(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0056537
(43) 공개일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0123739
(22) 출원일자 2007년11월30일
심사청구일자 2007년11월30일

(71) 출원인
주식회사 녹십자
경기도 용인시 기흥구 보정동 303
(72) 발명자
김세호
경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자
홍광원
경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장성구, 이현실

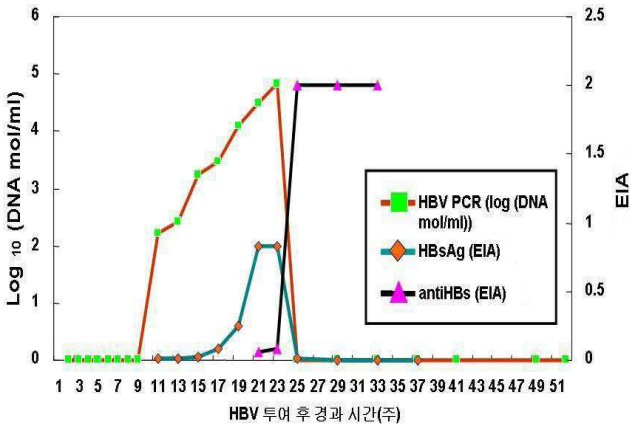
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) B형 간염 바이러스 중화능을 갖는 항체를 유효성분으로포함하는 B형 간염 바이러스 감염의 예방 또는 치료용조성물

(57) 요 약

본 발명은 B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)의 표면 항원(HBsAg)에 대한 인간 항체를 포함하는 HBV 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 항체 조성물은 동물실험을 통해 우수한 HBV 중화능을 나타내었으므로, HBV 감염 또는 이에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

신용남

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

신용원

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

장기환

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

류경환

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

최진설

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

김판경

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

봉기태

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

서동혁

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

오선정

경기 용인시 기흥구 보정동 303 (주)녹십자

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록: 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역(V_H) 및 서열목록: 2의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역(V_L)을 포함하는 인간항체를 포함하는, B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 항체가 세포주 HBAb-49(KCLRF-BP-00054)로부터 생산되는 것임을 특징으로 하는, HBV 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

항바이러스제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, HBV 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 항바이러스제가 인터페론, 항-HBV 단일클론 항체, 항-HBV 폴리클로날 항체, 뉴클레오시드 유사체, DNA 폴리머라제 저해제, siRNA 제제 또는 치료백신인 것을 특징으로 하는, HBV 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

인간을 포함하는 포유동물에 투여되는 것을 특징으로 하는, HBV 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 항체가 포유동물에 대해 하루 0.001 내지 10 mg/kg(체중)의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는, HBV 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 인간 B형 간염 바이러스(HBV) 중화 항체를 유효성분으로 포함하는 B형 간염 바이러스에 의한 질병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 간염과 간암의 주요 원인 바이러스로서, 만성 감염자의 약 1/3은 간 경화 내지 간암으로 발전하여 매년 1백만명 정도가 HBV 관련 질환으로 사망하는 것으로 조사되고 있다(WHO 통계자료).

<3> 백신의 개발로 B형 간염의 예방이 가능해 졌지만, 아직도 HBV 감염으로부터 유래된 만성 간염 환자가 상당수 존재하고 있고, 장기이식 기술의 발전과 더불어 간이식 수요가 획기적으로 증가하고 있으므로 간이식 수술에서 HBV 감염을 방지하여 이식 성공률을 높일 수 있는 항체의 개발은 매우 중요하다.

<4> 또한, 현재 B형 간염 치료제로서 라미부딘과 같은 바이러스 복제 저해제가 널리 사용되고 있으나, 이러한 바이러스 복제 저해제 약제를 단독으로 사용하여 만성 B형 간염을 치료하는 것은 불가능한 것이 현실이다. 따라서,

바이러스 복제 저해제와 서로 다른 메카니즘으로 작용하는 항체를 병용한다면 만성간염의 치료율을 훨씬 높일 수 있을 것으로 기대된다.

<5> 현재 이러한 용도로 사용되고 있는 항체로는 HBV에 대한 항체의 역가가 높은 혈액에서 분리 및 정제한 B형 간염 항체(HBIG) 제제가 있다. 그러나, 이러한 제제에서 항체는 혈장으로부터 분리 및 정제하여 제조되기 때문에 원료혈장 확보 및 수요에 탄력적인 대처의 어려움, 바이러스 감염의 우려, 낮은 활성, 고비용 등의 문제점이 있다.

<6> 이에 반해, 유전자 재조합에 의한 생산되는 항체는 혈액에서 제조하는 항체의 문제점을 모두 해결할 수 있는 대안이 될 수 있다. 즉, 이러한 유전자 재조합 항체를 사용하면 원료 혈장 확보의 어려움을 해결할 수 있고, 안전한 제품을 안정적으로 공급할 수 있다. 또한, 재조합 항체는 기존 혈장 유래 항체와 비교하여 평균적으로 3,000배 이상의 높은 활성(activity)을 나타내므로 이러한 재조합 항체를 간이식시의 HBV 감염 예방 또는 만성간염치료 등에 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명의 목적은 HBV 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<8> 상기 목적에 따라, 본 발명은 서열목록: 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역(V_H) 및 서열목록: 2의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역(V_L)을 포함하는 인간 항체를 유효성분으로 포함하는, B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 예방 또는 치료용 항체 조성물을 제공한다.

