(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월03일
(11) 등록번호 10-2680147
(24) 등록일자 2024년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/08 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
G01N 33/576 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/082 (2013.01)
A61P 31/20 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0066283
(22) 출원일자 2022년05월30일
심사청구일자 2022년05월30일
(65) 공개번호 10-2022-0168148
(43) 공개일자 2022년12월22일
(30) 우선권주장
1020210077615 2021년06월15일 대한민국(KR)
1020210093625 2021년07월16일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180012245 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에이피트바이오 주식회사
서울특별시 송파구 송파대로 167, 비동 비907호, 비908호, 비909호, 비910호, 비1510호(문정동, 문정역테라타워)
(72) 발명자
홍효정
강원도 춘천시 서부대성로 332. 103동 603호(석사동 청구아파트)
조경희
강원도 철원군 갈말읍 동온동길 215-1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 조경주

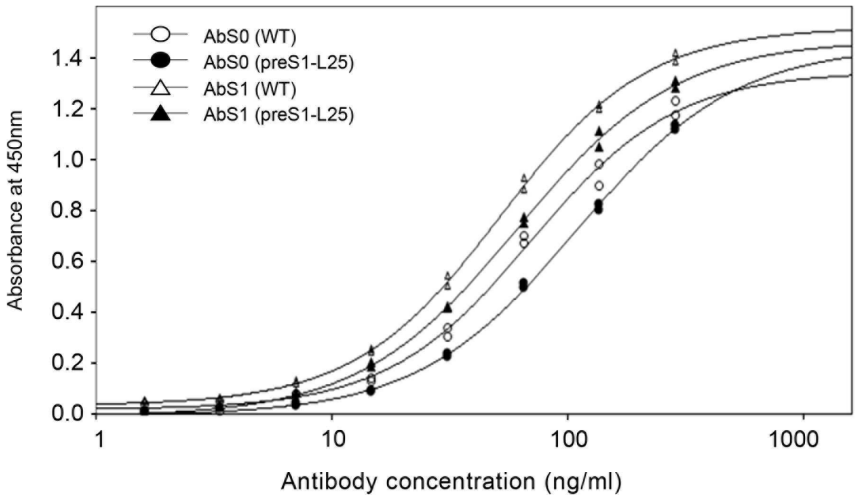
(54) 발명의 명칭 **B형 간염바이러스 preS1항원의 간세포 수용체 결합부위에 특이적으로 결합하는 인간 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 B형 간염바이러스 preS1항원의 수용체 결합 모티프에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 항체는 HBV의 다양한 유전자형을 타겟으로 하므로, HBV 중화 또는 B형 간염바이러스의 감염 억제, 치료가 필요한 분야에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
G01N 33/5761 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2333/02 (2013.01)
(72) 발명자
홍지수
인천광역시 부평구 안남로 222번길 27, 경남아파트 103동 1001호
최영진
서울특별시 광진구 용마산로24길 13, 3동 302호(중곡동 신향빌라)
이지우
경기도 광주시 퇴촌면 안도장골길 131-77

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135273
과제번호	2020R1A5A8019180
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업(대)/선도연구센터(중)/지역혁신성장분야
연구과제명	바이오 신약 혁신소재 융합 선도연구센터(연구책임자 이정형)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

HBV(Hepatitis B virus)의 preS1 항원 내의 특정 위치의 아미노산에 결합하는 항체로,

상기 preS1 항원 내의 특정 위치는 서열번호 19를 기준으로 22번, 23번 및 25번 위치에 상응하고,

상기 항체는 서열번호 5의 LCDR3 서열의 8번 타이로신; 서열번호 9의 HCDR3 서열의 6번 류신; 및 서열번호 8로 표시되는 HCDR2 서열의 1번 알라닌 또는 세린을 파라토프로 갖는 항체로서,

(a) 서열번호 3의 경쇄 CDR1, 서열번호 4의 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역; 및

(b) 서열번호 10의 중쇄 CDR1, 서열번호 11 또는 12의 중쇄 CDR2, 및 서열번호 13의 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역;

을 포함하는, 항체.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 항체는 HBV의 유전자형 A, B, C, D, E 및 F에서 선택된 하나 이상의 유전자형에 특이적으로 결합하는 것인 항체.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 14로 기재된 경쇄 가변영역; 및 서열번호 15 또는 16으로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항체.

청구항 11

제4항, 제7항 및 제10항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 12

제11항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 13

제12항의 발현 벡터를 포함하는, 단리된 숙주세포.

청구항 14

제4항, 제7항 및 제10항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, HBV 감염에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물은 B형 간염의 예방 또는 치료를 위한 것인, 조성물.

청구항 16

제4항, 제7항 및 제10항 중 어느 한 항의 항체를 이용하여, HBV 감염 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 존재하는 preS1 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계를 포함하는, HBV감염의 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 방법은 B형 간염의 진단을 위한 정보의 제공을 하기 위한 것인, 방법.

청구항 18

제4항, 제7항 및 제10항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, HBV 검출용 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 조성물은 B형 간염 진단용인 것인 조성물.

청구항 20

제18항의 조성물을 포함하는, HBV검출용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 B형 간염바이러스 preS1항원의 간세포 수용체 결합부위에 특이적으로 결합하는 인간 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus; HBV) 감염은 공중 보건에 있어서 가장 심각하고 만연한 문제이다. 2016년 지구상 HBV 만성 감염자는 약 2억 9000만명이다.

[0004] 현재까지 HBV 유전자형은 총 10종(A-J)이 존재하는 것으로 확인되었다. 유전자형 A 및 D는 아프리카 및 유럽에 분포하며, 유전자형 B 및 C는 아시아에 주로 분포하고, 유전자형 E-J는 유럽, 아메리카 및 아시아에 종종 출현한다. 가장 많이 존재하는 유전자형은 A-D로, B형 간염의 약 90%를 차지한다.

[0005] HBV 외피는 구조적으로 관련된 S(small), M(middle) 및 L(Large) 3개의 단백질을 포함한다. S 단백질은 이 외피 단백질들 중에 가장 많이 존재하는 단백질이며, M 단백질은 preS2 및 S로 구성되고, L 단백질은 preS1, preS2, 및 S로 구성된다.

[0006] HBV에 감염된 간세포는 감염성 HBV 입자(virion) 뿐만 아니라 비감염성인 구형 및 섬유형 준바이러스(subviral) 입자들을 생성한다. 이 준바이러스 입자들은 대부분 S 단백질로 구성되며, 일반적으로는 비리온에 비해 1000배 내지 10000배 더 많이 생성된다. 이 준바이러스 입자들은 바이러스 특이적 면역 반응을 감소시키는 것으로 추정된다.

[0007] S 단백질과 달리, L 단백질의 preS1은 주로 감염성 비리온에 존재한다. 또한, preS1의 20-26번(A-C, F 유전자형; D 유전자형인 경우 9-15번; E 유전자형인 경우 19-25번) 아미노산은 간세포 수용체인 NTCP(sodium taurocholate cotransporting polypeptide)에 결합하여 HBV 감염을 매개한다. 이 수용체 결합부위는 HBV 유전자형 간에 고도로 보존되어 있으므로, HBV 감염의 치료 및 예방의 타겟이 될 수 있다.

[0008] B형 간염 면역 단백질(Hepatitis B immune globulin; HBIG)은 우발성(accidental) 또는 주산성(perinatal) HBV 노출 후 예방의학적 치료를 위해 사용되고 있다. HBIG는 높은 항-S 단백질 항체 역가의 혈청을 수집하여 제조된다. 그러나, HBV 감염에 preS1 영역이 중요하다는 점을 고려하면, HBV 감염의 예방 및 치료에 있어서 HBV의 감염을 억제할 수 있는 preS1-특이적 단일클론 항체(monoclonal antibody; mAb)가 유망한 방법이 될 수 있다. 임상적으로, 항-preS1 항체의 존재는 B형 간염 환자의 회복과 연관이 있는 것으로 밝혀졌다. 최근에, Li 등은 preS1의 간세포 수용체 결합 부위(아미노산 20-26번, A-C, F 유전자형)의 downstream 부분인 아미노산 31-38번(A-C, F 유전자형)에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체(2H5-A14)가 인간 간세포를 이식한 마우스 모델에서 HBV의 감염을 예방할 뿐만 아니라 Fc-mediated effector function에 의하여 치료 효과도 나타냄을 증명하였다(Dan Li, Wenhui He, Ximing Liu, Sanduo Zheng, Yonghe Qi, Huiyu Li, Fengfeng Mao, Juan Liu, Yinyan Sun, Lijing Pan, Kaixin Du, Keqiong Ye, Wenhui Li, Jianhua Sui. 2017. A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. eLife 6:e26738. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.26738).

[0009] HBV 입자 또는 재조합 preS1 항원으로 면역화된 마우스로부터 다수의 HBV-중화 활성을 갖는 항-preS1 mAb가 제조되었다(Heermann K, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich W. 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of virology*.52: 396-402; Pizarro JC, Vulliez-le Normand B, Riottot M-M, Budkowska A, Bentley GA. 2001. Structural and functional characterization of a monoclonal antibody specific for the preS1 region of hepatitis B virus. *FEBS letters*.509: 463-468; Kim JH, Gripon P, Bouezzedine F, Jeong MS, Chi SW, Ryu SE, Hong HJ. 2015. Enhanced humanization and affinity maturation of neutralizing anti-hepatitis B virus preS1 antibody based on antigen-antibody complex structure. *FEBS letters.* 589: 193-200; Wi J, Jeong MS, Hong HJ. 2017. Construction and characterization of an anti-hepatitis B virus preS1 humanized antibody that binds to the essential receptor binding site. Journal of microbiology and biotechnology 27, 1336-1344. 등). 그러나 이렇게 제조된 대부분의 항체는 HBV 유전자형 전부를 중화하지 못한다는 문제점이 존재한다.

[0010] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 더 효율적인 예방이나 치료를 위해, HBV의 다양한 유전자형에 결합할 수 있으며 preS1의 간세포 수용체 결합 부위에 특이적인 단일클론항체를 제공하고자 예의 노력한 결과, B형 간염 바이러스의 대부분을 차지하는 유전자형 A 내지 F에 모두 결합하며, 간세포 수용체 결합 부위에 결합하여 HBV 감염

억제 효능을 나타내는 인간 단일클론항체를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 B형 간염바이러스 preS1 항원의 수용체 결합부위에 특이적으로 결합하는 신규한 항체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터 및 상기 벡터가 도입된 숙주세포를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 HBV 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 이용하여 HBV 감염을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 이용하여 HBV 감염 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 존재하는 preS1을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계를 포함하는, HBV 감염의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는, HBV 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 HBV 검출용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 이하, 본 출원을 더욱 상세히 설명한다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0022] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0023] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[0024] 알라닌 Ala, A　　아르기닌 Arg, R

[0025] 아스파라긴 Asn, N　　아스파르트산 Asp, D

[0026] 시스테인 Cys, C　　글루탐산 Glu, E

[0027] 글루타민 Gln, Q　　글리신 Gly, G

[0028] 히스티딘 His, H　　이소류신 Ile, I

[0029] 류신 Leu, L　　라이신 Lys, K

[0030] 메티오닌 Met, M　　페닐알라닌 Phe, F

[0031] 프롤린 Pro, P　　세린 Ser, S

[0032] 트레오닌 Thr, T　　트립토판 Trp, W

[0033] 타이로신 Tyr, Y　　발린 Val, V

[0034] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, B형 간염바이러스 preS1 항원에 특이적으로 결합하

는 신규한 항체를 제공한다.

