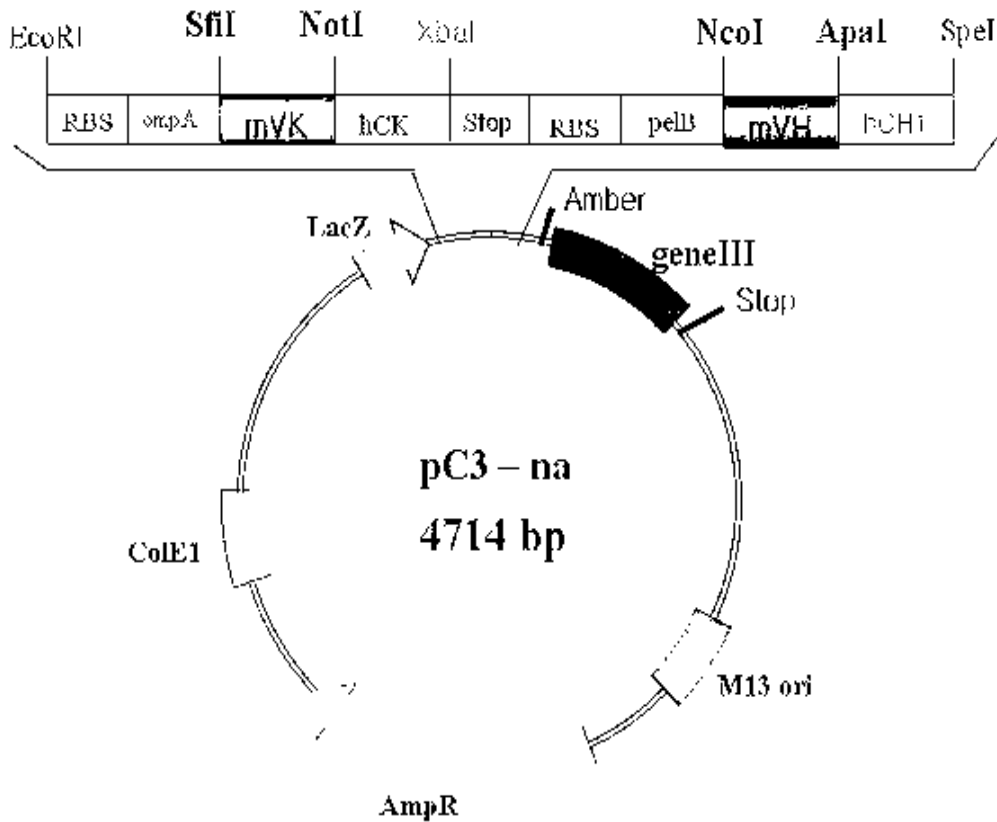
[0090] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 HBV 표면항원 pre-S1에 대한 인간화 항체는 생쥐 단일클론항체와 유사한 항원결합능을 나타내는 반면, 생쥐 단일클론항체보다 아미노산 잔기가 더 인간화되어 인체 내에서의 면역유발능이 현저히 감소되었으므로, HBV 감염의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

