

Hepatitis B Virus의 S항원에 특이적인 단세포군 항체 생산, 특성 연구 및 가변지역유전자 분석

유한양행 중앙연구소 바이오텍 연구실

송무영 · 김창석 · 박상구 · 이재선 · 유태형 · 고인영

Production, Characterization, and Variable Region Analysis of Monoclonal Antibodies Specific for Hepatitis B Virus S Antigen

Moo-Young Song, Chang-Seok Kim, Sang-Koo Park, Jae-Sun Lee, Tae-Hyoung Yoo and In-Young Ko

Biotech Laboratory, Yuhan Research Institute, Yuhan Corporation, Gunpo, Korea

ABSTRACT

Background: Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the worldwide public health problem affecting about 300 million people. The envelope protein of HBV consists of three components known as preS1, preS2, and S antigen. According to the recent study, anti-HBs Ab showed effective neutralization ability against HBV from chronic hepatitis B and liver transplant patients, suggesting the possible development of therapeutic antibody. **Methods:** Spleen cells immunized with S antigen of HBV were fused with myeloma cell line to obtain HBsAg specific monoclonal antibodies. High affinity antibodies against HBsAg (adr, ad and ay type) were selected by competitive ELISA method. Nucleotide sequence of the variable regions of monoclonal antibodies was analyzed by RT-PCR followed by conventional sequencing method. **Results:** We produced 14 murine monoclonal antibodies which recognize S antigen of HBV. Two of them, A9-11 and C6-9 showed the highest affinity. The sequence analysis of A9-11 revealed that variable regions of the heavy chain and light chains are members of mouse heavy chain I (B) and light chain lambda 1, respectively. Likewise, the sequence analysis of C6-9 revealed that variable regions of the heavy chain and light chains are members of mouse heavy chain II (B) and light chain kappa 1, respectively. Neutralization assay showed that A9-11 and C6-9 effectively neutralize the HBV infection. **Conclusion:** These results suggest that A9-11 and C6-9 mouse monoclonal antibodies can be used for the development of therapeutic antibody for HBV infection. (*Immune Network* 2002;3(4):281-286)

Key Words: HBV, monoclonal antibody, variable region, nucleotide sequence

서 론

B형 간염 바이러스는 hepadnaviridae과에 속하는 바이러스로, 전 세계에 걸쳐서 분포하며 가장 전염성이 강한 바이러스로 공공위생에 심각한 문제를 일으키는 바이러스이다. 전 세계적으로 약 3억 명이 B형 간염 바이러스

의 보균자로 알려져 있으며, 우리나라에서만도 약 3백만 명이 감염보균자로 보고되고 있다(1). B형 간염 바이러스에 감염된 혈액에서 분리된 바이러스는 여러 가지 형태와 크기를 갖고 있는데, 감염성이 있는 바이러스는 40~50 nm 크기의 구형입자로서 데인 입자(Dane particle)라고 불린다(2). 데인 입자는 27 nm 직경의 캡시드 안에 일부의 단일나선구조를 포함하는 2중 나선구조의 3,200 개 뉴클레오티드로 구성된 바이러스 유전자를 갖고 있으며, 캡시드 외부를 둘러싸고 있는 외피는 숙주유래로서 3종류의 표면항원이 존재하는데 각각 pre S1, S2, S항원으로 불린다(3-5).

책임저자 : 송무영, 유한양행 중앙연구소 바이오텍 연구실
☎ 435-715, 경기도 군포시 당정동 27-3
Tel: 031-452-4111(교 367), Fax: 031-456-4418
E-mail: songmy@yuhan.co.kr

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(02-PJ10-PG4-PT02-0010).

108개의 아미노산으로 이루어진 preS1은 서브타입 간의 변이가 심하며, 주로 바이러스와 간세포 상호 간의 결합에 관여하는 것으로 알려져 있다(5,6). PreS2는 55개의 아미노산으로 이루어졌으며, polymerized human serum albumin (pHSA)과 결합하는 부위를 포함하고 있다(7). 또한 preS2는 1곳의 N-glycosylation 지역 및 여러 개의 O-glycosylation 지역을 가지고 있으며, 말단부위에 많은 단백질 분해효소 인지 부위를 포함하고 있다(8).

