(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 39/29

(45) 공고일자 1999년07월15일
(11) 등록번호 10-0208129
(24) 등록일자 1999년04월14일

(21) 출원번호 10-1992-0702341
(22) 출원일자 1992년09월28일
(65) 공개번호 특1993-0700143
(43) 공개일자 1993년03월13일
(86) 국제출원번호 PCT/GB 91/00444
(86) 국제출원일자 1991년03월25일
(87) 국제공개번호 WO 91/14703
(87) 국제공개일자 1991년10월03일
(81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴
국내특허 : 오스트레일리아 일본 대한민국 미국
(30) 우선권주장 9007024.4 1990년03월29일 영국(GB)
(73) 특허권자 임페리얼 칼리지 오브 사이언스, 테크놀로지 메디신 데이비드 브라인모어 토마스
영국 런던 에스더블유7 2에이지 임페리얼 칼리지 셔필드 빌딩
(72) 발명자 토마스 하워드 크리스토퍼
영국 런던 더블유2 1피지 세인트 메리스 호스피톨 메디칼 스쿨 퀸 엘리자베스 더 퀸 마더 윙 더 디파트
카맨 윌리암 프레드릭
영국 글래스고우 지엘1 5제이알 쳐치 스트리트 더 인스티튜트 오브 바이롤로지
(74) 대리인 박경재

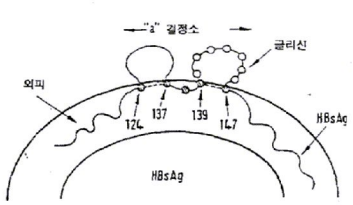
심사관 : 류종훈

(54) B형 간염 백신

요약

본원은 변이 HBsAg 단백질 또는 B형 간염 바이러스 표면 항원의 항원성을 나타내는 그의단편을 기술한다. 이러한 변이 단백질 또는 이의 단편은 HBsAg 서열(vHBsAg)의 위치 145에서 글리신 이외의 다른 아미노산이 존재하는 변형된 a 결정소를 함유한다. 또한, 본원은 vHBsAg를 함유한 백신, 항-vHBsAg 항체의 시험관내 진단검색용키트, 및 항-vHBsAg 항체를 함유한 항체제제를 제공한다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

B형 간염백신

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 B형 간염 바이러스 항원의 특이성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 DNA 분자에 관한 것이다.

더욱 특히, 본 발명은 인체내에서 B형 바이러스 변이주에 대한 항체의 생성을 자극하기위한 백선 조성물에 관한 것이다.

B형 간염 바이러스(HBV)에 의한 감염은 널리퍼져있는 심각한 문제이기는 하나, 많은 사람을 면역화하는데 사용할 수 있는 백신이 오늘날 용이하게 이용되고 있다. 그러한 예로서 유전공학 기술에 의해 수득된 생성물 Engerix-B(Smithkline Beecham p.l.c.)를 들 수 있다.

상이한 혈청형의 B형 간염 비리온의 게놈의 클로닝은 본 분야에 널리 알려져 있다[참조문헌 ; Miller et al., Hepatology, 9(1989) page 322 및 인용문헌]. B형 간염 비리온이며 감염환자로부터 분리 가능한 데인입자는 그 직경이 약 42mm이다. 각입자는 B형간염 표면항원(HBsAg)를 함유한 외피, 캡시드(HBcAg), 내인성 폴리머라제 및 DNA 게놈으로 구성되어 있다. 제3 폴리펩타이드인 e 항원(HBeAg)가 B형간염 바이러스에 의해 만들어지며 혈청중에서 용해된 형태로 발견된다.

HBV에 대한 시판백신은 천연형태 또는 재조합 형태의 B형 간염 바이러스 항원(HBsAg)을 함유한다. 진성 B형 간염 바이러스 표면 항원은, 감영자의 혈장으로부터, P24 및 이의 당화유도체 GP28로서 알려진 두개의 단백질(이들 모두는 S단백질 암호화 서열 또는 HBV S-유전자로서 알려진 HBV 게놈상의 226개 아미노산 암호화 서열에 의해 암호화 되어 있다)로 구성된 약 22nm의 입자로서 분리할 수 있다 [참조문헌 ; Tiollais et al, Nature, 317(1985), page 489 및 인용문헌]. HBsAg의 완전한 아미노산 서열 및 이를 암호화한 뉴클레오타이드 서열은 문헌 [Valenzuela et al., Nature, 280(1979), page 815]에 제시되어 있다. 본원 명세서에서는 Tiollais et al.(인용문헌중)의 번호지정 시스템을 이용하여 뉴클레오타이드 및 아미노산의 위치를 지정한다.

HBV S-유전자 암호서열을 발현 벡터상의 효모프로모터 조절하에 삽입시켜 삭카로마이세스 세레비지애에서 HBsAg을 발현하여 백신을 생산할 수 있음이 문헌[Harford et al., in Develop. Biol. Stander. 54 : Page 125 (1983), Valenzuela et al., Nature 298, page 347 (1982) 및 Bitter et al., J. Med. Virol. 25, page 123(1988)]에서 기술되었다. 피키아 파스토리스(Pichia Pastoris)에서의 발현이, 또한, 문헌[Gregg et al., Biotechnology, 5 (1587), page 479 (또는 유럽특허원 공보 제0226846호)]에 기술되어 있으며 이 문헌은 이외에도 한세눌라 폴리모파(Hansenula polymorpha)를 기술하고 있다(참조 ; 유럽특허원 제0 299 108호).

백신 또한 유럽특허원 공보 제0 278 940호에 기술된 바와 같이 HBsAg 단백질을 함유하는 하이브리드 면역원성 입자로 부터 제조할 수 있다.

이러한 입자는, 예를들면, HBV 게놈상에서 HBV-S 유전자 바로앞에 위치한 암호서열(이하 Pre S 암호서열이라한다)에 의해 암호화된 HBsAg 전구체 단백질의 전부-또는 일부 (또는 일부분들)을 함유할 수 있다. 정상적으로, Pre S 암호서열은 163개 아미노산을 암호화하며(ay HBV 아형의 경우), Pre S1 암호서열과 Pre S2 암호서열을 포함한다. Pre S2 암호서열은 55개 아미노산을 암호화하며 S단백질 암호서열 바로앞에 인접해 있다(참조 ; 유럽특허원 제0 278 940호).

HBV의 항원성 아형은 혈청학적으로 분류되며 HBsAg의 암호화 게놈의 영역에서 염기 한개의 변화에 기인하는 것으로 제시되어 왔다(Okamoto et al., J. Virol., 1987, 74, 5463-5467). 그러나, 모든 공지의 항원성 아형은 HBsAg의 아미노산 124 내지 147로 구성된 a 결정소를 함유한다. a 결정소에 대한 항체는 모든 아형에 대한 보호를 제공한다. 시험관내 돌연변이 유도에 의해 위치 147의 시스테인 및 위치 142의 프롤린이 a 결정소의 완전한 면역원성을 나타내는데 중요하게 작용하는 것으로 제시되었다(Ashton et al., J. Med. Virol., 1989, 29, page 196).

지난 10년간 B형 간염 바이러스(HBV)의 몇몇 변이체가 공개되어 왔다.

