

## Chinese hamster ovary 세포에서 발현된 preS2 및 S 부위 함유 HBsAg의 항체유발능

정성균\* · 박정민 · 이상봉 · 박동우 · 김동연 · 김기호\* · 김홍진\*<sup>#</sup>

일양약품 중앙연구소 생물공학실, \*중앙대학교 약학대학

(Received September 24, 2001; Revised October 22, 2001)

### Antibody productivity of HBsAg containing both preS2 and S regions expressed in Chinese hamster ovary cells

Sung-Kyun Chung\*, Jung-Min Park, Sang-Bong Lee, Dong-Woo Park,  
Dong-Yeon Kim, Ki-Ho Kim\* and Hong-Jin Kim\*<sup>#</sup>

Central Institute of Research, Il Yang Pharmaceutical Co. Ltd. Yongin 449-726, Korea

\*College of Pharmacy, Chung Ang University, 221, Huksuk-Dong, Dongjak-Ku, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — Many studies have provided evidences that hepatitis B surface antigen (HBsAg) including preS region could be an ideal candidate for a new hepatitis B virus (HBV) vaccine with higher efficacy. We established CHO cell lines, IY-CHO-2 and IY-CHO-11 expressing high levels of HBsAg containing preS2 and S protein by stable transfection method. These cell lines expressed the correct size (about 1 kb in length) of HBsAg mRNA as expected. The purified protein from the culture supernatants of the clones showed the same sizes as those expressed in native hepatitis B virus (24 kDa, 27 kDa, 34 kDa and 36 kDa). Antibody productivity of CHO-derived HBsAg protein at lower dose challenge was higher than the protein containing S region alone expressed in yeast system. These results indicate that CHO-derived HBsAg protein containing preS2 and S region can be effectively used for a better immune response as a HBV vaccine.

**Keywords** □ Hepatitis B virus, vaccine, CHO

Hepatitis B virus (HBV)는 혈액을 통해 감염되는 피막을 갖고 있는 DNA 바이러스로서, B형 간염을 일으키는 주된 병원체이다. 전 세계적으로 HBV 감염 환자는 약 3억 5천만명이며 이들은 만성간염, 간경화, 간암으로 발전될 위험에 직면한다.<sup>1)</sup> 현재까지 HBV 감염과 간질환을 예방하는 방법은 HBV 외막에 포함된 Hepatitis B surface antigen(HBsAg)을 이용한 백신의 사용이다.

HBV의 게놈은 핵산중합효소유전자(P; polymerase), 표면항원유전자(S; surface protein), 중심항원유전자(C; core protein), X유전자로 구성된다. 그 중 P, S,

C 유전자는 구조단백질을 발현하고, X유전자는 조절 단백질을 발현한다. 구조단백질 중 하나인 Hepatitis B surface antigen(HBsAg)은 S gene에 의하여 지시되는 polypeptide와 그것의 당단백질로 이루어지며, small(S), middle(M), large(L) 3가지 단백질로 구성된다. S 단백질은 226 amino acids로 구성되며, 3가지 단백질 중 가장 풍부하다. M 단백질은 preS2 라고 하며, S 단백질의 N-terminal에 55 amino acids가 첨가된다. L 단백질은 preS1라고 하며, M 단백질의 N-terminal에 108~119 amino acids가 첨가된다.<sup>2)</sup> 이들 단백질은 하나의 open reading frame으로 구성되며, 서로 다른 ATG 개시코돈으로 시작된다. HBV DNA genome에서 preS1과 preS2 region은 S region보다 우선한다.