[0035] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다.

[0036] 또한, 상기 용어는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체 및 이가(bivalent) 또는 이중특이성 분자(예를 들어, 이중특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함한다. 상기 용어는 추가로 FcRn에 대한 결합 기능을 보유한 단쇄 항체, 스캡, 항체 불변영역의 유도체 및 단백질 스캐폴드에 기초한 인공 항체를 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 상기 항체 단편은 항원결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fd, Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 등을 포함한다. 상기 Fd는 Fab 단편에 포함되어 있는 중쇄 부분을 의미한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. $F(ab')_2$ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중디설파이드Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 $F(ab')_2$ 단편을 얻을 수 있다), 구체적으로는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0037] 본 발명의 항체는 단일클론항체일 수 있다.

[0038] 본 발명에서 용어, "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0039] 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 도메인으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역(complementarity-determiningregion, 이하 "CDR"이라 함)이라 불리우는 3개의 다변가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.

[0040] 본 발명의 항체는 인간 항체일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어, "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서, 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간 면역글로불린의 아미노산 서열로 구성되어 있는 것을 의미한다. 인간 항체는 통상적으로 인간의 질병의 치료에 사용되는데, 이는 3가지 이상의 잠재적인 장점을 가질 수 있다. 먼저, 이는 인간 면역 체계와 보다 양호하게 상호작용하여, 예를 들어 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 또는 항체-의존성 세포성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)에 의하여 목적 세포를 보다 효율적으로 파괴시킬 수 있다. 둘째로, 인간 면역 체계가 상기 항체를 외래의 것으로 인식하지 않는 이점이 있다. 셋째로, 더 적은 양, 보다 적은 빈도의 약물을 투여하였을 때에도 인간 순환계 내 반감기가 천연 발생 항체와 유사하다는 이점이 있다.

[0042] 또한, 상기와 같은 본 발명의 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어, "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그 예로, IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 불변 영역으로부터 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어, "하이브리드(hybrid)"란 단쇄 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하며, 그 예로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의

CH1, CH2, CH3 및CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다.

[0045] 본 발명에서 용어, "B형 간염 바이러스(hepatitis B virus)" 는 HBV와 상호 교환적으로 사용되는 용어이며, 감염될 경우 이에 대한 면역 반응으로 인해 B형 간염을 일으킬 수 있는 바이러스이다.

[0046] 본 발명에서 용어, "preS1 항원" 은 HBV DNA의 S, C, X, P의 4개의 유전자 중, 하나인 S 유전자에 의하여 코딩되는 단백질을 의미한다. 구체적으로, S 유전자는 표면 항원을 코딩(encode)하는 유전자로, 이의 앞쪽에 Pre-S 영역이 존재하며, Pre-S는 PreS1 영역과 PreS2 영역으로 나뉘어 있다. 이들에 의하여 표면 단백질인 S(small) 단백질, M(middle) 단백질, L(large) 단백질이 코딩된다. S 단백질은 S 유전자로 코딩되고, M 단백질은 preS2와 S 단백질로 구성되어 있고, L 단백질은 preS1, preS2, S 단백질로 구성되어 있으며 주로 감염성 바이러스 입자(비리온)에 존재한다. 따라서 preS1은 바이러스의 표면단백질을 구성하며, 주로 감염성 비리온에 존재한다.

[0047] 본 발명에서 제공하는 항체는 다양한 유전자형의 HBV에 결합할 수 있으며, 구체적으로는 유전자형 A, B, C, D, E 및 F 모두에 결합할 수 있는 것일 수 있다. 일 구현예로, 본 발명에서 제공하는 항체는 preS1의 유전자형 A, B, C, D, E 및 F가 공유하는 수용체 결합 모티프 서열에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0048] 본 발명에서 용어, "B형 간염 바이러스 preS1 항원에 결합하는 항체"는 HBV의 표면 항원인 preS1에 결합하여 HBV에 대한 중화 활성 및/또는 HBV 감염 억제 활성을 나타낼 수 있는 항체를 말한다.

[0049] 일 구현예로, 본 발명에서 제공하는 항체는 preS1 항원의 특정 위치의 아미노산에 결합하는 것일 수 있고, 상기 위치는 서열번호 19를 기준으로 22번, 23번 및 25번에 상응하는 위치일 수 있다.

[0050] 상기 서열번호 19는 임의의 preS1 항원에서 본 발명의 항체가 결합하는 위치를 특정하기 위한 참조 서열(reference sequence)일 뿐, 본 발명의 preS1 항원은 서열번호 19로 제한되지 않으며, 임의의 preS1 항원 단백질에서 서열번호 19를 기준으로 22번, 23번 및 25번에 상응하는(corresponding) 위치는 서열 얼라인먼트(alignment)를 통해 확인할 수 있다. 이러한 서열 얼라인먼트에는 당업계에 알려진 Needleman-Wunsch 알고리즘, EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램, 다중 서열 정렬 등이 이용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 preS1 항원의 아미노산 서열은 공지된 데이터베이스에서 그 정보를 얻을 수 있으며, 예를 들어 서열번호 17 또는 18의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 22번, 23번 및 25번 아미노산은 서열번호 17 또는 18의 아미노산 서열에서 각각 3번, 4번 및 6번으로 표시되는 아미노산일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 상기 서열번호 19를 기준으로 22번, 23번 및 25번 아미노산은 본 발명의 항체가 결합하는 부위로, 본 발명의 항체가 인식하는 preS1 항원의 "에피토프(epitope)"는, 서열번호 19를 기준으로 22번, 23번 및 25번에 상응하는 위치로 표현할 수 있다. 한편 상기 서열번호 19를 기준으로 22번, 23번 및 25번에 상응하는 위치는, preS1 항원이 간세포 수용체와 결합하는 부위에 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 preS1 항원이 간세포 수용체와 결합하는 작용을 억제할 수 있다.

[0053] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체는 서열번호 19를 기준으로 22번 위치에 상응하는 류신(Leu22), 23번 위치에 상응하는 글리신(Gly23) 및 25번 위치에 상응하는 페닐알라닌(Phe25) 또는 류신(Leu25)에 결합하는 것일 수 있다.

[0054] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체는 서열번호 5의 LCDR3 서열의 8번 타이로신 및 서열번호 9의 HCDR3 서열의 6번 류신을 파라토프(paratope)로 갖는 항체일 수 있다.

[0055] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체는 서열번호 8로 표시되는 HCDR2 서열의 1번 아미노산을 파라토프로 갖는 항체일 수 있다. 상기 서열번호 8의 1번 아미노산은 알라닌 또는 류신일 수 있다.

[0056] 본 발명에서, 용어 "파라토프" 는 항체 또는 항체 단편이 항원에 특이적으로 결합하는, 즉 항체 또는 항체 단편이 항원에 물리적으로 접촉하는 항체 또는 항체 단편상의 영역 또는 구역을 의미한다.

[0057] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체는 서열번호 3의 경쇄 CDR1(LCDR1), 서열번호 4의 경쇄 CDR2(LCDR2), 및 서열번호 5의 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역; 및 서열번호 7의 중쇄 CDR1(HCDR1), 서열번호 8의 중쇄 CDR2(HCDR2), 및 서열번호 9의 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, preS1에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0058] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체는 서열번호 3의 경쇄 CDR1(LCDR1), 서열번호 4의 경쇄 CDR2(LCDR2), 및 서열번호 6의 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변영역; 및 서열번호 10의 중쇄

CDR1(HCDR1), 서열번호 11 또는 12의 중쇄 CDR2(HCDR2), 및 서열번호 13의 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, preS1에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0059] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체의 경쇄 가변영역은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 14로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다. 구체적으로 서열번호 15 또는 16으로 기재된 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 전술한 구현예 중 어느 하나에 따른 구현예로, 상기 항체는 서열번호 1로 기재된 경쇄 가변영역 및 서열번호 2로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로, 서열번호 14로 기재된 경쇄 가변영역; 및 서열번호 15 또는 16으로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에서는 서열번호 14의 경쇄 가변영역 및 서열번호 15의 중쇄 가변영역을 포함하는, preS1 영역에 특이적으로 결합하는 항체를 AbS0로 명명하였으며, AbS0이 HBV 유전자형 A, B, C 및 D 모두에 대해 우수한 결합능을 나타내는 것을 확인하였다.

[0063] 또한, 상기 서열번호 6의 LCDR3 서열의 8번 타이로신, 서열번호 13의 HCDR3 서열의 6번 류신 및 서열번호 11로 표시되는 HCDR2 서열의 1번 세린이 상기 AbS0 항체의 파라토프(paratope)임을 확인하고, 상기 AbS0 항체에서 HCDR2의 1번 세린을 다른 아미노산(알라닌)으로 치환한 결과 서열번호 12로 표시되는 HCDR2 서열을 가지는 항체가 AbS0에 비해서도 우수한 결합능을 나타내는 것을 확인하여, 서열번호 12의 HCDR2 서열을 가지는 항체를 AbS1 항체로 명명하였다.

[0064] 이와 같은 본 발명의 preS1에 결합하는 인간 항체는 기존 항체에 비하여 높은 친화도 및 낮은 면역원성을 제공하여 HBV에 대한 우수한 중화 및 감염 억제 활성을 나타낼 수 있으므로, 본 발명의 항체를 preS1에 대한 항원 인식 내지는 HBV의 중화, 감염 억제를 유용하게 사용할 수 있는 임의의 적용에 사용할 수 있다.