Mc Mahon 등은 HBsAg의 추정되는 모노클로날 항체 결합 도메인에서 글리신이 아르기닌으로 치환된 것이(DNA 서열분석에 의해 추정됨) 항-HBsAg 모노클로날 항체로 처리된 간이식 환자의 체내에서 발견되었다고 보고하였다(Cold Spring Harbor Symposium on the Molecular Biology of Hepatitis B viruses, September, 1989). 그러나, 이러한 결과는 변이 HBsAg 아미노산 서열을 합성하거나 이를 기초로한 백신 조성물을 개발할 수 있는 어떠한 동기도 제공하지 못하고있다.

다른 보고서에 따르면, 어린이 및 성인에게서 순환하는 B형 간염 표면 항원이 발견되었으며 이는 두종의 허가된 B형 간염 백신중 하나로 면역접종 받은후 특정항체(항-HBs)의 존재에도 불구하고 바이러스 성 복재가 일어남을 시사한다(Zanetti et al. Lancet, November 1988, page 1132). 모노클로날항체로 HBsAg를 분석한 결과 순환하는 항원은 a 결정소를 보유하지 않거나 이 결정소가 가장된 것으로 밝혀졌다. 결국, B형 간염 바이러스의 변이체의 출현이 감염의 풍도지역에서의 면역화와 연관된 역학결핍에 기인되는 것으로 검색되었다. 그렇지만, 그 변이체는 더이상 성상확인되지 않았다.

Zanetti 등의 연구로부터, 현재 이용되고 있는 B형 간염 백신은 적어도 소인 면역원 인자를 보유한 숙주내에서 회피돌연변이체, 즉 중화 면역으로부터 돌연변이된 복제성 감염 바이러스의 출현을 야기할 수 있는 잠재적 단점을 지니고 있음이 자명하다. 이러한 변이 바이러스는 명백하게 병인유발 능력을 보유하며 전파가능한 것으로 예상된다. 그러므로, 돌연변이 바이러스는 정상적인 HBsAg을 기본으로된 백신에 의해 생성된 항체에 의해 효과적으로 중화되지 않기때문에 심각한 면역화 문제를 야기시킬 수 있다.

본 발명은 공지된 HBV 백신과 연관된 상기의 단점을 극복하거나 적어도 최소화한다.

본 발명에 따라, HBsAg 서열의 위치 145에서 글리신이 아닌 다른 아미노산으로 변형된 a 결정소를 함유함을 특징으로하여 HBV 표면 항원의 항원성을 나타내는 HBsAg 단백질 또는 이의 단편이 제공된다.

변이체 HBsAg는 또한 필요한 경우 Pre S 서열도 포함할 수 있음이 이해되어야 한다.

본 발명에 따른 변이체 HBsAg 단백질 또는 이의 단편은 이하에서 vHBsAg로 나타낸다.

vHBsAg는 천연 형태가 아닌 혈액산물이 없는 합성 또는 고도의 정제된 물질이다.

바람직하게는 본 발명의 vHBsAg는 전체길이의 HBsAg에 상응하며 위치 145에서 변경된 아미노산 잔기를 제외하고 정상적인 HBsAg와 동일하다.

바람직하게는 vHBsAg는 고도의 정제된 형태이며, 예를들면 순도가 75% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장바람직하게는 95-100% 이다.

본 발명의 다른 양태로서 면역보호량의 vHBsAg를 적합한 담체와 함께 함유하는 백신조성물이 제공된다.

본 발명의 또다른 양태는 이하에서 기술된다.

본 발명의 vHBsAg 및 백신은 바이러스성 HBsAg의 a 결정소가 변형된 상기 일탈돌연변이체의 출현에 의해 인지된 문제점들을 극복하는데 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 백신은 HBsAg 아미노산 서열에서 위치 145에서 글리신이 아닌 다른 아미노산으로 변형된 a 결정소를 갖는 것으로 상기된 변이체 HBV에 대하여 보호하고 그의 출현 또는 전파를 방지할 수 있는 잇점을 지닌다.

따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 백신의 안전유효량을 인체에 투여함을 특징으로하여 상기 변이체 HBV에 의한 감염과 연관된 질환증세에 대하여 사람을 보호하는 방법을 제공한다.

다른 양태로서 본 발명은 치료요법, 특히 예방에 사용하기 위한 vHBsAg를 제공한다.

본 발명은, 또한, 상기한 변이체 HBV 감염과 연관된 질환증세에 대하여 사람을 보호하기 위한 백신조성물을 제조함에 있어서의 vHBsAg의 용도를 제공한다.

현 돌연변이 HBV 바이러스에 대하여 사람을 면역화 하기위해 사용될때 백신내의 vHBsAg 서열은 돌연변이 HBV 바이러스 내의 vHBsAg 서열과 정상적으로 대응하거나 항원적으로 균등하다.

바람직하게는 본 발명의 vHBsAg에서 위치 145에서의 아미노산은 정상적인 HBsAg에서 위치 145에서의 글리신을 암호화하는 GGA 코돈의 점돌연변이에 의해 유도할 수 있다.

본 발명의 바람직한 양태로서, 정상적인 HBsAg의 위치 145에서의 글리신 잔기는 보다 더 침수성인 아미노산으로 치환한다. 왜냐하면 이에따라 증강된 면역원성이 얻을 수 있기 때문이다.

본 발명의 특히 바람직한 양태로서, HBsAg의 a 결정소에서 위치 145에서의 변형은 하기하는 바와 같이 임상적으로 분리된 HBV 변이체에서 유도된 것으로 제시되어 왔기 때문에 글리신이 아르기닌으로 치환된 것이다.

[도면의 간단한 설명]

본 발명을 더욱 명료하게 기술하기위하여 하기도면이 제시된다 :

제1도는 a 결정소의 두개 루프 및 위치 145에서의 글리신 잔기를 가리키는 정상적인 HBsAg 아미노산 서열의 일부분의 개략도이다.

제2도는 PCR 및 서열분석을 위해 사용된 프라이머 결합부위, 및 정상서열에서 위치 587의 G가 A로 점돌연변이된 587-589 위치에서 발견된 AGA 코돈을 가리키는 임상적으로 분리된 변이체 HBsAg의 뉴클레오타이드 서열의 개략도이다.

제3도는 폴리머라제쇄반응(PCR)을 위한 올리고뉴클레오타이드 결합부위를 나타낸 플라스미드 pRIT10601 또는 pRIT13438 상의 S-유전자의 도식이다.

제4도는 플라스미드 pRIT13438를 도시한 것이다.

제5도는 플라스미드 pNN2deltaEco RI을 도시한 것이다.

제6도는 플라스미드 pRIT12775를 도시한 것이다.

폴리링커 1은 다음과 같다 : 0.01/Bgl II.Cla I.Hind III.BamH I.Ava I.Sma I.Ava I.Xho I.Sal I.

본 발명의 또다른 양태로서, vHBsAg 및 이로부터 수득된 백신조성물의 제조방법이 제공된다.

바람직하게는 vHBsAg는 펩타이드 합성법에 의해서거나 보다 바람직하게는 재조합 DNA 기술에 의해 합성적으로 수득한다.

