



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월08일
(11) 등록번호 10-1646830
(24) 등록일자 2016년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/42 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0061977
(22) 출원일자 2014년05월23일
심사청구일자 2014년05월23일
(65) 공개번호 10-2014-0141460
(43) 공개일자 2014년12월10일
(30) 우선권주장
1020130062168 2013년05월31일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1019990008648 A*
KR1019990008649 A
US05204096 A
US20030165816 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)셀트리온
인천광역시 연수구 아카데미로 23 (송도동)
(72) 발명자
윤준선
인천광역시 연수구 원인제로 59 35-201
김만수
인천광역시 연수구 신송로 82번길 6 409-602
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 21 항

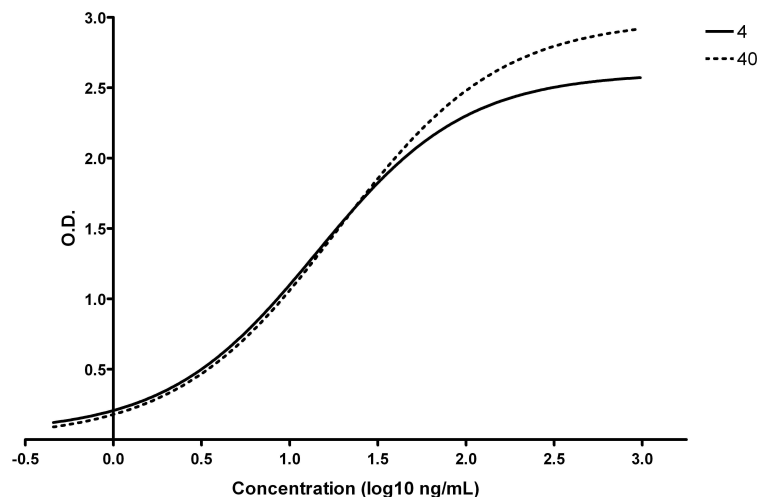
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 B형 간염 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자

(57) 요약

본 발명은 B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg) 서브타입 adw, adr, ayw, 및 ayr으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 결합하여 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자에 관한 것이다. 본 발명의 결합 분자는 HBsAg에 대한 우수한 결합 능력을 가짐으로써 HBV의 adw, adr, ayw, ayr 4가지 주요 아형 모두에 결합 가능하고 중화 효과를 나타내며, HBsAg의 다양한 돌연변이 항원에까지 폭넓은 중화효과를 나타내므로, B형 간염 예방 및 치료에 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이계숙

인천광역시 연수구 원인재로 124 110-1101

임병필

서울특별시 양천구 목동동로 50 1206-305

이승은

서울시 송파구 가락로17길 6-3

홍수현

인천광역시 연수구 경원대로467번길 18 302호

오재우

인천광역시 연수구 경원대로119번길 21 112-202

허필립

인천광역시 연수구 원인재로 312 106-706

장신재

인천광역시 연수구 센트럴로 232 103-4202

홍승서

서울특별시 강남구 언주로 107 210-608

명세서

청구범위

청구항 1

B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg)의 S(small) 단백질 야생형 및 상기 S 단백질의 101번, 112번, 126번, 129번, 133번, 143번, 173번, 175번, 184번, 185번 또는 196번 아미노산 위치의 돌연변이 항원에 결합하여 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자이되,

상기 결합 분자는 카바트 방법(Kabat method)에 따라

- i) 서열번호 1의 CDR1 영역, 서열번호 2의 CDR2 영역, 서열번호 3의 CDR3 영역, 서열번호 4의 CDR1 영역, 서열번호 5의 CDR2 영역 및 서열번호 6의 CDR3 영역; 및
- ii) 서열번호 7의 CDR1 영역, 서열번호 8의 CDR2 영역, 서열번호 9의 CDR3 영역, 서열번호 10의 CDR1 영역, 서열번호 11의 CDR2 영역 및 서열번호 12의 CDR3 영역

으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함함을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 결합 분자는 A, B, C, D, E, F, G 및 H 유전자형(genotype)의 B형 간염 바이러스에 결합하여 중화 활성을 가짐을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 결합 분자는 라미부딘(lamibudine), 아데포비어(adefovир), 클레부딘(clebudine) 또는 엔테카비어(entecavir) 내성 B형 간염 바이러스에 결합하여 중화 활성을 가짐을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 돌연변이 항원은 Q101R, K112R, T126N, I126S, Q129H, M133H, P143K, L173F, L175S, A184V, I185M 또는 W196L 돌연변이 항원이며,

여기서,

Q101R은 상기 S 단백질의 101번 위치가 글루타민이 아르기닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,

K112R은 상기 S 단백질의 101번 위치가 리신이 아르기닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,

T126N은 상기 S 단백질의 126번 위치가 트레오닌이 아스파라긴으로 치환된 돌연변이 항원이고,

I126S는 상기 S 단백질의 126번 위치가 이소류신이 세린으로 치환된 돌연변이 항원이고,

Q129H는 상기 S 단백질의 129번 위치가 글루타민이 히스티딘으로 치환된 돌연변이 항원이고,

M133H는 상기 S 단백질의 133번 위치가 메티오닌이 히스티딘으로 치환된 돌연변이 항원이고,
 P143K는 상기 S 단백질의 143번 위치가 프롤린이 리신으로 치환된 돌연변이 항원이고,
 L173F는 상기 S 단백질의 173번 위치가 류신이 페닐알라닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,
 L175S는 상기 S 단백질의 175번 위치가 류신이 세린으로 치환된 돌연변이 항원이고,
 A184V는 상기 S 단백질의 184번 위치가 알라닌이 발린으로 치환된 돌연변이 항원이고,
 I185M는 상기 S 단백질의 185번 위치가 이소류신이 메티오닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,
 W196L는 상기 S 단백질의 196번 위치가 트립토판이 류신으로 치환된 돌연변이 항원임을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 결합 분자는 서열번호 13으로 표시되는 가변영역 및 서열번호 14로 표시되는 가변영역을 포함함을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 결합 분자는 서열번호 15로 표시되는 가변영역 및 서열번호 16으로 표시되는 가변영역을 포함함을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 결합 분자는 서열번호 17로 표시되는 경쇄 및 서열번호 18로 표시되는 중쇄를 포함함을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 결합 분자는 서열번호 19로 표시되는 경쇄 및 서열번호 20으로 표시되는 중쇄를 포함함을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 결합 분자는 항체 또는 이것의 단편임을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 항체에 약물이 추가로 부착되어 있음을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 항체는 Fab 절편, Fv 절편, 디아바디(diabody), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 결합 분자.

청구항 18

제1항, 제10항, 제11항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항의 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 19

제18항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 20

제19항의 발현 벡터가 형질 감염되어 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자를 생산하는 숙주 세포.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 숙주 세포는 CHO 세포, F2N 세포, BHK 세포, SP2/0 세포, NS0 세포 및 HEK 293 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항 내지 제3항, 제5항, 제10항, 제11항, 제13항 내지 제17항 중 어느 한 항의 결합 분자를 포함하는 B형 간염의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제3항, 제5항, 제10항, 제11항, 제13항 내지 제17항 중 어느 한 항의 결합 분자를 포함하는 B형 간염의 진단용 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서,

상기 조성물은 멸균 주사용액, 동결건조(lyophilized) 제형, 사전 충전식 주사(pre-filled syringe) 용액제, 경구형 제형, 외용제 또는 좌제임을 특징으로 하는 B형 간염의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서,

상기 조성물은 멸균 주사용액, 동결건조(lyophilized) 제형, 사전 충전식 주사(pre-filled syringe) 용액제, 경구형 제형, 외용제 또는 좌제임을 특징으로 하는 B형 간염의 진단용 조성물.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

- i) 샘플과 제24항의 조성물을 접촉시키는 단계; 및
 - ii) 상기 조성물과 샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는
- 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단을 위해 정보를 제공하는 방법.

청구항 33

- i) 제24항의 조성물; 및
- ii) 용기

를 포함하는 B형 간염 바이러스 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 B형 간염 바이러스를 중화시킬 수 있는 결합 분자에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 인간 단일 B세포로부터 유래한 B형 간염 바이러스 표면항원(Hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)에 특이적인 인간 단일클론 항체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 헤파드나바이러스(Hepadnaviridae) 과에 속하는 DNA 바이러스로서, 간경화와 간암의 주요 원인인자이다. 2012년 WHO의 보고에 따르면, 전 세계적으로 2억 4천만 명 가량의 만성 HBV 감염환자가 존재하며 매년 50만 명에서 70만 명에 이르는 사람들이 B형 간염에 기인한 질병으로 사망한다고 한다. 한국의 경우 성인의 5~8%가 HBV 보유자인 것으로 파악되고 있으며, 성인에서 만성 간염 환자의 80%, 간경변증의 65%, 그리고 간세포암종 환자의 70%가 HBV 감염과 연관되어 있다. 1980년대 이후 우리나라의 B형 간염 유행률은 백신의 보급으로 현저히 감소하고 있으나 아직까지도 HBV의 감염은 만성 간질환의 가장 중요한 원인이며, 간질환은 국내에서 가장 중요한 사회문제의 하나로 손꼽히는 실정이다. 따라서 이미 감염된 환자에서 만성간질환으로의 진행을 예방하거나 신규 감염을 방지할 수 있는 적절한 항바이러스제 치료가 필수적이다.

- [0003] 현재 만성 B형간염의 치료에 사용되는 약제로는 인터페론(interferon, pegninterferon), 라미부딘(lamivudine), 아데포비어(adeфовir dipivoxil) 및 엔테카비어(entecavir) 등이 있으며, 인터페론을 제외한 경구 항바이러스 약제들은 모두 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드(nucleoside/nucleotide) 유사체 약물이다. 이 약물들은 HBV의 역전사 효소(reverse transcriptase)의 활성을 억제함으로써 바이러스의 DNA 복제를 저해하며, 혈청 HBV DNA의 양 감소와 ALT 수치의 정상화, 그리고 간 섬유화도 개선해 준다.

- [0004] 그러나 상기한 장점에도 불구하고, 뉴클레오사이드 유사체들은 장기간 사용 시 약제에 대한 내성을 유발하여 약효가 떨어지게 되고, 결과적으로 간기능을 악화시키고 간질환의 진행을 수반하게 한다. 특히 전 세계적으로 가장 널리 사용되어 온 라미부딘의 경우 5년 후 내성 발병률은 70~80%에 달하는 것으로 알려져 있다. 또한, 이 약물들은 HBV의 감염을 직접적으로 저해하지는 못한다. 그렇기 때문에, 신규 감염 예방을 위한 목적으로, 즉 산모에서 태아로의 수직 감염 및 간이식 환자에서의 재감염 방지를 위하여 B형 간염 항체 제제가 함께 사용되고 있다.

- [0005] 기존의 B형 간염 항체 제제는 항체를 보유하고 있는 사람의 혈액으로부터 고도의 정제기술을 사용하여 항체를 분리해내고 바이러스 불활화 기술을 사용하여 잠재적인 오염원을 제거하는 방식으로 제조된다. 그러나, 원료 혈장 확보의 어려움에 따른 과다한 수입비용 지출이 있으며 증가하는 수요에 탄력적으로 대처할 수 없는 문제가 있다. 또한 사람 혈장 유래의 바이러스의 제거에 많은 시간과 비용이 소요되지만 여전히 잠재적 감염원이 존재할 가능성이 있고, 낮은 효력에 기인한 장시간의 투여에 따른 불편함 역시 존재하는 등의 단점이 있다.

- [0006] 1970년대에 단일클론항체(monoclonal antibody, Mab)의 제조기법이 확립된 이래, 우수한 성능의 항체치료제를 개발하기 위하여 끊임없는 기술혁신이 이루어져 왔다. 마우스로부터 제조되는 단일클론항체는 인체에 그대로 투여 시 인간 항-마우스 항체(human anti-mouse antibody, HAMA)가 생성되기 때문에 장기간에 걸친 반복투여가 어렵다. 이러한 단점을 극복하고자 마우스 항체의 불변영역을 인간 항체의 아미노산 잔기로 대체시킨 키메라 항체(chimeric antibody)나, 90~95%의 아미노산 잔기를 인간 항체의 아미노산 서열로 대체시킨 인간화 항체(humanized antibody)가 개발되었으나, 여전히 HAMA의 생성을 완전히 해결하지 못하고 있다. 이에 따라 최근에는 완전한 인간 항체를 사용한 항체치료제의 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

[0007] HBV의 세부 분류는 전통적으로 표준혈청에 대한 B형 간염 표면항원(HBsAg)의 반응을 토대로 혈청형(serotype)을 정하여 이루어졌다. 현재는 이들 혈청형의 분자생물학적 특징이 알려져 있으므로 HBsAg의 아미노산 서열만으로도 아형(subtype) 분류가 가능하다. HBsAg의 124~147번 아미노산에 위치하는 'a' 결정기(a determinant)는 면역원성의 주요 부위이나 HBV에 공통적으로 나타나므로 세부 분류 시에는 다른 항원결정기(epitope)를 기준으로 아형을 나눈다. 즉, HBsAg에서 두 군데의 전혀 다른 위치에 있는 아미노산인 122번과 160번의 종류에 따라 d/y와 r/w 결정기로 분류되는 것이다. 만약 122번 아미노산이 arginine이면 아형은 y이며 lysine이면 아형은 d로 결정된다. 마찬가지로 160번 아미노산이 arginine이면 r, lysine이면 w의 아형으로 분류된다. 이러한 기준에 따라 최초 adr, adw, ayr, ayw 4종의 아형이 보고되었고, 이후 127번 아미노산에 따라 w1~w4를, 177번 또는 178번 아미노산의 추가변이 여부에 따라 q-를 분류함으로써 현재 혈청형의 아형은 10종이 되었다.

[0008] 한편, 최근에는 염기서열 분석이 일반화됨에 따라 혈청반응이 아닌 염기서열에 따른 HBV의 유전자형을 A에서 H까지 8종으로 분류하게 되었다. 이러한 유전자형은 전체 바이러스 유전체에서 나타나는 8% 이상의 차이에 의해서 나뉘며, 다시 4%를 기준으로 유전자아형(subgenotype)으로 분류된다.

[0009] HBV를 분류함에 있어서 보통 혈청형과 유전자형을 동시에 고려하는데, 혈청형과 유전자형의 관계는 항상 일치하지는 않으며 대개 한 가지 유전자형에 두세 가지의 혈청형이 공존하는 경우가 일반적이다. 또한 HBV는 유전자형에 따라 특이적인 지역분포를 나타낸다. 가령, 적어도 90% 이상의 한국 환자에서는 유전자형 C이자 혈청형 adr인 HBV가 관찰되는데, 중국의 경우 지역에 따라 조금씩 다른 비율로 유전자형 B(주 혈청형 adw2)와 C가 혼재되어 존재하는 것으로 나타난다. 인도에서는 유전형 D(주 혈청형 ayw2)가 우세한 가운데 지역에 따라 유전형 A(주 혈청형 adw2)가 일부 혼재되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 특색을 지닌 HBV의 다양성 때문에 단일클론 HBV 중화항체를 개발하는데 있어서 모든 유전자형에 존재하는 공통 부위에 결합하는 항체를 선별해 내는 것이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 상기 나열된 문제점들을 해결하고자 HBsAg에 대한 인간 단일클론항체를 개발하였고, 이 항체가 다양한 서브타입의 B형 간염 바이러스에 대하여 중화효력을 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg) 서브타입 adw, adr, ayw, ayr에 결합하여 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자를 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 발현 벡터가 형질 감염되어 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자를 생산하는 숙주 세포를 제공하는 것이다.

- [0015] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 결합 분자를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 B형 간염 바이러스에 감염된 대상에 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명의 다른 목적은 대상에 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 B형 간염 예방 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 조성물을 이용하여 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0019] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 조성물을 이용하여 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단을 위해 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 조성물을 포함하는 B형 간염 바이러스 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 상기 과제를 해결하고자, 본 발명의 일 구체예는 B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg) 서브타입 adw, adr, ayw, 및 ayr으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 결합하여 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자를 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 상기 발현 벡터가 형질 감염되어 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자를 생산하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 상기 결합 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 B형 간염 바이러스에 감염된 대상에 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료 방법을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 대상에 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 B형 간염 예방 방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 i) 샘플과 상기 조성물을 접촉시키는 단계; 및 ii) 상기 조성물과 샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단 방법을 제공한다.