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5613 (팩스) 02-820-5613

HBV에 대한 첫 백신은 만성 감염 환자의 혈액에서 분리된 HBsAg particles로 이루어졌다.<sup>3)</sup> 이 백신은 효율적인 백신으로서 역할은 하지만, 공급원의 제한과 다른 감염원에 의한 오염의 문제라는 한계가 있다. 이 한계를 극복하기 위하여 유전공학을 이용한 유전자 재조합 백신이 개발되었다. 이 백신은 HBsAg particles 중 S항원만이 발현되도록 제작된 발현백터를 사용하여 yeast에서 생산되었다.<sup>4)</sup> S항원은 HBV 감염에 대해서 protective antibody response를 유도하며 혈장 유래 백신보다 효과 및 안전성에서 우수하였다. 그러나 S항원에 대해 2.5~5.0%의 면역 기능이 감소된 환자는 잘 반응을 하지 않는 단점이 있다.<sup>5)</sup> 따라서, 이들도 면역력을 획득할 수 있는 새로운 백신의 개발이 필요하며 그 중 preS 부위를 포함시켜 S 항원 뿐만 아니라 preS 항원에 대해서도 면역반응을 일으키는 결과들이 보고되고 있다. Neurath 등은 non-responder mice에서 preS 항원은 S 항원에 대한 무면역성을 극복할 수 있으며,<sup>6,7)</sup> preS 항체는 급성 HBV 감염의 회복과 HBV 제거에 필수적인 기능을 한다고 하였다.<sup>8)</sup> 또한 preS1 부위의 아미노산 21~47은 간세포에 있는 수용체의 결합부위이며, 따라서, preS1(a.a 21~47)의 항체는 HBV의 접근을 방해하여 침팬치에서 HBV의 감염을 예방한다고 하였다.<sup>9-10)</sup> Neurath 등은 또한 preS2 부위의 아미노산 120~145은 B 세포와 T 세포의 인식부위이며,<sup>9)</sup> 따라서 preS2 항원은 S 항원으로 항체가 생성되지 않는 non-responder를 자극하여 항체를 생성시킨다는 보고가 있다.<sup>11-14)</sup>

현재 S 항원은 prokaryotic cell, yeast, mammalian cell, recombinant baculovirus, insect cell, plant 같은 여러 system에서 발현되고 있다. 그러나, 발현량이 가장 많은 *Escherichia coli*의 경우에는 glycosylation이 이루어지지 않아 glycoprotein인 S항원을 발현시키기에는 한계가 있었고, yeast strain인 *Saccharomyces cerevisiae*는 glycosylation이 human cell에 비해 너무 많이 이루어져서 S항원의 변형이 우려된다. 따라서 본 연구에서는 백신으로 뛰어난 효과가 있는 subtype인 adr의 preS와 S항원을 당쇄결합이 인간세포와 거의 비슷하게 이루어지고, S항원이 안정적으로 발현되어지는 Chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 발현시키고자 하였다.

따라서, 본 연구에서는 preS2 및 S 항원 발현 백터를 제작하여 CHO 세포를 형질전환시켜 HBsAg 발현

CHO 세포주를 구축하였다. 형질전환된 CHO 세포에서 HBsAg mRNA와 단백질이 정상적으로 발현되고 있음을 확인하였고 배양 상등액으로부터 HBsAg 단백질을 정제하여 Balb/c 마우스에서 항체유발능력을 확인하였다.

## 실험방법

**Plasmids** - pIEspHBVS2 플라스미드를 준비하기 위하여 먼저 Hepatitis B surface antigen 유전자를 함유하고 있는 플라스미드 pHBV를 주형으로 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. PCR에 이용한 순방향 프라이머의 염기서열은 5'-AGAGGCAAATCAGGTAGGA-3' 이었고 역방향 프라이머의 염기서열은 5'-GACGGACATTTATCTGGAT-3' 이었다. PCR은 94°C에서 1분, 60°C에서 90초, 72°C에서 1분간의 cycle을 35회 반복하여 수행하였다. *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단한 뒤 Klenow enzyme 처리한 pIEsp백터에 PCR 산물을 삽입시켜 pIEspHBVS2라 명명하였다.

pIEspHBVS2에 dihydrofolate reductase(DHFR) 유전자를 삽입하기 위하여 먼저, pSV2-*dhfr* 플라스미드를 주형으로, T7-, T3-universal primer를 이용하여 *dhfr* 유전자를 PCR법으로 증폭하였다. PCR 증폭산물을 pIEspHBVS2의 *Clal* 부위에 도입하여 pIEspHBVS2-*dhfr*라 명명하였다.

pIEspHBVS2-*dhfr* 플라스미드내 HBsAg 유전자의 염기서열 확인은 T7 sequenase system Ver 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 사용한 Sanger dideoxy termination 법에 의하였다.