DNA 재조합분자 및 서열의 작제, 조작 및 동정방법은 본 분야에 널리 알려져있다. 본 발명의 vHBsAg를 수득하기 위해 HBsAg의 정상적인 HBV S단백질(제1도)의 위치 145에서 글리신을 다른 아미노산으로 변이시키려면 S-유전자 뉴클레오타이드 서열의 위치 433-435 코돈 GGA를 필요한 아미노산을 암호화하는 다른 코돈으로 대체시켜야한다.

특별한 양태로서, GGA 코돈을 아르기닌을 암호화하는 모든 삼중자 CGA, CGC, CGG, CGT 또는 AGG로 치환하는 것이 바람직하며 특히 바람직한것은 AGA로 치환하는 것이다.

서열을 적절히 치환시키는데 몇가지 방법이 이용되고 있다. 한가지 적합한 방법은 포스파이트 또는 포르포아미다이트 화학에 의한, 바이러스 또는 효모 코돈 빈도를 이용한 목적하는 암호서열의 완전한 반복합성법이다.

DNA의 합성은 몇몇 회사로부터 상품으로 이용가능하다. 이러한 유전자 합성의 예로서 본원의 참조문헌으로 인용되는 Hayden and Mandecki, DNA7 : p571 (1988)에 기술된 것을 들 수 있다.

두번째 방법은 HBV 게놈을 함유한 벡터로부터의 적절한 제한단편을 단일 가닥 벡터상에 클로닝시키고 문헌[Botstein and Shortle, Science, 229, p.1153(1982)]에 기술된 바와 같이 부위 특이적 시험관내 돌연변이유도를 수행하는 것이다. pBR322 상에 클로닝된 ay 아형의 HBV 게놈을 함유한 제조합플라스미드 pRIT10601를 포함한 이. 콜라이 K12 균주 C600의 배양물이 부다페스트 협약하에 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 1982년 6월 2일자로 수탁번호 제ATCC 39132호로서 기탁되어있다. 226개 아미노산 HBsAg 단백질을 규정하는 S-유전자의 암호서열 또는 Pre S 폴리펩타이드의 암호화서열을 상기 클론으로부터 표준 DNA 재조합기술에 의해 절단할 수 있다.

한가지 적절한 제한 단편은 pRIT10601의 S-유전자 암호영역 내로부터의 575bp Xba I-Acc I 단편이다. 시

험관내 돌연변이 유도에 유용한 벡터시스템이 시판중에 있다. 이에따라 수득된 돌연변이 유전자 단편을 S-유전자 내로 재삽입시킨다.

세번째 방법은 문헌[Ho et al., Gene, 77 : p51 (1989)]에 기술된 바와같이 폴리머라제 쇄 반응(PCR) 기술을 이용하여 목적하는 돌연변이를 일으키는 것이다.

각각의 경우에, vHBsAg 암호서열은 적합한 프로모터의 조절하에 어떠한 적합한 숙주중에서도 발현될 수 있다.

VHBsAg의 암호화 DNA 서열을 함유하는 발현 벡터는 신규하며 본 발명의 또다른 양태를 형성한다. 이러한 발현 벡터를 형질전환된 숙주는 본 발명의 추가의 양태를 형성한다.

바람직한 양태로서, 숙주는 삭카로마이세스 세레비지애, 파키아 파스토리스 또는 한세눌라 폴리모파를 사용할 수 있으며 발현은 효모프로모터[예, 효모 TDH3 프로모터(글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제 유전자 ; Valenguela et al., 1982 및 Biller et al., 1988 참조) 또는 PH05(Miyanohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, p.1, 1983), MOX, FMDH(유럽특허원 제0299108호 참조) 및 AOX(유럽특허원 제0 226 846호 참조)]의 조절하에 이루어진다.

형질전환된 숙주는 통상의 수단에 의해 배양하거나 발효시키고 vHBsAg를 추출하고 정제할 수 있다. 효모 세포로부터 HBsAg의 정제는 본 분야에 잘 알려져 있으며 미합중국 특허 제4,649,192호, 제4,683,294호, 제4,694,074호 또는 제4,738,926호중 어느것에따라 수행할 수 있다. 본 발명에 따른 vHBsAg의 정제는 유사한 방법에 따라 수행한다.

vHBsAg를 함유하는 백신은 통상의 기술에의해 제조하며 바람직하게는 완충된 생리염수중에, 및 수산화알루미늄 및 인산 알루미늄을 포함한 여러가지의 공지된 부형제와 혼합되거나 혼입된 면역보호량의 vHBsAg를 함유한다. 면역보호란 심각한 부작용없이 감염균에 대하여 보호를 제공하기에 충분한 보호항체 또는 세포중재된 면역반응을 유발시키는데 투여되는 충분한 vHBsAg를 의미한다. vHBsAg의 투여량은 백신이 보조제와 함께 사용되는지의 여부에의해 결정되며 일반적으로는 단백질 1 내지 1000mcg, 예를들면 단백질 1 내지 200mcg, 더욱 바람직하게는 단백질 5 내지 40mcg을 함유한다. 투여량 및 투여수는 환자의 항체 역가 및 기타반응을 관찰하여 얻은 표준용량범위로 결정할 수 있다.

vHBsAg는, 또한 정상적인 HBsAg 또는 PreS1 또는 PreS2 폴리펩타이드의 전부 또는 일부(분들)을 함유하는 균질 또는 복합 HBsAg 입자와 같이 다른 HBsAg와 백신제형을 위해 혼합할 수 있다. 또한, 다른 유기체로부터의 단백질의 에피토프를 함유하는 하이브리드 HBsAg 입자 및 다른 면역원과 혼합하여 이가 또는 다가 백신을 형성할 수 있다. 백신 제조는 백신(Voller et al., University Park Press, Baltimore, MD, U.S.A., 1978)에 일반적으로 기술되어있다.

vHBsAg는 변이 HBV 바이러스 감염등을 위한 검색키트에 면역학적 시약으로서 유용하다. 또한, 공지의 방법으로 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 유도하는데 사용할 수 있다(모노클로날 항체중 일부는 변이항원에대해 특이적일 수 있으며 정상적인 HBsAg는 인지하지 못한다).

따라서, 본 발명의 다른 양태로서 (a) 상기 정의된 vHBsAg 및(b) 항원-항체반응을 검색하기위해 응용된 수단을 함유함을 특징으로 하여, 생물학적 매개물중에 존재하는 항 vHBsAg 항체의 시험관내 진단 검색을 위한 키트, 특히 면역화후의 중화항체를 위한 키트가 제공된다.

또다른 양태로서, 본 발명은 인체내의 B형간염 감염을 방지하거나 치료하는데 사용하기위한 항-vHBsAg 항체를 함유하는 항체제제를 제공한다. 또한, B형간염 감염을 방지하거나 치료하는 항-vHBsAg 항체 유효량으로 사람을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 상세히 설명될 것이다.