S 표면항원(HBsAg)은 바이러스 전체 표면항원의 약 80%를 차지하여 major 항원이라고도 불린다. S 표면항원의 역할은 간세포에 대한 바이러스 결합 등에 관여하는 것으로 알려져 있는데 인간 간 혈장막 상에 존재하는 apolipoprotein H, endonectin 등과 결합하는 것으로 보고되었다(9-11). S 표면항원은 항원성의 차이에 따라 공통항원인 'a' 결정기와 서로 상이한 'd' 또는 'y' 및 'w' 또는 'r'항원 결정기로 나뉘며, 그 혈청형은 adw, ayw, adr 그리고 ayr 등과 같은 subtype으로 분류되고 있는데(12), 한국에서는 주로 adr형이 검출되고 있다(13). 한 종류의 S 표면항원 서브타입에 대한 면역 후 체내에 형성된 항체들이 다른 서브타입의 S 표면항원을 갖는 HBV에 대하여도 면역력을 보유하는 것으로 보아 표면항원의 'a' 결정기는 면역력 형성에 필수적인 것으로 알려져 있다(12,14).

본 연구에서는 HBV 바이러스의 S 표면항원에 특이적으로 결합할 수 있는 14종의 단세포균 항체를 만들었으며, 그중에서 S 표면항원에 대해 높은 결합력을 갖는 2종의 단세포균 항체(A9-11, C6-9)의 중쇄 및 경쇄 가변 지역에 대한 유전자 분석을 진행하였으며 바이러스에 대한 항체 역가 분석을 통하여 이들 단세포균 항체의 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

하이브리도마 세포주의 개발. 하이브리도마(hybridoma) 세포주의 제작은 생후 6~8주 된 Balb/c마우스를 사용하였고, 재조합 표면항원(HBsAg)은 adr 아형을 International Enzymes 사(Las Vegas, Nevada, USA)로부터 구입하였다. 세포융합 시 모세포로 사용되는 Sp2/O-Ag14 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA)으로부터 분양 받아 사용하였다. 재조합 S 표면항원(HBsAg)의 면역 후 항체 생성 역가가 높은 마우스의 비장세포를 분리한 다음 PEG 1,500을 이용하여 Sp2/O-Ag14 골수종 세포주와 융합시켰다. 융합 후 ELISA 스크리닝 방법을 이용하여 항체를 생산하는 세포 주만을 선별하였으며, 3차 이상의 클로닝 과정을 거쳐 단세포균 세포주를 확립하였다.

ELISA 분석. 면역에 사용된 S 표면항원을 100 ng/well의 농도로, 96-well 플레이트에 12시간 동안 4°C에서 코팅한

다음, 0.5% 카세인(casein)을 37°C에서 1시간 처리하였다. 플레이트를 0.05% Tween 20이 포함되어 있는 PBS로 3회 세척한 후, 항체용액 100 ul를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse 항체를 1,000배 희석하여 첨가하고, horseradish peroxidase substrate kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 발색시켜 흡광도를 측정하였다.

항체 역가를 측정하기 위하여 5 ng의 항체와 여러 농도($10^{-11} \sim 10^{-6}$ M)의 항원(adr 타입)을 각각 섞은 뒤 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 0.5 ug의 항원이 코팅되어 있는 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 유리 항체(free antibody)의 농도는 indirect ELISA법에 의하여 결정하였으며, 결합친화도는 항체의 결합을 50% 저해하는 항원 농도의 역수로 정하였다.

Western 분석. S 표면항원을 환원 및 비환원 조건으로 나누어 12% SDS-PAGE를 실시하였다. 환원조건을 위해서는 DTT (dithiothreitol, 100 mM)가 첨가된 표본 완충액과 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후 전기영동을 실시하였고, 비환원 조건을 위해서는 DTT가 첨가되지 않은 표본 완충액에 섞은 후 전기영동을 수행하였다. 전기영동으로 분리된 항원은 nitrocellulose filter membrane에 3시간 동안 전이시키고(4°C, 30 V), 비특이 반응 차단 완충액(5% skim milk in 1×PBS, 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20)에서 2시간 반응시켰다. 여기에 표본 항체를 1 ug/ml 농도로 각각 희석하여 넣고 상온에서 2시간 동안 결합시킨 다음 0.05% Tween20이 함유된 인산완충 식염수(1×PBST)로 3회 세척하였다. 세척 후 2차 항체인 anti-mouse IgG conjugated HRP를 1 : 1,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰으며 발색은 Opti-4CN substrate kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

중화능력시험. HBV 바이러스 입자는 HBV 전체 유전자가 삽입된 HepG2.2.15 세포주(ATCC, Rockville, Maryland, USA)를 배양하여 얻은 상층액을 PEG6,000 등을 이용하여 침전시킨 다음 10,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 바이러스 입자만을 회수하여 사용하였다. HBV 감염은 Gripon 등(15)의 방법에 따라 간세포를 10^6 cell/well의 농도로 seeding한 다음 3일 후 준비된 HBV 바이러스 입자(3×10^7)를 감염시켰다.