**세포배양** - Chinese hamster ovary(*dhfr*-)세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 10% FBS(Gibco BRL Products Co., USA), 0.1 mM sodium hypoxanthine, 0.016 mM thymidine (HT supplement; Gibco BRL Products Co., USA), penicillin(100 U/ml)/streptomycin(100 ug/ml) (Gibco BRL Products Co., USA) 및 25 mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiper-azine-N'-2-ethanesulfonic acid)가 함유된 MEM(minimal essential medium)- $\alpha$  배지에서 유지하였다.

**Transfection과 형질전환체 선발** - Transfection은 Calcium co-phosphate precipitation 방법<sup>15)</sup>을 사용하

였고, 형질전환 효율을 높이기 위하여 pIEspHBVS2-*dhfr*를 *EcoRI*로 절단하여 선형화시켜 사용하였다. 7 시간의 transfection 후 15% glycerol로 2분간 쇼크를 유발한 후, PBS로 2회 세척하고 10% FBS, 0.1 mM sodium hypoxanthine, 0.016 mM thymidine 함유 MEM- $\alpha$  배지에서 세포를 안정화시켰다. 이틀 후 1/60로 세포를 희석하여 선택배지에 세포를 2주간 유지하여 형질전환체를 선별하였다. 선택배지는 nucleosides가 함유되지 않은 배지로, MEM- $\alpha$  배지에 10% dialyzed FBS(Gibco BRL Products Co., USA), 2.0 g/L sodium bicarbonate, 1% penicillin-streptomycin (P/S; Gibco BRL Products Co., USA : 10,000 units/ml penicillin G sodium and 10,000  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate in 0.85% saline), 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid)를 첨가하여 사용하였다. 이어서 각 선별된 세포들을 선택배지에 0.005  $\mu$ M MTX(methotrexate; Sigma Co., USA)를 첨가시켜 준비한 증폭배지에서 15일간 배양한 후, 배양 상등액에 대하여 방사선면역분석법(Ausria II kit; Abbott Laboratories, IL, USA)을 실시하여 양성반응을 보인 세포주를 선별한 후, 다시 MTX의 농도를 증가시켜 가면서 HBsAg의 발현이 증가된 세포주를 선별하였다.

**RT-PCR** - CHO 형질전환체로부터 분리한 total RNA를 주형으로 RT(reverse transcription)-PCR을 수행하였다. 60mm 플레이트 상의 세포에서 High Pure RNA Isolation Kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA 1.5  $\mu$ g, oligo(dT) primer, MMLV reverse transcriptase를 이용하여 역전사를 수행한 뒤, HBsAg cDNA 염기서열을 이용하여 제작된 순방향 프라이머(5'-AGAGGCAAATCAGGTAGGA-3')와 역방향 프라이머(5'-GACGGACATTTATCTGGAT-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 30초, 55°C에서 35초, 72°C에서 40초의 cycle을 30회 반복하였다.

**HBsAg 단백질 정제** - HBsAg에 대한 monoclonal antibody (mAb)를 생산하는 hybridoma cell를 마우스 복강에 주사한 뒤 마우스의 Ascite fluid를 뽑아내어 그 fluid내에 있는 Anti-HBsAg mAb(25 mg)와 CNBr-activated Sepharose-4B(Amersham Pharmacia Biotech, USA) 3 g를 결합시켜 HBsAg가 결합할 수 있는 항