[실시예 1]

[변이 B형간염 바이러스(일탈 돌연변이체)의 동정]

(a) 방법

(i) HBV 백신으로의 면역화

HBV 백신의 많은시도가 1982년 이태리에서 시작되었다. 몇몇 센터가 참여하였으며, 이중하나는 나폴리소재의 D. Cotugno 병원 감염질환 제4분과(the Fourth Division of Infectious Diseases)이며 1590명의 대상자가 시험되었다. 이들 환자들의 대부분의 출신지는 Campania로서 HBsAg의 전파율이 5% 이었다. 대부분의 환자는 HB-VAX(Merck Sharp and Dohme) 또는 HEVAC-B(Pasteur)(들다 혈장-유도된 백신이다)로 접종된 남부이태리의 두지방출신의 HBsAg 양성보유자의 유아들이다. HB-VAX는 성인의 경우 20㎍용량(유아의 경우 10㎍)으로 0, 1 및 6개월의 간격으로 접종하였고 HEVAC-B는 5㎍용량으로 0, 1, 2 및 14개월의 간격으로 접종하였다. 영아, 또한, 출생시 및 생후 1개월에 Chon 에탄올 분별과정에 의해 제조된 B형간염과 면역 글로불린(HBIg)(Biagini) 0.5ml 이 접종되었다. 보균자와 가족집단으로 수많이 접촉된 성인 및 어린이 모두 또한 접종되었다.

(ii) 간염 마커

혈액샘플을 시판되고 있는 키트(Abbott Laboratories)를 이용하여 HBsAg, HBeAg, 항-HBe, 항-HBs 및 항-HBc에 대해 시험하였다. 항-HBs를 정량판넬(Abbott Laboratories)로 얻은 표준곡선과 비교하여 측정하였다. HBsAg 양성여부를 재시험 및 HBsAg 검정기(Abbott Laboratories)를 이용한 중화반응으로 확인하였다. HBsAg 중화반응은 거의 항-α 만을 함유한 혈청을 이용하여 수행하였다. 바이러스 복제의 마커를 갖는 환자로부터의 혈청이 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 수중에 대해 시험하였다.

(iii) HBsAg 및 항-HBs 아형분류

HBsAg 아형분류는 보균자 접촉하는 5명의 감염된 유아 및 5명의 감염된 어린이, 가족집단 접촉하는 감염된 성인 8명중 6명, AS, AA 및 AE 케이스 뿐만아니라 두 성인케이스에 대하여 수행하였다. 아형분류를 위해, 항-a, 항-d 또는 항-y로 피복된 비드(Sorin Biomedica)를 실온에서 밤새 혈청과 배양하였다. 증류수로 세척한 후, 13.2 ㎕Ci ^{125}I 양 항-HBs를 가하고, 45℃에서 1시간동안 방치한후 세척하고 섬광계수기로 정량분석하였다. 고체상에서 항-a 또는 항-y를 사용하여 수득된 개수가 음성 대조군의 평균치(7명의 건강한 HBV 음성 대상자)의 2.1배를 초과하고 항-d 비드로 수득된 계수가 안전치보다 낮을경우 샘플은 ay로 고려되었다. 만일 계수가 고체상에서 항-y에 부가되었을때 안전치보다 높지만 항-a 또는 항-d 고체상에 부가되었을때 안전치보다 낮은경우 샘플은 단지 y반응성을 갖는것으로 고려되었다.

반응성의 특이성은 모노클로날 항체(Sorin Biomedica)로 중화시켜 확인되었다. HBsAg 양성혈청을 아형분류에앞서 모노특이성 항-a, 항-d 또는 항-y 항체와 혼합하였다. 참조 HBsAg-함유혈청을 대조군으로서 사용하였다.

항-HBs 아형분류는 고체상의 한 아형의 재조합 HBsAg(rHBsAg) 및 탐침으로서 다른아형의 방사성요오드화된 것을 사용하는 샌드위치 RIA를 이용하여 AS, AA 및 두명의 성인사례에 대하여 수행하였다. 폴리스티렌비드를 ad 또는 ay rHBsAg로 피복하였다. 항-a를 검출하기 위하여 0.2ml의 혈청을 실온에서 밤새 비드와 배양하였다. 세척후, 비드를 방사성요오드화된 rHBsAg와 40℃에서 2시간동안 배양하였다. 세척후, 비드의 방사성을 계수하였다. ad 아형검정을 위해, ad로 피복된 비드를 표지된 ad rHBsAg로 프로브하였으며 ay 검정에 대해서도 유사하게 수행하였다. 음성대조군의 평균치보다 4배이상의 계수를 갖는 표본은 양성이다. 역가는 표준판넬과 비교하여 mTU/ml로서 나타내었다. 혈청중의 항-a의 퍼센트는 항-ad 또는 항-ay x 100 / 항-a를 계산하여 측정하였다.

(iv) 서열분석 연구를위한 환자

105의 ALT를 갖는 HBsAg, HBeAg, 및 항-HBc 양성보균자(환자IE)로 부터 1983년 3월 5일에 남아(AS)를 분만하였다. 부친은 항-HBc 및 항-HBs 양성이다. 출생시 및 생후 1개월에 유아에게 1.5ml의 HBIg를 접종하고 생후 3개월, 4개월 및 9개월째 HB-VAX(Merck Sharp and Dohme)로 접종하였다. 서열분석 연구를위해, 모친으로부터 분만시에, 유아로부터 생후 11개월에(HBsAg, HBeAg 및 항-HBc 양성 ; 항-HBs 420 mIU/ml ; ALT 120) 및 생후 5년째(HBsAg 및 HBeAg 양성, 항-HBs 음성 ; ALT 36) 채취된 혈청을 선택하였다. 또한 연구와 관련없이 부작위로 선택된 4명의 이태리인 HBeAg 양성 보균자로부터 채취된 혈청, 및 3명의 영국인 HBsAg 양성환자로부터 채취한 혈청도 서열분석하였다.

(v) PCR 및 직접서열분석

50㎕l 혈청을 200㎕l 용량의 25mM 아세트산 나트륨, 2.5mM EDTA, 0.5% SDS 및 1mg/ml 프로테이나제 K(Boehringer Mannheim)중에서 밤새 37℃로 분해시켰다. 2회의 페놀·클로로포름 및 2회의 클로로포름 추출후, DNA를 에탄올로 침전시키고 펠렛을 70% 에탄올로 세척하였다. 펠렛을 20㎕l 수중에 재현탁시켰다. 문헌[Carman et al., Lancet, 1989, ii, 558-591)의 방법을 이용하여 각각 300 피코몰의 프라이머 BCS2 및 BC4를 갖는 DNA10㎕l에 대하여 PCR을 수행하였다. 목적서열, 프라이머결합부위 및 프라이머서열의 세부사항은 제2도에 도시되어있다.

증폭된 DNA의 존재를 확인하기위하여 반응물 10㎕l를 아가로즈 겔 전기영동한후, 잔여물을 G-50 세파덱스 칼럼(Pharmacia)을 통해 스피닝 시키고 에탄올로 침전시켰다. 70스크린판 에탄올로 3회 세척한후, 펠렛을 20㎕l 수중에 재현탁시켰다. 한편, 10 피코몰의 서열분석 프라이머 BCS3을 20㎕l의 최종용량으로 10U 폴리뉴클레오타이드키나제(Boehringer Mannheim)를 사용하여 10㎕Ci 감마 ^{32}P-ATP로 표준완충액중에서 표지시켰다. 서열분석 프라이머는 표지시킨후 컬럼-정제하지 않았다.