[0065] 본 발명의 또 하나의 양태는, 상기 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0066] 본 발명의 항체는 공지의 항체 제조기술로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일클론항체를 제조하는 방법은 면역된 동물로부터 얻은 B 림프구를 사용하여 하이브리도마를 제조함으로써 수행될 수 있거나(Koeher and Milstein, 1976, Nature, 256:495), 파지 디스플레이(phage display) 기술 등을 이용함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 그 밖에 공지의 항체 제조기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0067] 파지 디스플레이 기술을 이용한 항체 라이브러리는 하이브리도마를 제작하지 않고 바로 B 림프구로부터 항체 유전자를 얻어 파지(phage) 표면에 항체를 발현시키는 방법이다. 파지 디스플레이 기술을 이용하면 B-세포 불멸화(immortalization)에 의해 단일클론항체를 생성하는데 관련된 기존의 많은 어려움이 극복될 수 있다. 일반적으로 파지 디스플레이 기술은 1) 파지의 외피 단백질(coat protein) pⅢ (또는 pⅣ) N-말단에 해당하는 유전자 부위에 무작위 서열의 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 삽입하는 단계; 2) 천연형의 외피 단백질 일부와 상기 무작위 서열의 올리고뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 융합 단백질을 발현시키는 단계; 3) 상기 올리고뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 결합할 수 있는 물질을 처리하는 단계; 4) 상기 물질에 결합된 항체-파지 입자들을 낮은 pH나 결합 경쟁력 있는 분자를 이용하여 용출시키는 단계; 5) 패닝(panning)에 의하여 용출된 파지를 숙주 세포 내에서 증폭시키는 단계; 6) 원하는 양을 얻기 위해 상기 방법을 반복하는 단계; 및 7) 패닝에 의해 선별된 파지 클론들의 DNA 서열로부터 활성이 있는 항체의 서열을 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명의 단일클론항체의 제조방법은 파지 디스플레이 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 당업자는 공지의 파지 디스플레이 기술, 예를 들어 Barbas 등(METHODS : A Companion to Methods in Enzymology 2:119, 1991 및 J. Virol. 2001 Jul;75(14):6692-9) 및 Winter 등(Ann. Rev.Immunol. 12:433, 1994) 의 논문 등에 공지된 방법을 참고하여 상기 본 발명의 제조방법의 각 단계를 용이하게 수행할 수 있다. 항체 라이브러리를 구축하기 위해 사용될 수 있는 파지는, 예를 들어 필라멘트성 파지(filamentous phage)로 fd, M13, f1, If1, Ike, Zj/Z, Ff, Xf, Pf1 또는 Pf3 파지가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 필라멘트성 파지의 표면상에 이종 유전자의 발현을 위해 사용될 수 있는 벡터에는 예를 들어, fUSE5, fAFF1, fd-CAT1 또는 fdtetDOG 등의 파지 벡터 또는 pHEN1, pComb3, pComb8 또는 pSEX 등의 파지미드 벡터가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 증폭

을 위한 재조합 파지의 성공적인 재감염을 위해 요구되는 야생형 외피 단백질을 제공하기 위해 사용될 수 있는 헬퍼파지에는, 예를 들어 M13K07 또는 VSCM13 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명의 단일클론항체 또는 파지디스플레이 클론을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열분석될 수 있다. 그 예로, 파지 주형 DNA로부터 당해 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 디자인된 올리고뉴클레오티드프라이머를 사용할 수 있다. 일단 상기 폴리뉴클레오티드가 단리되면, 이를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 상기 발현 벡터를 적당한 숙주세포에 도입하여, 형질전환된 숙주세포(즉, 형질전환체)로부터 원하는 단일클론항체를 생산할 수 있다. 따라서 본 발명의 상기 인간 단일클론항체의 제조 방법은 인간 단일클론항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터에서 상기 인간 단일클론항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 단계를 포함하는, 인간 단일클론항체의 제조방법일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0070] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드가 포함된 발현 벡터 및 상기 벡터가 도입된 숙주세포를 제공한다.

[0071] 상기 항체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0072] 본 발명에서 제공하는 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 구체적으로는 숙주세포에서 상기 뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 그 예로 파지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스 또는 레트로바이러스벡터 등에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 형태가 될 수 있다.

[0073] 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 발현벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 발현벡터일 수 있다.

[0074] 본 발명에서 제공하는 상기 발현 벡터가 도입된 숙주세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환된 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO(중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0(마우스 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NSO(마우스 골수종), 보우스 멜라노마(Bowes melanoma) 세포, HT-1080, BHK(베이비 햄스터 신장세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6(인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[0075] 본 발명에서 용어, "도입"은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포에 전달하는 방법을 의미한다. 이와 같은 도입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포좀융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시키는 것을 의미한다. 아울러, 유전자 총 봄바드먼트(gene gun bombardment) 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에서 도입은 형질전환과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0076] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 포함하는 HBV 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물은 B형 간염의 예방 또는 치료를 위한 것일 수 있다.

[0077] 본 발명에서 용어, "B형 간염"은 HBV에 감염된 경우, 이로 인한 면역 반응으로 인하여 간에 염증이 생기는 질환을 말한다. 본 발명의 항체는 HBV에 대한 우수한 중화능 및 감염 억제능을 나타내므로, 이를 B형 간염의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.

[0078] 본 발명에서 용어, "예방"이란 상기 조성물의 투여에 의해 HBV 감염의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있으며, 상기 "치료"란 상기 조성물의 투여에 의해 HBV 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0079] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및

특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0081] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0082] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0083] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0084] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 암의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0085] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 이용하여 HBV 감염을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0086] 구체적으로, 상기 방법은 상기 항체를 HBV 감염 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0087] 상기 방법은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 HBV가 감염되거나 감염된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 HBV 감염을 예방 또는 치료하는 방법일 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0088] 상기 개체는 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 상기 조성물의 투여에 의해 HBV 감염이 치료되는 개체를 제한없이 포함한다. 이때, 상기 항체는 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 항체는 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0089] 상기 방법은 또한 B형 간염의 예방 또는 치료에 사용될 수 있으며, 구체적으로는 HBV 유전자형 A, B, C, D, E 및 F에서 선택된 어느 하나 이상의 HBV 감염 치료에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0090] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 HBV 감염의 예방 또는 치료를 위한 의약품의 제조에 사용하기 위한 용도이다. 상기 의약품은 또한 B형 간염의 예방 또는 치료에 사용될 수 있으며 HBV 유전자형 A, B, C, D, E 및 F에서 선택된 어느 하나 이상의 HBV 감염 치료에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 항체 및 HBV 감염의 예방 또는 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0091] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 이용하여 HBV 감염 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 존재하는

preS1을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계를 포함하는, HBV 감염의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[0092] 상기 방법은 HBV 감염 진단 방법일 수 있다. 또한, 상기 방법은 B형 간염의 진단을 위하여 사용될 수 있다.

[0093] 상기 항체, HBV에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0095] 상기 HBV 진단을 위한 정보의 제공방법은 본 발명의 preS1에 특이적인 항체를, HBV 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료와 반응시키고 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 preS1 단백질을 검출할 수 있으며, 이를 통해 HBV 감염의 진단을 위한 정보의 제공을 할 수 있다.

[0096] 구체적으로, (a) 상기 항체를 HBV 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 처리하여 preS1 단백질을 항원-항체 반응을 통하여 검출하는 단계; (b) 상기 (a)에서 검출된 preS1 단백질의 수준을 대조군과 비교하여, 대조군에 비하여 preS1 단백질 수준이 높으면 HBV 감염 환자로 판정하는 단계를 포함하는, 방법일 수 있다.

[0097] 본 발명에서 용어, "생물학적 시료"란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 발명의 항체와 반응시켜 preS1 단백질의 존재 또는 HBV 감염 유무를 확인할 수 있다.

[0098] 본 발명에서 용어, "항원-항체 복합체"란 시료 중의 preS1 단백질 항원과 이를 인지하는 본 발명에 따른 항체의 결합물을 의미하며, 이러한 항원-항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 군에서 선택되는 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 그러나 반드시 이들로만 제한되지 않고 다양한 응용과 적용이 가능하다.

[0099] 본 발명에서는 항원-항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용할 수 있다. 구체적인 예로는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 방사성 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있으며, 반드시 이들로만 한정되는 것은 아니다.

[0100] 검출 표지체로서 사용되는 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β-D-갈락토시다제, 호스래디쉬퍼옥시다제, β-라타마제 등을 포함하며, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+}, Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을 포함하며, 리간드로는바이오틴 유도체 등을 포함하며, 발광물로는 아크리디늄에스테르, 이소루미놀 유도체 등을 포함하며, 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등을 포함하며, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co, ^{3}H, ^{125}I, ^{125}I-볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0101] 구체적으로, 상기 검출 방법은 항원-항체 복합체를 효소면역흡착법(ELISA)을 이용한 것일 수 있다. 효소면역흡착법(ELISA)에는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 이차 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.

[0102] 상기 항체는 검출 표지를 가질 수 있으며, 검출표지를 가지지 않을 경우는 이들 단일클론 항체를 포획할 수 있고 검출 표지를 가지는 또 다른 항체를 처리하여 확인할 수 있다.

[0103] 본 발명의 또 하나의 양태는 본 발명에서 제공하는 항체를 포함하는, HBV 검출용 조성물을 제공한다. 상기 항체에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0104] 상기 HBV 검출은 HBV의 preS1 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[0105] 일 구현예로, 상기 조성물은 검사대상시료를 채취 또는 검출 시약을 적용하기 위한 도구, 항원-항체 결합을 확인하기 위한 시약 또는 장치 등 항체를 사용하여 생물학적 시료로부터 항원 단백질의 존재 유무를 확인하는 통상의 검출용 조성물에 포함되는 도구, 장치 또는 시약이 더 포함될 수 있다.

[0106] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 포함하는 HBV 검출용 키트를 제공한다. 상기 HBV 검출에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0107] 일 구현예로, 상기 키트는 또한 간염 진단 키트의 형태일 수 있다. 상기 조성물 및 B형 간염, 진단에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0108] 본 발명의 또 하나의 양태는 상기 항체를 HBV 검출을 위한 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도이다. 상기 항체 및 HBV에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0110] 본 발명의 항체는 HBV의 다양한 유전자형이 공유하는 서열을 타겟으로 하여, HBV의 다양한 유전자형에 결합할 수 있으며 HBV와의 결합능이 우수하므로, HBV 감염의 검출 및 진단 뿐만 아니라 치료가 필요한 분야에도 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0112] 도 1은 HBV preS1 N-말단 아미노산 서열을 정렬한 것이다(유전자형 A-F, HBV 유전자형 A에 따라 넘버링함). 아미노산 20번-26번은 preS1의 필수적인 수용체결합 모티프로, 회색 음영으로 표시하였다. Bio-preS1-L 펩타이드에 포함된 서열은 밑줄로 표시하였다.

도 2는 인간 Fab 합성 라이브러리로부터 항-preS1 단일클론 Fab를 분리하는 실험 결과를 나타낸 것이다. 도 2A는 각 패닝 라운드마다 파지의 인풋 및 아웃풋 역가를 나타낸 것이다. pfu는 plaque-forming unit을 나타낸다. 도 2B는 indirect ELISA에 의해 결정된 양성 다클론 파지 증폭을 나타낸 것이다. 단일클론 Fab의 분리를 위해 preS1에 대해 가장 많이 증폭된 4번째 라운드의 패닝이 선택되었다. 도 2C는 4번째 패닝의 아웃풋으로부터 골라낸 양성 Fab 클론들 중에서 바이오-preS1-L 펩타이드에 대한 항원결합활성이 가장 우수한 AbS0 Fab 파지의 indirect ELISA 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 AbS0 Fab으로부터 IgG1으로 전환 및 정제된 AbS0 mAb의 항원결합 활성을 분석한 것이다. 도 3A는 non-reducing(NR, 6%) 조건 및 reducing(R, 10%) 조건에서 정제된 AbS0의 SDS-PAGE를 나타낸다. M은 단백질 마커, HC는 중쇄, LC는 경쇄를 나타낸다. 도 3B는 HBV 유전자형(A-D)의 preS1에 대한 정제된 AbS0 mAb의 항원결합 활성을 ELISA로 평가한 것이다. 도 3C는 Octet RED384를 이용한 BLI에 의한 AbS0의 친화도 분석 결과를 나타낸 것이다. HBV 유전자형 A의 재조합 preS1은 2배수 연속 희석으로 제조되었다(25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 nM). 모든 값은 복수의 웰로부터 수득하여 평균값 ± SEM으로 표현하였다. 도 3D는 AbS0항체의 preS1에 대한 비특이적 결합 가능성을 배제하기 위하여, L1CAM을 발현하지만 preS1을 발현하지 않는 인간 난소암세포주 SKOV3에 AbS0 항체가 결합하지 않음을 FACS로 분석한 결과이다.