효 과

<9> 본 발명의 항체 조성물은 HBV 감염을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 간이식 수술에서 HBV 감염을 방지하거나 바이러스 복제 저해제와 병용함으로써 만성간염을 예방 또는 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<10> 본 발명의 조성물은 서열목록: 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역(V_H) 및 서열목록: 2의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변영역(V_L)을 포함하는 인간항체를 유효성분으로 함유한다.

<11> 본 발명자들은 침팬지를 대상으로 한 실험에서 본 발명의 항체의 HBV 중화 효능을 입증하였다. 구체적으로, HBV와 상기 항체를 혼합하여 침팬지에 투여한 후, 1년간 HBV의 감염이 이루어지지 않았음을 확인하였다. 또한, HBV에 감염된 침팬지에 상기 항체를 투여한 후, HBV 표면항원(HBsAg)의 농도가 감소되었다가 항체의 농도가 감소함에 따라 HBsAg의 농도가 증가함을 확인하였다. 아울러, 상기 항체가 환자 혈액중의 HBV와 결합하는 능력이 탁월하다는 것을 면역침전법을 이용하여 확인하였으며, HBV가 감염된 사람 간 조직에도 강하게 결합한다는 것을 면역조직화학 염색법을 이용하여 확인하였다.

<12> 본 발명에 사용된 상기 인간항체는 바람직하게는 대한민국 등록특허 제10-467706호에 개시되어 있으며, 세포주 HBAb-49 (KCLRF-BP-00054)를 통해 얻을 수 있다.

<13> 상기 항체는 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같이, 동물실험에서 HBV에 대한 우수한 중화능을 나타내었으므로, 이를 포함하는 본 발명의 조성물은 HBV 감염, 예를 들어 간이식시 HBV의 감염, 및 HBV 감염에 의해 발생하는 질병, 예를 들어 만성간염의 예방 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

<14> 또한, 본 발명의 조성물은 통상적인 방법에 따라 약학 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 상기 항체를 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다. 담체가 희석제로 사용되는 경우에는 항체에 대한 담체, 부형제 또는 매질(medium)로 작용하는 고형, 반고형 또는 액상의 물질일 수 있다. 따라서, 제형은 정제, 환제, 분제, 새세이, 엘릭시르, 현탁제, 유제, 용액제, 시럽제, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀제, 멸균 주사제, 멸균 분제 등의 형태일 수 있다.

<15> 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제형은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 항체의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

<16> 본 발명의 항체 조성물은 상기 항체와 함께 인터페론, 항-HBV 단일클론 항체, 항-HBV 폴리클로날 항체, 뉴클레오시드 유사체, DNA 폴리머라제 저해제, siRNA 제제 또는 치료백신을 항바이러스제로서 추가로 포함할 수 있다.

<17> 본 발명의 조성물을 인간을 포함하는 포유동물에게 투여함으로서 HBV 감염 및 HBV 감염에 의해 유발되는 질병을 예방 또는 치료할 수 있다. 이때, 상기 항체의 투여량은 처리되는 대상, 질병 또는 상태의 심각도, 투여의 속도 및 처방 의사의 판단에 따른다. 유효성분으로서 상기 항체는 포유동물에 대해 하루 0.001 내지 10 mg/kg(체중), 바람직하게는 0.005 내지 1 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부의 경우에 있어서, 상기 언급된 범위보다 적은 투여량이 보다 적합할 수 있고, 해로운 부작용을 일으키지 않으면서도 보다 많은 양의 사용될 수도 있으며, 보다 많은 투여량의 경우는 하루에 걸쳐 수회의 적은 분량으로 분배될 수도 있다.

<18> 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 상세하게 설명하고자 하나, 이는 본 발명의 구성 및 작용의 이해를 돕기 위한 것일 뿐이며 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<19> **실시예 1: 침팬지에서의 HBV 중화능 실험**

<20> 본 발명의 인간항체가 *in vivo*에서 HBV 중화능을 나타내는지 확인하기 위하여, 하기와 같은 방법으로 실험하였다.

<21> 3개의 튜브에 간염연구재단(Hepatitis Research Foundation, 미국)에서 입수된 HBV 100 CID50(50% chimpanzee infectious doses)을 넣고, 2개의 튜브에 본 발명의 인간항체(녹십자, 한국)를 각각 0.1 mg 및 10 mg 첨가하였으며, 1개의 튜브에는 항체를 첨가하지 않았다. PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 튜브 내 혼합물의 부피를 모두 3 ㎖로 조정한 후, 37℃에서 1시간 반응시키고, 다시 4℃에서 밤새 반응시킨 다음, 액체 질소로 동결하여 시험물질을 준비하였다.

<22> 동물실험을 위해 HBV에 감염된 적이 없는 침팬지 3 마리 각각에 상기 시험물질을 정맥투여하였다. 하기 표 1에 침팬지별 항체 투여량을 표시하였다.