4㎕l의 DNA를 시퀘나제 키트(United States Biochemicals)중에 공급된 2㎕l의 5X 완충액의 존재하에 표지된 BCS3 4㎕l에 가하였다. 그런다음 95℃로 가열하고 서서히 50℃로 냉각시켰다. 표지화단계는 수행하지 않고 최종 혼합물을 동일용량의 물로 희석시킨 것을 제외하고는 제조업자의 방식을 수행하였다. 반응물을 5% 세쿠아겔(National Diagnostics) 폴리아크릴아미드-우레아 겔 상에서 전기영동하였다.

(vi) 소수성 플롯팅

정상적인 HBsAg와 변이 HBsAg 로부터의 a 결정소의 아미노산 139 내지 147을 프로시스(Pharmacia) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

(b) 결과

(i) 아형분류 연구

1590명의 백신접종자 가운데 44명(2.8%)가 HBsAg를 유도하였으며, 이들중 12명은 약한 반응성을 보이고 어떠한 HBV 마커도 나타내지 않았다. 이들 환자중 18명에 대한 세부사항을 얻었다 : 보균 모친으로부터 태어난 유아5명, 가족집단접촉된 어린이 5명 및 가족집단 접촉된 성인 8명.

HBV의 아형은 감염된 유아와 어린이들의 모든 접촉자 및 성인접촉자 8명(모든 시험대상자)중 6명에게서 ay로 결정되었다. 환자 AS의 모친은 분만 후 2개월 경과한 두 경우에 대하여 ay로 밝혀졌다. 환자 AS는 생후 12개월 및 18개월째 아형 y에대해 약양성으로 항-HBs가 검출가능하지 않은후 6개월 되는 46개월째에 ay 양성으로 밝혀졌다. 백신접종후 2년째 환자 AA, 9개월째 환자 AE 및 두성인환자(면역화후 26 및 28개월에서)는 단지 y양성이었다.

이들결과는 모노클로날 시약을 사용하여 검증되었다. y-함유 혈청을 갖는 모든환자는 항-a가 아닌 항-y로 중화되었다.

항-HBs의 아형분류에의해 50 내지 70%의 항체가 항-a인것으로 밝혀졌다. 환자 AS의경우 생후 6개월지나 약 90%가 a 결정소에 대항하였다.

(ii) a 결정소의 서열분석

서열분석에의해 환자 AS는 위치 587(HBV 게놈의 독특한 Eco RI 부위로부터 지정된 번호)에서 구아노신으로부터 아데노신(G→A)으로의 단일돌연변이가 일어나 HBsAg의 145번 아미노산이 글리신으로부터 아르기닌으로 치환되어있음이 밝혀졌다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 제3도에 도시된 pRIT10601상의 ay S-유전자서열과 상동성을 가지며 주형으로서의 ay S-유전자와함께 Taq 폴리머라제에 의해 뉴클레오타이드를 연장하기위한 프라이머로서 사용된다. BC145 및 146 상의 밑줄친 AGA 및 TCT 삼중자는 목적하는 erg 145 치환체를 암호화한다. 또한, BC144 상의 서열 GAATTCG는 S-유전자 암호서열의 TAA 종결코돈에 한개의 bp 떨어진 EcoRI 제한부위의 도입을 가능케한다. 주형으로서 제4도에 도시된 플라스미드 pRIT13438 또는 pRIT10601을 사용하여 제조업자(Perkin Elmer Cetus)에 의해 규정된 바와같이 PCR 반응을 수행한다. 이러한 변화는 생후 11개월 및 생후 5년에 존재하는것과 마찬가지로 안정한것으로 나타났다. 모친 IE 및 대조환자는 현재까지 공개된 모든 서열의 경우에서처럼 상기 위치에서 글리신을 갖는다. 다른한편, 결정서의 서열은 환자 AS 및 IE 뿐만아니라 지금까지 공개된것과 동일하였다.

(iii) 소수성 플롯팅

정상적인 HBsAg의 a 결정소와 환자 AS의 것의 두번째 루프의 상대적 소수성을 측정하였다. 문헌[Kyte and Doolittle, J. Biol. 1982, 157, 105-132]의 방법을 이용하여, 두번째 루프에대한 평균 소수성 지수는 -1.3에서 -1.9로 변한것으로 밝혀졌으며 문헌[Hopp and Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 3824-3828]의 방법을 이용했을때는 -0.5로부터 -0.9로 변했다.

[실시예 2]

[아미노산위치 145에서 gly가 arg로 치환된 ay 아형의 변이 S-유전자 암호서열의 작제]

통상의 포스포이미다이트 화학방법을 이용하여 Biosearch 8600 DNA 합성 기상에서 제조업자의 지시에따라 하기 서열을 갖는 4개의 올리고뉴클레오타이드프라이머 BC17, BC144, BC145 및 BC146을 합성하였다.

서열 1

BC17 5′ GTCTAGACTCGTGGTGGACT 3′

BC144 5′ TTGGAATTCGTTAAATGTATA 3′

BC145 5′ CTTCGGACAGAAATTGCACCT 3′

BC146 5′ AGGTGCAATTTCTGTCCGAAG 3′

이들 올리고뉴클레오타이드는 제3도에 도시된바와같이 pRIT10601 성의 ay S-유전자서열과 일치하며 템플레이트로서 ay S-유전자를 갖는 Tag 폴리머라제에의한 뉴클레오타이드연장을 위한 프라이머로서 사용된다. BC145 및 BC146 상의 강조된 AGA 및 TCT 트리플렛은 소정의 arg145 치환을 암호화한다. 또한, BC144 상의 서열 GAATTCT는 S-유전자 암호화서열의 TAA 말단 코돈에 EcoRI 제한부위 하나의 bp 말단의 도입을 가능하게한다. PCR 반응을 템플레이트로서 제4도에 도시된 pRIT10601 또는 pRIT13438을 이용하여 제조업자(Perkin Elmer Cefus)에의해 특정된바와같이 수행된다.

pRIT13438은 pRIT10601로부터 유도되고 시험관내 조작에의해 도입된 EcoRI과 Bgl II 제한부위에의해 플랭킹된 완전한 ay S-유전자 암호서열을 함유한 통상적인 이. 콜라이 벡터이다. 약 1내지 10ng의 주형 DNA를 100㎕의 최종용량으로 50mMKCl, 10mM 트리스-HCl pH8.3, 1.5mM $MgCl_2$, 0.01%(W/V) 젤라틴, 200㎛M의 dATP, dGTP, dCTP, 및 dTTP, 1㎛M의 각프라이머 및 2.5 단위의 Taq 폴리머라제와 혼합한다. 하나는 BC17 및 주형을 갖는 BC146을 함유하고 다른하나는 BC144 및 주형을 갖는 BC145를 함유하는 두개의 별개 반응물을 전개한다.

두개의 혼합물을 25회의 주기로 변성(2분, 94℃), 어닐링(2분, 48℃) 및 연장(2분, 72℃)시킨다음 DNA 열적순환기(Perkin Elmer Cetus, 벨기에 브루셀 소재의 Van der Heyden 으로부터 입수)를 사용하여 72℃에서 15분 연장 시간으로 1회주기를 수행한다. 통상의 아가로즈 겔 전기영동으로 각 혼합물중의 목적하는 증폭된 단편의 존재가 입증되며 단편을 센트리콘 100컬럼(Amicon Division, W.R. Grace Co., 벨기에 브루셀 소재의 Van der Heyden 으로부터 입수가능함)에 통과시켜 정제한다. 약 1 내지 10ng의 각 증폭된 단편을 일회의 반응으로 프라이머 BC17 및 BC144와 혼합하고, 어닐링반응을 60℃에서 진행시키는 것을 제외하고 상술한 바와 똑같이 증폭시킨다.