도 4는 HBV 유전자형 D에 대한 AbS0의 비리온 결합 활성 및 in-vitro HBV 중화 활성을 평가한 결과이다. 도 4A는 AbS0에 의한 HBV 유전자형 D 입자의 면역침강이다. HzKR127-3.2(ref: Kim JH et al. Enhanced humanization and affinity maturation of neutralizing anti-hepatitis B virus preS1 antibody based on antigen-antibody complex structure. FEBS Lett. 589:193-200)가 양성 대조군으로 사용되었으며, 마우스 IgG는 음성 대조군으로 사용되었다. RC DNA는 이완된 고리모양 DNA, DSL DNA는 이중가닥 선형 DNA를 나타낸다. 도 4B는 HBV 유전자형 D 입자들을 AbS0(10, 1, 0.1 μg) 또는 마우스 IgG(10 μg)과 프리-인큐베이션(pre-incubation)한 후 배양된 HepG2-NTCP 세포에 첨가한 다음, 2일마다 배지를 교체하였으며 감염 7일 후 세포를 수확하였다. 수확된 세포로부터 HBV DNA를 추출하여 서던 블롯 혼성화를 수행한 결과이다.

도 5는 AbS0 항체의 에피토프 매핑을 하기 위하여, GST-preS1(aa 1-56)-strep의 19-34번 아미노산의 알라닌 치환 변이체의 발현, 정제 및 SDS-PAGE를 수행한 결과이다.

도 6은 GST-preS1(aa 1-56)-strep의 19-34번 아미노산의 알라닌 치환 변이체에 대한 AbS0 항체의 결합능을 indirect ELISA로 분석한 결과이다.

도 7은 AbS0 항체의 preS1 항원에 결합하는 부위(Paratope)를 분석하기 위하여, AbS0 항체의 LCDR3(도 7A 및 7C), HCDR3(도 7B 및 7D) 각 잔기들을 알라닌으로 치환시킨 항체 변이체들의 항원결합능을 indirect ELISA (7A, 7B) 및 quantitative ELISA (7C, 7D)로 분석한 결과이다.

도 8은 AbS0 항체의 preS1 항원에 결합하는 부위(Paratope)를 분석하기 위하여, AbS0 항체의 HCDR1의 Ala33 (도 8A-C), HCDR2의 Ser50 (도 8D)을 다른 잔기들로 치환시킨 항체 변이체들의 항원결합능을 indirect ELISA로 분석한 결과이다.

도 9는 AbS1 및 AbS0 항체의 보존적(NPLGFFP; WT) 및 다른 서열(NPLGFLP; preS1-L25)의 수용체 결합 모티프를 갖는 Genotype A의 GST-preS1(aa 1-56)-strep 단백질에 대한 항원결합능을 indirect ELISA로 분석한 결과이다.

도 10은 AbS1 항체의 Genotype E, F의 GST-preS1(aa 1-56)-strep 단백질에 대한 항원결합능을 quantitative ELISA (도 10A) 및 indirect ELISA (도 10B)로 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0113] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0114] **실시예 1: preS1 항원 제조**

[0115] *Biotechnology letters.*17: 871-876(Kim HS, Hong HJ. 1995. Efficient expression, purification and characterization of hepatitis B virus preS1 protein from Escherichia coli)등에 개시된 방법을 사용하여, HBV 유전자형 C의 GST-preS1(1-119), GST-preS1(1-56), 및 preS1(1-119)를 제조하였다. 그리고 NTCP 결합 모티프(20-NPLGFFP-26)를 포함하는, 바이오틴화된 합성 preS1 펩타이드(biotin-SGSGNPLGFFPDHQLDP, Bio-preS1-L peptide)는 AnyGen, Inc(South Korea)에 제작의뢰하여 사용하였다. 이렇게 제작된 재조합 preS1 항원 및 Bio-preS1-L 펩타이드를 항체 라이브러리의 패닝을 위한 항원으로 사용하였다. 또한 발굴된 항체의 여러 HBV 유전자형의 preS1 항원에 대한 결합 여부를 분석하기 위하여 HBV 유전자형 A-F의 GST-preS1(1-56)-strep tag을 대장균에서 발현 및 정제하였다. 유전자형 A-F의 preS1(1-56)의 서열은 도 1에 나타나 있다.

[0116] **실시예 2: 파지 디스플레이된 인간 합성 Fab 라이브러리로부터 preS1의 간세포 수용체 결합부위에 특이적인 Fab의 선별**

[0117] HBV preS1의 간세포 수용체 결합부위에 특이적인 Fab를 분리하기 위해 인간 합성 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 4개의 preS1 항원에 대하여 패닝하였다.

[0118] 구체적으로, 실시예 1의 GST-preS1(1-119), GST-preS1(1-56), Bio-preS1-L 펩타이드와 preS1(1-119) 4개의 preS1 항원에 대하여 각각 1, 2, 3 및 4라운드의 표준 패닝 절차에 따라 인간 합성 Fab 라이브러리(다양성 1.35 X 10^9)의 패닝을 수행하였다. 각각의 preS1 항원을 immunotube(Bio-preS1-L 펩타이드의 경우는 streptavidin-coated plate)에 코팅하여 하룻밤 동안 4℃에 보관하였다. 항체 라이브러리 파지는 항원과 함께 인큐베이션하였으며, 결합되지 않은 파지는 0.1% PBST (PBS 내에 0.1% Tween 20)로 세척하였다. 37℃에서 30분 동안 트립신 용액 10 μg/ml를 사용하여 결합된 파지를 용출하였다. *E.coli* TG1 세포에 용출한 파지를 감염시켜 37℃에서 1시간 동안 생장시켜 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 증폭된 파지로 다음 라운드의 패닝을 수행하였으며 각 라운드마다 점차 세척 정도를 강화하였다. 각 라운드마다 파지 수의 인풋 및 아웃풋은 희석과 CFU로 계산하였다 (도 2A).

[0119] 패닝이 진행되면서 preS1 항원에 대한 항체 클론들이 증폭되었는지를 확인하기 위하여 각 라운드의 아웃풋 파지들에 대해서 indirect ELISA를 수행한 결과, 재조합 preS1 항원 및 Bio-preS1-L 펩타이드에 결합하는 Fab 클론들이 3차 패닝 후부터 증폭됨을 확인하였다(도 2B).

[0120] 따라서, preS1 항원에 가장 높은 활성을 나타내는 Fab 클론들을 선별하기 위하여, 4번째 라운드의 패닝 이후 188개의 파지 Fab 클론을 무작위로 선별하여 HBV 유전자형(A-D)의 preS1 항원에 공통적인 Bio-preS1-L 펩타이드를 사용한 indirect ELISA를 수행하였다 (도 2C).

[0121] 구체적으로, 패닝 4라운드를 수행한 후 총 188 콜로니를 무작위적으로 선별하고 각각 배양한 후 모노클로날 Fab 파지를 수득하기 위하여 헬퍼 파지로 감염시켰다. 그 후 양성 클론을 확인하기 위해 이 파지들에 indirect ELISA를 수행하였다. Indirect ELISA에서 100 ng의 BSA, Bio-PreS1-L 펩타이드를 고정항원으로 사용하였고 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-컨쥬게이트된 항-M13(1:5000 v/v, GE Healthcare)을 2차 항체로 사용하였다. Quantitative ELISA에서 항-M13 항체(100 ng/well, GE Healthcare) 및 항-인간 kappa HRP(1:2000 v/v, Novex)를 각각 고정 항체 및 2차 항체로 사용하였다.

[0122] 분석 결과, AbS0 Fab 파지가 Bio-PreS1-L 펩타이드에 가장 높은 항원 결합능 을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 실시예 1의 preS1(1-119) 항원에 대한 결합 능도 높게 나타냄을 확인하였다 (도 2C).

[0123] **실시예 3:AbS0 Fab의 인간 IgG1로의 전환 및 항원 결합능 분석**

[0124] AbS0 Fab을 인간 IgG1으로 전환하고 HEK293F 세포에서 발현시켰으며, 배양 상청액에 대해 단백질 정제를 수행하였다.

[0125] 3-1 AbS0 Fab의 인간 IgG1로의 전환

[0126] 선별된 Fab를 IgG1 형태로 전환하기 위하여, 중쇄 가변 영역(VH) 및 카파경쇄 가변 영역(VK) 서열을 PCR로 증폭한 후 재조합 PCR을 이용해 IgG 중쇄 및 경쇄 리더 서열과 각각 결합시켰다. 결과물인 VH 및 VK 서열을 인간 Cγ1 및 Cκ 유전자가 들어있는 pdCMV-*dhfr*C 발현 플라스미드의 *Eco*RI-*Apa*I 및 *Hin*dIII-*Bsi*WI 부위에 서브클로닝하여, pdCMV-*dhfr*C-AbS0 발현 플라스미드를 제작하였다.

[0127] 3-2 항체 정제

[0128] 3-1에서 제조한 발현 플라스미드를 폴리에틸렌이민(PEI; polyethyleneimine)을 이용하여 1:4의 비율(30 μg:120 μg)로 HEK293F 세포 30 mL에 도입하였다. 형질전환된 세포를 7일간 배양하였고, 배양 상청액으로 Protein A를 이용한 친화도 크로마토그래피를 수행한 후 UV-Vis Spectrophotometer를 이용하여 항체의 농도를 결정하였고, SDS-PAGE에 위하여 정제된 항체의 순도를 검증하였다(도 3A).

[0129] 3-3 결합 활성 분석

[0130] 정제된 AbS0 mAb의 여러 HBV 유전자형의 preS1 항원에 대한 항원 결합 활성을 분석하기 위해, 각 웰에 유전자형 A-D (도 1)의 GST-preS1(1-56)-strep (30 nM/well)을 코팅한 후, 연속으로 희석된 AbS0 항체와 반응시켰다. 결합된 AbS0 항체는 항-인간 IgG Fc-HRP(1:10,000 v/v, Jackson)을 2차 항체로 이용하여 검출하였다.

[0131] 그 결과, 정제된 AbS0 항체가 유전자형 A-D의 재조합 preS1에 모두 잘 결합하는 것을 확인하였다(도 3B). 이를 통해, AbS0 항체는 유전자형 A-D의 preS1 항원에 대하여 결합 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0132] 3-4 AbS0의 항원결합 친화도 분석

[0133] Octet RED384 (ForteBio)를 이용해 Bio-Layer Interferometry로 항체의 친화도를 결정하였다. 구체적으로, 0.1% PBA(PBS 내에 0.1% BSA) 내에서 96-well microtiter plate (Greiner Bio-One)를 1000 rpm으로 20분간 교반하여 anti-human Fc-coated biosensor tips (AHC, ForteBio)을 활성화시켰다. AbS0 항체(1 μg/ml, 200 μl)를 가하여 10분간 포획하고 0.1% PBA로 2분간 세척하였다. HBV 유전자형 A의 GST-preS1(1-56)-strep 항원을 0.1% PBA로 2-fold serial dilution(25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 nM)을 수행하고 팁에 결합한 항체와 각각 5분 간 assotiation step 및 10분 간 dissociation step을 수행하였다. Baseline drift에 대해 항체가 없는 러닝 버퍼에만 노출된 control sensor (antibody-captured AHC sensor) 값을 빼고 측정값을 보정하였다. 작동 온도는 30℃로 유지하였다. 데이터는 1:1 interaction model (fitting global, Rmax unlinked by sensor)를 이용하여 ForteBio data analysis software version 7.1를 사용하여 분석하였다.