표 1

<23>

		성별	연령	체중(kg)	항체 투여량
대조군	침팬지 1	수컷	4살	12.2	-
시험군 1	침팬지 2	수컷	4살	11.6	0.1 mg
시험군 2	침팬지 3	암컷	4살	10.8	10 mg

<24> 항체 투여 1주일 전부터 항체 투여 후 8주까지는 1주 간격으로, 8주 이후부터는 2주 간격으로 채혈하여 HBV DNA, HBsAg(HBV 표면항원), 항-HBs(HBV 표면항원 항체), 항-HBc(HBV 코어항체), ALT, AST 등 HBV 감염과 관련된 지표들을 측정하였고, 아울러 혈액 및 소변 검사를 통해 항체의 생체 내 안전성을 확인하였으며, 침팬지 1 내지 3에 대한 결과를 하기 표 2 내지 4에 각각 표시하였다. 또한, 침팬지 1에 대하여 HBV DNA, HBsAg 및 anti-HBs의 변화 양상을 측정하여 도 1에 그래프로 나타내었다.

표 2

	ALT (sf units)	AST (sf units)	HBV PCR Log10(DNAmol/ml)	HBsAg (EIA)	항-HBs (EIA)	항-HBc (EIA)
투여 1주전	6	11	N			
투여 당일	5	10	N			
1주후	15	13	N			
2주후	6	16	N			
3주후	8	22	N			
4주후	2	6	N			
5주후	6	11	N			
6주후	5	12	N			
7주후	6	20	N			
8주후	7	18	N			
10주후	8	18	2.21	.015(-)		
12주후	10	23	2.43	.023(-)		
14주후	13	25	3.24	.064(+)		
16주후	12	18	3.47	.209(+)		
18주후	8	20	4.10	.600(+)		1.004(-)
20주후	8	13	4.50	>2.000(+)		1.264(-)
22주후	10	12	4.82	>2.000(+)	.056(-)	1.038(-)
24주후	15	18	N	.003(-)	.085(-)	.0129(+)
28주후	23	22	N	N	>2.000(+)	0.156(+)
32주후	19	18	N	N	>2.000(+)	0.119(+)
36주후	21	19	N	N	>2.000(+)	0.061(+)
40주후	7	23	N			
44주후	25,24	19	N			
48주후	19	16	N			
51주후	28,29	23	N			

<25>

표 3

	ALT (sf units)	AST (sf units)	HBV PCR Log10 (DNAmol/ml)	항-HBs EIA	항-HBc EIA
투여 1주전	26	22	N		
투여 당일	9	26,25	N		
1주후	10	23	N		
2주후	6	24	N		
3주후	9	25	N		
4주후	4	18	N		
5주후	9	37,37	N		
6주후	5	25	N		
7주후	5	9	N		
8주후	5	13	N		
10주후	8	17	N		
12주후	14	21	N		
14주후	17	23	N		
16주후	15	19	N		
18주후	22	16	N		
20주후	20	16	N		
22주후	13	19	N		
24주후	24	22	N		
28주후	28,28	25	N		
32주후	24	26	N		
36주후	23	25	N		
40주후	11	20	N		
44주후	27,27	17	N		
48주후	18	13	N	N	
51주후	30,29	24	N		N

<26>

표 4

	ALT (sf units)	AST (sf units)	HBV PCR Log10(DNAmol/ml)	HBeAg EIA	항-HBe EIA	항-HBs EIA	항-HBc EIA
투여 1주전	5	18	N				
투여 당일	11	22	N				
1주후	7	18	N				
2주후	5	20	N				
3주후	13	31,31	N				
4주후	9	19	N	(-)	(-)		
5주후	8	23	N	(-)	(-)		
6주후	14	26	N	(-)	(-)		
7주후	7	15	N	(-)	(-)		
8주후	10	19	N	(-)	(-)		
10주후	20	16	N				
12주후	13	19	N				
14주후	16	21	N				
16주후	16	24	2.24*,N,N				
18주후	21	24	N				
20주후	14	22	N				
22주후	16	19	N				
24주후	21	17	N				
28주후	18	21	N				
32주후	23	16	N				
36주후	22	17	N				
40주후	16	23	N				
44주후	24,25	15	2.69*,N,N				
48주후	20	19	N			N	
51주후	28,31	22	N				N
* borderline (+)							

<27>

<28> 상기 표 2 내지 4에 표시한 바와 같이, 대조군으로 사용한 침팬지 1에서는 HBV의 감염이 관찰된 반면, HBV와 함께 항체를 투여한 침팬지 2 및 3에서는 실험기간 내내 바이러스의 감염이 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터, 본 발명의 항체가 우수한 HBV 중화능을 가진다는 것을 확인하였다. 또한, 간 기능 검사, 각종 혈액학적 검사, 소변 검사 등에서도 특별한 이상 소견을 보이지 않아 항체의 생체 내 안전성을 확인하였다.

<29> **실시예 2: 마우스 모델에서의 HBV 중화능 실험**

<30> 2-1) HBV DNA를 코딩하는 플라스미드의 제조

<31> HBV(adr subtype) 유전자(Gene Bank accession No. DQ683578)의 1.3 서열(HBV 게놈의 인핸서(enhancer) I의 업스트림부터 시작해서 폴리아데닐레이션 위치의 다운스트림에서 끝나는 HBV의 유전자; 도 2)을 엔도프리 플라스미드 키트(EndoFree Plasmid Kit; Qiagen, 독일)를 이용하여 pcDNA3.1(Invitorgen사, 미국)의 PmeI 제한효소 자리에 삽입함으로써 플라스미드 pHBV1.3-MBRI를 제조하였다.