- [0029] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 i) 샘플과 상기 조성물을 접촉시키는 단계; 및 ii) 상기 조성물과 샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단을 위해 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명의 다른 일 구체예는 i) 상기 조성물; 및 ii) 용기를 포함하는 B형 간염 바이러스 진단용 키트를 제공한다.
- [0031] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예는 B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg) 서브타입 adw, adr, ayw, 및 ayr으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 결합하여 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에 따른 상기 결합 분자는 A, B, C, D, E, F, G 및 H 유전자형(genotype)의 B형 간염 바이러스에 결합하여 중화 활성을 가진다.
- [0034] 또한, 본 발명에 따른 상기 결합 분자는 라미부딘(lamibudine), 아데포비어(adefovair), 클레부딘(clebudine) 또는 엔테카비어(entecavir) 내성 B형 간염 바이러스에 결합하여 중화 활성을 가진다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 결합 분자는 HBsAg의 101번, 112번, 126번, 129번, 133번, 143번, 173번, 175번, 184번, 185번 또는 196번 아미노산 위치의 돌연변이 항원에 결합하여 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 돌연변이 항원은 Q101R, K112R, T126N, I126S, Q129H, M133H, P143K, L173F, L175S, A184V, I185M 또는 W196L 돌연변이 항원일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 여기서,
- [0038] Q101R은 HBsAg의 101번 위치가 글루타민이 아르기닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0039] K112R은 HBsAg의 101번 위치가 리신이 아르기닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0040] T126N은 HBsAg의 126번 위치가 트레오닌이 아스파라긴으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0041] I126S는 HBsAg의 126번 위치가 이소류신이 세린으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0042] Q129H는 HBsAg의 129번 위치가 글루타민이 히스티딘으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0043] M133H는 HBsAg의 133번 위치가 메티오닌이 히스티딘으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0044] P143K는 HBsAg의 143번 위치가 프롤린이 리신으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0045] L173F는 HBsAg의 173번 위치가 류신이 페닐알라닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0046] L175S는 HBsAg의 175번 위치가 류신이 세린으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0047] A184V는 HBsAg의 184번 위치가 알라닌이 발린으로 치환된 돌연변이 항원이고,
- [0048] I185M는 HBsAg의 185번 위치가 이소류신이 메티오닌으로 치환된 돌연변이 항원이고,

- [0049] W196L는 HBsAg의 196번 위치가 트립토판이 류신으로 치환된 돌연변이 항원이다.
- [0050] 상기 HBsAg의 WT 아미노산 서열(Genotype C)은 서열번호 44로 표시될 수 있으며, GenBank No. GQ872210.1에서도 서열정보를 확인할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 결합 분자는 카밧 방법(Kabat method)에 따라
- [0052] i) 서열번호 1의 CDR1 영역, 서열번호 2의 CDR2 영역, 및 서열번호 3의 CDR3 영역;
- [0053] ii) 서열번호 4의 CDR1 영역, 서열번호 5의 CDR2 영역, 및 서열번호 6의 CDR3 영역;
- [0054] iii) 서열번호 7의 CDR1 영역, 서열번호 8의 CDR2 영역, 및 서열번호 9의 CDR3 영역; 및
- [0055] iv) 서열번호 10의 CDR1 영역, 서열번호 11의 CDR2 영역, 및 서열번호 12의 CDR3 영역
- [0056] 으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0057] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 카밧 방법(Kabat method)에 따라 서열번호 1의 CDR1 영역, 서열번호 2의 CDR2 영역, 및 서열번호 3의 CDR3 영역; 및 서열번호 4의 CDR1 영역, 서열번호 5의 CDR2 영역, 및 서열번호 6의 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0058] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 카밧 방법(Kabat method)에 따라 서열번호 7의 CDR1 영역, 서열번호 8의 CDR2 영역, 및 서열번호 9의 CDR3 영역; 및 서열번호 10의 CDR1 영역, 서열번호 11의 CDR2 영역, 및 서열번호 12의 CDR3 영역을 포함하는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 가변영역의 CDR은 Kabat 등에 의해 고안된 시스템에 따라 통상적인 방법으로 결정되었다(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th), National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 본 발명에 사용된 CDR 넘버링은 Kabat 방법을 사용했지만, 이외에 IMGT 방법, Chothia 방법, AbM 방법 등 다른 방법에 따라 결정된 CDR을 포함하는 결합분자도 본 발명에 포함된다.
- [0060] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 서열번호 13 내지 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0061] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 서열번호 13으로 표시되는 가변영역 및 서열번호 14로 표시되는 가변영역을 포함한다.
- [0062] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 서열번호 15로 표시되는 가변영역 및 서열번호 16으로 표시되는 가변영역을 포함한다.
- [0063] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 서열번호 17 내지 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0064] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 서열번호 17로 표시되는 경쇄 및 서열번호 18로 표시되는 중쇄를 포함한다.

[0065] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 결합 분자는 서열번호 19로 표시되는 경쇄 및 서열번호 20으로 표시되는 중쇄를 포함한다.

[0066] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 결합 분자는 항체 또는 이것의 단편이다. 상기 항체는 Fab 절편, Fv 절편, 디아바디(diabody), 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있으나, 이것에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 HBsAg에 결합하는 완전한 인간 항체를 제공한다. 본 명세서에서 항체는 최대한 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 무손상(intact) 단일클론 항체, 다클론 항체, 2종 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중 특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편을 포함한다. 항체는 특이적인 항원을 인식하고 결합할 수 있는 면역계에 의하여 생성되는 단백질이다. 그 구조적인 면에서, 항체는 통상적으로 4개의 아미노산 쇄(2개의 중쇄 및 2개의 경쇄)로 이루어진 Y-형상의 단백질을 가진다. 각각의 항체는 주로 가변 영역 및 불변 영역의 2개의 영역을 가진다. Y의 팔의 말단 부분에 위치한 가변 영역은 표적 항원에 결합하고 상호작용한다. 상기 가변 영역은 특정 항원 상의 특이적 결합 부위를 인식하고 결합하는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. Y의 꼬리 부분에 위치한 불변 영역은 면역계에 의하여 인식되고 상호작용한다. 표적 항원은 일반적으로 다수의 항체 상의 CDR에 의하여 인식되는, 에피토프라고 하는 다수의 결합 부위를 가지고 있다. 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 각각의 항체는 상이한 구조를 가진다. 그러므로, 한 항원은 하나 이상의 상응하는 항체를 가질 수 있다.

[0067] 아울러 본 발명은 상기 항체의 기능적 변이체를 포함한다. 항체들은 변이체들이 B형 간염 바이러스 또는 이것의 표면항원(HBsAg)의 서브타입에 특이적으로 결합하기 위해 본 발명의 항체와 경쟁할 수 있다면 본 발명의 항체의 기능적 변이체로 간주된다. 기능적 변이체는 1차 구조적 서열이 실질적으로 유사한 유도체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 예를 들면, 생체외(in vitro) 또는 생체내(in vivo) 변형, 화학약품 및/또는 생화학 약품을 포함하며, 이들은 본원 발명의 부모 단일클론 항체에서는 발견되지 않는다. 이와 같은 변형으로는 예를 들어 아세틸화, 아실화, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유 결합, 가교, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 수산화, 메틸화, 산화, 페길화, 단백질 분해 및 인산화 등이 포함된다. 기능적 변이체는 선택적으로 부모 항체의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산의 치환, 삽입, 결실 또는 그들의 조합을 함유하는 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다. 더욱이 기능적 변이체는 아미노 말단 또는 카르복시 말단 중 하나 또는 모두에서 아미노산 서열의 절단체(truncated form)를 포함할 수 있다. 본 발명의 기능적 변이체는 본 발명의 부모 항체와 비교하여 동일하거나 다르거나, 더 높거나 낮은 결합 친화력을 가질 수 있지만, 여전히 B형 간염 바이러스 또는 이것의 표면항원(HBsAg)의 서브타입에 결합할 수 있다. 일 예로, 골격구조, 초가변(Hypervariable) 영역, 특히 CDR3 영역을 포함하나 이에 한정되는 것은 아닌 가변 영역의 아미노산 서열이 변형될 수 있다. 일반적으로 경쇄 또는 중쇄 영역은 3개의 CDR 영역을 포함하는, 3개의 초가변 영역 및 더욱 보존된 영역, 즉 골격 영역(FR)을 포함한다. 초가변 영역은 CDR로부터의 아미노산 잔기와 초가변 루프로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명의 범위에 속하는 기능적 변이체는 본 명세서의 부모 항체와 약 50%~99%, 약 60%~99%, 약 80%~99%, 약 90%~99%, 약 95%~99%, 또는 약 97%~99% 아미노산 서열 동질성을 가질 수 있다. 비교될 아미노산 서열을 최적으로 배열하고 유사하거나 또는 동일한 아미노산 잔기를 정의하기 위해 컴퓨터 알고리즘 중 당업자에게 알려진 Gap 또는 Bestfit를 사용할 수 있다. 기능적 변이체는 부모 항체 또는 그것의 일부를 PCR 방법, 올리고머 뉴클레오티드를 이용한 돌연변이 생성 및 부분 돌연변이 생성을 포함하는 공지의 일반 분자생물학적 방법에 의해 변화시키거나 유기합성 방법으로 얻을 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 또한, 상기 항체에 약물이 추가로 부착될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 항체는 약제가 결합된 항체-약물 접합체(conjugate)의 형태로 사용될 수 있다. 약물을 국소 전달하기 위해 항체-약물 접합체(ADC), 즉 면역접합체를 사용하게 되면 상기 약물 모이어티를 감염된 세포에 표적화 전달할 수 있는데, 상기 약물 작용제를 접합시키지 않은 채로 투여하게 되면, 정상 세포에 대해서도 허용될 수 없는 수준의 독성이 야기될 수 있기 때문이다. 약물-연결성 및 약물-방출성뿐만 아니라 폴리클로날 및 모노클로날 항체(mAb)의 선택성을 높임으로써 ADC의 최대 효능과 최소 독성을 개선할 수 있다.

- [0069] 약물 모이어티를 항체에 부착시키는, 즉 공유 결합을 통하여 연결시키는 통상적인 수단으로는, 일반적으로 약물 모이어티가 항체 상의 수 많은 부위에 부착되는 불균질한 분자 혼합물이 유발된다. 예를 들어, 세포독성 약물을 전형적으로, 종종 항체의 수많은 리신 잔기를 통하여 항체와 접합시켜 불균질한 항체-약물 접합체 혼합물을 생성시킬 수 있다. 반응 조건에 따라서, 이러한 불균질한 혼합물은 전형적으로, 약물 모이어티에 부착된 항체 분포도가 0 내지 약 8 이상이다. 또한, 특별한 정수비의 약물 모이어티 대 항체를 수반한 접합체의 각 아군은, 약물 모이어티가 항체 상의 각종 부위에 부착되는 잠재적으로 불균질한 혼합물이다. 항체는 크고, 복잡하며 구조적으로 다양한 생체 분자이고, 종종 많은 반응성 관능기를 갖고 있다. 링커 시약 및 약물-링커 중간체와의 반응성은 pH, 농도, 염 농도 및 조용매와 같은 요인들에 의해 좌우된다.
- [0070] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 상기 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 일 예로, 본 발명은 상기 항-HBsAg 단일클론 항체를 암호화하는 단리된 핵산 분자를 포함한다. 본 발명의 핵산 분자는 본 발명에서 제공하는 항체의 아미노산 서열을 당업자에게 알려진 바와 같이 폴리뉴클레오티드 서열로 번역된 핵산 분자 모두를 포함한다. 그러므로 ORF(open reading frame)에 의한 다양한 폴리뉴클레오티드 서열이 제조될 수 있으며 이 또한 모두 본 발명의 핵산 분자에 포함된다.
- [0071] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 상기 발현 벡터로는 셀트리온 고유의 발현 벡터인 MarEx 벡터(한국특허등록 제10-1076602호 참조) 및 상업적으로 널리 사용되는 pCDNA 벡터, F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL, Ti 벡터; 코스미드; 람다, 람다이드(lambdoid), M13, Mu, p1 P22, Q μ , T-even, T2, T3, T7 등의 파아지; 식물 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나에서 선택된 발현 벡터를 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 발현 벡터로 알려진 모든 발현 벡터는 본 발명에 사용 가능하며, 발현 벡터를 선택할 때에는 목적으로 하는 숙주 세포의 성질에 따른다. 숙주세포로의 벡터 도입시 인산칼슘 트랜스펙션, 바이러스 감염, DEAE-텍스트란 조절 트랜스펙션, 리포펙타민 트랜스펙션 또는 전기천공법에 의해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 당업자는 사용하는 발현 벡터 및 숙주 세포에 알맞은 도입 방법을 선택하여 이용할 수 있다. 발현 벡터는 하나 이상의 선별 마커를 함유할 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 선별 마커를 포함하지 않은 벡터를 이용하여 생산물 생산 여부에 따라 선별이 가능하다. 선별 마커의 선택은 목적하는 숙주 세포에 의해 선별되며, 이는 이미 당업자에게 알려진 방법을 이용하므로 본 발명은 이에 제한을 두지 않는다. 또한, 본 발명의 핵산 분자를 정제를 용이하게 하기 위하여 태그 서열을 발현 벡터 상에 삽입하여 융합시킬 수 있다. 상기 태그로는 핵사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 태그, myc 태그 또는 flag 태그를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 당업자에게 알려진 정제를 용이하게 하는 태그는 모두 본 발명에서 이용 가능하다.
- [0072] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 상기 발현 벡터가 형질 감염되어 B형 간염 바이러스에 중화 활성을 가지는 결합 분자를 생산하는 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 상기 포유동물 세포로 CHO 세포, F2N 세포, CSO 세포, BHK 세포, 바우스(Bowes) 흑색종 세포, HeLa 세포, 911 세포, AT1080 세포, A549 세포, HEK 293 세포 또는 HEK293T 세포 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 포유동물 숙주세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.
- [0073] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 상기 결합 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 상기 결합분자 이외에 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 당업자에게 이미 잘 알려져 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 조성물은 B형 간염의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다. 본 발명의 다른 일 구체예에서, 상기 조성물은 B형 간염의 진단용으로 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 조성물은 상기 결합분자와 함께 인터페론, 항-HBV 단일클론 항체, 항-HBV 폴리클로날 항체, 뉴클레오

시드 유사체, DNA 폴리머라제 저해제, siRNA 제제 또는 치료백신을 항바이러스 약물로서 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명의 결합 분자를 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 멸균 주사용액, 동결건조(lyophilized) 제형, 사전 충전식 주사(pre-filled syringe) 용액제, 경구형 제형, 외용제 또는 좌제 등의 형태로 제형화할 수 있으나, 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 진단 조성물에 사용되는 본 발명의 결합분자는 검출가능하게 표식되는 것이 바람직하다. 생분자들을 표식시키는 데 사용 가능한 다양한 방법들이 당업자에게 잘 알려져 있고, 본 발명의 범주 내에서 고려된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 표식 종류의 예로는 효소, 방사성 동위원소, 콜로이드금속, 형광 화합물, 화학발광 화합물 및 생발광 화합물이 있다. 통상적으로 사용되는 표식들은 형광물질(가령, 플루레신, 로다민, 텍사스 레드 등), 효소(가령, 고추냉이 퍼옥시다아제, β -갈락토시다아제, 알칼리포스파타아제), 방사성 동위원소(가령, 32 P 또는 125 I), 바이오틴, 디곡시게닌, 콜로이드 금속, 화학발광 또는 생발광 화합물(가령, 디옥세탄, 루미놀 또는 아크리디늄)을 포함한다. 효소 또는 바이오티닐기의 공유 결합법, 요오드화법, 인산화법, 바이오틴화법 등과 같은 표식 방법들이 당 분야에 잘 알려져 있다. 검출 방법들로는 오토라디오그래피, 형광 현미경, 직접 및 간접 효소 반응 등이 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 통상적으로 사용되는 검출 분석법으로는 방사성 동위원소 또는 비-방사성 동위원소 방법이 있다. 이들은 그 중에서도 웨스턴블롯팅, 오버레이-분석법, RIA(Radioimmuno Assay) 및 IRMA(ImmuneRadioimmunometric Assay), EIA(Enzyme Immuno Assay), ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), FIA(Fluorescent Immuno Assay) 및 CLIA(Chemiluminescent Immune Assay)이 있다.