[0134] 그 결과, AbS0 항체의 친화도는 0.5 nM임을 확인하였다.

표 1

[0135] Octet RED384 (ForteBio)를 이용하여 Bio-Layer Interferometry로 측정한 항체 친화도

Antibody	K_D	K_{on} (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	Full R^2
AbS0	0.50 nM	3.92×10^{5}	1.94×10^{-4}	0.9969

[0136] *K_{on}, rate of association; K_{dis}, rate of dissociation; Full R^2, estimate of the goodness of the curve fit

[0137] 3-5 AbS0 항체의 항원결합 특이성(specificity) 평가

[0138] AbS0 항체의 preS1 항원에 대한 비특이적 결합 가능성을 배제하기 위하여 L1CAM을 발현하지만 preS1을 발현하지 않는 인간 난소암세포주 SKOV3(Min, J.-K. 등, Clin. Cancer Res. 16(14):3571-80, 2010)를 이용하여 flow cytometry를 수행하였다.

[0139] 구체적으로, 배양된 SKOV3 세포(2×10^{5})에 AbS0 또는 양성 대조군으로 Ab417(L1CAM 특이 인간 항체: Cho S. et

al., MABS 8(2), 414-425, 2016)를 1 μg (in 100 μl of 0.1% PBA) 가하고 4℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 0.1% PBA로 두 번 세척하였다. 이 세포에 anti-human IgG Fc-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (1:2000 v/v, BD Pharmingen)를 가하고 4℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후, propidium iodide (1:200 v/v, Sigma)를 가하고 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 이용하여 세포를 분석하였다. 실험 결과, Ab417은 SKOV3에 결합하였지만 AbS0 항체는 SKOV3 세포에 결합하지 않았다(도 3D).

[0140] 이를 통해, AbS0 항체가 preS1 항원에 특이적으로 결합한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0141] **실시예 4: AbS0 항체의 HBV 중화 활성 평가**

[0142] 4-1 면역 침강(Immunoprecitation)분석

[0143] AbS0 항체가 HBV 비리온에 결합하는지를 확인하기 위하여 HBV 유전자형 D를 사용하여 면역 침강 분석을 수행하였다.

[0144] 기존의 HBV-중화효능을 나타내는 항-preS1 인간화항체 HzKR127-3.2를 HBV 유전자형 D의 양성 대조군으로 사용하였고, 마우스 IgG를 음성 대조군으로 사용하였다. 면역침강 후 바이러스 DNA를 추출하여 서던 블롯팅으로 측정하였다.

[0145] 구체적으로, HBV 유전자형 D의 HBV 입자 제조를 위해 HepG2 세포를 6웰 플레이트에 6 X 10^5 밀도로 뿌리고 37℃에서 배양하였다. 다음날, HepG2 세포를 pHBV1.2 (HBV 유전자형 D)로 형질주입하고 4일간 인큐베이션하였다. 배양 상청액을 수확하여 AbS0, HzKR127-3.2(양성 대조군), 또는 mouse IgG(음성 대조군) 1 μg/ml과 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션한 후, protein A bead 20 μl와 6시간 동안 4℃에서 면역침강을 수행하였다. 면역침강시킨 복합체를 PBS로 3회 세척한 후 다음과 같이 바이러스 DNA를 검출하였다. 즉, 형질주입된 플라스미드 DNA를 제거하기 위해 면역복합체에 DNase I (Sigma) 및 mung bean nuclease (Takara, Kusatsu, Shiga, Japan)를 37℃에서 20분간 처리하였다. Core-associated HBV DNA를 제조하기 위해 침강된 면역복합체에 Proteinase K(20 mg/ml, Roche)를 37℃에서 2-3시간 동안 0.5% SDS 존재하에 가하여 분해한 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1) (Sigma)를 이용하여 HBV DNA를 추출하였고 에탄올과 3M 소듐 아세테이트를 이용해 정제하였다. 정제된 DNA를 1% 아가로오스 겔에서 분리하였고 HBV DNA를 서던 블롯팅으로 검출하였다.

[0146] 그 결과, HBV DNA의 RC(relaxed circular) 및 DSL(double-stranded linear)형태가 AbS0 또는 HzKR127-3.2 항체 침강물과 함께 검출되었고, mouse IgG에 의해서는 HBV DNA가 검출되지 않았다(도 4A).

[0147] 이를 통해 AbS0 항체가 HBV 유전자형 D의 비리온에 결합할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0148] 4-2 AbS0의 HBV 중화 활성 평가

[0149] AbS0이 HBV 감염을 중화할 수 있는지 시험하기 위해, 유전자형 D의 HBV 입자들을 서로 다른 농도의 항체와 프리-인큐베이션(pre-incubation)하였고, 세포 수용체 NTCP를 과발현하는 HepG2-NTCP 세포에 첨가하였다.

[0150] 구체적으로, NTCP를 과발현하는 HepG2(HepG2-NTCP라 칭함) 세포주를 이용해 AbS0의 HBV-중화 활성을 분석하였다. HepG2-NTCP 세포를 6웰 플레이트에 6 X 10^5 밀도로 뿌려 37℃에서 배양하였다. 다음날, HepG2-NTCP 세포를 4% PEG(polyethylene glycol)와 2.5% DMSO를 포함한 PMM(primary hepatocyte maintenance medium) 배지에서 유전자형 D의 HBV 입자로 감염시켰다(세포당 바이러스 게놈 등가물~2000개).

[0151] 중화 분석을 위해 HBV 입자들을 희석된 AbS0 항체(10, 1, 0.1 μg) 또는 mouse IgG(10 μg)와 각각 1시간 동안 상온에서 각각 프리-인큐베이션한 후 배양된 HepG2-NTCP 세포에 첨가하고, 2.5% DMSO를 포함한 PMM 배지로 매일 2시간 마다 교체하며 7일간 세포들을 배양하였다. 감염된 HepG2-NTCP 세포로부터 세포내 HBV DNA를 추출하였고 서던 블롯팅을 수행하였다.

[0152] 그 결과, AbS0 항체는 용량에 비례하게 HBV 중화 효과를 나타냈지만, mouse IgG는 중화 효과를 나타내지 못함을 확인하였다(도 4B).

[0153] 이를 통해 AbS0는 HBV 감염을 중화하는 능력이 있음을 확인할 수 있었다.

[0154] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 신규 항체인 AbS0가 HBV 유전자형 A-D에 모두 결합할 수 있으며, 상기 유전자형의 바이러스를 효과적으로 중화시킬 수 있음을 시사하는 것으로, 상기 유전자형의 바이러스 감염을 예방하거나 바이러스 감염에 의한 간염 환자의 치료에 효과적임을 시사하는 것이다. 아울러, 상기 HBV 유전자형 A-D 감

염 여부 역시 특이적으로 검출할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0155] 상기 본 발명의 신규 항체 AbS0의 경쇄가변영역은 서열번호 14로, 중쇄가변영역은 서열번호 15로 표시하였다.

[0156] **실시예 5: AbS0 항체의 fine epitope 결정**

[0157] AbS0 항체의 HBV 중화효능의 기전을 이해하기 위하여, AbS0의 preS1내에서의 결합 부위(fine epitope)를 정확히 결정하고 이 fine epitope의 아미노산 서열이 HBV 마다 보존되어 있는지 분석하였다.

[0158] 5-1 PreS1(19-34)의 alanine scanning mutagenesis

[0159] AbS0 항체는 genotype C의 preS1(20-32) 펩타이드를 사용한 인간 항체 라이브러리의 패닝을 통하여 발굴한 것이므로, 이 항체가 preS1(20-32) 영역 내에 결합할 것으로 추정하여, 어떠한 잔기들이 AbS0 항체에 결합하는지를 분석하기 위하여, genotype C의 preS1(19-34)의 각 잔기를 알라닌(alanine)으로 치환시킨 변이체들을 만들고, AbS0 항체의 각 변이체에 대한 항원결합능을 분석하였다.

[0160] 구체적으로, 돌연변이 서열이 포함된 프라이머를 이용하여 재조합 PCR 방법으로 preS1(19-34)의 각 잔기를 알라닌으로 치환시킨 DNA를 합성하고 *BamHI*과 *EcoRI* (NEB) 제한효소로 절단한 후, wild type의 preS1 서열이 포함되어 있는 상기 pGST-preS1(1-56)-strep 발현 플라스미드의 *BamHI-EcoRI* 부위로 각각 subcloning 함으로써, wild type의 preS1(1-56) 대신 알라닌 치환 변이체를 갖는 발현 플라스미드를 제작하였다. 이 후, 각 변이체를 발현하기 위해 재조합 *E. coli* DH5α를 0.2 mM의 IPTG가 포함된 배지에서 18℃에서 19 시간 동안 배양하였다. 이후, sonication에 의하여 세포를 파쇄한 후 글루타티온 비드(Genscript)를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의하여 GST-preS1(1-56)-strep 단백질을 정제하고, 정제된 단백질의 순도를 12% SDS-PAGE로 확인하였다(도 5).

[0161] 5-2. preS1의 알라닌 치환 변이체에 대한 항체의 항원 결합능 분석

[0162] 각 알라닌 치환 변이체에 대한 AbS0 항체의 항원 결합능을 indirect ELISA 로 분석하였다(도 6).

[0163] 구체적으로, 각 웰에 돌연변이 된 GST-preS1(1-56)-strep 항원(200 ng)을 코팅한 후, 연속적으로 희석된 AbS0 항체와 인큐베이션하였다. 결합된 AbS0 항체는 항-인간 IgG Fc-HRP(1:10,000 v/v, Thermo)를 2차 항체로 이용하여 검출하였다.

[0164] 그 결과, L22A, G23A 또는 F25A 돌연변이체는 wild type의 preS1 항원에 비해 항체 결합 활성을 완전히 상실하는 것을 확인하였다. 이 결과는 AbS0 항체가 preS1 항원의 Leu22, Gly23 및 Phe25에 직접적으로 결합함을 의미한다.

[0165] **실시예 6: AbS0 항체의 epitope 결합 부위(paratope) 결정 및 친화도가 증가한 변이체의 확인**

[0166] AbS0 항체의 CDRs 중에서 항원과 직접적으로 결합하는 아미노산 잔기들을 찾기 위하여, CDR 잔기들을 alanine scanning mutagenesis와 위치지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 시킨 후, 이 변이체들의 항원결합능을 분석하였다.

[0167] 6-1. AbS0 항체의 HCDR3 및 LCDR3의 alanine scanning mutagenesis

[0168] AbS0 항체의 HCDR3(서열번호 15 기준 V95, I96, Y97, S99, L100) 및 LCDR3(서열번호 14 기준 S91, Y92, S93, S94, Y96)의 각 잔기를 알라닌으로 치환시킨 변이체들을 제작하기 위하여, 돌연변이 서열이 포함된 프라이머를 이용하여 VH 또는 VL 유전자를 재조합 PCR 방법을 이용하여 합성하였다. HCDR3 변이체들의 경우에는 각각 합성된 VH 유전자를 *Eco*RI과 *Apa*I 제한효소로 절단한 후에 AbS0 항체의 중쇄 유전자가 들어있는 발현벡터 (pCMV-dhfr-AbS0H)의 *Eco*RI-*Apa*I 위치에 subcloning 하였고, LCDR3 변이체의 경우에는 각각 합성된 VL 유전자를 *Hin*dIII와 *Bsi*WI 제한효소로 절단한 후에 AbS0 항체의 경쇄 유전자가 들어있는 발현벡터 (pCMV-dhfr-AbS0k)의 *Hin*dIII-*Bsi*WI 위치에 subcloning 하여, 다음과 같이 총 10개의 알라닌 치환 변이체들의 발현 플라스미드들을 제작하였다.