하기의 서열을 갖는 추가의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 BC90 및 BC153도 BC17 및 BC144 대신 사용될 수 있다 :

서열 2

BC90 5' ATGGAGAACATCACATCAGCATTCCTAGGA 3'

BC153 5' TTGGAATTCGTTAAATGTATACCCAAAGACAAAA 3'

BC90은 개시 코돈에서 출발하는 ay S-유전자 서열의 5' 말단과 상동성이다. BC153은 BC144와 중복된다.

주형으로서의 pRIT13438 DNA와 상술한 기타성분과함께 BC90 및 BC146을 함유하는 PCR 반응혼합물, 및 주형으로서의 pRIT13438과 상술한 기타성분과 함께 BC145 및 BC153을 함유하는 다른 PCR 반응혼합물을 전개시켰다. 두혼합물을 25회의 주기로 변성(2분, 94℃), 어닐링(2분, 48℃) 및 연장(2분, 72℃)시켜 증폭한다. BC90/BC146 증폭물로부터의 목적하는 445bp 단편 및 BC145 / BC153 증폭물로부터의 267bp 단편을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 전기용출하여 정제하였다.

이어서, 약 10ng의 각 단편을 혼합하고 상술된바와 동일한 조건에서 올리고뉴클레오타이드 BC90 및 BC153의 존재하에 25회주기로 PCR 증폭시켰다. 약 69bp의 증폭된 단편 생성물을 회수한다. 이는 Xbal 및 EcoRI 엔도뉴클레오아제에 더한 한개의 인지부위를 함유한다.

이러한 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머, ay S-유전자 주형 및 PCR 반응을 사용하여 arg145 치환되고 5'Xbal, 3'EcoRI 연장된 590bp S-ay 단편 변이체를 수득한다. 목적하는 단편을 센트리콘 100컬럼상에 통과시켜 프라이머와 PCR 반응의 다른 산물로부터 정제하는 것이 바람직하다. 이어서, 통상의 클로닝 기술을 이용하여 효모벡터에 융합된 정상적인 바이러스성 암호서열의 상응하는 Xbal-EcoRI 단편대신에 수득한 단편으로 치환시킨다. 이러한 목적에 적합한 벡터는 ad 혈청형 S 암호서열이 효모 TDH3 프로모터와 융합하고 효모 ARG3 전사 터미네이터의 상향하여 발현 카세트를 형성한 pNN2delta EcoRI(제5도)이다. 이러한 발현 카세트의 작제방법 및 이동은 유럽특허원 제0 278 940호에 교시되어있다. 숙주로서 선택된 효모중에서 발현을 조절하기위해 선택된 프로모터와 전사 터미네이터 단편에 따라 상기 유형과 같이 적합한 어떠한 벡터도 사용될 수 있다는것은 본분야 전문가라면 누구나 이해할 것이다. 또한, BC144와 다른 프라이머를 사용함으로써 변이단편의 3'말단에 다른 제한 부위가 도입될 수 있다. 또한 명백한것은 adw 및 ayw 혈청형의 공지된 HBV 분리체 사이에 아미노산의 변이를 유도하는 뉴클레오타이드 차이가 PCR에 의해 수득된 변이 Xbal-EcoRI 단편의 pNN2delta EcoRI 상의 치환에의해 ayw 암호서열이 형성되도록 Xbal 부위의 하향에 위치한다.

상술된 BC90, BC153, BC145 및 BC146 과의 PCR 반응으로부터 얻어진 약 1.5mcg의 690bp 단편을 Xbal 및 EcoRI 엔도뉴클레아제로 분해시키고 분해된 단편 약 0.15mcg을 Xbal 및 EcoRI 엔도뉴클레아제로 분해되고 탈린산화된 벡터 pRIT12642 약 50ng와 혼합하고 연결시켰다. pRIT12642는 제5도에 도시된 pNN2delta EcoRI 벡터와 정확히 동일하다. 연결 혼합물로부터 플라스미드를 회수하고 변이 ay 암호서열이 TDH3 프로모터의 3'에 및 이의 조절하에 위치한 발현카세트를 형성하도록 pRIT12642 벡터의 Xbal 및 EcoRI 부위 사이에 삽입된 S-암호화 변형서열을 함유한 Xbal-EcoRI 단편을 함유한 pRIT13555로서 동정하였다.

상술된 바와같이 수득된 vHBsAg 발현카세트를 2.89kb 단편으로서 pNN2delta EcoRI 유도체 플라스미드로부터 Bal II 및 Sal I 엔도뉴클레아제로 분해시켜 절단하고 효모내에 도입하기위해 선택된 벡터 상에 삽입시킨다. 삭카로마이세스 세레비지애에 적합한 다수복제 벡터는 제6도에 도시된 바와같이 pBR327 레플리콘 상의 EcoRI 및 Sal I 부위사이에 삽입된 폴리링커를 함유하고 널리공지된 DNA 단편을 이용하여 통상의 DNA 조작기술에의해 작제된 pRIT12775 이다. pRIT13555로 부터의 2.98 Bal II-Sal I 카세트 단편을 엔도뉴클레아제로 분해하여 수득하고 통상의 클로닝 기술을 이용하여 pRIT12775의 Bal II와 Sal I 부위 사이에 삽입시켜 플라스미드 pRIT13557을 형성하였다. 효모 게놈내로 카세트를 통합시키는 것이 필요하다면, 문헌 [Jacobs et al., Gene, 80, page 279 (1989)]에 기술된것과 같은 통합성벡터가 바람직하다. pRIT12775 상에 vHBsAg 발현카세트를 삽입하였을때, 문헌[Tto et al., J. Bcteriol. 153 : p163(1983)]의 방법에따라 루이신2 결핍 돌연변이체의 효모세포를 루이신 독립 형질전환체를 위한 선별로 형질전환시킨다. 이중 leu2 돌연변이된 적합한 수용균주는 부다페스트 협약하에 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 1982년 6월 2일자로 수탁번호 제ATCC 20630호로 기탁된 균주 DC5 이다.

또다른 적합한 균주는 부다페스트 협약하에 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 1986년 8월 18일자로 수탁번호 제ATTCC20820호로 기탁된 균주 DC5의 cir° 유도체이다. 균주 DC5 cir°를 루이신 독립 콜로니의 선별로서 상기인용된 Ito의 방법을 이용하여 pRIT13557의 DNA로 형질전환시킨다. 형질전환체 콜로니를 아배양하여 Y1648로서 동정된 균주를 설정하였다.

또한, vHBsAg 암호서열을 함유하는 발현 카세트를 둘이상의 폴리펩타이드 중의 혼합물이 함유된 복합 HBsAg 입자를 형성하도록 다른 발현 카세트를 보유한 삭카로마이세스 세레비지애, 한세눌라 폴리모파 또는 피키아 파스토리스의 숙주세포내로 형질전환시킨다.