중화능력시험을 위하여 표본항체를 농도별(0.001~10 ug)로 1시간 동안 상온에서 바이러스 입자와 미리 반응시킨 다음 배양된 간세포에 첨가하여 감염시켰다. 감염 후 5일 및 25일에 배양 상층액을 회수하였고, Murex HBsAg immunoassay kit (Abbott murex, Wiesbaden, Germany)를 이용하여 HBV S 표면항원 양을 측정하였다. 측정된 항원농도는 양성대조군의 항원양을 100%로 하여 항체에 의한 바이러스 입자의 억제 정도를 환산하였다.

경쇄 및 중쇄 염기서열 분석. 하이브리도마 세포(1×

Table I. The characteristics of 14 murine monoclonal antibodies directed against S surface antigen of HBV

Name	Isotype	Affinity ($\times 10^9 M^{-1}$)	Specificity	Conformational /Linear
A7-1	IgG ₁ /κ	1.76	Adr, ad, ay	Linear
A7-11	IgG ₁ /κ	N.D	Adr, ad, ay	Linear
A8-2	IgG ₁ /κ	0.75	Adr, ad, ay	Linear
A9-11	IgG _{2a} /λ	1.84	Adr, ad, ay	Conformational
C2-3	IgG ₁ /λ	0.75	Adr, ad, ay	Conformational
C6-9	IgG ₁ /κ	0.24	Adr, ad, ay	Conformational
C4-19	IgG _{2a} /κ	0.47	Adr, ad	Conformational
C1-5	IgG ₁ /κ	0.27	Adr, ay	Linear
C2-17	IgG ₁ /λ	0.81	Adr, ay	Conformational
A6-6	IgG ₁ /λ	0.17	Adr	Conformational
B8-4	IgG ₁ /κ	N.D	Adr	Linear
C6-3	IgG _{2b} /κ	0.81	Adr	Conformational
C10-7	IgG ₁ /κ	0.88	Adr	Linear
C19-1	IgG _{2a} /κ	0.73	Adr	Conformational

10⁸)를 회수한 다음 FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands)를 이용하여 mRNA만을 순수 분리하였다. cDNA 합성은Thermoscript RT-PCR kit (BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 합성하였고, 항체 유전자 증폭은 Ig Prime Kit (Novagen, Darmstadt, Germany)을 사용하여 A9-11 및 C6-9의 가변 중쇄 및 경쇄 유전자를 증폭하였다(Table I). A9-11 항체 중쇄 가변 유전자 증폭 프라이머(Vh5'-c, Vh3')는 5'-ACTAGTCGACATGGCTGTCTTAGGGCTGCTCCTCTGCCTG-3'과 5'-CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGGGGATAGACGGATGG-3'를, 경쇄 가변 유전자 증폭 프라이머(λVI5'-a, λVI3')는 5'-TTCATGGCCTGGATTTCACTTATATTCTCTCTCCTGGCT-3'과 5'-CCCAAGCTTAGCTC TTCAGTGAGGGTGGAAA-3'를 사용하였다. C6-9 항체 중쇄 유전자의 증폭 프라이머(Vh5'-e, Vh3')는 5'-CTAGTCGACATGGGATGGAGCGGGGTC-3'과 5'-CCCAAGCTTCCAGGGGCCAA GGGATAG-3'를, 경쇄 가변 유전자 증폭 프라이머(κVI5'-c, κVI3')는 5'-ACTAGTCGACATGGTCCTCATG-3'과 5'-CCCAAGCTTACTGGATGGTGGG-3'를 사용하였다. PCR 과정은 3단계로 나뉘어 1단계는 95°C에서 5분 동안 반응시키고, 2단계는 94°C에서 1분 30초, 55°C에서 2분, 72°C에서 3분을 30회 진행하였고, 3단계는 94°C에서 1분 30초, 55°C에서 2분, 72°C에서 10분의 조건으로 1회 실시하였다. 증폭된 중쇄 및 경쇄 가변 유전자는 Invitrogen사의 Topo-TA cloning kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands)을 사용하여 클로닝한 후 sequenase version II 키트(USB, Cleveland, OH, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다.

결 과

마우스 항체의 항원 아형별 반응성 분석. 편역된 비장 세포와 골수종 세포간의 융합을 통하여 B형 간염 바이러스의 S 표면항원에 대한 단일클론 항체를 생산하는 14개의 하이브리도마 세포주를 확보하였다(Table I). 각 단일클론 항체는 adr, ad, ay형에 대한 ELISA분석 및 western 분석을 실시한 결과 6개는 항원의 선형(linear) 형태를 인지하고, 나머지 8개는 항원의 입체(conformational) 형태를 인지하는 것으로 나타났다. 또한, 항원 아형별 반응성을 분석한 결과 3종 항원 결합군, 2종 항원 결합군, 그리고 1종 항원에만 결합하는 항체군으로 구분되었다. S 표면항원의 adr 타입에 대한 ELISA 분석결과 A9-11이 $1.8 \times 10^9 M^{-1}$ 로 가장 높은 역가를 나타냈다.