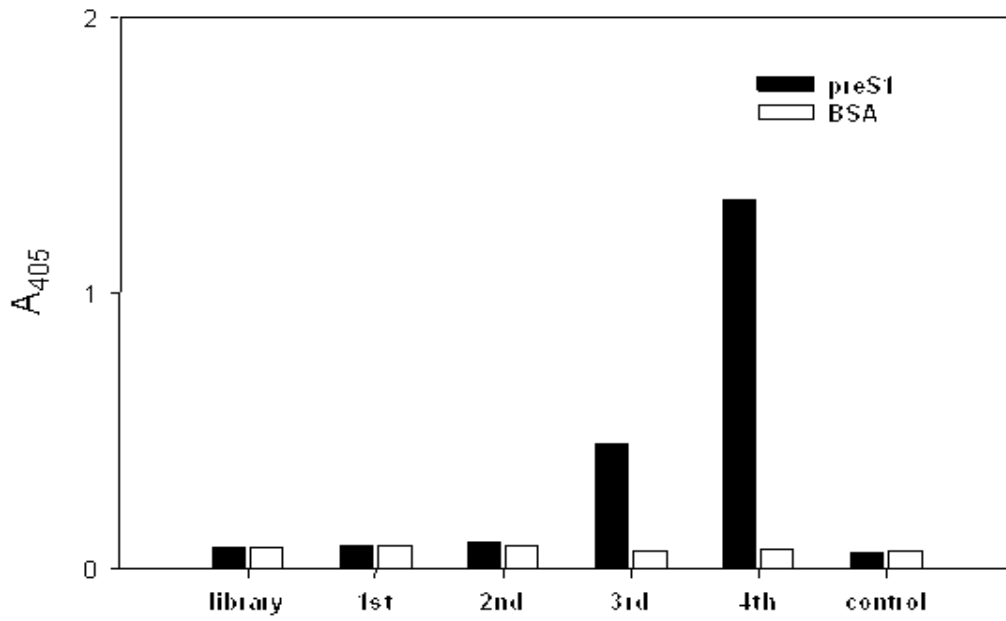
- [0001] 도 1은 본 발명의 생쥐 면역 라이브러리 제조에 사용된 파지미드 (phagemid) 벡터를 나타낸 것이고,
- [0002] 도 2는 생쥐 면역 라이브러리로부터 B형 간염바이러스의 표면항원 preS1에 특이적인 파지(phage)를 1차, 2차, 3차 및 4차로 패닝(panning)한 것을 나타낸 그래프이고,
- [0003] 도 3는 본 발명의 키메라 항체 Fab클론들의 항원결합능을 비교한 것을 보여주는 그래프이고,
- [0004] 도 4는 본 발명의 키메라 항체와 기존의 AP1 항체의 항원결합능을 비교한 것을 보여주는 그래프이다.
- [0005] 도 5는 항체 3-34로 B형 간염바이러스를 면역침강한 후 southern blotting으로 바이러스 DNA를 검출한 그림이다.