<32> 2-2) 플라스미드의 주입

<33> 면역결핍된 8주령의 암컷 C57BL/6J-Prkdcscid/SzJ 마우스(Jackson laboratory, 미국)의 꼬리 정맥에 2-1)에서 제조한 pHBV1.3-MBRI 플라스미드 20 ㎍을 마우스 체중의 9%에 해당하는 부피로 생리 식염수에 용해하여 0.3 ㎖/초의 속도로 주입하였다(hydrodynamic injection).

<34> 2-3) 항체 및 HBV 복제 저해제 투여

<35> 측정에 의해 HBsAg 수준이 최대치에 도달할 때마다 마우스 체중 20 g을 기준으로 5 mg/kg의 농도로 본 발명의 항체를 꼬리 정맥으로 투여하였다. 대조군 마우스에는 초기에 꼬리 정맥으로 PBS 100 ㎕만을 주입하였으며, 80일 후 본 발명의 항체를 상기와 같이 주입하였다. 비교군으로서 마우스 체중 20 g을 기준으로 HBV 치료제인 제픽스(Zeffix®; 라미부딘(Lamivudine), 글락소스미스클라인) 1 타블렛을 증류수에 희석하여, 매일 100 ㎕의 부피

로 투여하였다. 이때, 100일 동안은 5 mg/kg씩, 100일째부터는 50 mg/kg씩, 124일째부터 160일째까지는 500 mg/kg씩을 구강으로 투여하였다.

<36> 2-4) HBsAg 수준의 변화 양상 분석

<37> 실험기간 동안 3~4일 간격으로 채혈(eye-bleeding)한 후, 제네디아 HBsAg ELISA 3.0 키트(녹십자 MS, 한국)를 이용하여 혈액 내의 HBsAg 수준과 잔존 항체량을 분석하였다.

<38> 상기 혈액을 연속적으로 희석하여 ELISA 흡광도를 측정하였고, 10배 희석한 혈액에서 최종 결과를 비교하였다(도 3).

<39> 도 3의 결과에서 알 수 있듯이, 제픽스 투여군에서는 HBsAg가 일정한 수준으로 유지된 반면 본 발명 항체 투여군에서는 HBsAg가 감소하여 완전 소멸된 후 다시 최대치로 올라가는 사이클이 반복되었다. 이러한 결과를 통해, 본 발명의 항체가 HBsAg를 중화시키는 효능이 매우 우수하다는 것을 확인하였다. 제픽스에 의한 효능이 나타나지 않은 것은 제픽스에 의한 저해효과를 나타내기에는 실험동물의 간에서의 HBV 생성이 너무 활발하였기 때문인 것으로 추정되었다. 또한, 본 발명 항체와 제픽스 동시 투여군은 항체 단독 투여군과 유사한 반응 곡선을 나타내었다. PBS 투여군에서는 일관되게 HBsAg 수준이 유지되는 것을 보여 주었는데, 80일 경에 본 발명 항체를 투여한 후에는 HBsAg 수준이 낮아져, 마찬가지로 본 발명의 항체가 HBsAg를 중화시키는 효능이 매우 우수하다는 것을 확인하였다.

<40> 한편, 혈액 중의 잔존 항체량은 표준 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 정제된 재조합 HBsAg 용액을 PBS에 5 ㎍/㎖의 농도로 희석하여 넌크 이뮤노 모듈(Nunc immuno module)의 각 웰에 100 ㎕씩 분주하고 2~8℃에서 밤새 반응시킨 후, 1% BSA/PBS 블로킹 완충액 300 ㎕를 각 웰에 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 블로킹 완충액을 제거한 다음, 표준액, 검액, 스파이크(spike)된 검액을 각각 100 ㎕씩 다시 가하여 실온에서 90분 동안 반응시켰다. 이 후 반응액을 제거하고 세척액(PBS/0.05% Tween 20)으로 5회 세척하였다. 여기에 염소 항-인간 IgG Fab-특이적 퍼옥시다제 접합체(Goat anti-Human IgG Fab-specific Peroxidase conjugate; Sigma)를 1% BSA/PBS 용액으로 25,000배 희석하여 100 ㎕씩 플레이트의 모든 웰에 가하고 실온에서 60분 동안 반응시켰다. 다시 플레이트를 상기 세척액으로 5회 세척하고 기질 용액(TMB 마이크로웰 퍼옥시다제 기질 용액 A 및 B의 1:1 혼합물, KPL, 미국) 100 ㎕를 모든 웰에 가하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 반응정지액(1N H_2SO_4) 100 ㎕를 모든 웰에 가한 후 측정파장 450 nm 및 참조파장 620~650 nm에서 흡광도를 측정하여 항체 잔존량을 측정하였다(도 4).

<41> 도 4의 결과에서 볼 수 있듯이, 본 발명 항체 투여군과 항체 및 제픽스 투여군 모두 항체 농도에 있어 동일한 양상을 보여주고 있다. 이를 도 3의 결과와 비교하여 보면, 투여된 항체가 HBsAg와 반응하여 감소함에 따라 HBsAg 수준이 상승하여 최고점에 이르는 양상이 반복됨을 알 수 있다.