[0077] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 B형 간염 바이러스에 감염된 대상에 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 B형 간염 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 치료 방법에 있어서, 당업자에게 알려진 치료제를 함께 투여할 수 있다. 본 발명의 치료 방법에 있어서, 투여 방법은 경구 및 비경구로 나눌 수 있으며, 일 예로 투여 경로는 정맥 내일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0078] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 치료 방법은 항-바이러스 약물을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 항-바이러스 약물은 인터페론, 뉴클레오시드/뉴클레오티드 유사체, 항-HBV 모노클로날 항체, 항-HBV 폴리클로날 항체, DNA 폴리머라제 저해제, siRNA 제제 또는 치료 백신일 수 있으나, 이것에 한정되는 것은 아니다. 상기 뉴클레오시드/뉴클레오티드 유사체는 라미부딘(lamivudine), 엔터카비어(entecavir), 클레부딘(clebudine) 또는 아데포비어(adeфовir dipivoxil)일 수 있으나, 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 대상에 상기 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 B형 간염 예방 방법에 관한 것이다. 본 발명의 예방 방법에 있어서, 당업자에게 알려진 예방제를 함께 투여할 수 있다. 본 발명의 예방 방법에 있어서, 투여 방법은 경구 및 비경구로 나눌 수 있으며, 일 예로 투여 경로는 정맥 내일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0080] 본 발명의 조성물을 인간을 포함하는 포유동물에게 투여함으로써 HBV 감염 및 HBV 감염에 의해 유발되는 질병을 예방 또는 치료할 수 있다. 이때, 상기 결합분자(예, 항체)의 투여량은 처리되는 대상, 질병 또는 상태의 심각도, 투여의 속도 및 처방 의사의 판단에 따른다. 유효성분으로서 상기 결합 분자는 포유동물에 대해 하루 0.001 내지 10 mg/kg(체중), 또는 0.005 내지 1 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다. 경우에 따라, 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.

[0081] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 i) 샘플과 상기 조성물을 접촉시키는 단계; 및 ii) 상기 조성물과

샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명의 진단 방법에 있어서, 본 발명의 결합 분자(예, 단일클론 항체)는 진단 검출을 위하여 필요에 따라 표지 물질을 접합시킬 수 있으며 이는 당업자에게 이미 공지된 사항이다.

[0082] 본 발명의 진단 방법에 있어서, 상기 샘플은 대상의 가래, 침, 혈액, 땀, 폐 세포, 폐 조직의 점액, 호흡기 조직 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 당업자에게 알려진 통상적인 방법으로 샘플 준비가 가능하다.

[0083] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 i) 샘플과 상기 조성물을 접촉시키는 단계; 및 ii) 상기 조성물과 샘플의 반응을 검출하는 단계를 포함하는 환자의 B형 간염 바이러스 감염 여부 진단을 위해 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0084] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 i) 상기 조성물; 및 ii) 용기를 포함하는 B형 간염 바이러스 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 진단용 키트에 있어서, 상기 2)의 용기에는 고체 담체가 포함된다. 본 발명의 결합분자는 고체 담체에 부착될 수 있고, 이와 같은 고체 담체로는 다공성 또는 비다공성, 평면 또는 비평면일 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 환자로부터 유래한 샘플과 상기 조성물을 접촉시키는 단계를 포함하는 B형 간염 바이러스의 존재 여부를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0086] 이하 본 발명에서 사용되는 용어를 다음과 같이 정의한다.

[0087] "B형 간염 바이러스(HBV)"는 헤파드나바이러스(Hepadnaviridae) 과에 속하는 DNA 바이러스로서, 간경화와 간암의 주요 원인 인자이다.

[0088] "유전자형(genotype)"은 A, B, C, D, E, F, G, H 8종으로 분류되며, 8% 이상의 HBV 유전체의 염기서열 차이를 기준으로 나뉜다. 유전자형은 더 나아가서 유전자아형(subgenotype)으로 세분화되며, 이는 4% 이상의 유전체 염기서열 차이를 기준으로 한다. 이에 따라 각 유전자형은 A1-A5, B1-B5, C1-C5, D1-D4, E, F1-F4, G, H로 다시 분류될 수 있다.

[0089] "혈청형(subtype)"은 주요 결정기인 124-147번 아미노산의 *a* 결정기 (*a* determinant)와 122번 아미노산의 *d/y* 결정기, 그리고 160번 아미노산의 *w/r* 결정기에 의하여 *adw/adr/ayw/ayr*의 네 가지 주요 혈청형으로 분류된다. *a* 결정기는 모든 혈청형에 공통적으로 나타나고, *d/y*와 *w/r* 결정기는 각각 122번, 160번 아미노산이 lysine인지 arginine인지에 따라 상호배타적으로 나타난다. 이와 같은 주요 혈청형 외에, 현재는 여러 아미노산 위치의 아-결정기(sub-determinant)에 의해서 결정되는 다양한 아-혈청형이 알려져 있다. 예를들어, *w* 혈청형의 아형은 127번 아미노산이 proline, threonine, leucine인지에 따라 각각 *w1/2*, *w3*, *w4*으로 결정되며, 158번과 159번 또는 177번과 178번 아미노산의 변이 여부에 따라서 *q+* 혹은 *q-* 혈청형으로 분류될 수 있다. 이 밖에도 134번, 143번, 159번, 161번 그리고 168번 아미노산 등이 아-혈청형에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 요약하자면, HBV의 혈청형은 크게 *adw/adr/ayw/ayr* 네 가지로 분류 가능하며, 이는 세부적으로 *adw2*, *adw3*, *adw4q-*, *adrq+*, *adrq-*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*의 총 10가지로 세분화할 수 있다.

[0090] "B형 간염 바이러스 표면항원(Hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)"은 HBV의 세 가지 표면 단백질, 즉 L(preS1+preS2+S), M(preS2+S), S(small) 중 226개 아미노산으로 이루어진 S 단백질을 의미하며, virion과

22nm subviral particle을 구성하는 주요 요소이다. 전체적으로는 소수성(hydrophobic)을 띄지만 부분적으로 친수성(hydrophilic)을 나타내는 부위가 두 곳이 있다. 첫 번째 부위는 아미노산 서열 30-79까지인데 이 부위는 바이러스 내부에 존재하고, 두 번째 부위는 바깥으로 노출되어 있는 아미노산 서열 99-168까지이며 major hydrophilic region(MHR)이라 불린다. MHR에서 항원-항체 반응 시 중화항체의 주요적 부위가 되는 'a' 결정기는 124-147번 아미노산 위치에 있다.

[0091] 본 발명에서 사용되는 용어 "결합 분자"는 키메라, 인간화 또는 인간 단일클론 항체와 같은 단일클론 항체를 포함하는 온전한(intact) 이뮤노글로블린(immunoglobulin), 또는 항원에 결합하는 이뮤노글로블린, 예를 들면 인플루엔자 A 바이러스의 단량체 HA 또는 삼량체 HA와의 결합을 위해 온전한(intact) 이뮤노글로블린과 경쟁하는 이뮤노글로블린 단편을 포함하는 가변성 도메인 또는 기질과 결합 가능한 효소, 수용체, 단백질을 뜻한다. 구조와는 상관없이 항원-결합 단편은 온전한(intact) 이뮤노글로블린에 의해 인식된 동일한 항원과 결합된다. 항원-결합 단편은 결합 분자의 아미노산 서열의 2개 이상의 연속기, 20개 이상의 연속 아미노산 잔기, 25개 이상의 연속 아미노산 잔기, 30개 이상의 연속 아미노산 잔기, 35개 이상의 연속 아미노산 잔기, 40개 이상의 연속 아미노산 잔기, 50개 이상의 연속 아미노산 잔기, 60개 이상의 연속 아미노산 잔기, 70개 이상의 연속 아미노산 잔기, 80개 이상의 연속 아미노산 잔기, 90개 이상의 연속 아미노산 잔기, 100개 이상의 연속 아미노산 잔기, 125개 이상의 연속 아미노산 잔기, 150개 이상의 연속 아미노산 잔기, 175개 이상 연속 아미노산 잔기, 200개 이상의 연속 아미노산 잔기, 또는 250개 이상의 연속 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. "항원-결합 단편"은 특히 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일-쇄 항체(scFv), 2가(bivalent) 단일-쇄 항체, 단일-쇄 파지 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디, 테트라바디, 폴리펩티드로의 특정 항원에 결합하기에 충분한 이뮤노글로브린의 하나 이상의 단편을 함유하는 폴리펩티드 등을 포함한다. 상기 단편은 합성으로 또는 완전한 이뮤노글로블린의 효소적 또는 화학적 분해에 의해 생성되거나, 재조합 DNA 기술에 의해 유전공학적으로 생성될 수 있다. 생성 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0092] 본 발명에서 사용되는 "약제학적으로 허용 가능한 부형제"라는 용어는 용인 가능한 또는 편리한 투약 형태를 제조하기 위한 약물, 제제 또는 결합 분자와 같은 활성 분자로 조합되는 불활성 물질을 의미한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 비독성이거나, 적어도 독성이 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 이의 의도된 용도를 위해 허용될 수 있는 부형제이고, 약물, 제제 또는 결합 분체를 포함하는 제형화의 다른 성분과 양립할 수 있다.

[0093] 본 발명에서 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 인플루엔자 A 바이러스의 노출 전 또는 노출 후에 예방 또는 치료에 유효한 본 발명의 결합 분자의 양을 나타낸다.

발명의 효과

[0094] 본 발명의 결합 분자는 B형 간염 바이러스 표면항원(HBsAg)에 대한 우수한 결합 능력을 가짐으로써 HBV의 adw, adr, ayw, ayr 4가지 주요 아형 모두에 결합 가능하고 중화 효과를 나타내며, HBsAg의 다양한 돌연변이 항원에 까지 폭넓은 중화효과를 나타내므로, B형 간염 예방 및 치료에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0095] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 1차 선별한 16개 항체들 중 4번, 40번 항체의 B형 간염 바이러스 표면항원(HBsAg) 서브타입 adr에 대한 결합을 ELISA를 이용하여 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 1차 선별한 16개 항체들 중 4번, 40번 항체의 HBsAg 서브타입 ad, ay, adr, adw에 대한 결합을 ELISA를 이용하여 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 2차 선별된 12개 항체들 중 4번, 40번 항체의 a 결정기의 다양한 돌연변이

항원에 대한 반응성을 ELISA를 이용하여 확인한 결과이다.

도 4a 내지 4d는 본 발명의 일 실시예에 따라 3차 선별된 5개 항체들 중 4번, 40번 항체의 B형 간염 바이러스 4가지 유전자형 A, B, C, D에 대한 시험관 내 중화 실험 결과로서, real-time PCR 방법을 이용하여 세포 내의 바이러스 양을 증식하고 있는 HBV의 DNA 양으로 측정한 결과이다.

도 5a 내지 5d는 본 발명의 일 실시예에 따라 3차 선별된 5개 항체들 중 4번, 40번 항체의 B형 간염 바이러스 4가지 유전자형 A, B, C, D에 대한 시험관 내 중화 실험 결과로서, chemiluminescent immunoassay(CLIA) 방법을 이용하여 증식되어 세포 외로 배출된 바이러스 양을 HBsAg양으로 측정한 결과이다.

도 6a 내지 6d는 본 발명의 일 실시예에 따라 선별된 4번과 40번 항체의 경쇄 또는 중쇄를 클로닝한 벡터 맵을 각각 도시한 것이다.

도 7a, 7b는 본 발명의 일 실시예에 따라 선별된 4번과 40번 항체의 경쇄와 중쇄를 모두 포함하는 발현 벡터 맵을 각각 도시한 것이다.

도 8은 4번과 40번 항체의 7개 HBV 유전자형 A, B, C, D, E, F, H의 환자 유래 15개 HBV 표면항원 혈청 샘플에 대한 결합 활성을 sandwich ELISA로 확인한 결과이다.

도 9는 4번과 40번 항체의 4종류의 약제(라미부딘, 아테포비어, 클레부딘, 엔테카비어) 내성 바이러스에 대한 결합 활성을 sandwich ELISA로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 인용된 문헌은 본 발명의 명세서에 참조로서 통합된다.

[0097] 실시예

[0098] 실시예 1: 급성 B형 간염 회복 환자의 혈액으로부터 PBMC 분리

[0099] 혈액의 공여자는 혈액 검사를 통하여 과거 급성 B형 간염이 있었다 회복된 사람을 대상으로 하였으며 공여자 선정과 채혈 과정은 임상시험심사 위원회(IRB)의 승인을 받고 이루어졌다. 이들 공여자의 특징은 다음과 같다. (1) HBsAg 항원을 가지고 있지 않다. (2) HBsAg과 HBcAg에 대한 항체를 보유하고 있다. (3) 다른 전염성 바이러스 즉 anti-HCV 항체 및 anti-HIV 항체에 대하여 음성 반응을 보인다. 공여자 선정 후 B형 간염 백신을 접종하고 약 100 ml의 전혈을 채혈하여 lymphoprep™(Axis-Shield, Norway, 1114545) 방법을 사용하여 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 분리하였다. 분리된 PBMC는 인산 완충용액으로 3회 세척한 후, KM banker II(Cosmobio, Japan, KOJ-16092010) 냉동 배지(freezing medium)로 2×10^7 cells/ml 농도로 맞추어 액체 질소 탱크(Liquid Nitrogen Tank)에 보관되었다.

[0100] 실시예 2: 1차 단일클론 항체 선별

[0101] 항원 특이 항체를 분비하는 B 세포의 선별 방법은 Jin 등(Jin A. *et al.*, 2009. *Nat Med.* 15, 1088-1092)에 의해 설명된 방법을 이용하였다. 간략하게, 상기 실시예 1에서 분리된 PBMC를 준비된 마이크로어레이 칩 상의 각각의 웰에 1개씩 첨가하였다. 단일 세포로부터 분비된 항체는 미리 코팅(precoated)된 항-인간 IgG 항체에 의해 확인되었다. 이를 통해 선별된 항체 분비 세포(antibody secreting cell)를 대상으로 표지된 HBsAg 항원을 이용하여 HBsAg에 결합하는 항체의 분비 여부를 ELISPOT(enzyme linked immunospot assay: Sedgwick J.D., 2005, *Methods Mol Biol.* Vol.302, pp.314)으로 확인하였다. 확인된 개별 항체 분비 세포로부터 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 방법을 이용하여 항체의 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain) 유전자의 서열을 확보하였다. 확보된 중쇄 및 경쇄 DNA를 pcDNA 3.1(+) 발현 벡터(invitrogen, USA, V790-20)에 삽입하여 항체의 경쇄 및 중쇄를 각각 생산하는 발현 벡터를 제조한 후, 상기 제조된 경쇄 및 중쇄 생산 발현 벡터를 F2N 세포(한국등록특허 제10-1005967호, 특허권자: ㈜셀트리온)에 형질 감염시켰다. 그 후, 형질 감염된 F2N 세포에서

생산된 항체를 이용하여 하기 실시예 3에 기재된 ELISA 방법을 통해 HBsAg에 결합을 하는 항체 16개(3, 4, 5, 12, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 32, 34, 35, 37, 38, 40번)를 1차적으로 선별하였다. 이때에는 각 항체 샘플을 분리, 정제하지 않고 배지에 발현되어 있는 상태 그대로 연속 희석하여, 희석 배율에 따른 적절한 HBsAg와의 반응을 가지면서 비특이적 반응이 없는 모든 항체를 선별하였다.

[0102] 1차 선별된 16개 항체의 HBsAg에 대한 반응성을 재확인하고 2차 선별에 필요한 정제된 항체를 확보하기 위하여, 추출된 각 항체의 DNA로 부유배양 중인 F2N 세포주를 형질 감염시켜 단일 클론 항체를 생산하는 일시적 세포주를 제조하였다. 그 방법은 하기와 같다.

[0103] 세포 내 일시적 형질 감염을 위하여 양이온성 폴리머(cationic polymer)인 FreeStyle™ Max(Invitrogen, USA, 16447-100)를 사용하였으며, 제조사의 사용설명서에 따라 형질 감염을 수행하였다. 형질 감염 전날, EX-CELL 293 Serum free media(SAFC, LIK, 14571C, 이하 "EX-CELL 293 배지"라 칭함)에서 배양된 F2N 세포를 원심분리를 수행하여 Modified EX-CELL 293 배지(SAFC, LIK, 65237, 맞춤 주문 생산)를 이용하여, ml 당 1×10^6 개의 세포 농도로 250 ml Erlenmeyer Flask에 80 ml 또는 1 l Erlenmeyer Flask에 200 ml 접종하였다. 형질 감염 당일, 80 ml 접종한 경우, 단일클론 항체를 코딩하는 DNA 100 μ g와 FreeStyle™ Max 시약 100 μ l을 각각 OptiPRO SFM II(Invitrogen, USA, 12309) 배지를 이용하여 1.6 ml volume으로 희석한 후, 가볍게 혼합하여 주었다. 200 ml 접종한 경우, DNA 250 μ g와 FreeStyle™ Max 시약 250 μ l를 각각 OptiPRO SFM II 배지를 이용하여 4 ml volume으로 희석한 후, 가볍게 혼합하여 주었다. 각각 혼합한 후, 즉시 희석된 FreeStyle™ Max 시약 용액을 DNA가 희석되어 있는 용액과 혼합한 다음, 상온에서 19분 반응하였다. 상온에서 19분 반응하는 동안, 전날 접종된 F2N 세포를 신선한 Modified EX-CELL 293 배지를 이용하여 ml 당 0.8×10^6 개의 세포 농도로 희석하였으며, 19분 반응 후, DNA와 FreeStyle™ Max 시약 혼합 용액을 F2N 세포에 처리함으로써 형질 감염을 진행하였다. 형질 감염 다음날, 동량의 EX-CELL 293 배지를 형질 감염된 세포에 첨가하여 7-8일 동안 배양함으로써 단일클론 항체를 생산하였다.