**도면**

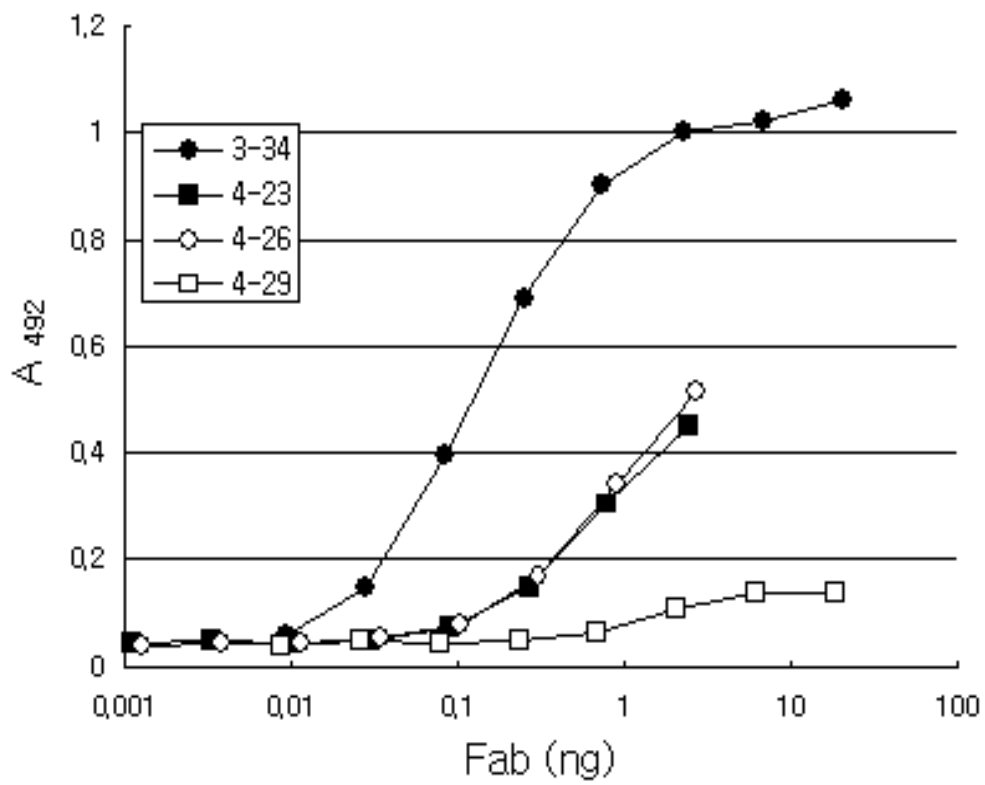
**도면1**



도면2

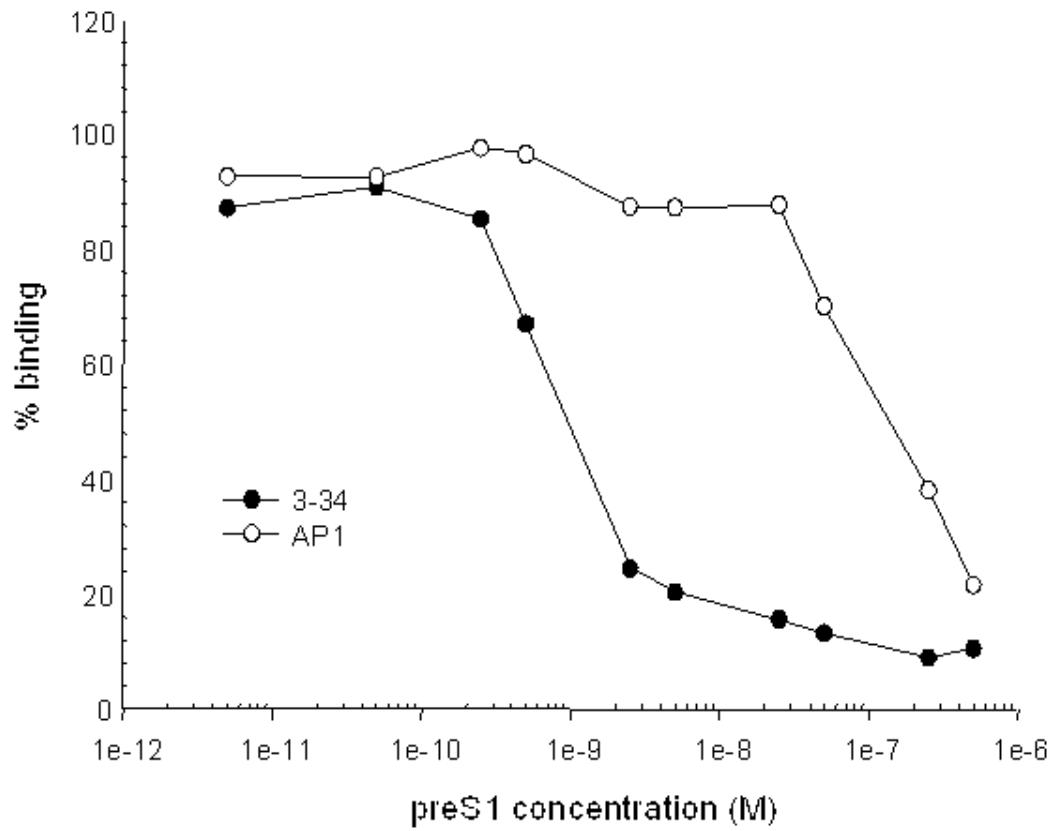


도면3

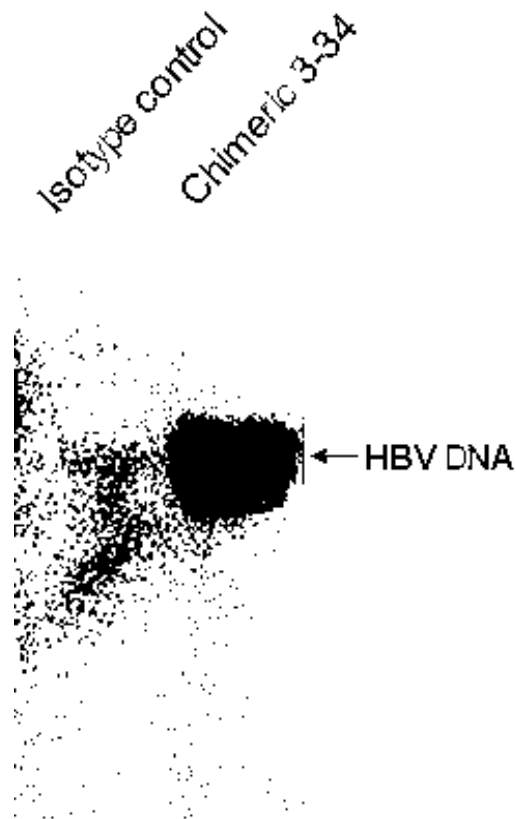




도면4



도면5



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Monoclonal Antibody against preS1, surface antigen of Hepatitis B Virus
- <130> PA9603-214/KR
- <160> 30
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VK amplification