표 2

[0169]

L3-v1	S91A	H3-v1	V95A
L3-v2	Y92A	H3-v2	I96A
L3-v3	S93A	H3-v3	Y97A
L3-v4	S94A	H3-v4	S99A
L3-v5	Y96A	H3-v5	L100A

[0170] 각 변이체를 생산하기 위하여, 상기 제작된 발현 플라스미드를 폴리에틸렌이민(PEI; polyethyleneimine)과 1:4의 비율(30 μg:120 μg)로 혼합한 다음 HEK293F 세포에 도입하였다. 형질전환 된 세포를 7일 동안 배양하여 변이체 항체를 발현시킨 후, 배양 상청액을 획득하여 이들의 항원결합능을 indirect ELISA로 분석하였다. 구체적으로, 각 웰에 HBV 유전자형 C의 재조합 GST-preS1(1-56)-strep 항원(100 ng)을 코팅한 후, 연속으로 희석된 AbS0 항체 또는 AbS0 변이체를 결합시켰고 2차 항체로서 항-인간 IgG Fc-HRP(1:10,000 v/v, Thermo)를 가하여 반응시켰다.

[0171] Indirect ELISA에 사용된 AbS0 항체 또는 AbS0 변이체의 농도는 quantitative ELISA에 의해 결정되었다. 각 웰에 항-인간 IgG kappa 항체(100ng, Thermo)를 코팅한 뒤, 연속적으로 희석된 AbS0 항체 또는 변이체를 결합시켰고, 2차 항체로서 항-인간 IgG Fc-HRP(1:10,000 v/v, Thermo)를 가하여 반응시켰다.

[0172] 그 결과, HCDR3 변이체 L100A 및 LCDR3 변이체 Y96A는 항원 결합 활성이 없거나 매우 낮은 반면, 다른 6개 변이체들(HCDR3의 V95A, S99A; LCDR3의 S91A, Y92A, S93A, S94A)은 wild type의 AbS0과 동일한 항원결합능을 나타냈다(도 7). CDR3 변이체 I96A 및 Y97A는 발현되지 않아서 분석할 수 없었다. 이 결과로부터 AbS0의 HCDR3의 Leu100, LCDR3의 Tyr96이 항원결합에 매우 중요하게 관여함을 확인하였다.

[0173] 6-2 AbS0 항체 HCDR1 및 HCDR2의 위치 지정 돌연변이

[0174] 일반적으로 항체에서 HCDR1의 33번 아미노산과 HCDR2의 50번 아미노산은 항체 마다 달라 다양성이 높으며, 항원결합에 관여하는 것으로 알려져 있으므로, AbS0 항체의 경우 33번, 50번 잔기가 항원결합에 관여하는지를 분석하기 위하여 위치 지정 돌연변이를 수행하였다. (33번 및 50번 위치는 서열번호 15를 기준으로 기재한 위치임)

[0175] AbS0 항체의 경우 HCDR1의 33번 아미노산이 알라닌으로 되어 있어 이 잔기가 항원결합에 관여하는지를 알아보기 위하여 알라닌을 8개의 다른 잔기들(S, P, V, T, G, D, L, N)로 치환하였고, 50번 아미노산은 세린으로 되어있어 6개의 다른 잔기들(A, Y, E, F, V, P)로 치환하였다. 변이체 유전자의 제작을 위하여 degenerate primer들을 이용한 재조합 PCR을 수행하였으며, 합성된 VH 유전자를 *Eco*RI과 *Apa*I 제한효소로 절단한 후에 pdCMV-dhfr-AbS0의 *Eco*RI-*Apa*I 위치에 subcloning 하여 변이체들의 발현 플라스미드들을 얻었고, 염기서열 분석을 통하여 상기의 총 14종의 변이체를 확보하였음을 확인하였다. 각각의 발현 플라스미드를 상기 6-1에서와 같은 방법으로 HEK293F 세포에 도입하였으며, 7일 동안 배양 후 얻은 배양 상청액을 상기 6-1에서와 같이 indirect ELISA와 quantitative ELISA로 분석하였다.

[0176] 그 결과, 중쇄 HCDR1 33번 아미노산의 경우, 알라닌을 아스파라긴(A33N, 도 8A), 루신(A33L, 도 8B), 아스파르트산(A33D, 도 8C)으로 치환한 경우에는 항원결합능을 나타내지 않았고, 글리신으로 치환된 변이체(A33G, 도 8C)도 wild type AbS0 항체에 비해 항원 결합능이 크게 감소된 것으로 나타났다. 이 결과는 중쇄 HCDR1의 33번 아미노산이 항원결합에 관여하는 것을 의미한다. 반면, 3 개 변이체인 A33S(도 8A), A33V 및 A33P(도 8B)는 wild type 항체와 유사한 항원 결합능을 나타냈다.

[0177] HCDR2의 50번 세린의 변이체의 경우, S50A 변이체는 AbS0 항체에 비해 약간 증가한 항원결합능을 나타냈으며, S50Y 변이체의 항원 결합 활성은 크게 감소한 반면 S50F 및 S50E 변이체들은 항원 결합 활성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 8D). S50V 및 S50P 변이체의 경우 발현이 검출되지 않아서 항원 결합능을 분석할 수 없었다. 이 결과는 HCDR2의 50번 잔기가 항원 결합에 중요하게 작용하며, 세린 보다는 알라닌이 항원 결합에 더 최적임을 의미한다.

[0178] AbS0 항체 HCDR2의 52a번 글루타민(서열번호 11 기준으로 4번 아미노산)도 항원결합에 관여하는지를 분석해보기 위하여 글루타민을 4개의 다른 아미노산(Y, A, F, M)으로 치환한 변이체들을 제작하여 HEK293F 세포에서 일시적 발현시킨 결과, 변이체(Q52aA, A52aF, A52aM)들은 AbS0 항체와 동일한 항원 결합능을 나타내었고, Q52aY 변이체

는 발현이 검출되지 않아서 분석하지 못하였다. 이 결과로부터 HCDR2 아미노산 52a번이 preS1 항원과의 상호 작용에 관여하지 않는 것으로 추정하였다.

[0179] 상기 실시예 5 및 6의 결과들을 토대로, AbS0 항체에서 HCDR1의 Ala33, HCDR2의 Ser50, HCDR3의 Leu100, LCDR3의 Tyr96이 preS1의 Leu22, Gly23, Phe25에 직접적으로 결합함을 추정할 수 있었다. 또한, 실시예 6의 실험을 통해서 AbS0 보다 항원결합능이 더 향상된 변이체 S50A를 얻을 수 있었고, 이 변이체 항체를 'AbS1'으로 명명하였다.

[0180] **실시예 7: AbS1 항체의 항원결합 특성 분석**

[0181] 7-1 AbS1과 AbS0 항체의 genotype A및 C의 preS1 항원에 대한 결합능 비교

[0182] 상기 실시예 6-2에서 AbS0 항체 및 변이체의 항원 결합능을 분석하기 위하여 HBV 유전자형 C의 재조합 GST-preS1(1-56)-strep 항원을 사용하였으므로, AbS1 항체가 다른 유전자형의 preS1 항원에 대해서도 AbS0보다 결합능이 더 높은지를 분석하기 위하여, 유전자형 A의 재조합 GST-preS1(1-56)-strep 항원에 대해서 indirect ELISA를 수행하였다. 그 결과, AbS1은 AbS0 보다 유전자형 A의 preS1에 대해서 더 높은 항원결합능을 나타냄을 확인하였다(도 9).

[0183] 7-2 AbS1 항체의 다른 receptor-binding motif를 갖는 preS1 항원에 대한 결합능 분석

[0184] AbS1 항체의 epitope(preS1의 Leu22, Gly23, Phe25)이 HBV receptor-binding motif내에 들어있으므로, AbS1 항체가 지구상에 존재하는 HBV에 광범위하게 결합 가능한지를 추정하기 위하여, HBV database(https://hbvdb.lyon.inserm.fr/HBVdb/)에 등록되어 있는 9639개(2021년 4월 30일 현재)의 preS1 유전자들의 수용체 결합부위(aa 20-26, genotype A)의 서열들을 분석한 결과 96.6% preS1 서열들이 receptor-binding motif로서 NPLGFFP 서열을 갖고 있었고, 2.6%는 25번 위치에 페닐알라닌 대신 류신이 있는 NPLGFLP을 갖고 있었다(표 3).

표 3

[0185] HBV 유전자형 A-H내에서 NPLGFFP 또는 NPLGFLP를 갖는 receptor-binding motif의 비율

Receptor-binding motif (number)	Genotype							
	A	B	C	D	E	F	G	H
NPLGFFP (9312)	1355 (96.50%)	2751 (98.18%)	3055 (97.73%)	1453 (99.18%)	432 (96.86%)	234 (81.53%)	1 (1.28%)	31 (100%)
NPLGFLP(247)	36 (2.56%)	30 (1.07%)	38 (1.22%)	8 (0.55%)	5 (1.12%)	53 (12.47%)	77 (98.72%)	0 (0.00%)
Others(80)	13(9 D.S.*) (0.93%)	21(12 D.S.) (0.75%)	33(18 D.S.) (1.06%)	4(3 D.S.) (0.27%)	9(8 D.S.) (2.02%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Total(9639)	1404	2802	3126	1465	446	287	78	31

[0186] *different sequences

[0187] 따라서 AbS1 항체가 NPLGFLP에도 결합하는지를 분석하기 위하여 NPLGFLP 서열을 갖는 genotype A의 GST-preS1(1-56)-strep 항원을 발현 및 정제하여 indirect ELISA를 수행한 결과, AbS1 항체는 NPLGFLP에 대하여 NPLGFFP에 대한 결합능보다 약간 낮지만 잘 결합함을 확인하였다(도 9).

[0188] 위 결과들로부터, AbS1항체가 유전자형 A, C의 preS1 항원에 대하여 AbS0보다 더 높은 항원 결합능을 나타냄을 확인하였고, 두 항체 모두 NPLGFLP 서열의 간세포 수용체 결합 모티프를 갖는 HBV에도 잘 결합할 수 있음을 예측할 수 있었다.