[0104] 최종적으로 분리, 정제된 16개 항체의 항원(HBsAg)에 대한 결합력은 ELISA를 이용하여 재확인하였으며, 그 중 4번, 40번 항체의 결과는 도 1과 같다. 1차 선별에 사용된 항원은 모두 CHO 세포에서 발현된 HBsAg *adr* 서브타입으로서, 이 항원에 대해서 결합력을 가지는 항체들은 기본적으로 *adr* 서브타입에 대하여 특이적으로 반응하는 것으로 간주할 수 있다.

[0105] 실시예 3: 2차 단일클론 항체 선별

[0106] 1차적으로 선별된 16개의 항체들의 HBsAg 서브타입에 따른 특이성을 확인하고, *adw*, *adr*, *ayw*, *ayr* 4가지 주요 서브타입에 대해 모두 반응하는 항체를 2차적으로 선별하고자, 다양한 서브타입의 HBsAg을 확보하여 ELISA를 진행하였다. *d/y* 결정기에 대한 결합 특이성을 확인하기 위하여 사용한 HBsAg *ad/ay* 서브타입은 Acris사(독일)로부터 구입하였다. 이 두 항원은 B형 간염 환자의 혈액으로부터 분리된 것들이다. *adw/adr* 서브타입의 HBsAg의 경우, *d/r* 결정기에 대한 결합 특이성 확인을 위하여 사용되었고 ProspecBio사(이스라엘)에서 구매한 제조합 단백질이다.

[0107] 항체의 항원(HBsAg)에 대한 반응성은 항원과 항체를 이용한 효소결합 면역흡수 분석법(ELISA)에 의해 측정되었다. 자세한 방법은 하기와 같다.

[0108] 먼저 100 μ l의 HBsAg *ad/ay* 또는 *adw/adr* 서브타입 항원(400 ng/ml)을 각각 96-웰 마이크로타이터 플레이트(Nunc, Denmark, 449824)의 웰에 흡착시켰다. 상기 플레이트를 1 % 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 함유된 인산 완충용액(Teknova, USA, D5120)으로 처리하여 블로킹한 후, 1 μ g/ml로 희석한 항체 샘플을

플레이트의 각 웰에 추가하였다. 이후, 실온에서 1 시간 반응(incubation)시킨 다음, 과산화효소가 표지된 염소의 항-인간 감마 항체(Zymed, USA, 62.8420)로 감지하였다. 실온에서 1시간 반응 후 테트라메틸벤즈이딘(Tetramethylbenzidine: TMB, Sigma-Aldrich, USA, T0440)과 반응시키고, 본 반응을 1 N H₂SO₄로 중지시켰다. 플레이트 리더기(Spectramax plus 384, Molecular Device)를 사용해 450/620 nm에서 흡광도를 측정하고, 그래프패드 프리즘 프로그램(GraphPad Software Inc. U.S.A.)을 이용하여 항원-항체 간 반응성을 그래프로 나타내었다. 항체의 반응성은 흡광도 값 0.5를 기준으로 하여 그 이상일 경우 양성, 그 미만일 경우 음성으로 판단하였다.

[0109] 실험 결과, 16개 항체 중 4 종류의 항체는 μ 결정기 또는 γ 결정기를 각각 혹은 동시에 인식하지 못하였으나, 나머지 12개의 항체들은 모두 항원의 서브타입에 관계없이 잘 반응하였다. 이 중 4번과 40번 항체의 HBV 표면항원 서브타입에 대한 특이성 결과는 도 2에서 보여지는 바와 같다.

[0110] 표 1은 상기의 결과를 종합하여 정리한 것이다. 양성은 +, 음성은 - 기호로 각각 나타내었다.

표 1

[0111] 4번과 40번 항체의 서브타입 특이성을 밝히기 위한 ELISA 실험 결과

HBsAg	4	40
ad	+	+
ay	+	+
adr	+	+
adw	+	+

[0112] 실시예 4: α 결정기의 다양한 돌연변이 항원에 대한 결합 활성 조사

[0113] 상기 실험에 의해 선별된 12개 항체들의 α 결정기 상의 8 가지 돌연변이 항원에 대한 반응성을 확인하고자 상기 실시예 3에서 설명한 것과 동일한 방식으로 ELISA를 수행하였다. 이 항원들은 각각 126, 129, 133, 143번 아미노산 위치에서 변이를 갖고 있는 것들로서, 실제로 만성 B형 간염 환자에서 보고된 바 있는 Hepatitis B Immune globulin(HBIG) 또는 백신에 대한 회피 돌연변이에서 발견된 것일 뿐만 아니라 진단에 있어서도 표면항원의 측정이 제대로 되지 않는 등의 문제를 일으키는 것들이다(Horvat et al., Labmedicine, vol. 42(8): 488-496, 2011). 이 항원들의 제조할 단백질은 상기한 ProspeBio사로부터 구입하였다.

[0114] 도 3은 α 결정기 돌연변이 항원에 따른 4번과 40번 각항체의 반응성을 나타낸 것으로, 그 결과는 반응성의 유무에 따라 양성(+) 및 음성(-)으로 구분하여 표 2로 정리하였다.

표 2

[0115] 4번과 40번 항체의 α 결정기 돌연변이 HBsAg에 대한 결합 활성 확인 ELISA 결과

HBsAg	4	40
adw T126N	+	+
adw Q129H	+	+
adw M133H	+	+
adw T143K	+	+

[0116] 실시예 5: B형 간염 바이러스에 대한 시험관내 중화 효력 검증

[0117] 12개의 항체 중 α 결정기 돌연변이 항원에 대한 반응성이 우수한 다섯 종류의 항체만 다시 선별하여 다양한 유

전자형의 B형 간염 바이러스에 대한 중화력을 검증하기 위하여 시험관내 중화 실험(in vitro neutralization assay)을 수행하였다.

[0118] HBV에 대한 시험관내 중화 실험은 인간 간세포에 바이러스를 감염시킬 때 각 항체의 처리 조건에 따라서 얼마나 감염이 저해되는가를 바이러스 증식이 가장 활발한 시점에서 세포 내와 세포 외의 바이러스 양을 측정함으로써 항체의 중화력을 평가하는 방법이다. 세포 내의 바이러스 양은 증식하고 있는 HBV의 DNA양으로 측정하였고, 증식되어 세포 외로 배출된 바이러스 양은 배지 내의 HBV DNA양과 HBsAg양으로 측정하였다. 이때 HBV DNA는 TaqMan probe를 이용한 realtime-PCR 방법으로, HBsAg은 chemoluminescent immunoassay(CLIA) 방법으로 정량하였다.

[0119] 5-1. 1차 시험관내 중화 실험

[0120] B형 간염 바이러스의 감염에 필요한 인간 간세포는 바이러스 접종 하루 전날 인간화된 간조직을 갖고 있는 키메라 마우스(uPA/SCID mouse with humanized liver)로부터 두 단계의 콜라게네이즈 퍼퓨전(collagenase perfusion) 방법을 통하여 준비되었다. 분리된 간세포는 제1형 콜라겐이 도포되어 있는 24-웰 플레이트에 웰당 4×10^5 개씩 깔아주었고, 이때 배지로는 10% FBS(Atlas Biologicals, USA, F0500A), 1X 페니실린/스트렙토마이신(pecinillin/streptomycin; Gibco, USA, 15140)과 20 mM 헤페스(HEPES; Gibco, USA, 15630)가 포함된 DMEM(Gibco, USA, 11965)이 각 웰당 500 μ l씩 사용되었다. 준비된 간세포는 37°C의 5% CO₂ 습윤(humidified) 세포배양기에서 24시간 배양되었다.

[0121] 바이러스 감염은 인간화된 간조직을 갖고 있는 키메라 마우스에서 생산된 A(Genebank accession number: AB246345.1), B(Genebank accession number: AB246341), C(Genebank accession number: AB246338.1), D(Genebank accession number: AB246347) 4 가지 유전자형(genotype)의 HBV를 사용하여 이루어졌으며, 선별된 항체와 혼합된 상태로 웰당 2×10^6 개 바이러스의 농도로 세포에 처리되었다. 자세한 과정은 다음과 같다.

[0122] A. 바이러스 접종 혼합물의 준비

[0123] dHCGM 배지(DMEM+10% FBS, NaHCO₃ 44mM, L-proline 15 ug/ml, insulin 0.25 ug/ml, dexamethasone 50nM, EGF 5 ng/ml, Asc-2p 0.1 mM, DMSO 2%)를 이용하여 최종 100 μ l가 되도록 바이러스와 각 항체를 섞어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 때 바이러스는 2×10^6 개가 되도록 하였고, 선별된 각 항체는 10, 1, 0.1, 0.01 ug/ml의 4 가지 농도가 되도록 희석하였다.

[0124] B. 바이러스 접종

[0125] 125 μ l의 dHCGM 배지에 25 μ l의 40% PEG(Sigma, USA, P1458)를 섞은 후, A에서 준비한 바이러스/항체 혼합물을 넣어줌으로써 최종적으로 250 μ l의 접종 혼합물을 준비하였다. 준비된 세포로부터 배지를 제거한 후 접종 혼합물을 넣어주었고, 그 후 24시간 동안 배양하였다.

[0126] C. 배지 교환 및 배양, 분석 샘플의 준비

[0127] 바이러스의 접종 후 간세포는 총 12일 동안 배양되었으며, 1일, 2일, 7일째에 세포의 washing 및 배지의 교환이 이루어졌다. 기존의 배양액을 제거한 다음 500 μ l의 DMEM+10% FBS로 위상을 수행하였고, 동일한 양의 dHCGM 배지를 새로 넣어주었다. 그리고 7일째 배지 교환의 경우, 기존의 배양액은 세포로부터 새로 생산되어 배출된 세포 외 HBsAg과 HBV DNA 정량을 위해서 각각 300 μ l와 30 μ l씩 모아 두었고 분석 시점까지 -20°C에 보관되었다.

[0128] 12일의 배양기간이 끝난 후에는 세포와 배양액 모두가 세포 내/외의 바이러스 정량 분석에 사용되었다. 배양액

은 기존과 동일한 방식으로 HBsAg 측정용과 HBV DNA 측정용으로 나뉘서 채취되었으며, 세포는 각 웰을 500 μ l의 DMEM+10% FBS로 1회 세척한 후 500 μ l의 SMITEST(Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) solution을 넣어서 용해시키는 방식으로 채취되었다. HBV DNA의 추출은 제조사(Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.)의 프로토콜에 따라서 이루어졌다.

D. 샘플 분석

HBV DNA 정량은 TaqMan probe, TaqMan PCR Core Reagents(Life Technologies, USA), 그리고 ABI Prism 7500 sequence detector system(Applied Biosystems, USA)을 이용한 realtime-PCR 방법으로 수행되었다. HBsAg 정량은 CLIA 방법을 사용한 자동화 시스템인 ARCHITECT(Abbott, USA)로 이루어졌다.

표 3

HBV 정량을 위한 realtime-PCR용 primer/probe 서열

Primer/Probe	서열	서열번호
Forward primer	CACATCAGGATTCCTAGGACC	41
Reverse primer	AGGTGTTGGTGAGTGATTGGAG	42
TaqMan probe	CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC (Dye: FAM for 5', TAMRA for 3')	43

표 4

Realtime-PCR 프로그램

Program	Cycle
50℃ 2min	1
95℃ 10min	1
95℃ 20sec → 60℃ 1min	53
Threshold	0.1

4번과 40번 항체에 대한 실험 결과는 도 4a 내지 4d, 5a 내지 5d에서와 같이 각 측정 항목에 따라 바이러스의 유전자형(genotype)별로 구분하여 나타내었다.

우선 각 항체의 처리 농도에 따른 세포 내 HBV DNA양을 비교 분석해 보면, 실험에 사용된 5종류의 항체들이 유전자형 C로 구분되는 HBsAg의 *adr* 서브타입에 대한 결합력을 기준으로 1차 선별된 것들이기 때문에 유전자형 C에 대해서는 모두 강한 중화력을 가진 것을 확인할 수 있었다. 양성대조용으로 사용된 HBIg가 음성대조용으로 사용된 anti-Her2 항체(CT-P6)에 비해서 400배 이상의 HBV DNA양 감소를 보여준 상황에서, 그 처리량의 1/10인 40번 항체의 1 ug/ml 처리 샘플에서도 동일한 수준의 바이러스 DNA 감소를 보여주었다. 4번 항체의 경우는 0.1 ug/ml의 낮은 농도 처리에서도 100배에 이르는 HBV DNA 감소를 보여줌으로써 비교적 높은 수준의 중화력을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 4번과 40번 항체는 특히 A, B 유전자형에 대해서는 양성대조군인 HBIg보다 최고 중화력에서 두 배 이상 앞서는 월등한 효력을 나타내었고, D 유전자형에 대해서는 중화효력이 1 ug/ml (40번 항체) 또는 0.1 ug/ml (4번 항체)의 낮은 농도에서도 높게 유지되었다(도 4a 내지 4d).

상기한 4번, 40번 항체의 A, B, C, D 4가지 유전자형에 대한 중화 효력의 특징은 배양액에서 측정한 세포 외 HBsAg의 정량 결과에도 매우 유사하게 반영되어 있는 것으로 밝혀졌다(도 5a 내지 5d).

이상의 결과를 종합하자면, 여러 단계를 거쳐서 선별된 5 종류의 항체로 A, B, C, D 4가지 유전자형의 HBV에 대하여 시험관내 중화 효력 검증을 실시하였고, 그 결과 4번과 40번 항체가 사용된 모든 바이러스에 대하여 높은

수준의 중화력을 지닌 것으로 확인되었다.

[0137] **실시에 6: 선별된 4번, 40번 항체의 발현벡터 및 생산 세포주 제조**

[0138] **6-1. 발현 벡터의 제조**

[0139] 중쇄 유전자와 경쇄 유전자를 각각 포함하는 original pcDNA 플라스미드를 주형으로 하여 95℃ 1분 열변성 후 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분 조건으로 30cycle을 진행하는 중합효소연쇄반응 (PCR) 방법에 의해 중쇄 유전자와 경쇄 유전자를 각각 증폭하였다. 증폭된 중쇄 유전자와 경쇄 유전자에 제한효소 *Nhe* I과 *Pme* I을 처리한 후, 동일한 제한효소로 처리된 CT184 플라스미드와 pCT146 플라스미드에 각각 삽입하였다. pCT184 및 pCT146 플라스미드는 각각 항체의 중쇄와 경쇄를 클로닝하기 위해 제작된 셀트리온 고유의 벡터이다(도 6a 내지 6d). 이후, 중쇄 전사단위 (프로모터-중쇄 유전자-폴리A)와 경쇄 전사단위 (프로모터-경쇄 유전자-폴리A)를 함께 포함하는 발현벡터를 제작하기 위하여, 중쇄 유전자를 포함하는 pCT184 플라스미드에 제한효소 *Pac* I과 *Asc* I을 처리하여 중쇄 전사단위를 확보한 다음, 경쇄 유전자를 포함하는 pCT146 플라스미드에 동일한 제한효소를 처리하여 중쇄 전사단위를 삽입하여, 중쇄 전사단위와 경쇄 전사단위를 동시에 포함하는 플라스미드를 제작하였다 (도 7a, 7b). 제작된 플라스미드는 Endofree plasmid maxi kit (QIAGEN, Germany, Cat#12362)를 이용하여 추출되었고, 추출된 DNA를 이용하여 염기서열 분석을 통해 최종적으로 항체의 염기서열을 확인하였다.

[0140] **6-2. 생산 세포주의 제조**

[0141] 상기 추출된 항체의 DNA를 이용하여 CHO-K1 세포주에 형질 도입하여 단일클론 항체를 생산하는 세포주를 제조하였으며, 방법은 하기와 같다.