<42> **실시예 3: 면역침전법(immunoprecipitation)에 의한 항체의 HBV 결합능 확인 I**

<43> 본 발명의 항체가 B형 간염 환자의 혈액(아주대학교 의과대학에서 제공 받음)에 있는 HBV와 결합하는지를 면역침전법을 이용하여 확인하였다.

<44> 3-1) B형 간염 환자의 혈액 준비

<45> 0.2% BSA/PBS 완충용액으로 10배 희석한 B형 간염 환자의 혈액 1000 ㎕를 염소 항-인간 IgG(Fc 특이적)-아가로스 접합체(Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ) 와 반응시켜 혈액 내에 존재하는 면역글로불린을 제거하였다.

<46> 3-2) 항체와 염소 항-인간 IgG-아가로스 접합체의 결합 반응

<47> 10 ㎕의 본 발명 항체(0.1, 0.5, 1 및 5 ㎍), PBS 용액 및 50 ㎕의 염소 항-인간 IgG-아가로스 접합체(Research Diagnostics)를 혼합하여 실온에서 1시간 동안 흔들어 주면서 반응시킨 후, 여기에 다시 10 mg의 사람 면역 글로불린(I.V.-Globulin-S, 녹십자)을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 흔들어 주면서 반응시켜 염소 항-인간 IgG-아가로스 접합체의 결합부분을 차단하였다. 이때, 비교군으로서 혈액에서 정제한 HBV 항체(Hepabig®), TT-F9(항-파상풍 톡소이트 인간항체) 및 HuS 10(항-B형간염바이러스 표면항원 인간화항체)에 대해서도 1 ㎍씩 상기와 동일하게 처리하였다.

<48> 3-3) 항체가 결합되어 있는 염소 항-인간 IgG-아가로스 접합체와 환자 혈액의 결합 반응

<49> 3-1)에서 준비한 혈액 200 ㎕와 3-2)에서 준비한 항체가 결합되어 있는 염소 항-인간 IgG-아가로스 접합체를 혼합하여 실온에서 1시간 동안 흔들어 줌으로써 환자 혈액 중의 HBV와 항체를 반응시켰다.

<50> 3-4) HBV의 침전 여부 확인

<51> 3-3)의 반응액을 원심분리한 후 상층액을 취하여 코바스 암플리코 HBV 모니터 테스트(Cobas Amplicor HBV Monitor Test, v2.0; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)로 HBV를 측정하였다.

<52> 원심분리한 후 남아있는 아가로스는 0.2% BSA/PBS 완충액으로 10회 세척해 준 다음, 다시 상기 완충액 100 ㎕를 섞고 10% SDS 5 ㎕, 50 mM EDTA 2 ㎕ 및 200 ㎍의 프로티나아제 K (Sigma-Aldrich)를 첨가하여 55℃에서 30분간 반응시켰다. 그 다음, 상층액을 취해 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen, Hilden, Germany)로 DNA를 분리한 후, LiquiMix GM PCR premix(Neurotics, 한국), 프라이머 M3(서열목록: 3) 및 POL8(서열목록:4)를 사용하여 HBV 특이 DNA를 증폭하였다. 이때, PCR은 55℃에서 5분간 반응 후, 95℃ 1분, 55℃ 1분 및 72℃ 1분의 사이클을 35회 반복하고 최종적으로 72℃에서 10분간 반응하여 수행되었다. 증폭된 DNA는 1.0% 아가로스 젤에서 분석하였다. 대조군으로는 HBV 인간화 항체 및 파상풍 인간항체(녹십자, 한국)를 사용하였으며, 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5의 (a) 및 (c)에서, 각 레인에 해당하는 분석 시료는 다음과 같다:

<53> 도 5-(a)

<54> 1: 본 발명항체 0.1 ㎍ 처리군, 2: 본 발명항체 0.5 ㎍ 처리군, 3: 본 발명항체 1 ㎍ 처리군, 4: 본 발명항체 5 ㎍ 처리군, 5: PBS

<55> 도 5-(c)

<56> 1: PBS, 2: TT-F9(항-파상풍 톡소이트 인간항체) 1 ㎍ 처리군, 3: Hepabig® 1 ㎍ 처리군, 4: HuS 10(항-B형간염바이러스 표면항원 인간화항체) 1 ㎍, 5: 본 발명항체 1 ㎍ 처리군)

<57> 먼저, 도 5의 (a) 및 (b)에 표시된 바와 같이, 면역침전 반응에 사용한 항체의 양이 증가할수록 침전되는 HBV의 양도 증가하였고, 면역침전 반응 후 상층액의 HBV 양은 항체의 양이 증가함에 따라 감소하였으며, 침전된 HBV의 양은 항체의 양이 증가할수록 이에 비례하여 증가하였다. 또한, 도 5의 (c)에 표시한 바와 같이, 같은 양의 항체를 사용할 경우 혈액에서 정제한 HBV 항체(Hepabig®)는 HBV 결합력이 약하여 HBV를 침전시키지 못하는 것에 반해 본 발명의 항체는 HBV와의 강한 결합력으로 인해 HBV를 침전시킴을 확인하였다.