[0189] 7-3 AbS1 항체의 genotype E, F의 preS1 항원에 대한 결합능 분석

[0190] 상기 실시예들을 통하여 AbS1 항체가 HBV 유전자형 A-D 및 변이체의 preS1 항원에 결합할 수 있음을 확인하였으므로, AbS1 항체가 유전자형 E, F의 preS1 항원에 대해서도 결합할 수 있는지를 확인하기 위하여, 유전자형 E,

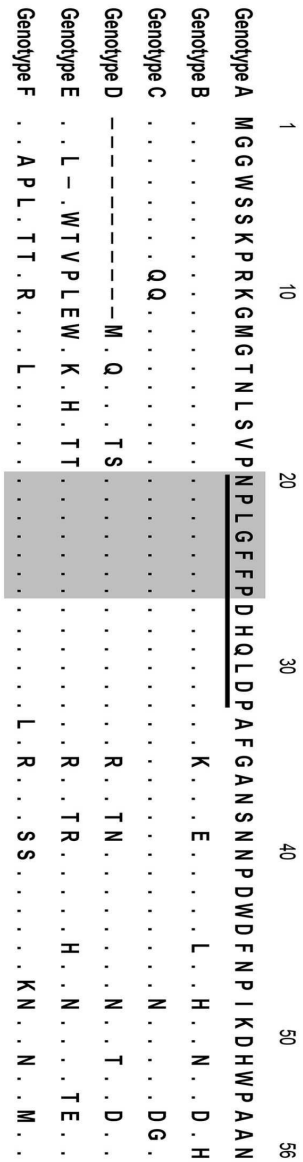
F의 재조합 GST-preS1(1-56)-strep 항원에 대해서 quantitative ELISA (도 10A) 및 indirect ELISA (도 10B)를 수행하였다. 이 때 실시예 5의 genotype C의 F25A 변이체 preS1 항원을 negative control로 사용하였다. 그 결과, AbS1은 유전자형 E, F의 preS1에 잘 결합함을 확인하였다(도 10).

[0191] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 신규 항체인 AbS0, AbS1이 HBV 유전자형 A-F에 모두 결합할 수 있으며, preS1의 간세포 수용체 결합 모티프에 결합하므로, HBV가 간세포로 들어가는 과정을 차단함으로써 HBV의 중화뿐만 아니라 HBV의 감염을 효과적으로 저해하는 HBV entry inhibitor의 작용기전을 갖는 바, HBV 감염의 예방 및 치료에도 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0192] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

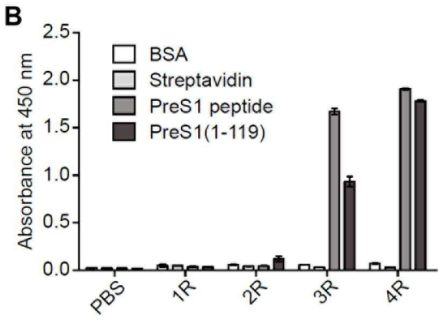
도면1

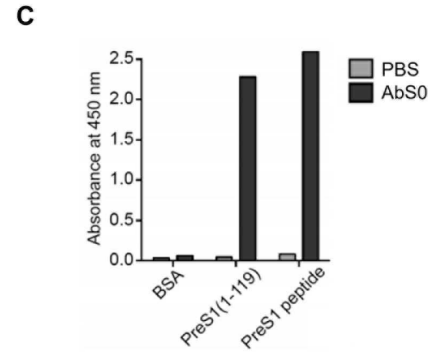


도면2

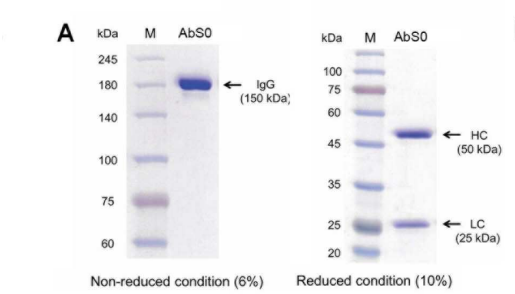
A

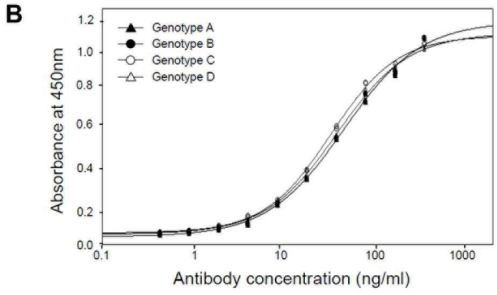
Round	Antigen	Wash	Input phage titer (pfu/ml)	Output phage titer (pfu/ml)
1R	GST-preS1 (1-119)	10	1.62×10^{14}	1.42×10^{6}
2R	GST-preS1 (1-56)	13	1.76×10^{14}	1.0×10^{6}
3R	PreS1 peptide	15	3.10×10^{13}	6.33×10^{7}
4R	PreS1 (1-119)	20	6.90×10^{13}	5.49×10^{9}

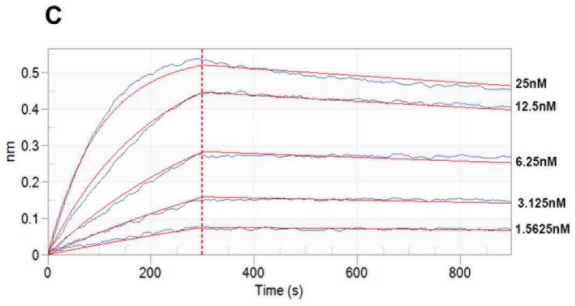


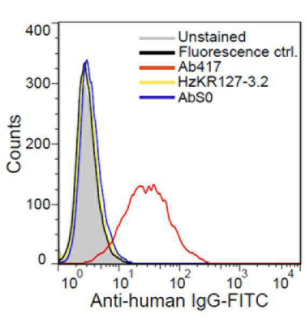


도면3

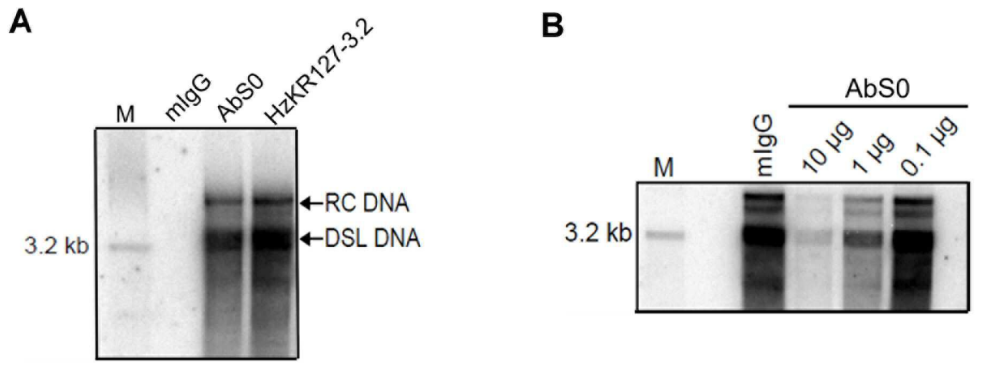




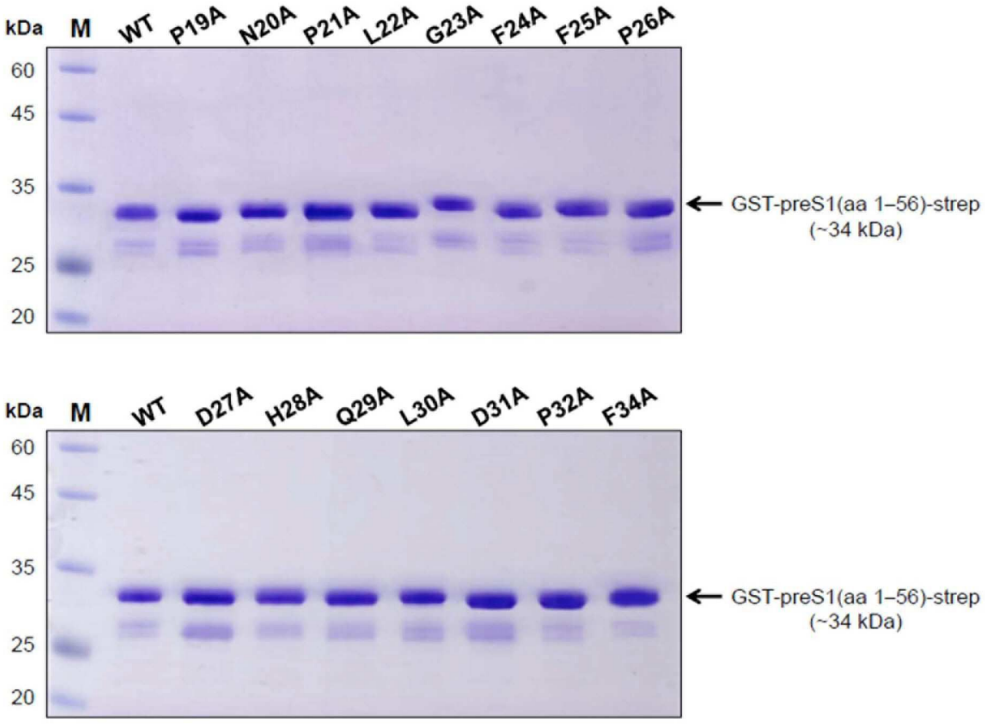




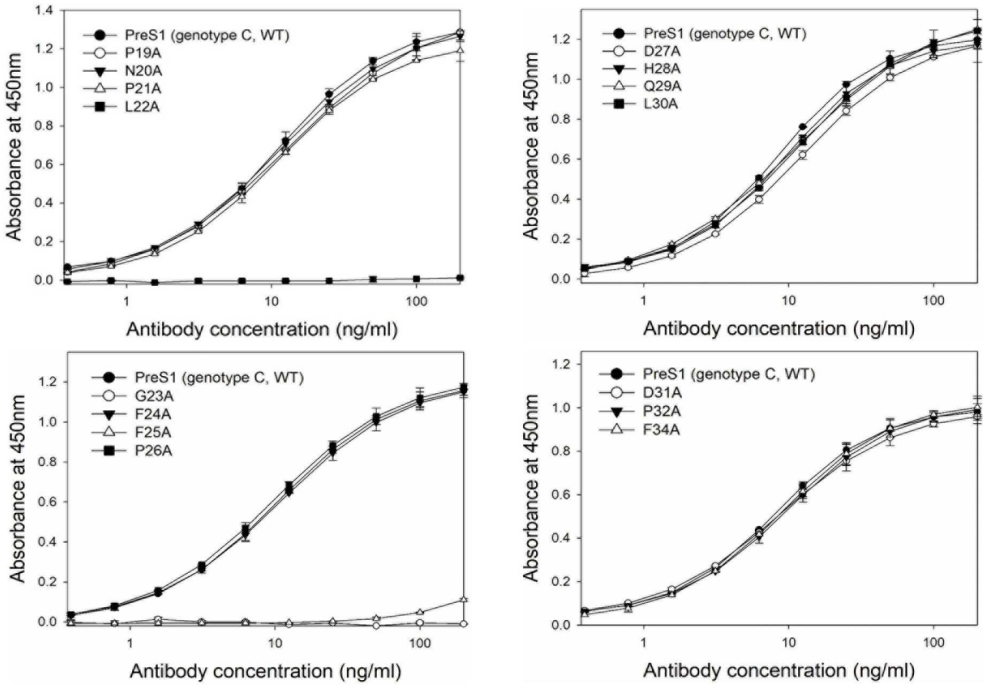
도면4


A
M
mIgG
AbS0
HzKR127-3.2
3.2 kb
RC DNA
DSL DNA
B
AbS0
M
mIgG
10 μg
1 μg
0.1 μg
3.2 kb