통상의 클로닝 기술을 이용하여 효모 TDH3 프로모터, pRIT1060로부터의 ay아형의 S-유전자의 암호서열 및 효모 ARG3 터미네이터 단편으로 이루어진 2.98kb 발현카세트를 작제하였다. 이어서, 이 카세트를 pRIT12775의 Bal II 및 Sal I 부위 사이에 삽입하여 pRIT13558을 형성하였다. 그런다음, pRIT13558을 상기의 Ito 기술을 이용한 형질전환에의해 루이신 독립 선별을 갖는 수용균주 D5 cir° 내로 형질전환 시켰다. 형질전환 콜로니를 아배양하여 Y1654로서 동정된 균주를 설정하였다.

균주 Y1654는 본 발명에따른 vHBsAg의 특성을 조사할때 대조군으로서 유용한 ay 아형의 HBsAg를 발현한다.

출발물질로서 pRIT10601 및 효모 ARG3 프로모터를 이용하여 효모내에서 ay 아형입자를 아클로닝하고 발현한 것이 문헌[De Wilde et al in Devel. Biol. Standard. 59, 99-107 (1985)]에 기술되어 있다.

Y1648 및 Y1654의 배양물을 성장시키고 조세포추출물 중에서 HBsAg를 AUSRIA 방사성면역검정법(미합중국 일리노이 노쓰 시카고 소재의 Abbott Laboratories)으로 추출하고 측정하였다. Y1648 및 Y1654 각각에 대한 두 배양물의 검정결과는 하기와 같다.

[표 1]

균 수	배양물번호	단 백 질 (g/l 배양물)	AUSRIA 에의한 HBsAg (g/l 배양물)	비센트단백질로서의 HBsAg
Y1648	C 1316	23.42	0.0115	0.049
	C 1324	27.30	C.013	0.05
Y1654	C 1332	20.12	0.127	0.63
	C 1336	26.09	C.136	0.52

균주 Y1648은 균Y1654에 비하여 AUSRIA 반응물질을 약 10배 적게 생산한다. 변성되고 환원된 HBV 표면 항원 폴리펩타이드를 인지하는, 모노클로날 항체 HBS1(벨기에 릭센사르트 소재의 Smithkline Beecham Biologicals)를 이용한 조세포추출물의 웨스턴 블롯팅은 Y1648 이 Y1654와 마찬가지로 24K의 분자량을 갖는 거의 동일량의 HBS1 반응성 단백질을 생성하였다.

효모세포의 배양, HBsAg의 추출 및 검정, 및 웨스턴 블롯팅의 방법은 본원의 참고문헌으로 인용된 유럽 특허원 제0 278 940호 및 제0 414 374호에 기술되어 있다.

표면 항원 물질을 상기 인용된 미합중국 특허 제4,649,192호 및 제4,683,294호에 따른 통상의 방법에의해 Y1648과 Y1654의 세포추출물로부터 정제하였다.

제제는 미량의 이량체 및 다량체와함께 24K에서 단백질의 순수한 HBV 표면 항원 단백질로 구성되었다.

균주 Y1654로부터 효모유도된 HBsAg의 두 제제는 AUSRIA/단백질비가 1.64 및 2.79인 반면 균주 Y1648 로부터의 vHBsAg 제제는 0.1 및 0.13의 감소된 AUSRIA/단백질비를 제공하였다.

균주 Y1648 로부터 정제된 vHBsAg를 우라닐 아세테이트로 염색한 후 전자 현미경으로 검사하였다. 이 물질은 HBV 표면 항원의 전형적인 구형입자의 존재를 나타내었다.

[실시예 3]

[백신 조성물의 제조]

10mM 인산나트륨, 150mM Nacl pH 6.8 중의 3% 수산화 알루미늄의 완충된 멸균 수용액에 유사한 완충액중의 실시예 2의 vHBsAg를 일정하게 교반시키면서 가하여 5 내지 40 mcg 단백질과 알루미늄(Al)mg당 0.5mg의 최종농도로 만든다. 이어서, 티메로살(나트륨 머티올레이트)을 보존제로서 최종농도 20,000(W/V)중의 1로 가한다.

본 백신은 사람에게 비경구로 투여하기에 적합하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

변형 B형 간염 표면 단백질(vHBsAg)의 서열을 함유하는 단백질 및 이들의 단편에 있어서, 상기 vHBsAg는

vHBsAg의 'a'결정소가 야생형 B형 간염의 'a'결정소와 다른 항원성을 나타내도록 위치 145에 있는 아미노산이 아르기닌으로 치환된 B형 간염 표면 단백질의 변성 'a' 결정소를 포함하는 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 위치 145에서의 변경된 아미노산 잔기를 제외하고 HBsAg S-단백질과 동일한 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 위치 145에서의 변형이 글리신으로부터 아르기닌으로의 치환인 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 순도가 75% 이상인 단백질.

청구항 5

제1항, 제2항, 또는 제3항 중 어느 한 항에 따른 vHBsAg를 암호화하는 DNA 서열을 함유함을 특징으로하는 발현벡터.

청구항 6

제5항의 벡터로 형질전환된 숙주.

청구항 7

제4항에 청구된 유효량의 vHBsAg가 적합한 담체 또는 보조제와 혼합되어 있음을 특징으로하는 백신 조성물.

청구항 8

제6항의 숙주를 적합한 배양배지중에서 배양시키고 필요한 정도의 순도로 생성된 vHBsAg를 정제하는 단계를 포함함을 특징으로하는, 제1항 또는 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 vHBsAg의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, HBV와 연관된 질환에 대해 사람을 보호하기 위한 백신 제조에 사용하기 위한 단백질.

청구항 10

(a) 제1항 또는 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에따른 vHBsAg와, (b) 항원-항체 반응을 검색하기위해 응용된 수단을 포함함을 특징으로 하는, 생물학적 매개물중에서 항-vHBsAg 항체의 시험관내 진단검색용 키트.

청구항 11

사람에게서 B형 간염의 진단, 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한, 제1항, 제2항 또는 제3항 중 어느 한 항에 따른 vHBsAg에 대한 항체를 함유하는 항체 제제.

청구항 12

위치 145에서 점 돌연변이 코돈이 아르기닌을 코딩하도록 야생형 HBsAg의 위치 145에 있는 글리신을 코딩하는 GGA 코돈에서의 점 돌연변이에 의해 위치 145에서 아미노산을 유도하는 것을 포함하며, 상기 점 돌연변이 코돈이 AGA, CGA, CGC, CGG, CGT 및 AGG로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 제1항에 따른 단백질의 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, vHBsAg가 Pre S 코딩 서열을 포함하는 단백질.

청구항 14

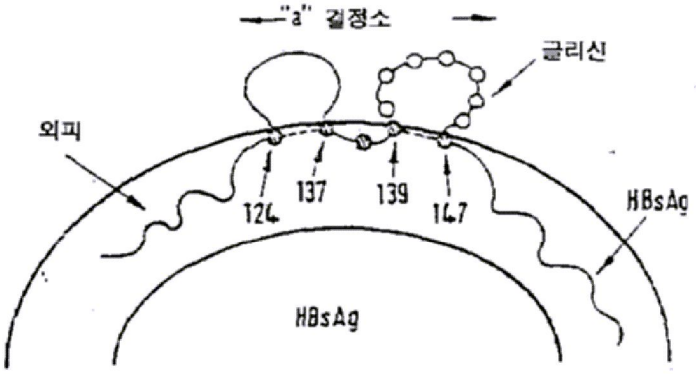
제13항에 있어서, Pre S 코딩 서열이 Pre S1 코딩 서열인 단백질.