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(45)

<223> primer used for VK amplification

<400> 1

cagcatgtgg cccaggcggc cgayattgtg mtsacmcarw ctmca

45

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VK amplification

<400> 2

agatgggtgcg gccgcagttc gttttatttc caactttgtc cc

42

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VK amplification

<400> 3

agatgggtgcg gccgcagttc gtttcagctc cagcttggtc cc

42

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VK amplification

<400> 4

agatgggtgcg gccgcagttc gtttkatttc cagyttggtc cc 42

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VH amplification

<400> 5

gctgccaac cagccatggc csargtnmag ctgsagsagt c 41

<210> 6

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VH amplification

<400> 6

gctgccaac cagccatggc csargtnmag ctgsagsagt cwgg 44

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VH amplification

<400> 7

gctgccaac cagccatggc ccaggttact ctgaaagwgt stg 43

<210> 8  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primers used for VH amplification

<400> 8  
 gctgccaac cagccatggc cgaggtccar ctgcaacart c 41

<210> 9  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primers used for VH amplification

<400> 9  
 gctgccaac cagccatggc ccaggtccaa ctvcagc arc c 41

<210> 10  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primers used for VH amplification

<400> 10  
 gctgccaac cagccatggc cgaggtgaas stggtggaat c 41

<210> 11  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for VH amplification

<400> 11  
gctgccaac cagccatggc cgatgtgaac ttggaagtgt c 41

<210> 12  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primers used for VH amplification

<400> 12  
cgatgggcc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtgt gt 42

<210> 13  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primers used for VH amplification

<400> 13  
cgatgggcc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gt 42

<210> 14  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primers used for VH amplification

<400> 14  
cgatgggcc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gt 42



<210>	15	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primers used for amplification of VK extension PCR	
<400>	15	
	gaggaggagg aggaggagca gcatgtggcc caggcggcc	39
<210>	16	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primers used for amplification of VK extension PCR	
<400>	16	
	gaggaggagg aggaggagag atggtgcggc cgcagttcg	39
<210>	17	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primers used for amplification of VH extension PCR	
<400>	17	
	gaggaggagg aggaggagc tgcccaacca gccatggcc	39
<210>	18	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Primers used for amplification of VH extension PCR	

<400> 18  
gaggaggagg aggaggagcg atgggccctt ggtggaggc

39

<210> 19  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> light chain variable region

<400> 19  
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 20  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> heavy chain variable region

<400> 20

Glu Val Asn Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Phe Arg Glu Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Thr Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110

Ser

<210> 21

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> light chain variable region

<400> 21

gatattgtgc tgacacaatc tccactctcc ctgctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagecttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagga cagattcac actcaagatc 240

agcaaagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300

tggacgttcg tggagggac caagctggag ctgaaa 336

- <210> 22
- <211> 339
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> heavy chain variable region

<400> 22  
gaggtgaacg tggatgaac tgggggagc ttagtcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgccttggtt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaacc attaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca atgccaaaaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagagggg 300

actatatggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctca 339

- <210> 23
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Primers used for whole IgG

<400> 23  
tgcaaagctt cggcagcagc a 21

<210> 24  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primers used for whole IgG

<400> 24  
 tccttcaaca ccagacaac 19

<210> 25  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primers used for whole IgG

<400> 25  
 ttgtctggtg ttgaaggaga tattgtgctg 30

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primers used for whole IgG

<400> 26  
 ggtgcagccg ccgtacgttt 20

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for whole IgG

<400> 27

gacgaattca ctctaaccat ggaa

24

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for whole IgG

<400> 28

ggagtggaca cctgtag

17

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for whole IgG

<400> 29

actacagtg tccactccga ggtgaacgtg gtgg

34

<210> 30

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primers used for whole IgG

<400> 30

caccggttcg gggaagt

17