<58> **실시예 4: 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)에 의한 항체의 HBV 결합능 확인 Ⅱ**

<59> 본 발명의 항체가 HBV-감염 조직에 결합하는지를 면역조직화학염색법을 이용하여 확인하였다.

<60> HBV 감염된 사람 간 조직(Spring Bioscience, Fremont, CA, 미국. Catalog No. STS-025)의 냉동 슬라이드를 아세톤으로 고정시키고 메탄올에 희석한 과산화수소와 반응시켰다. 그 다음, 상기 조직 슬라이드를 정상 토끼 혈청과 반응시킨 후, 차례로 아비딘(avidin) 및 바이오틴(biotin)으로 반응시켰다. 여기에 이뮤노프로브(Immunoprobe; Sigma-Aldrich) 바이오틴화 키트를 사용하여 바이오틴을 결합시킨, 본 발명 항체 및 이와 동일한 아이소타입의 사람 면역글로불린(IgG1 아이소타입 음성대조 항체; Sigma-Aldrich)를 각각 반응시키고, StreptABComplex/HRP(Dako, 네덜란드)를 다시 반응시켰다. 상기 반응물들에 대해 각각 3,3'-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DAB) 염색제로 염색을 하고 해마톡실린(haematoxylin)으로 대조 염색(counterstain)을 실시한 뒤, 본 발명의 항체 및 상기 IgG1 아이소타입 음성대조 항체를 반응시킨 결과를 각각 도 6의 (a) 및 (b)에 표시하였다.

<61> 도 6의 (a) 및 (b)에 표시한 바와 같이, 아이소타입 음성대조 항체 (b)는 HBV가 감염된 사람 간 조직에 결합하지 않은 반면, 본 발명의 항체 (a)는 동일 조직에 강하게 결합함을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

<62> 도 1은 항체를 투여하지 않은 침팬지 혈액에서의 HBV DNA, HBsAg 및 anti-HBs의 변화 양상을 나타낸 결과이고,

<63> 도 2는 HBV 게놈 및 플라스미드 pHBV1.3-MBRI의 구조를 나타낸 모식도이고,

<64> 도 3은 HBV 감염 마우스에 본 발명의 항체 및 HBV 복제 저해제를 투여한 후, 혈중 HBsAg의 농도의 변화를 측정

한 결과이고,

<65> 도 4는 HBV 감염 마우스에 본 발명의 항체 및 HBV 복제 저해제를 투여한 후, 혈중 항체 농도의 변화를 측정한 결과이고,

<66> 도 5의 (a)는 본 발명항체의 처리량에 따른 혈액 중 HBV와의 결합반응 정도를 면역침전법으로 확인한 결과이고,

<67> 도 5의 (b)는 본 발명항체의 처리량에 따른 HBV DNA 양의 변화를 나타낸 결과이고,

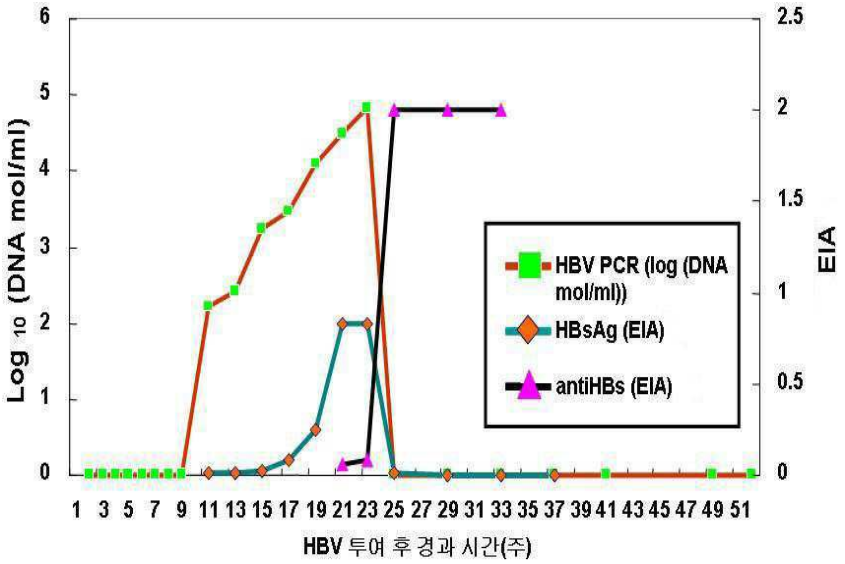
<68> 도 5의 (c)는 본 발명항체의 처리에 따른 혈액 중 HBV와의 결합반응 정도를 다른 항체들을 처리한 경우와 비교하여 나타낸 결과이고,