마우스 항체의 중화능력 분석. 마우스 항체의 중화능력 시험을 위하여 3종 항원(adr, ad, ay) 모두에 결합할 수 있는 항체군 중 항원의 입체 형태를 인식하는 A9-11, C2-3, C6-9 항체에서 ELISA 활성이 가장 높은 A9-11과 C6-9를 선정하였다(C2-3은 C6-9보다 항체 활성이 우수하나 A9-11과 동일한 경쇄 램다서열을 사용하여 제외하였다). 또한, 선형 형태를 인식하는 A7-1, A7-11, A8-2항체 중 항체 활성이 높은 A7-1, A8-2를 선정하여 사용하였다. In vitro 중화능력은 인간 간세포에 대한 HBV의 감염 억제 여부로 분석하였다. HBV 감염 5일, 25일째 생쥐 항체들의 HBV 감염 억제효과를 분석한 결과 A9-11은 10 ug, 1 ug/ml의 농도에서 HBV 감염을 효과적으로 억제하였으며, C6-9의 경우 고농도(10 ug/ml)에서의 바이러스 억제 능력은 A9-11 보다 떨어지나 IC₅₀ (5일째)은 A9-11 보다 높게 나타났다(Fig. 1). 항원의 선형 형태를 인식하는 항체 A7-1, A8-2은 HBV 바이러스에 대한 중화능력이 없는 것으로 확인되었다.

마우스 항체(A9-11와 C6-9) 가변유전자 증폭. A9-11과 C6-9의 가변 중쇄 및 경쇄 유전자는 마우스 항체 생산 세포주로부터 획득한 cDNA를 Ig Prime Kit (Novagen, Darmstadt, Germany)를 사용하여 증폭하였다(Fig. 2). 그 결과 A9-11 중쇄는 Vhc, 경쇄는 λVIa에 의해 증폭되었으며, C6-9 중쇄는 Vhe, 경쇄는 κVIb, κVIc 프라이머에 의해 증폭되는 것으로 나타났다. C6-9 경쇄가 2중(κVIb, κVIc)에 의하여 증폭된 것은 하이브리도마 제작에 사용되는 골수종세포가 MOPC-21 유래인 경우 경쇄의 카파 가변 말단이 결손된 유전자를 발현시키며 이 유전자는 κVIb, κVIc 프라이머에 의하여 증폭되는 서열을 갖기 때문이라는 보고와 일치하였다(16). C6-9 항체 경쇄가 증폭된 2중(κVIb, κVIc)의 유전자 분석을 실시한 결과 κVIb는 MOPC-21 유래 카파 가변 말단이 결손된 유전자만이 증폭되었으며, κVIc는 MOPC-21 유래 카파 가변 말단이 결손된 유전자 및 C6-9 경쇄 항체 유전자가 함께