[0142] CHO-K1 세포 내 형질도입을 위하여 Lipofectamine LTX & PLUS (Invitrogen, USA, Cat# 15338-100)를 사용하였으며, 제조사의 사용설명서에 따라 형질도입을 수행하였다. 형질도입 전날, SFM4CHO 배양액 (Hyclone, Cat# SH30549.02)에서 배양된 CHO-K1세포를 10% dFBS (dialysis fetal bovine serum, Gibco, Cat#26400)가 포함된 MEM α 배지 (Gibco, Cat#12561)를 이용하여, well당 0.5×10^6 개의 세포 수로 6 well plate에 접종하였다. 형질도입 당일, 항체 DNA 2.5 ug과 PLUS시약 2.5 ul를 OptiPRO SFM II (Invitrogen, USA, 12309) 배지 500ul에 혼합 후 5분 뒤에 Lipofectamine LTX 시약 6.25 ul을 첨가하고 상온에서 30분 반응하였다. 상온에서 30분 반응하는 동안, 전날 접종된 CHO-K1 세포의 배양액을 MEM α 배지로 교환하였으며, 30분 반응 후, 항체 DNA와 Lipofectamine LTX 시약 혼합 용액을 CHO-K1세포에 처리함으로써 형질도입을 진행하였다. 형질도입 후 4시간 후에 10% dFBS가 포함된 MEM α 배지로 교환 후 3일 동안 배양하였다. 형질도입 후 3일 뒤 메토크세이트 (Methotrexate; MTX)가 포함된 SFM4CHO 배양액을 이용하여 well당 1000 개의 세포 수로 96 well plate에 접종하였다. 이후, 메토크세이트 처리 농도를 순차적으로 증가시키는 방법을 통하여 유전자 증폭을 유도함으로써, 항체 생산성이 높은 예비클론들을 선정하였다. 선정된 예비클론들을 이용하여 제어 희석 클로닝 (limiting dilution cloning)을 진행하여 단일 세포 유래 클론들을 확보하였다.

[0143] **실시에 7: 다양한 만성 B형 간염 환자 유래 유전자형 바이러스의 표면항원에 대한 결합 특성 조사**

[0144] 4번과 40번 항체가 실제로 전세계적으로 유행하는 다양한 유전자형의 바이러스에 대해서 결합하여 중화효력을 나타낼 수 있는지를 확인하고자, 환자 혈청 유래의 다양한 유전자형 바이러스의 표면항원으로 이루어져 있는 World Health Organization(WHO)의 reference panel(1st WHO International Reference Panel for HBV Genotypes for HBsAg Assays, PEI code 6100/09)을 사용하여 sandwich ELISA를 수행하였다. 해당 표준품의 상세 정보는 표5와 같으며, 실험 방법은 하기와 같다.

[0145] 두 항체를 항-인간 IgG Fc γ (gamma) 항체(Jackson ImmunoResearch, U.S.A, 109-006-098)가 코팅된 96-웰 마이크로타이틀 플레이트(Nunc, Denmark, 449824)의 각 웰에 2 ug/ml의 농도로 100 μ l씩 분주하여 흡착시켰다. 워싱 후, 상기 플레이트를 3 % 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 함유된 인산 완충용액(Teknova, USA,

D5120)으로 처리하여 블로킹하였다. 다시 워싱한 후, HBsAg genotype panel인 15개의 혈청 시료를 100 μ l씩 분주하여 37℃에서 90분간 반응(incubation)시켰다. 이때, 각 혈청 시료는 450/620 nm에서 흡광도 0.8~1.2 정도를 갖도록 1% BSA가 함유된 인산 완충용액(Teknova, USA, D5120)으로 적절히 희석하였다. 항체와 반응하여 붙어 있는 HBsAg를 감지하기 위하여 과산화효소가 표지된 토끼의 항-HBV 표면항원 항체(Thermo Scientific, U.S.A., PA1-73087)를 37℃에서 60분간 처리하였다. 발색 및 반응 정지, 그리고 흡광도 측정은 실시예 3, 4에서와 동일한 방법을 사용하였다. 두 항체의 각 유전자형 HBV 표면항원에 대한 반응성은 엑셀(Microsoft, U.S.A.)을 이용하여 그래프로 분석하였다(도 8).

[0146] 분석 결과, 4번과 40번 두 항체 모두 15개 HBsAg 샘플에 잘 결합하는 것을 확인하였다. 전술한 바와 같이, 이 표면항원 샘플들은 실제로 환자 혈액으로부터 제조된 혈청들이며, HBV의 전체 8개 유전자형 중 G형을 제외한 A부터 H형까지 7개 유전자형을 커버하고 있다. 또한, 여러 종류의 아유전자형이 존재하는 A, B, C, D, F형의 경우 각 유전자형별로 우세하게 퍼져있는 아유전자형 및 서브타입(혈청형) 샘플이 2~3개씩 포함되어 있는데, 이것은 실험에 사용된 WHO의 HBV 유전자형 패널이 실질적으로 전 세계에서 유행하는 대부분의 HBV 유전자형을 대변한다는 의미이다. 패널에는 유전자형 G가 빠져있으나, G의 경우는 현재까지 아유전자형이 보고된 바 없고 서브타입(혈청형)으로는 adw2로 분류가 되기 때문에 패널에 포함되어 있는 5개의 adw2 샘플에 대한 실험 결과로 G형에 대한 4번, 40번 항체의 결합 활성을 미루어 짐작 가능하다.

[0147] 따라서, 모든 15개 샘플에 4번과 40번 항체가 우수한 결합 활성을 보여준 것은 두 항체가 전 세계적으로 유행하고 있는 모든 유전자형의 HBV에 결합할 수 있고 그에 따른 중화력을 나타낼 수 있음을 의미한다.

표 5

[0148] 환자 유래 혈청 HBV 표면항원 panel의 상세 정보(1st WHO International Reference Panel for HBV genotypes for HBsAg assays, PEI code 6100/09)

Sample #	Origin	Genotype	sub-genotype	Subtype
1	South Africa	A	A1	adw2
2	Brazil		A1	adw2
3	Germany		A2	adw2
4	Japan	B	B1	adw2
5	Japan		B2	adw2
6	Japan	C	C2	adr
7	Japan		C2	adr
8	Russia		C2	adr
9	Germany	D	D1	ayw2
10	Russia		D2	ayw3
11	South Africa		D3	ayw2
12	West Africa	E	N/A	ayw4
13	Brazil	F	F2	adw4
14	Brazil		F2	adw4
15	Germany	H	N/A	adw4

[0149] **실시예 8: 다양한 약제 내성 바이러스에 대한 결합 특성 조사**

[0150] 만성 B형 간염 환자들에게 널리 사용되는 HBV 중합효소의 억제제인 라미부딘(lamibudine, LMV), 아데포비어(adeфовir, ADV), 클레부딘(clebudine, CLV), 엔테카비어(entecavir, ETV)에 대한 내성 돌연변이와 4번, 40번 항체 사이의 결합 특성을 상기 실시예 8에서 사용한 방법과 동일한 sandwich ELISA법을 사용하여 확인하였다. 실험에 사용된 야생형 바이러스를 비롯하여 모든 내성 돌연변이 바이러스는 해당 약물 치료에 대한 내성이 발생한 환자의 혈액으로부터 얻어낸 HBV DNA를 사용하여 건국대학교 의학전문대학원 약리학교실에서 클로닝된 것들로서, Huh7 세포주 혹은 HepG2 세포주를 사용한 형질도입 실험을 통하여 약제 내성이 실험적으로도 확인된 균주들이다(Ahn et al., Journal of Virology, 88(12): 6805-6818, 2014). 모든 바이러스는 유전자형 C형이며, 각

바이러스의 특징은 표 6과 같다.

- [0151] 이와 같이 준비된 각각의 HBV 발현벡터를 T75 플라스크(BD BioScience, 353136)에 키운 Huh7 세포주에 Lipofectamine2000(Life technologies, 11698019)을 이용하여 형질도입하였고, 3일 동안 배양하여 바이러스를 생산하였다. 생산된 바이러스는 Centricon(Millipore, U.S.A.)을 사용하여 농축하였고, 각 샘플의 바이러스 양은 Monolisa HBsAg Ultra(BioRad, 72346) ELISA kit를 사용하여 HBsAg양으로 비교한 후 서로 비슷한 값을 갖도록 적절하게 희석하여 실험에 사용하였다.
- [0152] 실험 결과, 4번 항체와 40번 항체 모두 라미부딘(LMV), 아데포비어(ADV), 클레부딘(CLV), 엔테카비어(ETV) 내성 바이러스에 야생형 바이러스와 동일한 수준으로 결합 활성을 갖는 것으로 나타났다(도 9 참조). 여기서 ADV 내성 바이러스에 대한 결합 활성이 상대적으로 조금 낮은 것처럼 보이나, 이것은 해당 샘플의 생산량 자체가 다른 샘플들에 비해서 약간 낮은 것에 기인하는 것으로 판단된다.
- [0153] 이와 같은 사실은 4번, 40번 항체가 실험에 사용된 각 약제 내성 바이러스 한 종류에 대해서뿐만 아니라, 해당 약제에 대해서 발생하는 대부분의 내성 바이러스에 대해서 결합 활성 및 중화 효능을 가질 수 있음을 의미한다. 왜냐하면, HBV에 약제 내성을 가져오는 변이는 표 6에서 확인할 수 있는 것처럼 HBV 폴리머라제의 reverse transcriptase(RT) 도메인의 특정 아미노산 변이와 관련이 있으며, 이러한 변이는 약제 별로 매우 특이적으로 발생하기 때문이다. 이러한 특이적인 폴리머라제의 변이는 유전자를 공유하는 HBV의 특성상 HBsAg의 특이적 변이를 동반하기도 하는데, 가령 폴리머라제의 rtM204I 변이는 HBsAg의 W196L 변이를, rtA181V 변이는 HBsAg의 L173F 변이를 가져오게 된다(표 6 참조). 4번과 40번 항체는 약제 내성 변이에 동반되는 이들 표면항원의 변이에 상관없이 잘 결합함을 확인하였다.
- [0154] 또한, 이 실험에서 사용된 각 내성 바이러스들은 위에서 언급한 내성 특이적인 표면항원의 변이에 더하여 비특이적으로 발생한 많은 표면항원의 변이를 갖고 있다(표 6 참조). 이 실험의 결과는 4번, 40번 항체가 HBsAg의 Q101R, K112R, I126S, L175S, A184V, I185M 위치에 변이가 있는 바이러스에 결합 및 중화 활성을 가질 수 있음을 나타낸다.

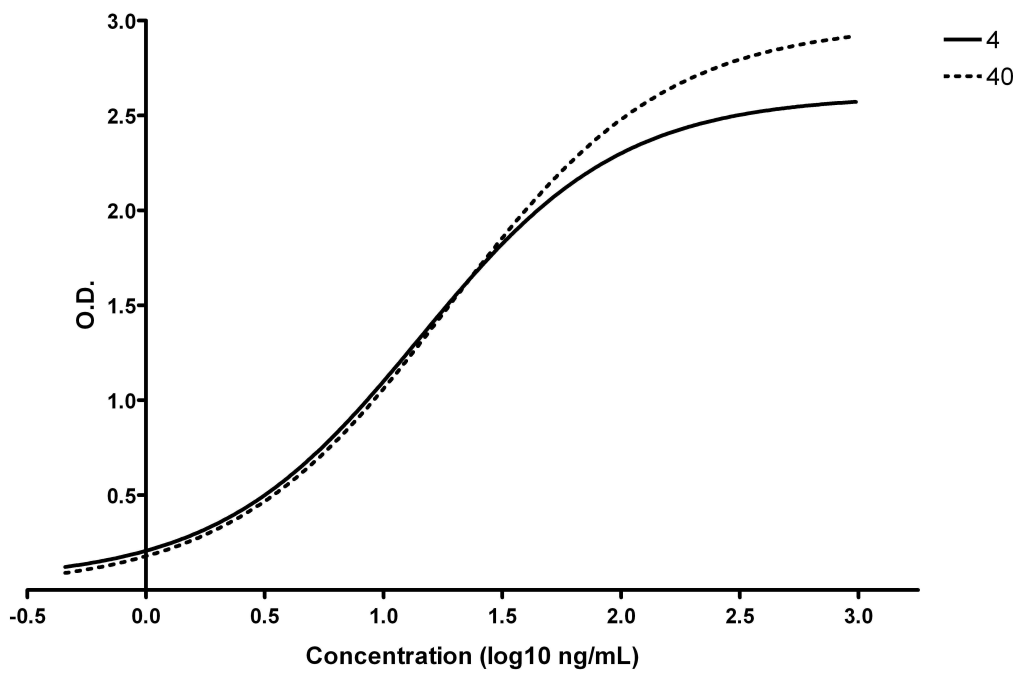
표 6

- [0155] 실험에 사용된 약제 내성 바이러스 정보

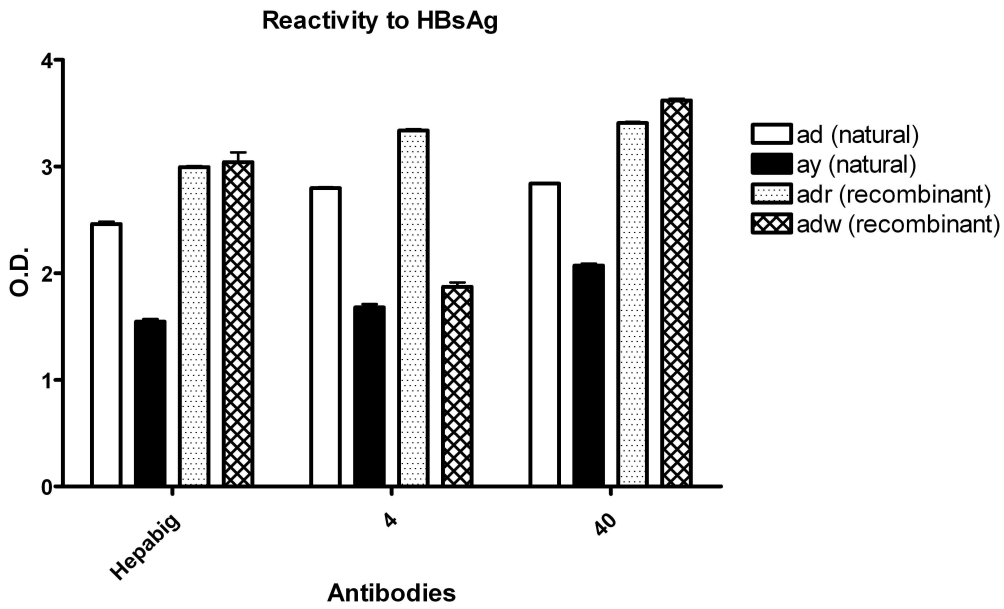
Strain	HBV polymerase의 돌연변이 위치 (RT domain)	HBsAg의 돌연변이 위치
Wild type (genotype C)	N/A	N/A
라미부딘(LMV) 내성 바이러스	L80I, M204I	W196L
아데포비어(ADV) 내성 바이러스	A181V	I126S, L173F, L175S
클레부딘(CLV) 내성 바이러스	M204I	Q101R, I126S, A184V, W196L
엔테카비어(ETV) 내성 바이러스	L180M, M204V	Q101R, K112R, I185M