청구항 15

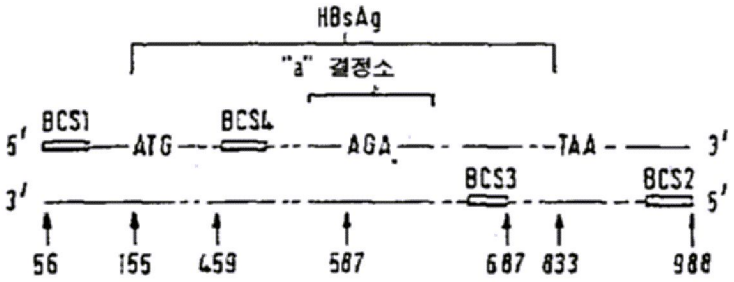
제13항에 있어서, Pre S 코딩 서열이 Pre S2 코딩 서열인 단백질.

도면

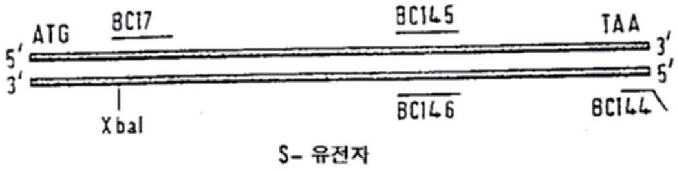
도면1



도면2

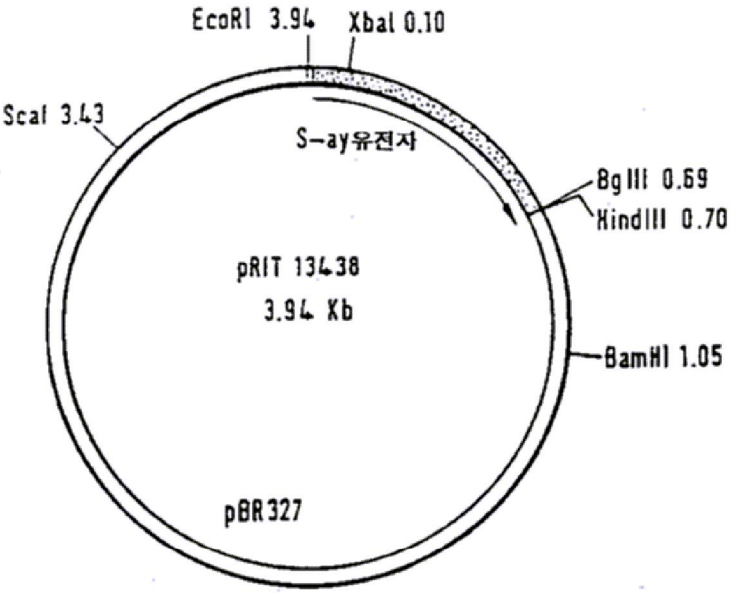


도면3

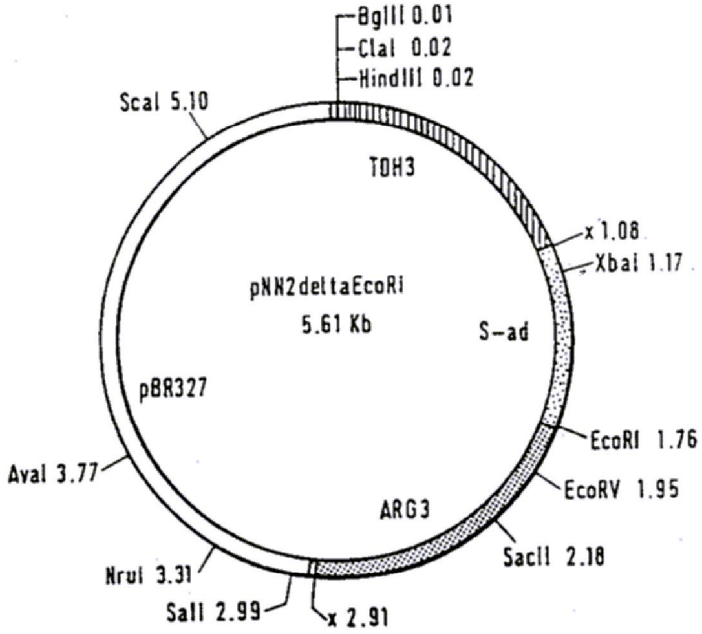


S- 유전자

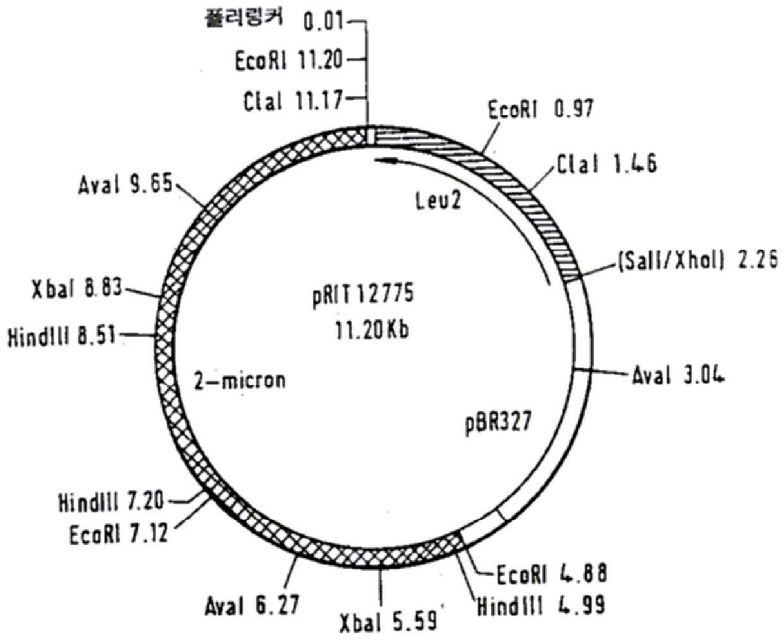
도면4


EcoRI 3.94
Xbal 0.10
ScaI 3.43
S-ay유전자
BglII 0.69
HindIII 0.70
pRIT 13438
3.94 Kb
BamHI 1.05
pBR327

도면5


BglII 0.01
ClaI 0.02
HindIII 0.02
ScaI 5.10
TDH3
x 1.08
Xbal 1.17
pNN2deltaEcoRi
5.61 Kb
S-ad
pBR327
EcoRI 1.76
EcoRV 1.95
AvaI 3.77
ARG3
SacII 2.18
NruI 3.31
SalI 2.99
x 2.91

도면6


폴리링커 0.01
EcoRI 11.20
ClaI 11.17
EcoRI 0.97
ClaI 1.46
Leu2
(SalI/XhoI) 2.26
AvaI 9.65
XbaI 8.83
HindIII 8.51
pRIT12775
11.20Kb
2-micron
AvaI 3.04
pBR327
HindIII 7.20
EcoRI 7.12
EcoRI 4.88
HindIII 4.99
AvaI 6.27
XbaI 5.59