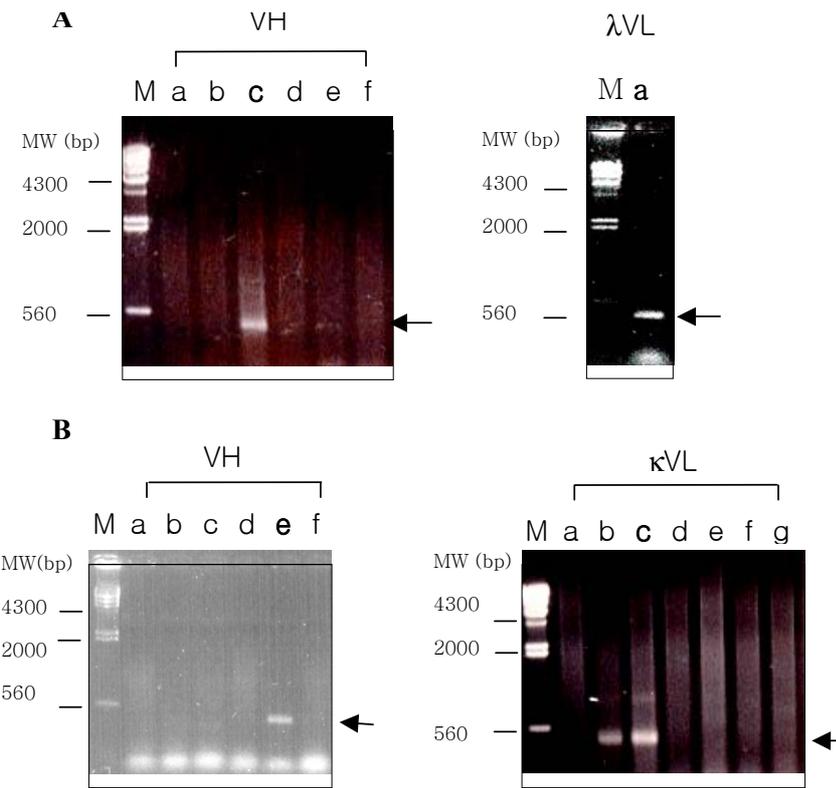


Figure 1. RT-PCR amplification of the variable regions of A9-11 and C6-9 (A) PCR products of A9-11 by Vh primers(a, b, c, d, e, f) and λV1 primer (a) of Ig-prime kits (*Material and Methods*). The variable region of the heavy and light chains of A9-11 was amplified by Vh (a) and λV1 (a) primers, respectively. (B) PCR products of C6-9 by Vh primers (a, b, c, d, e, f) and κV1 primers (a, b, c, d, e, f, g) of Ig-prime kits. The variable region of the heavy and light chains of C6-9 was amplified by Vh (e) and κV1 (c) primers, respectively. M indicates a DNA control, whose molecular weights are given on the left.

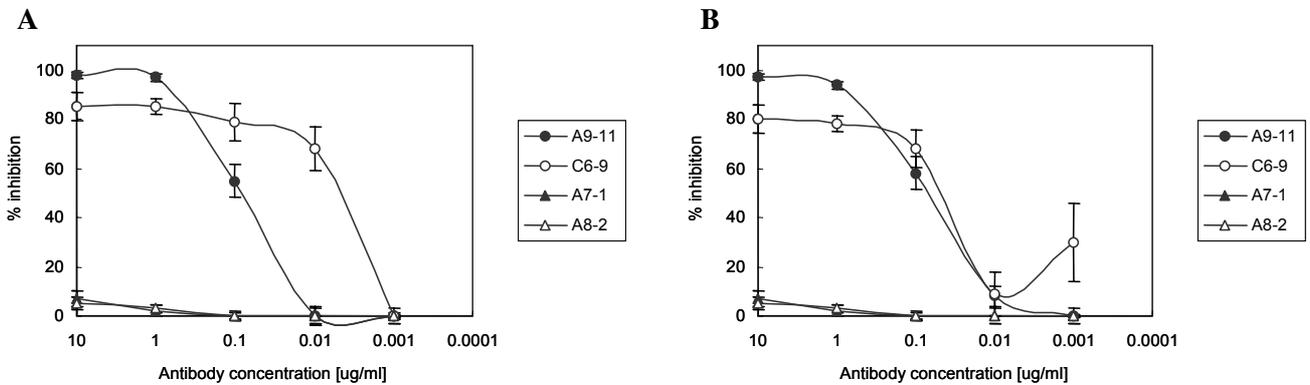


Figure 2. Neutralizing activity of mouse monoclonal antibodies. Various concentrations of the antibody were preincubated with virus and the mixture was inoculated into cultured hepatocytes. After 5 days (A), and 25 days (B) post-infection, the HBsAg concentration of the culture supernatant was determined.

증폭된 것을 확인하였다(data not shown).
마우스 항체(A9-11와 C6-9) 가변지역의 염기서열 분석. A9-11의 가변 유전자 염기서열 분석결과 Kabat 등 (17,18)의 정의에 의하여 중쇄는 마우스 서브그룹 I (B), 경쇄는 서브그룹 lambda 1에 속하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). 중쇄 가변영역 말단의 diversity (D) 지역과 joining (J) 지역의 분석결과 D 지역은 DQ52 계열(19,20)에 속하지만 V, D 그리고 J 지역 간의 불완전한 연결에 의하여 germline D 서열보다 짧은 유전자 서열을 형성한 것으로

밝혀졌다. 또한 J 지역은 JH1 계열에 속하는 것으로 확인 되었으나 JH1과 비교하여 3개의 염기가 상이하였으며 4개의 염기가 결손된 것으로 나타났다. 경쇄의 경우에는 Jλ1 유전자 서열과 100% 일치하였다.
 C6-9의 가변 유전자 분석결과 중쇄는 마우스 서브그룹 II (B) 계열로 확인되었고, 경쇄의 경우 kappa 1 서브 그룹에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 중쇄 D 지역은 DSP2.2 계열로 확인되었으나 germline D 서열보다 긴 서열을 갖고 있었으며 J 서열은 JH4 계열로 4개의 염기가