도면

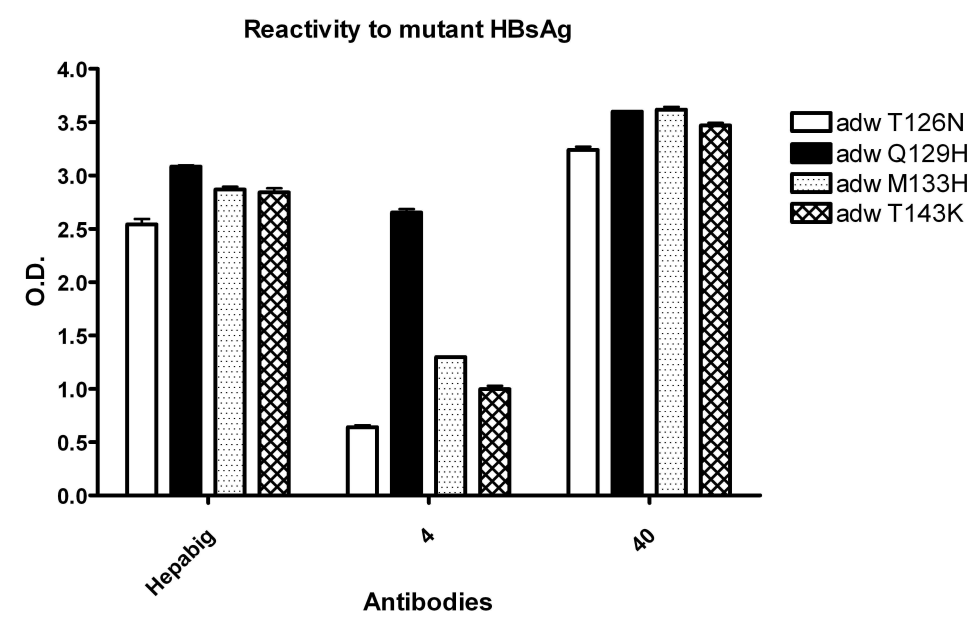
도면1



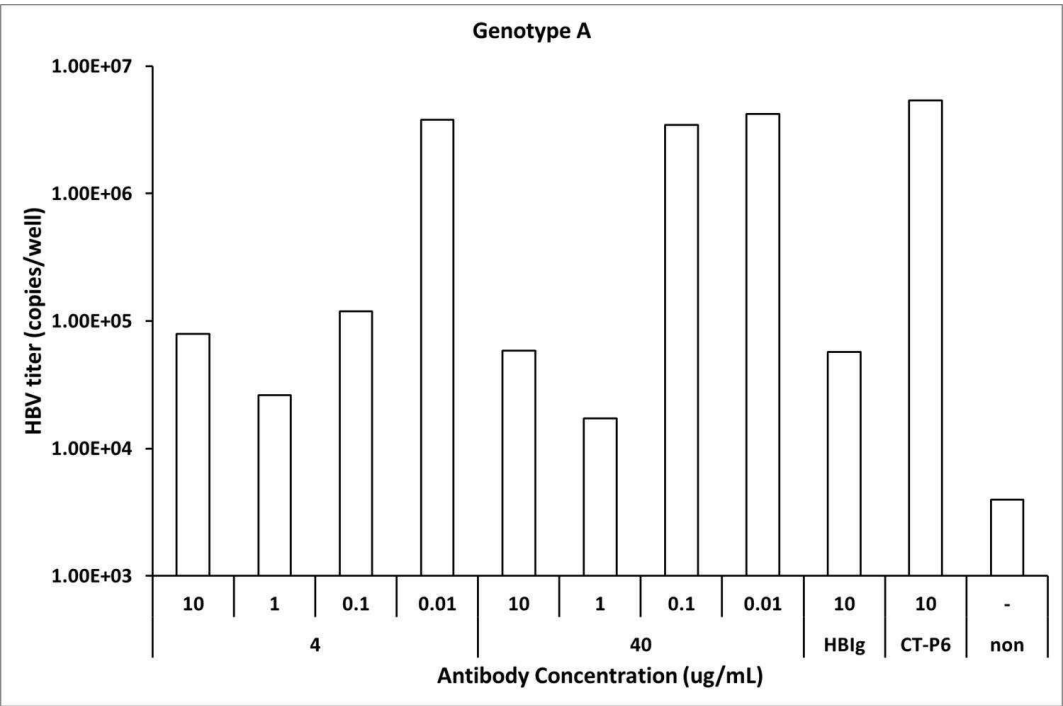
도면2



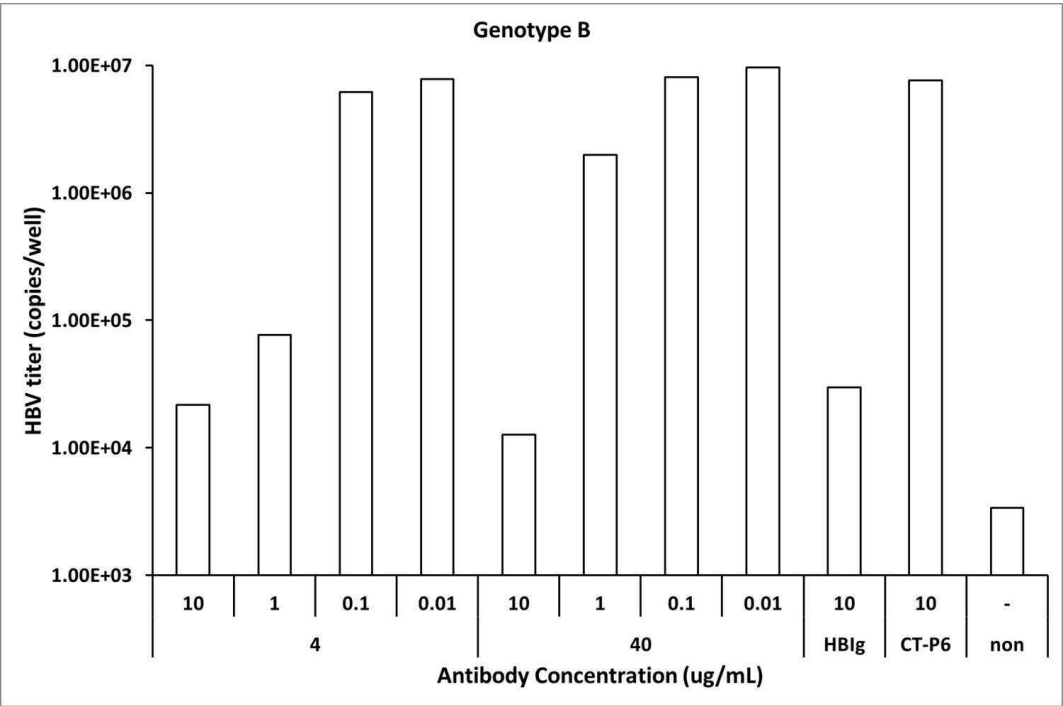
도면3



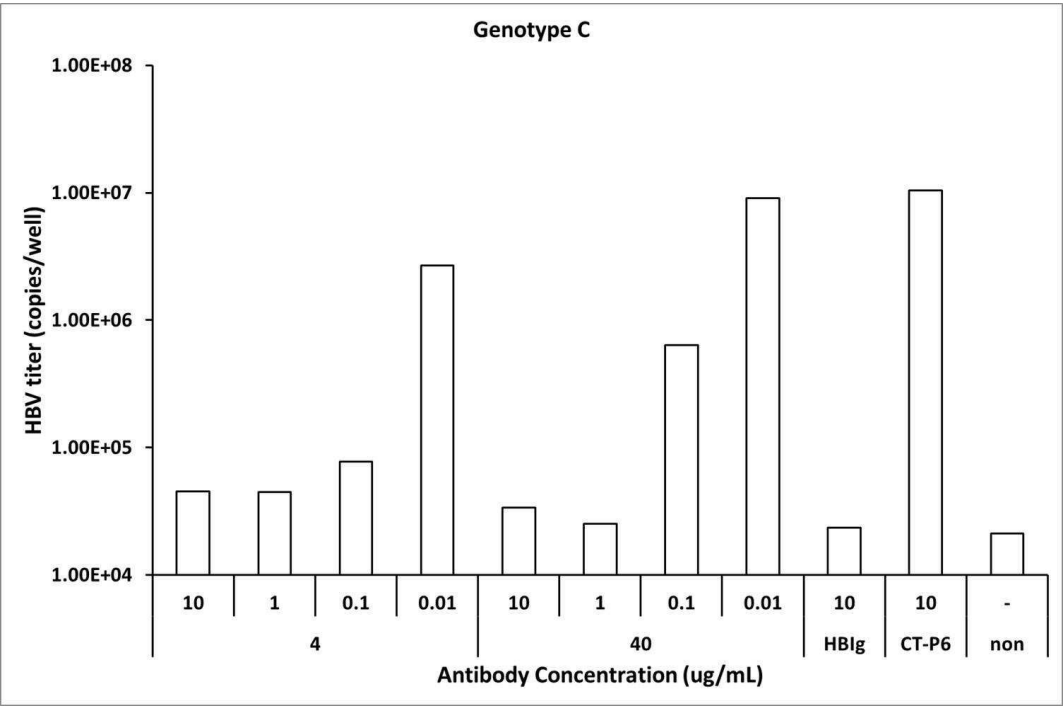
도면4a



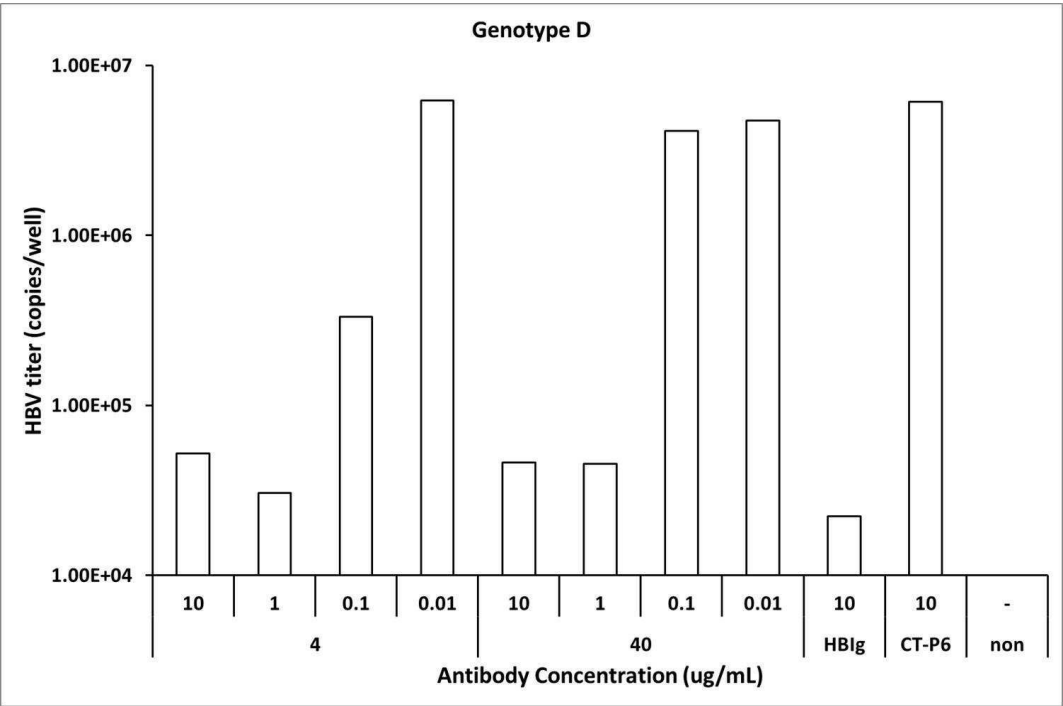
도면4b



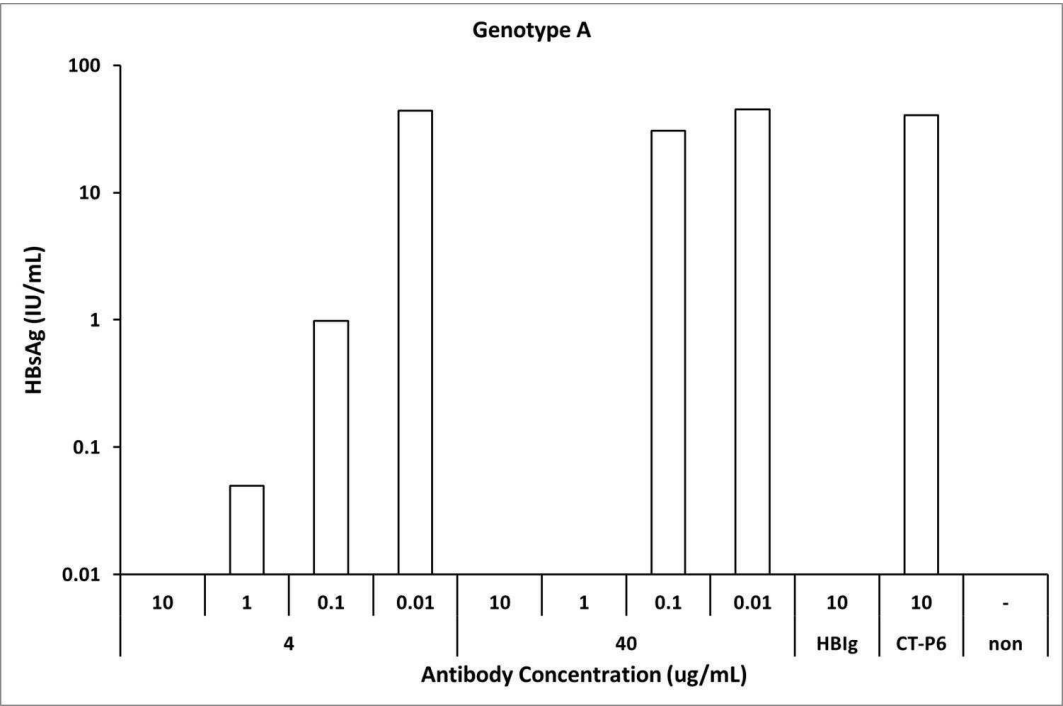
도면4c



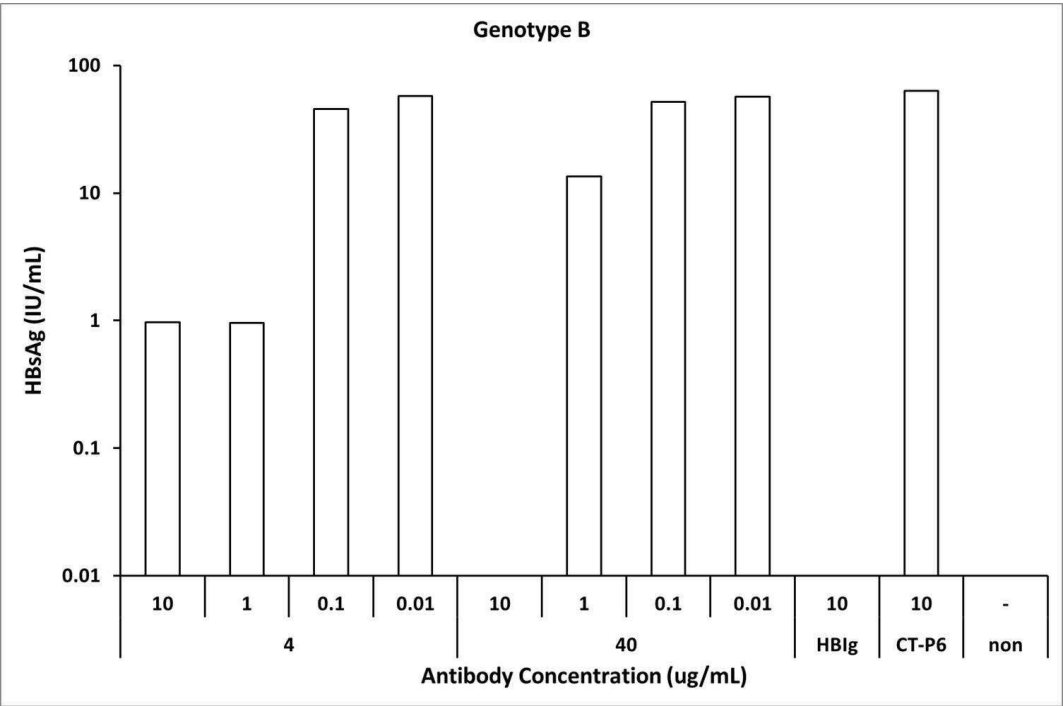
도면4d



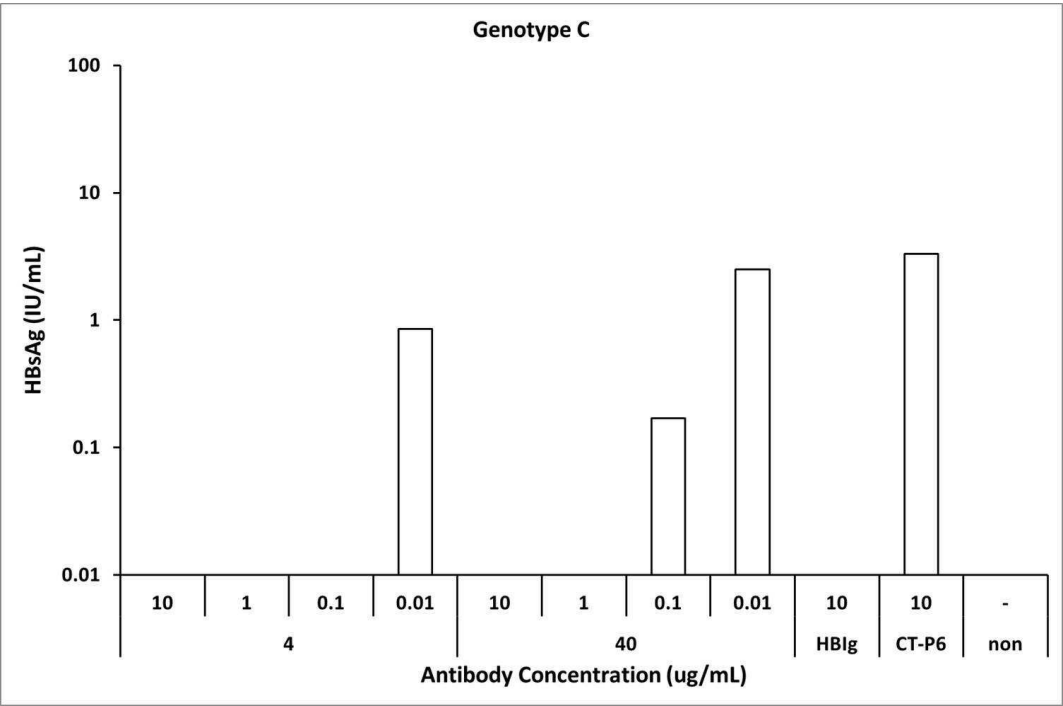
도면5a



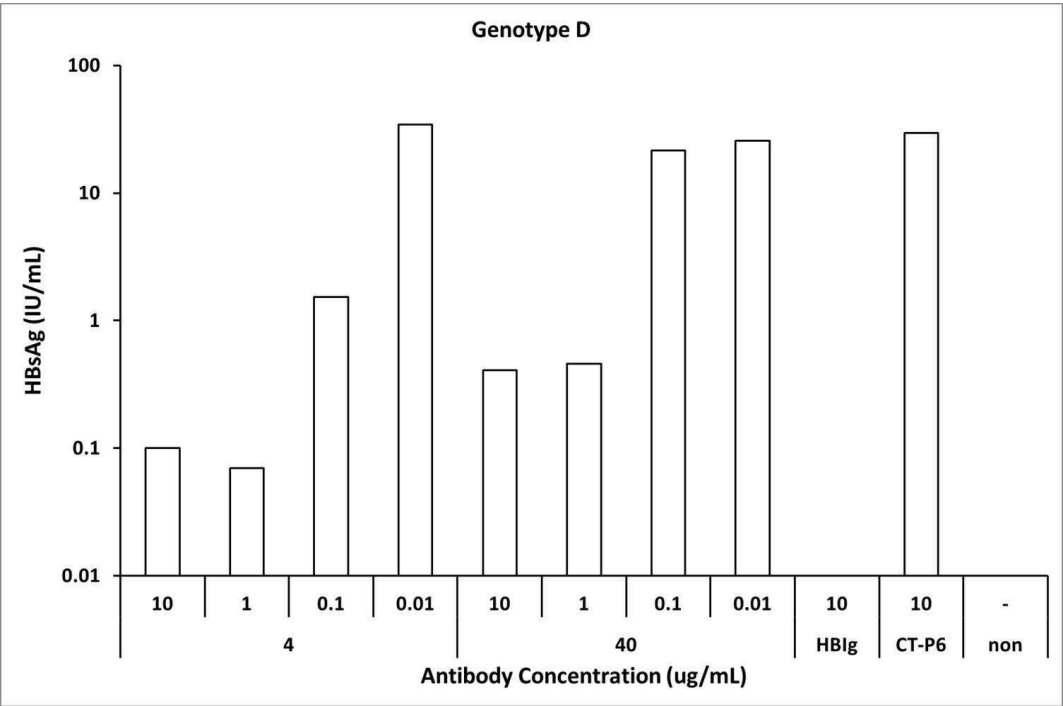
도면5b



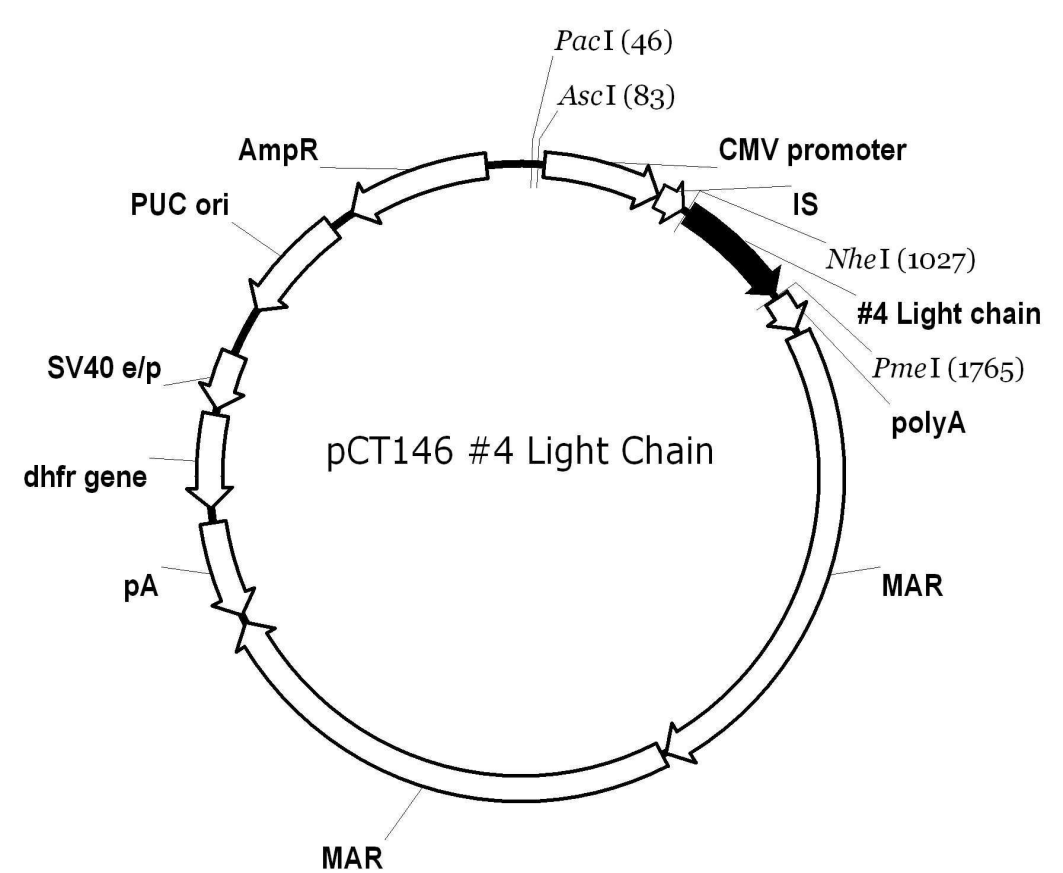
도면5c



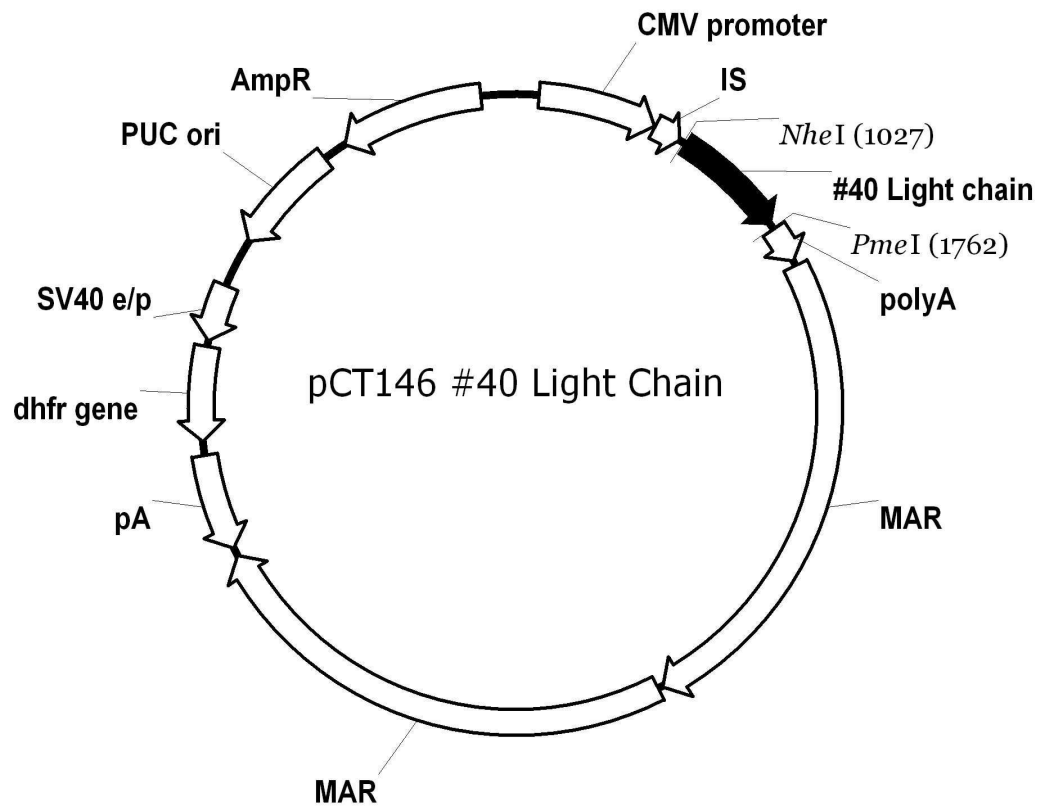
도면5d



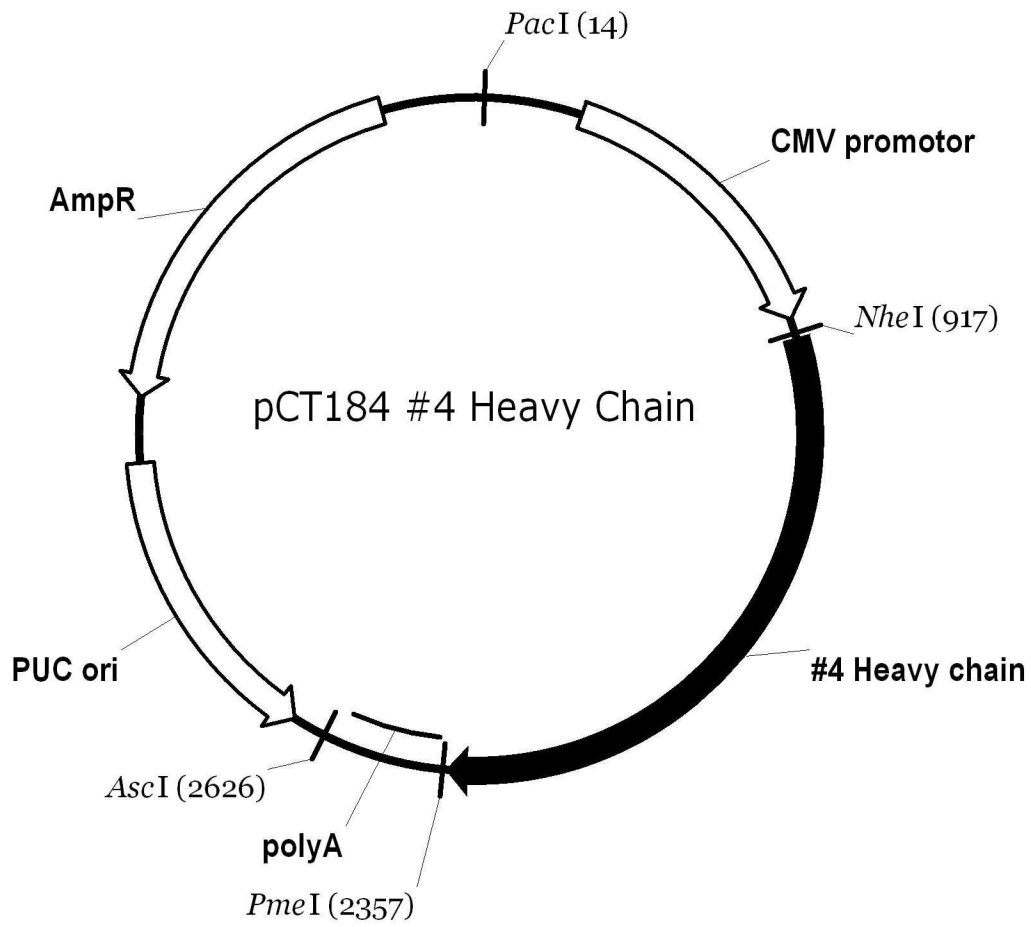
도면6a



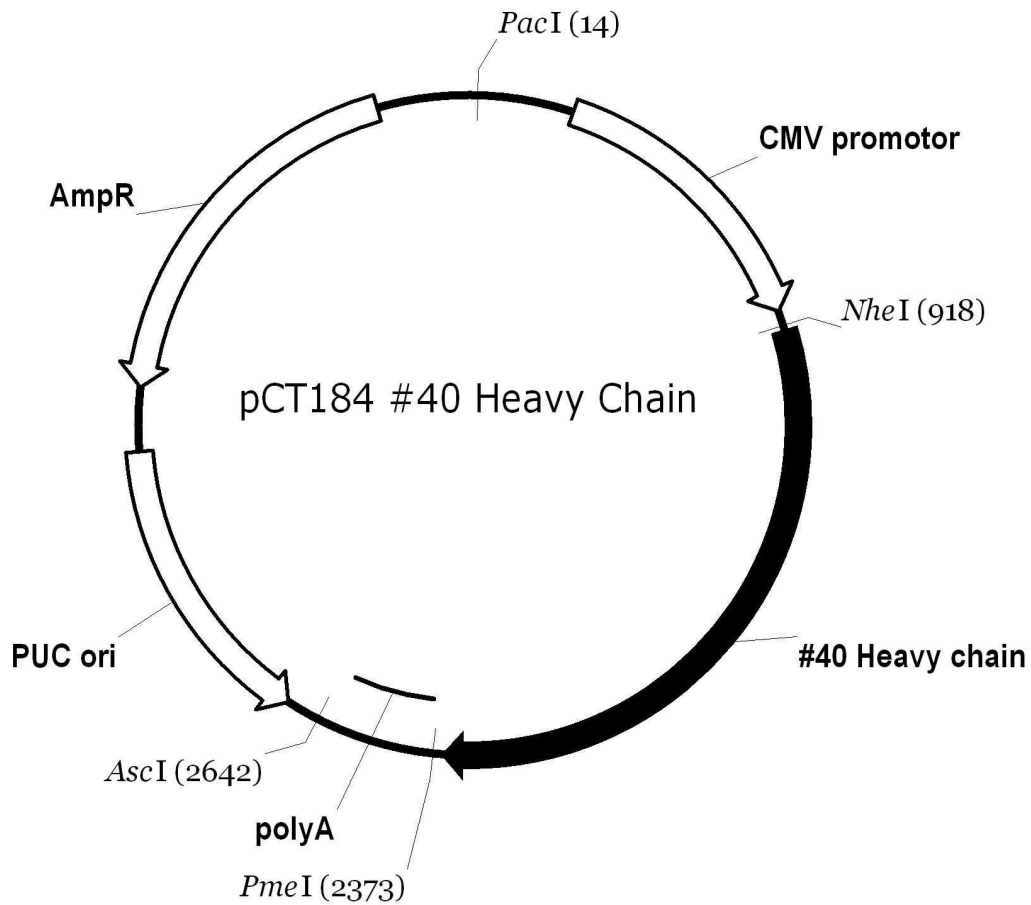
도면6b



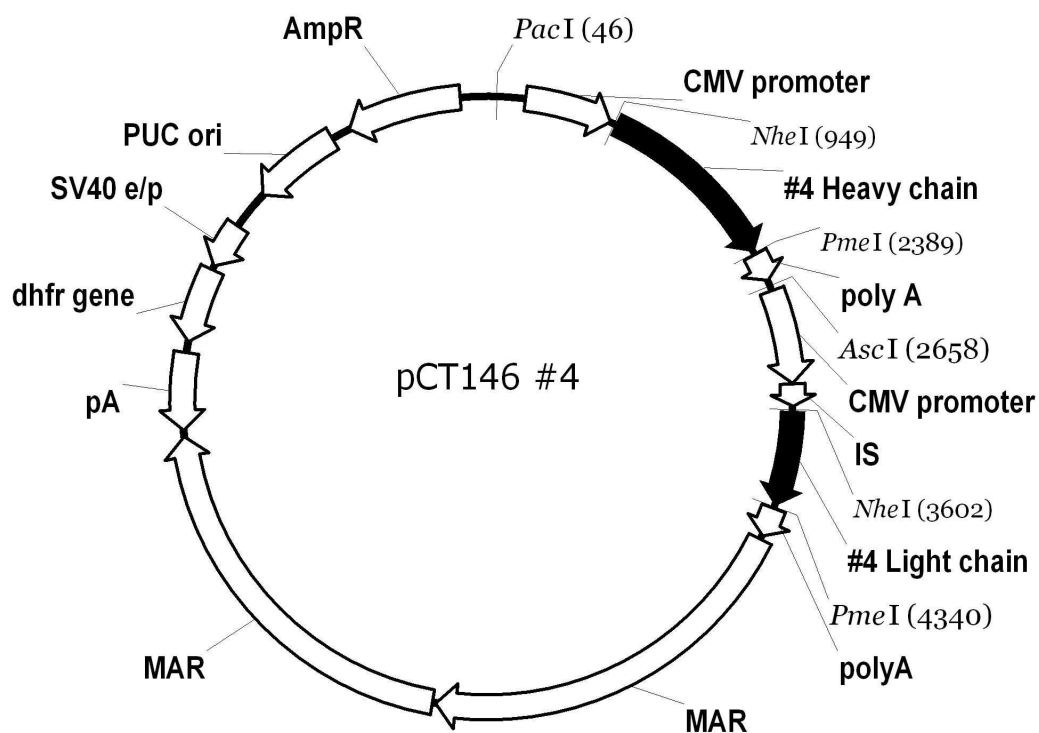
도면6c



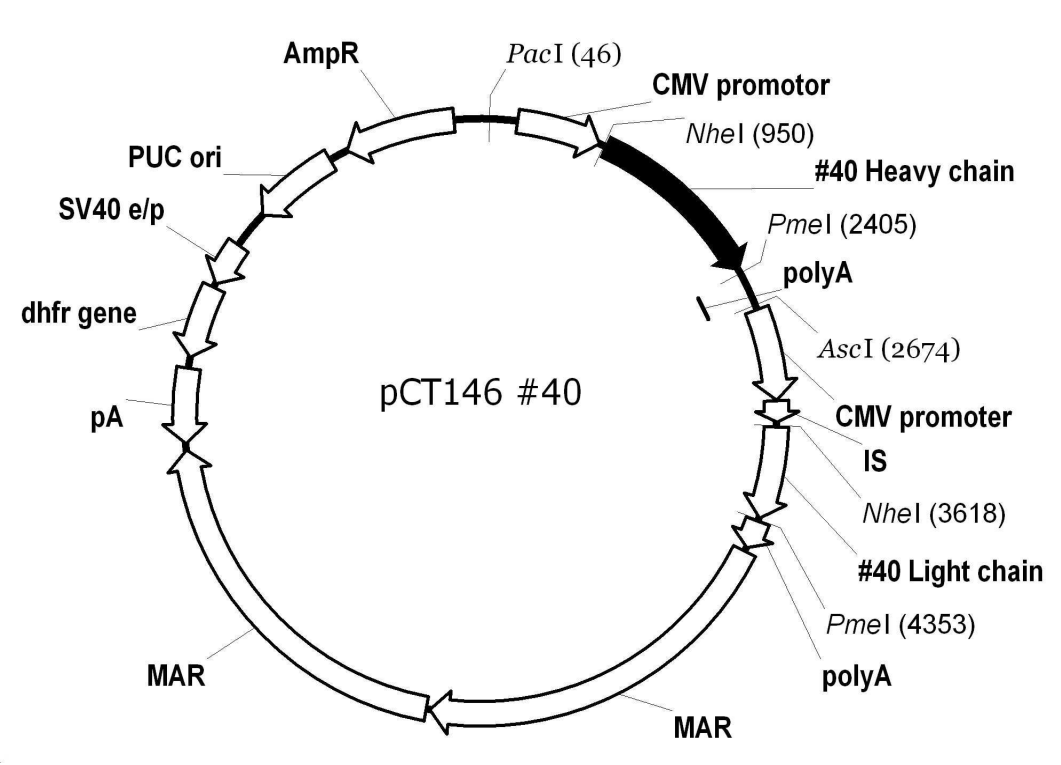
도면6d



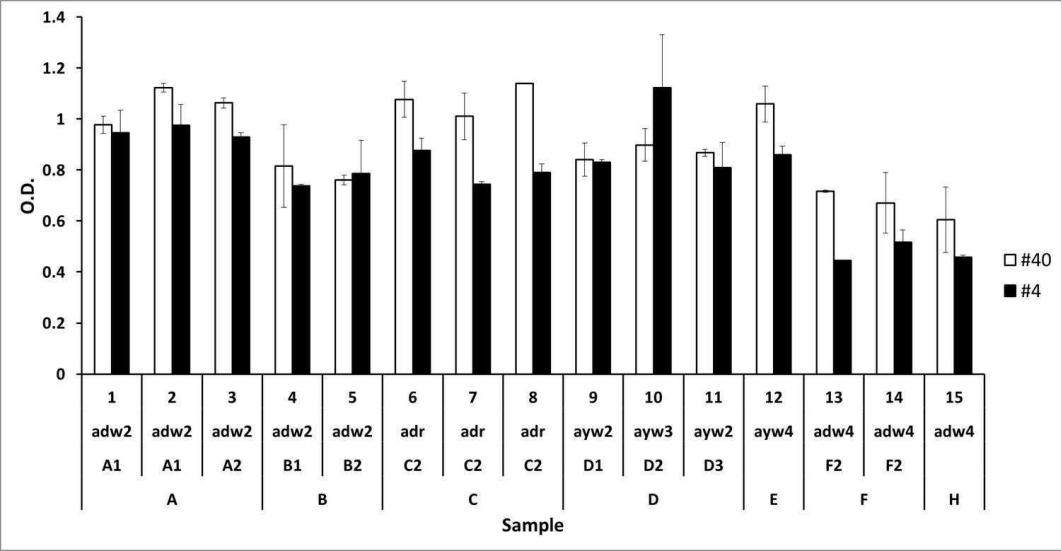
도면7a



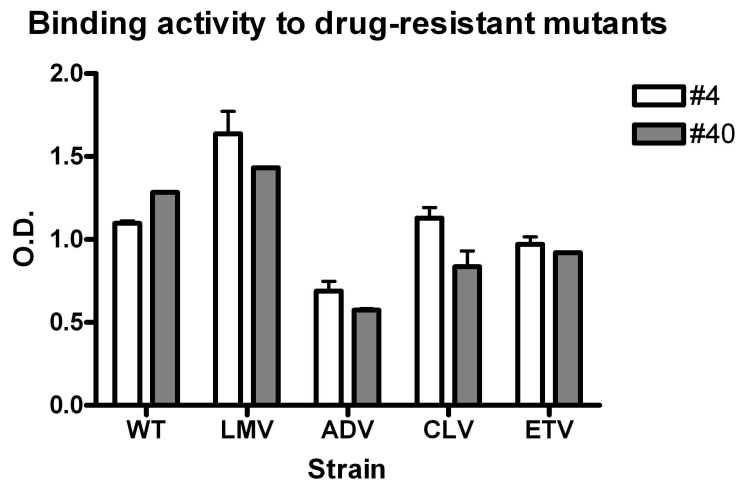
도면7b



도면8



도면9



서열 목록

<110> Celltrion Inc.

<120> A binding molecule able to neutralize Hepatitis B virus

<130> CPD2014022KR

<150> 10-2013-0062168

<151> 2013-05-31

<160> 44

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain CDR1

<400> 1

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Ser Val Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> #40 light chain CDR2

<400> 2

Ser Asn Ser Gln Arg Thr Ser

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain CDR3

<400> 3

Ala Ala Trp Asp Asp Asn Leu Ser Trp Glu Ile

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 heavy chain CDR1

<400> 4

Ala Ser Tyr Met Gly

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 heavy chain CDR2

<400> 5

Leu Ile Phe Thr Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly

1 5 10 15

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 heavy chain CDR3

<400> 6

Leu Asn Trp Ala Gly Tyr Ala Tyr Gly Pro Ala Tyr Tyr Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Asp Val

<210> 7

<211>

16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 light chain CDR1

<400> 7

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Tyr Asn Tyr Val Asp

1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 light chain CDR2

<400> 8

Leu Gly Ser Asp Arg Ala Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 light chain CDR3

<400> 9

Met Gln Ala Leu Gln Ser Pro Pro Val

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain CDR1

<400> 10

Phe Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain CDR2

<400> 11

Tyr Val Tyr Ile Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210>

12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain CDR3

<400> 12

Gly His Tyr Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ala Val Tyr Tyr Phe Asp Arg

1 5 10 15

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain variable region

<400> 13

Gln Ser Gln Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Ala Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn

20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Ser Ser Asn Ser Gln Arg Thr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Asn Leu
85 90 95

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

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 heavy chain variable region

<400> 14

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Pro Ser Gly Phe Ser Val Arg Ala Ser
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ser Leu Ile Phe Thr Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
50 55 60

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

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

Arg Leu Asn Trp Ala Gly Tyr Ala Tyr Gly Pro Ala Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 light chain variable region

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Lys Gly Tyr Asn Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asp Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Ser Pro Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain variable region

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Ser Ser Gly Ser Ile Ser Phe Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Val Tyr Ile Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly His Tyr Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ala Val Tyr Tyr Phe Asp
 100 105 110

Arg Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain

<400> 17

Met Ala Ser Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly

1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Gln Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr

20 25 30

Ala Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

35 40 45

Gly Lys Asn Ser Val Asn Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Ser Ser Asn Ser Gln Arg Thr Ser Gly Val Pro Asp

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

85 90 95

Gly Leu Gln Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp

100 105 110

Asp Asn Leu Ser Trp Glu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser

130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser

145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser

165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn
180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp

195 200 205

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 18
<211> 475
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> #40 heavy chain
<400> 18

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Ala Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Pro Ser Gly Phe Ser Val
35 40 45

Arg Ala Ser Tyr Met Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ser Leu Ile Phe Thr Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ser Arg Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Phe Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Asn Trp Ala Gly Tyr Ala Tyr Gly Pro Ala Tyr
115 120 125

Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser
130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

385 390 395 400
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

 450 455 460
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475