<69> 도 6의 (a)는 HBV-감염 사람 간 조직에 대한 본 발명항체의 결합 반응을 면역조직화학 염색법을 이용하여 확인한 결과이고,

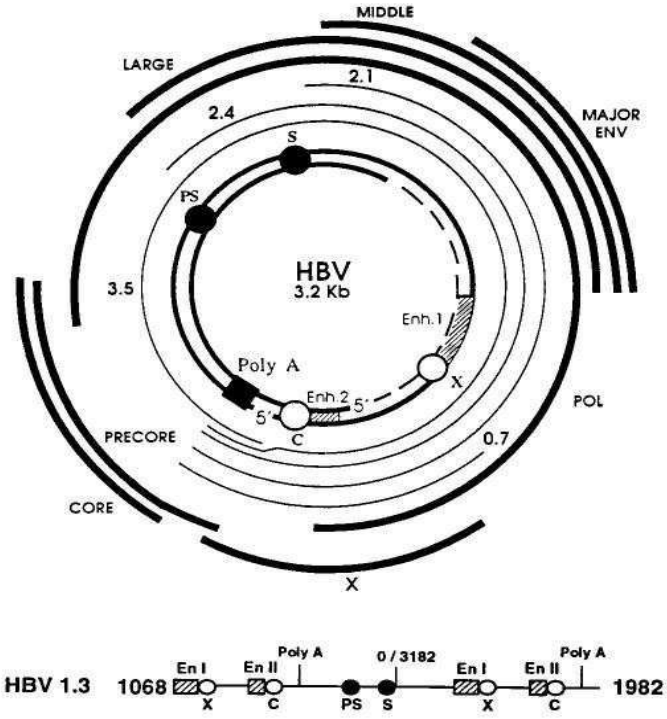
<70> 도 6의 (b)는 HBV-감염 사람 간 조직에 대한 본 발명항체의 동일 아이소타입 음성대조 항체의 결합 반응을 면역조직화학 염색법을 이용하여 확인한 결과이다.

도면

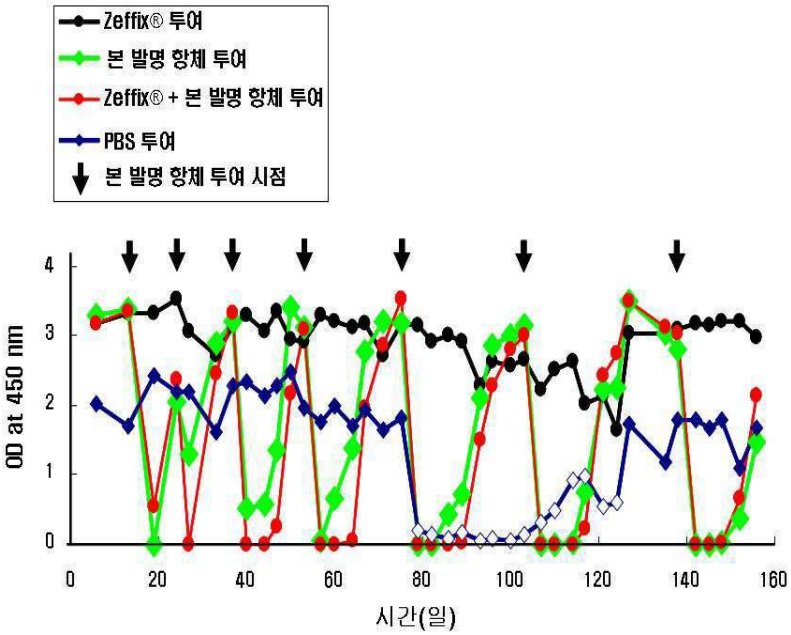
도면1



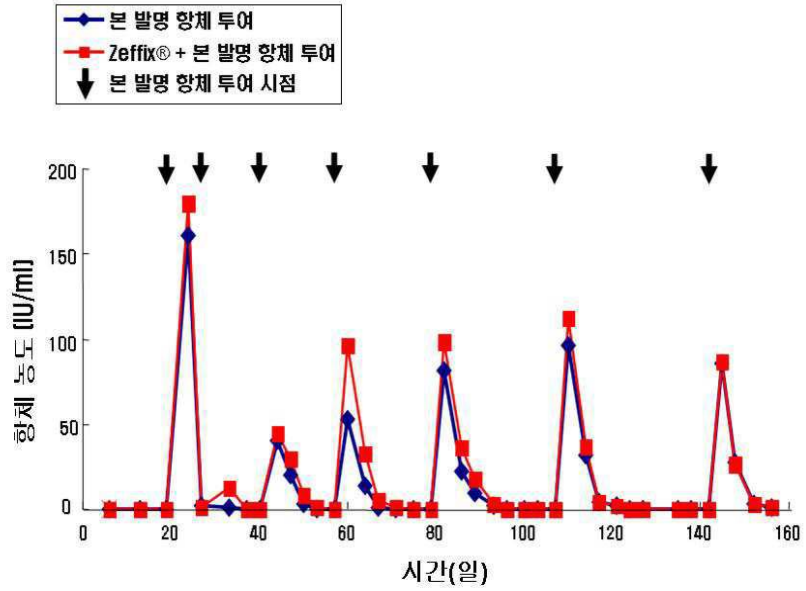
도면2


MIDDLE
LARGE
2.1
2.4
MAJOR ENV
S
PS
HBV
3.2 Kb
3.5
Enh.1
Poly A
X
Enh.2
5'
5'
C
POL
PRECORE
0.7
CORE
X
HBV 1.3
1068
En I
En II
Poly A
0 / 3182
En I
En II
Poly A
1982
X
C
PS
S
X
C