A																				
CAG Q	GTG V	CAG Q	CTG L	AAG K	CAG Q	TCA S	GGA G	OCT P	GGC G	CTA L	GTG V	CAG Q	CCC P	TCA S	CAG Q	AGC S	CTG L	TCC S	ATC I	60 20
ACC T	TGC C	ACA T	GTC V	TCT S	GGT G	TTC F	TCA L	TTA L	AGT S	ACC T	TAT Y	GGT G	GTA V	CAG Q	TGG W	GTT V	CGC R	CAG Q	TCT S	120 40
CCA P	GGA G	AAG K	GGT G	CTG L	GAG E	TGG W	CTG L	GGA G	GTG V	ATA I	TGG W	AGT S	GGT G	GGA G	AAC N	ACA T	GAC D	TAT Y	AAT N	180 60
GCA A	GCT A	TTC F	ATA S	TCC S	AGA R	CTG L	AGC S	ATC I	AGC S	AAG K	GAC D	AAC N	TCC S	AAG K	AAC N	CAA Q	GTT V	TTC F	TTT F	240 80
AAA K	GTG V	AAC N	AGT S	CTG L	CAA A	GCT D	GAT D	GAC D	ACA T	GCC A	ATA I	TAT Y	TAT Y	TGT C	GCC A	AGA R	GCA A	CGG R	TAC Y	300 100
TTC F	GAT D	GTC V	TGG W	GGC G	GCT A	GGG G	ACC T	ACG T	GTC V	ACC T	GTC V	TCC S	TCA S							342 114
B																				
CAG Q	GCT A	GTT V	GTG V	ACT T	CAG Q	GAA E	TCT A	GCA A	CTC L	ACC T	ACA T	TCA S	OCT P	GGT G	GAA E	ACA T	GTC V	ACA T	CTC L	60 20
ACT T	TGT C	CGC R	TCA S	AGT S	ACT G	GGG G	GCT A	ATT T	ACA T	ACT T	AAT N	AAC N	TTT F	GCC A	AAC N	TGG W	GTC V	CAA Q	GAA E	120 40
AAA K	CCA P	GAT D	CAT H	TTA L	TTC F	ACT G	GGT G	CTA A	ATA I	GGT G	GAT D	ACC T	AAC N	AAC N	CGA R	GTT V	CCG P	GGT G	GTT V	180 60
CCT P	GCC A	AGA R	TTC F	TCA S	GGC G	TCC S	CTG L	ATT I	GGA G	GAC D	AAG K	GCT A	GCC A	CTC L	ACC T	ATC I	ACA T	GGG G	GCA A	240 80
CAG Q	ACT T	GAA E	GAT E	GAG A	GCA A	ATA I	TAT Y	TTC F	TGT C	GCT A	CTA L	TGG W	TAC A	AAC N	AAC N	TGG W	GTG V	TTC F	GGT G	300 100
GGA G	GGA G	ACC T	AAA K	CTG L	ACT T	GTC V	CTA L	GGC G												327 109

Figure 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the cDNA coding variable region of the heavy (A) and light chains (B) of A9-11. CDRs are underlined.

A																				
CAG Q	GTG V	CAG Q	CTG L	GTG V	CAG Q	TCT A	GGA G	GCT A	GAG E	GTG V	AAA K	AAG K	CCC P	GGG G	GCT A	TCA S	GTC V	AAG K	GTG V	60 20
TCC S	TGC C	AAG K	GCT A	TCC S	GAG G	TAC Y	ACC T	TTC F	ACT T	AAT N	CAC H	TTG L	ATA I	GAG E	TGG W	GTA V	AGG R	CAG Q	GCG G	120 40
CCT P	GGA G	CAG Q	GGC G	CTT L	GAG E	TGG W	ATG M	GGA G	GTG V	ATT I	AAT N	CCT P	GGA G	AGT S	GGT G	GGT G	ACT T	AAC N	TAC Y	180 60
AAT N	GAG E	AAG K	TTC F	AAG K	GGC G	AGG R	GTA V	ACA T	ATA I	ACT T	GCA A	GAC D	ACA T	TCC S	ACC T	AGT S	ACC T	GCC A	TAC Y	240 80
ATG M	GAA E	CTC L	AGC S	CTG L	AGA R	TCT A	GAA E	GAC D	ACT T	GCG G	GTC V	TAT Y	TAC A	TGT C	GCA A	AGA R	ATG M	ACA T		300 100
ACA T	TTT F	TTA L	GGT G	GAG E	GGC G	TAT Y	GCT A	ATG M	GAC D	TAC A	TGG W	GGT G	CAA Q	GGT G	ACC T	TTA L	GTC V	ACC T	GTC V	360 120
TCC S	TCA S																			366 122
B																				
GGA D	CAT I	TGT M	GAT S	GTC S	ACA Q	GTC S	TCC P	ATC S	CTC L	CCT L	AGC G	TGT V	GTC S	AGT S	TGG G	AGA E	GAA K	GGT V	TAC T	60 20
TAT M	GAG S	CTG C	CAA K	GTC S	CAG S	TCA Q	GAG S	CCT L	TTT L	ATA Y	TAG S	TGG G	CAA N	TCA Q	AAA K	GAA N	CTA Y	CTT L	GGC A	120 40
CTG W	GTA Y	CCA Q	GCA Q	GAA K	ACC P	AGG G	GCA Q	GTC S	TCC P	TGA E	ACT L	GCT L	GAT Y	TTA A	CTG W	GGC A	ATC S	CAC T	TAG R	180 60
GGA E	ATC S	TGG G	GGT V	CCC P	TGA D	TCG R	CTT F	CAC T	AGG G	CAG S	TGG G	ATC G	TGG G	GAC T	AGA D	TTT F	CAC T	TCT L	CAC T	240 80
CAT I	CAG S	CAG S	TGT V	GAA K	GGC G	TGA E	AGA D	CCT L	GGC G	AGT V	TTA Y	CTG Y	CTA Q	GCA Q	ATA Y	TTA Y	TAG S	CTA Y		300 100
TCG R	GAC T	GTT F	CGG G	TGG G	AGG G	CAC T	CAA K	GCT L	GGA E	AAT I	CAA K	ACG R								339 113