 <210> 19
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #4 light chain
 <400> 19
 Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

 Val Ala Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu His Ser Lys Gly Tyr Asn Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

 100 105 110
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Ser Pro Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125
 Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235
 <210> 20
 <211> 473

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #4 heavy chain
 <400> 20
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Val Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Ser Ser Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Phe Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Val Tyr Ile Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln

	85	90	95
Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr			
	100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Gly His Tyr Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ala Val Tyr			
	115	120	125
Tyr Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala			
	130	135	140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser			
145	150	155	160
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
	165	170	175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly			
	180	185	190
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu			
	195	200	205
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr			
	210	215	220
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys			
225	230	235	240
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	245	250	255
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	260	265	270
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	275	280	285
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	290	295	300
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
305	310	315	320
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	325	330	335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 21
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220

><223> #40 light chain CDR1

<400> 21

tctggaagca gtc caatat cgggaaaaat agtgtcaac

39

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain CDR2

<400> 22

agtaacagtc agcggacgtc a

21

<210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #40 light chain CDR3
 <400> 23
 gcagcgtggg atgacaattt gtcctgggag atc 33

<210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #40 heavy chain CDR1
 <400> 24
 gcctcctaca tgggt 15

<210> 25
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #40 heavy chain CDR2
 <400> 25
 cttattttta ccgctggcaa cacatattac gcagactccg tgagggga 48

<210> 26
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #40 heavy chain CDR3
 <400> 26
 ctaaactggg ccgggtacgc ctatggtecc gctactact acggtttgga cgtc 54

<210> 27
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #4 light chain CDR1

<400> 27
aggtctagtc agagcctcct gcatagtaag ggatacaact atgtggat 48
<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #4 light chain CDR2
<400> 28
ttgggttctg atcgggcctc c 21
<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #4 light chain CDR3
<400> 29
atgcaagctc tacaaagtcc tccggtt 27
<210> 30
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #4 heavy chain CDR1
<400> 30
ttttactact ggagt 15
<210> 31
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #4 heavy chain CDR2
<400> 31
tattgtctata tcagtgggga caccgactac aatccctccc tcaagagt 48
<210> 32
<211> 48
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain CDR3

<400> 32

gggcactatg gttcggggag tgattacgcg gtttactact ttgaccgc 48

<210> 33

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain variable region

<400> 33

cagtctcagt tgactcagcc accctcagcg tctgggaccg ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caatatcggg aaaaatagtg tcaactggta ccgacaattc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctct agtaacagtc agcggacgtc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcatccc tggccatcag tggactgcag 240

tctgacgatg aggcggatta ttactgtgca gcgtgggatg acaatttgtc ctgggagatc 300

ttcggcggag ggaccaaact gactgtccta ggt 333

<210> 34

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 heavy chain variable region

<400> 34

gaggtgcagc tgggtgcagtc tgcgggcggg ttagtccagc ctggggggtc cctgcgaatc 60

tcctgtgcac cctctggatt cagtgtcagg gcctcctaca tgggttggat ccgccaggct 120

ccaggaagg ggcctggaatg gatctcactt atttttaccg ctggcaacac atattacgca 180

gactccgtga ggggaagatt caccgtctcc agagacagtt ccaggaacac actgtacttt 240

caaatgaaca acctgagagt cggggacacg gctgtgtatt attgtgcgag actaaactgg 300

gccgggtacg cctatggtec cgctactac tacggcttgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcatcg tctctca 378

<210> 35

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 light chain variable region

<400> 35

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgtccgtcg cccctggaga gccggcctcc	60
atctcctgca ggtctagtc gagcctcctg catagtaagg gatacaacta tgtggattgg	120
tacctgcaga agccaggga gtctccacag ctctgatct atttgggttc tgatcgggcc	180
tccggggctc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc	240
agcagagtgg agcctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaagtcct	300
ccggttttcg gcggaggga caagtgagg atcaaa	336

<210> 36

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain variable region

<400> 36

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgtacta tctctagtg ctccatcagt ttttactact ggagtggat ccggcagccc	120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat gtctatatca gtggggacac cgactacaat	180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtcacaagt ccaagaacca gttctccctg	240
aaactgaggt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtttatt actgtgcgag agggcactat	300
ggttcgggga gtgattacgc ggtttactac ttgaccgct ggggccaggg agccctggtc	360
accgtctcct ca	372

<210> 37

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #40 light chain

<400> 37

atggccagct tcctctcct cctcacctc ctactcact gtgcagggtc ctgggccag	60