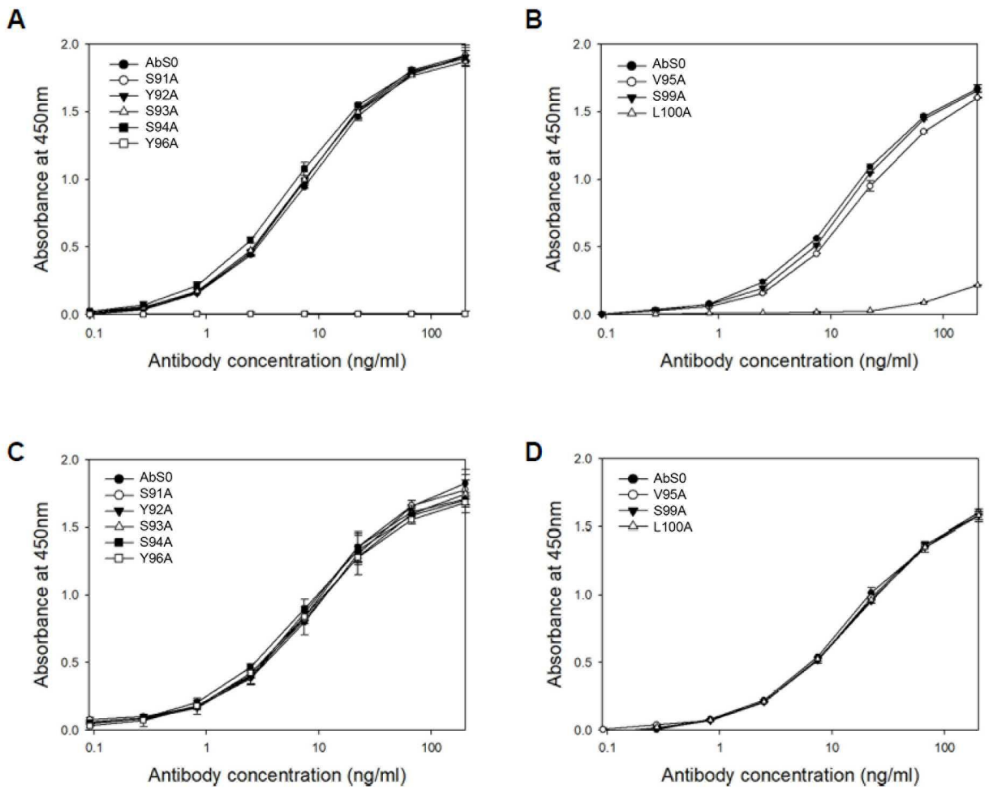
도면5


kDa
M
WT
P19A
N20A
P21A
L22A
G23A
F24A
F25A
P26A
60
45
35
25
20
GST-preS1(aa 1–56)-strep
(~34 kDa)
kDa
M
WT
D27A
H28A
Q29A
L30A
D31A
P32A
F34A
60
45
35
25
20
GST-preS1(aa 1–56)-strep
(~34 kDa)

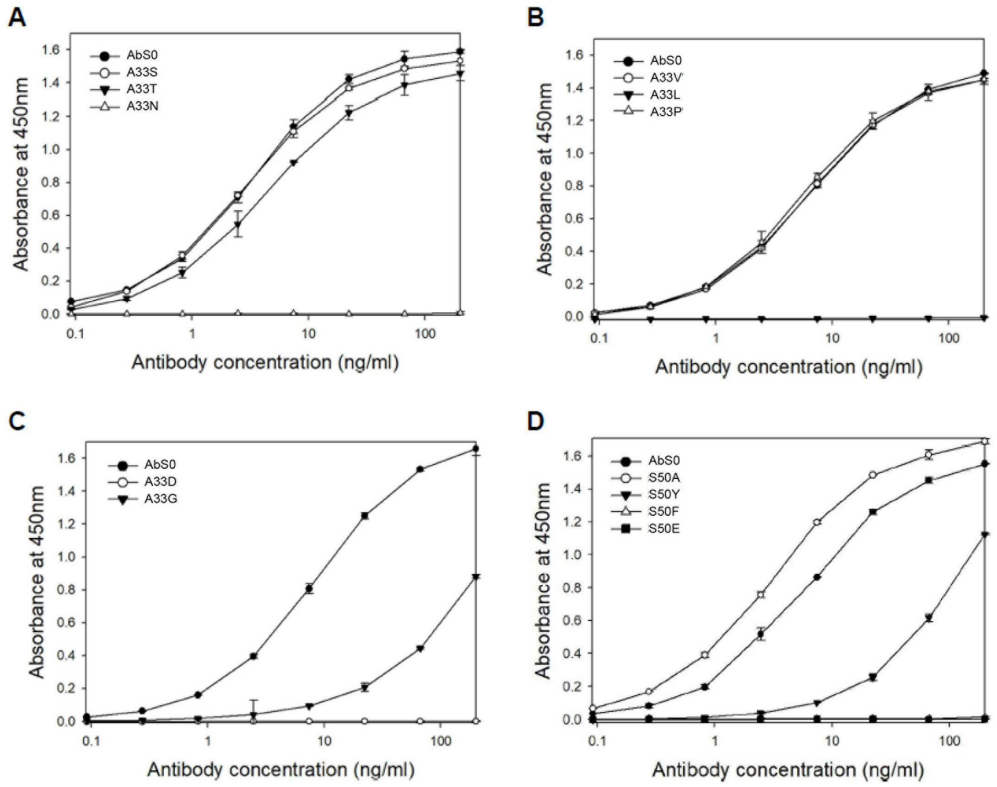
도면6


PreS1 (genotype C, WT)
P19A
N20A
P21A
L22A
PreS1 (genotype C, WT)
D27A
H28A
Q29A
L30A
PreS1 (genotype C, WT)
G23A
F24A
F25A
P26A
PreS1 (genotype C, WT)
D31A
P32A
F34A
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)

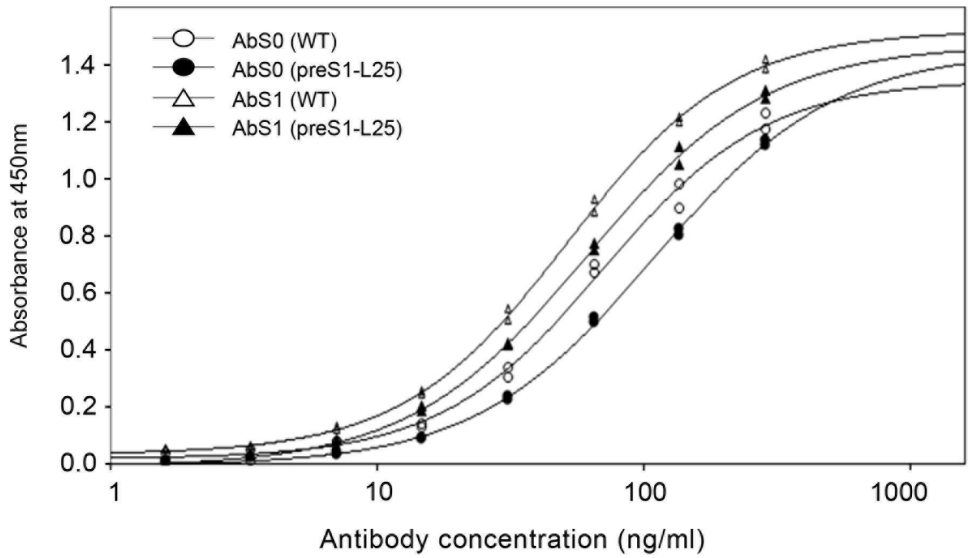
도면7


A
B
C
D
AbS0
S91A
Y92A
S93A
S94A
Y96A
AbS0
V95A
S99A
L100A
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)

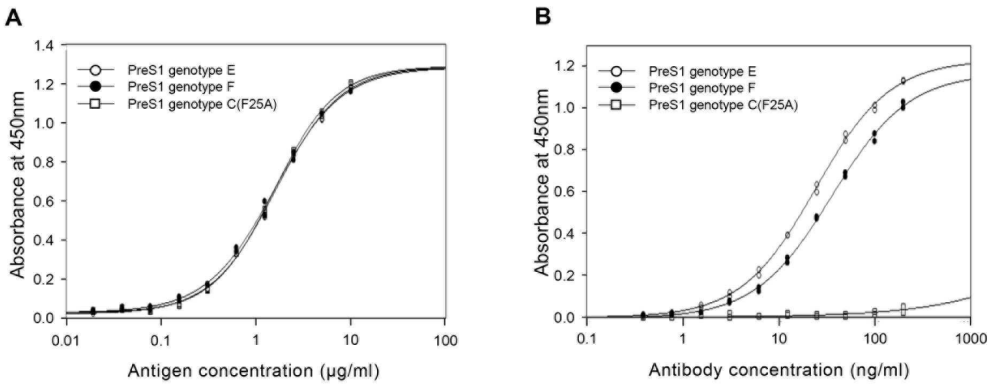
도면8


A
AbS0
A33S
A33T
A33N
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)
B
AbS0
A33V
A33L
A33P
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)
C
AbS0
A33D
A33G
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)
D
AbS0
S50A
S50Y
S50F
S50E
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)

도면9


AbS0 (WT)
AbS0 (preS1-L25)
AbS1 (WT)
AbS1 (preS1-L25)
Absorbance at 450nm
Antibody concentration (ng/ml)

도면10



서 열 목 록

<110> APITBIO, Inc.

<120> A human antibody against the receptor- binding motif on the preS1 of hepatitis B Virus and an use thereof

<130> KPA210579-KR-P1

<150> KR 10-2021-0077615

<151> 2021-06-15

<150> KR 10-2021-0093625

<151> 2021-07-16

<160> 19

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(34)

<223> LCDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(56)

<223> LCDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> LCDR3, X can be any amino acid

<400> 1

Asp Ile Gln 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 Ser Ile Ala Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213
> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> HCDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (33)

<223> X can be any amino acid (preferably S, P, V or A)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> HCDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)

<223> X is Ser or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (53)

<223> X can be any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(106)

<223> HCDR3, X can be any amino acid

<400> 2

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Lys Val Ile Tyr Ala Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 (LCDR1)

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ala Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 (LCDR2)

<400> 4

Ala Thr Ser Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 (LCDR3)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(6)

<223> X can be any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)

<223> paratope

<400> 5

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Tyr Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X can be any amino acid (preferably S, P, V or A)

<400> 7

Thr Tyr Xaa Met Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> X is Ser or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> paratope

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X can be any amino acid

<400> 8

Xaa Ile Ser Xaa Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> X can be any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X can be any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)

<223> paratope

<400> 9

Xaa Ile Tyr Ala Xaa Leu Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 10

Thr Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2_AbS0

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> paratope

<400> 11

Ala Ile Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2_AbS1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> paratope

<400> 12

Ser Ile Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 13

Val Ile Tyr Ala Ser Leu Asp Tyr
1 5

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 14

Asp Ile Gln 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 Ser Ile Ala Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 15
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain_AbS0
<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Ile Tyr Ala Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain_AbS1
<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Ile Tyr Ala Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> preS1_epitope 1
<400> 17
Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro
1 5
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> preS1_epitope 2
<400> 18
Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro
1 5
<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> preS1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(26)

<223> receptor binding motif

<400> 19

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
1 5 10 15

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Asp Gly Asn Gln Val Gly Val Gly Ala Phe Gly
50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser
85 90 95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
100 105 110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala
115