Figure 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the cDNA coding variable region of the heavy (A) and light chains (B) of C6-9. CDRs are underlined.

결손된 것으로 분석되었다. 경쇄 J 지역은 JK1 서열로 확인되었으며 2개의 염기만이 다른 것을 알 수 있었다. A9-11과 C6-9의 유전자 분석결과 지금까지 보고되지 않은 새로운 유전자로 판명되어, GenBank에 등록하였다 (A9-11 중쇄 가변 유전자 Accession No. GI 9944968, A9-11 경쇄 가변 유전자 Accession No. GI 9944970, C6-9 중쇄 가변 유전자 Accession No. GI 15705832, C6-9 경쇄 가변 유전자 Accession No. 15705834).

고찰

본 연구에서는 HBV의 S 표면항원에 대하여 특이적으로 결합하는 14개의 마우스 단세포군 항체를 확보한 후

이들 항체에 대한 특성분석 및 유전자 분석을 수행하였고 역가 항체를 선별하였고, 바이러스 항원에 대한 감염력 억제 능력을 중화능력시험(neutralization assay)으로 분석하였다. 각각의 항체는 항원의 입체(conformational), 또는 선형(linear)형태에 결합하는 2개의 그룹으로 구분되었으며, 6개의 항체는 항원의 선형 형태를 인지하고, 나머지 8개의 항체는 항원의 입체 형태를 인지하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 항체 반응성을 항원 아형별로 분석한 결과 3종(adr, ad, ay), 2종(ad, ad 또는 adr, ay), 그리고 1종(adr)에 결합하는 그룹으로 구분되었다. 그중 3종에 결합하는 4개의 항체(A7-1, A8-2, A9-11, 그리고 C6-9)에 대한 중화능력시험을 실시하였고, S항원의 입체 형태를

인식하는 A9-11과 C6-9만이 HBV 중화능력이 있는 것으로 나타났다. 특히 항체 A9-11은 1 ug/ml의 항체 농도에 서도 HBV 바이러스를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다으며, 바이러스에 대한 중화능력은 기존에 보고된 항 HBs 항체와 동등한 수준인 것으로 확인되었다(21). 이러한 결과는 HBV에 중화능력이 있는 대부분의 항 HBs 항체가 입체 형태를 인식한다는 연구(14,22,23) 및 'a' 결정기가 중화항체를 유도할 수 있다는 보고(24)와 일치하는 양상을 보여주었다.

가변 유전자 염기서열 분석결과 항체 A9-11의 중쇄 가변은 마우스 서브그룹 I (B), 경쇄 가변은 lambda1 계열에 속하는 것으로 나타났으며, 항체 C6-9의 중쇄 가변이 마우스 서브그룹 II (B), 경쇄 가변이 kappa 1 계열인 것으로 확인되었다. 또한 항체 A9-11과 C6-9 CDR 지역 간의 아미노산 비교 분석 결과는 유사성이 없었으며, 특히 각 항체 중쇄 CDR3 지역은 서로 다른 계열의 유전자(DQ52, DSP2.2)를 사용하여 아미노산 서열 및 크기에서 많은 차이를 보였다. 이러한 결과는, 기존에 보고된 항 HBs 항체(23-25)의 CDR 지역에 대한 아미노산 분석 결과에서와 같이 각 항체의 CDR 지역간 아미노산 유사성이 없는 것으로 보아, HBV 바이러스의 S 표면항원에 대하여 결합하는 항체들의 CDR 지역이 매우 다양하게 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