tctcagttga ctacgccacc ctacagctct gggaccgccg ggcagagggt caccatctct	120
tgttctggaa gcagctccaa tatcgggaaa aatagtgtca actggtaccg acaattccca	180
ggaacggccc ccaaactcct catctctagt aacagtcagc ggacgtcagg ggtccctgac	240

cgattctctg gctccaagtc tggcacctca gcatccctgg ccatcagtgg actgcagtct	300
gacgatgagg cggattatta ctgtgcagcg tgggatgaca atttgtcctg ggagatcttc	360
ggcggaggga ccaaactgac tgtcctaggt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg	420
ttccccccct ccctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactagtgtg tctgatcagt	480
gacttctacc cgggagctgt gacagtggct tggaaggcag atggcagccc cgtcaaggcg	540
ggagtggaga cgaccaaacc ctccaaacag agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac	600
ctgagcctga cgcccagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat	660
gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcatag	708
<210> 38	
<211> 1428	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> #40 heavy chain	
<400> 38	
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatit taaaagggtt ccagtgtgag	60
gtgcagctgg tgcagtctgc gggcgggtta gtccagcctg gggggtcctt gcgaatctcc	120
tgtgcacctt ctggattcag tgtcagggcc tctacatgg gttggatccg ccaggtcca	180
gggaaggggc tggaatggat ctacttatt tttaccgtg gcaacacata ttacgcagac	240
tccgtgaggg gaagattcac cgtctccaga gacagttcca ggaacacact gtactttcaa	300
atgaacaacc tgagagtcgg ggacacggct gtgtattatt gtgcgagact aaactgggcc	360
gggtacgctt atggtcccgc ctactactac ggcttggacg tctggggcca agggaccacg	420
gtcatcgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc	480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa	540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct	600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac	720
aagaaagttg agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct	780
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc tttcccccaa aaccaagga caccctcatg	840
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag	900
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	1020

tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1080
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140
 ccatccccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggc caaagcttc 1200
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagca gctcacctg 1320
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1428

<210> 39

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 light chain

<400> 39

atgaggctcc ctgtcagct cctggggctg ctaatgtctt gggctctctgg atccagtggg 60
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgtccgtcg cccctggaga gccggcctcc 120
 atctcctgca ggtctagica gagcctcctg catagtaagg gatacaacta tgtggattgg 180
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc tgatcgggcc 240
 tccggggctc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300

agcagagtgg aggtcagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaagtctc 360
 ccggttttctg gcggaggagc caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
 ctgaataact tctatccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540
 tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagacccc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

720

<210> 40

<211> 1422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #4 heavy chain

<400> 40

atgaaacatc tgtggttctt cttctcctg gtggcagttc ccagatgggt cctgtcccag	60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaggcctt cggagaccct gtccctcacc	120
tgtactatct ctagtggctc catcagtttt tactactgga gttggatccg gcagccccc	180
gggaagggac tggagtggat tgggtatgtc tatatcagtg gggacaccga ctacaatccc	240
tcctcaaga gtcgagtcac catatcagtc gacaagtcca agaaccagtt ctccctgaaa	300
ctgaggtctg tgaccgtgc ggacacggcc gtttattact gtgcgagagg gcactatggt	360
tcggggagtg attacgcgtt ttactacttt gaccgtggg gccagggagc cctggtcacc	420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc	480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg	540
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc	660
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa	720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc	780
ctggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc	840
cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag	900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	960
cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg	1020
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagccc catcgagaaa	1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc	1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc	1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc	1260
cctcccgctg tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	1380
cactacagc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga	1422
<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer for realtime PCR	
<400> 41	
cacatcagga ttctaggac c	21

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for realtime PCR
 <400> 42
 aggttggtga gtgattggag 20
 <210> 43
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe for realtime PCR
 <400> 43
 cagagtctag actcgtggtg gacttc 26
 <210> 44
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Hepatitis B virus HBsAg
 <400> 44
 Met Glu Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30
 Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys
 35 40 45
 Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
 50 55 60
 Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80
 Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
 100 105 110

Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala

115

120

125

Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp

130

135

140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg

145

150

155

160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu

165

170

175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Ala Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu

180

185

190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile

195

200

205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val

210

215

220

Tyr Ile

225