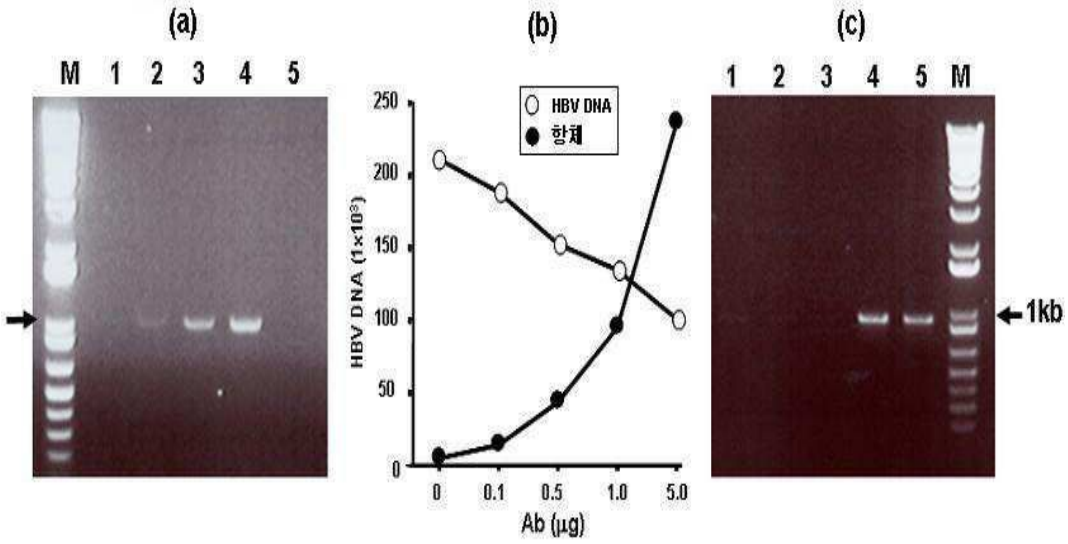
도면3


Zeffix® 투여
본 발명 항체 투여
Zeffix® + 본 발명 항체 투여
PBS 투여
본 발명 항체 투여 시점
OD at 450 nm
0
1
2
3
4
0
20
40
60
80
100
120
140
160
시간(일)

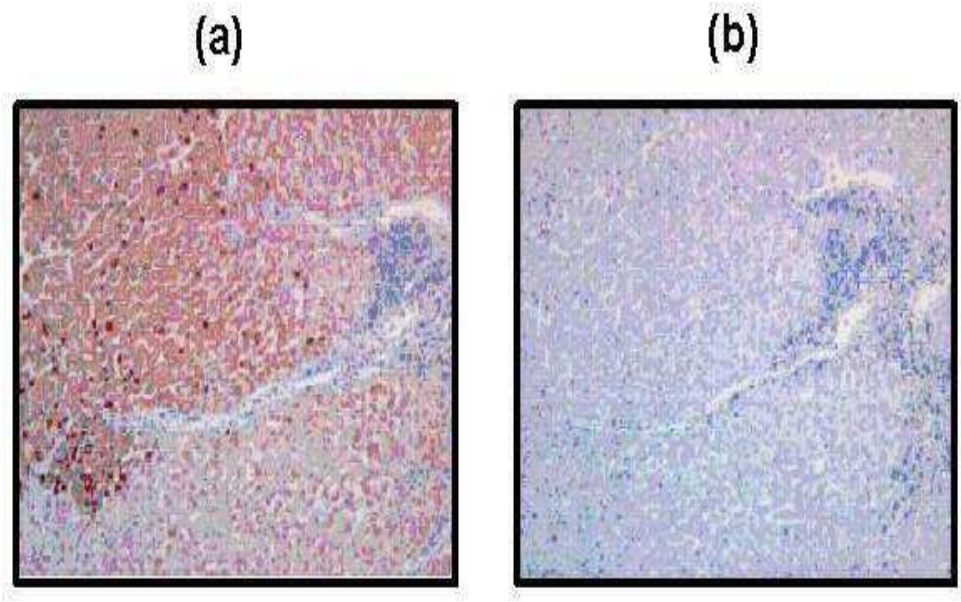
도면4


본 발명 항체 투여
Zeffix® + 본 발명 항체 투여
본 발명 항체 투여 시점
항체 농도 (IU/ml)
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
시간(일)

도면5


(a)
M 1 2 3 4 5
(b)
HBV DNA
항체
HBV DNA (1×10⁵)
250
200
150
100
50
0
0
0.1
0.5
1.0
5.0
Ab (μg)
(c)
1 2 3 4 5 M
1kb

도면6



서 열 목 록

<110> KOREA GREEN CROSS CORPORATION
<120> Composition comprising a human antibody capable of neutralizing hepatitis B virus for preventing or treating hepatitis B virus infection

<130> FPD/200711-0045

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable region of human antibody H chain

<400> 1
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Lys Tyr

20 25 30

Lys Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser Arg Asp Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Asp Gly Trp Leu Trp Gly Trp Asp Val Arg Ser Asn Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Asn Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable region of human antibody L chain

<400> 2
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Asn Ser
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Val Thr Pro Glu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer M3

<400> 3
ctgggaggag ttgggggagg agatt 25

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer POL8

<400> 4
aggatagaac ctagcaggc 19