결론적으로 A9-11 및 C6-9 마우스 항체는 HBV S 표면항원에 결합하는 기존에 보고되지 않은 새로운 항체로서 이들 항체의 항원결합 부위인 가변 유전자를 이용하여 키메라 항체 및 인간화 항체의 개발이 가능하며 만성 B형 간염 환자의 치료를 위하여 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Chisari FV, Ferrari C: Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 13;29-60, 1995
- Blumberg BS: Australia antigen and the biology of Hepatitis B. *Science* 197;17-25, 1977
- Dreesman GR, Hollinger FB, Suriano JR, Fujika RS, Brunschwig JP, Melnick JL: Biophysical and biochemical heterogeneity of purified hepatitis B antigen. *J Virol* 10; 469-476, 1972
- Tiollais P, Charnay P, Vyas GN: Biology of hepatitis B virus. *Science* 213;406-411, 1981
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH: Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 52; 396-402, 1984
- Leo K, Marjolijn K, Iain M. L, Jon CC, Peter K, Arie JJ: Pre-S proteins in Hepatitis B. *J Med Virology* 28;47-51, 1989
- Michel ML, Pontisso P, Sobczak E, Malpica Y, Streeck RE, Tiollais P: Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81;7708-7712, 1984
- Darrell L. P, Narapendra N, Francisco G: Structure of Hepatitis B surface antigen: Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J Bio Chem* 257;10414-10420, 1982
- Leenders W, Glansbeek H, De Bruin W, Yap S: Binding of the major and large HBsAg to human hepatocytes and liver plasma membranes: Putative external and internal receptors for infection and secretion of hepatitis B virus. *Hepatology* 12;141-147, 1990
- Mehdi H, Kaplan M, Anlar F, Yang X, Bayer R, Sutherland K, Peoples M: Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 68;2415-2424, 1994
- Hertogs K, Leenders W, Depla E, De Bruin W, Meheus L, Raymackers J, Moshage H, Yap S: Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* 197;549-557, 1993
- Magnitus LO, Norder H: Subtypes, Genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38;24-34, 1995
- Kim KT, Hyun SW, Kim YS, Rho HM: Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus (subtype adr). *Korean Biochem J* 21;319-331, 1988
- Ogata N, Ostberg L, Ehrlich PH, Wong DC, Miller RH, Purcell RH: Markedly prolonged incubation period of hepatitis B in chimpanzee passively immunized with a human monoclonal antibody to 'a' determinant of hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;3014-3018, 1993
- Gripon P, Diot C, Guguen-Guillouzo C: Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus. *Virology* 192;534-540, 1993
- Carroll WL, Mendel E, Levy S: Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript. *Mol Immunol* 25; 991-995, 1988
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM: Sequences of Proteins of immunological interest, fifth ed, National Institutes of Health, Public Health Service, Bethesda, MD, 1991
- Harris L, Bajorath J: Profiles for the analysis of immunoglobulin sequences: Comparison of V gene subgroups. *Protein Science* 4;306-310, 1995
- Blomberg B, Tonegawa S: DNA sequences of the joining regions of mouse light chain immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79;530-533, 1982
- Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S: Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 290;562-565, 1981
- Ryu CJ, Gripon P, Park HR, Park SS, Hong HJ: In vitro neutralization of hepatitis B virus by monoclonal antibodies against the viral surface antigen. *J Med Virology* 52;226-233, 1997
- Lohman K, Kieber ET, Kennedy R: Molecular characterization and structural modeling of immunoglobulin variable regions from murine monoclonal antibodies specific for hepatitis B virus surface antigen. *Mol Immunol* 30;1295-1306, 1993
- Fernandez M, Diaz T, Galvan A, Valdez R, Gonzalez E, Ayala M, Diaz J, Bestagno M, Burrone O, Gavilondo J: Antigen recognition characteristics and comparative performance in immunoaffinity purification of two monoclonal antibodies specific for the hepatitis B virus surface antigen. *J Biotechnol* 56;69-80, 1997
- Bhatnager PK, Papas E, Blum HE, Milich DR, Nitecki D, Kareb MJ, Vyas GN: Immune response to synthetic peptide analogues of HbsAg specific for the a determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* 79;4723-4727, 1982
- Ryu CJ, Jin BR, Chung HK, Han MH, Hong HJ: Cloning and characterization of cDNAs coding for heavy and light chains of a monoclonal antibody specific for the S antigen of hepatitis B virus. *Gene* 144;313-314, 1994