체-친화성 컬럼을 준비하였다. HBsAg를 발현하는 CHO세포를 배양하여 얻은 배양 상등액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포 및 파편을 제거하였다. Phosphate buffered saline(PBS; 137 mM NaCl, 15 mM sodium phosphate dibasic, 1.5 mM potassium phosphate monobasic, 3 mM potassium chloride, pH 7.2)로 평형화시킨 HBsAg-mAb affinity column에 상등액을 통과시키고 PBS와 0.5 M NaCl(in PBS)로 세척한 후, 3 M sodium thiocyanate (in 10 mM sodium phosphate, pH 7.2)로 단백질을 용출하였다. 이어서 PBS에 대하여 투석한 후 Centriplus(Amicon. Inc., USA)를 이용하여 농축하였다.

**Western Blot** - 정제된 HBsAg(0.06  $\mu$ g)에 대해 12.5% SDS-PAGE를 수행한 뒤 Bio-Rad Mini Transblot electrophoretic transfer cell을 이용하여 gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim milk에 한시간 동안 상온에서 방치시킨 뒤 1 $\times$ BST(Tris-buffered saline Tween, 20 mM Tris base, 137 mM sodium chloride, 1 M hydrochloric acid, 0.1% Tween 20)로 5분간 2번 씻고, 1 $\times$ BST에 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 항-HBsAg 단일클론 항체(에스디, 수원, 한국)를 희석하여 한시간 반응시켰다. 그런 다음, 1 $\times$ TBST로 5분간 2번 씻은 후, ECL 키트(Pharmacia Biotech, Sweden)를 사용하여 film에 감광시켜 항원-항체 결합을 가시화하였다.

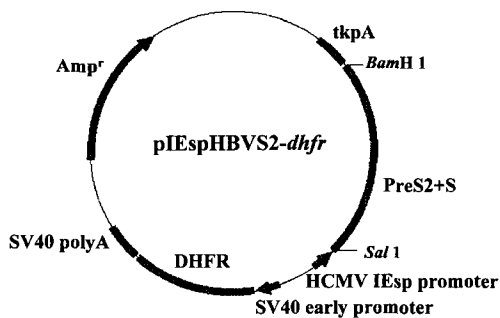
**항체형성능 확인** - CHO세포에서 발현, 생산된 HBsAg이 항체 생성능이 있는지를 알아보기 위하여 Balb/c 마우스(삼육, 한국)를 이용하여 실험하였다. 마우스를 실험군 3군과 대조군 3군씩 총 6군으로 나누고 각 군에는 10 마리씩 마우스를 배정하였다. 실험군 3군에는 CHO 세포에서 발현된 HBsAg을 각각 1.25  $\mu$ g, 0.312  $\mu$ g, 0.078  $\mu$ g 씩 취하여 보조제 알루미늄염 0.5 mg과 혼합한 뒤 식염수를 이용하여 총 부피 1 ml이 되게 하여 마우스 복강에 주사하였다. 대조군 3군의 마우스에는 효모 유래 B형 간염 백신 1.25  $\mu$ g, 0.312  $\mu$ g 및 0.078  $\mu$ g를 복강에 1 회 주사하였다. 투여 28일 후에 심장으로부터 혈액을 500  $\mu$ l씩 취하고 실온에서 1 시간동안 방치하여 응고시킨 후 25°C, 6400 $\times$ g(Micro 17R, 한일, 한국)으로 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 이 혈장중에 포함된 항-HBsAg 항체를 enzygnost 항-HBs II 키트(Enzygnost Anti-

HBs II Kit; Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 ELISA 법으로 검색하였다.

### 실험결과 및 고찰

**HBsAg 발현 CHO 세포주 구축 - HBsAg 발현 CHO 세포주를 구축하기 위하여, 먼저 포유동물발현벡터인 pIEspHBVS2-dhfr를 제작하였다(Fig. 1). pIEspHBVS2-dhfr 플라스미드 내 HBsAg cDNA의 5' 바로 위쪽에는 HCMV immediate-early enhancer promotor sequence가 위치해 있고 3' 바로 밑으로는 HSV-1 thymidine kinase polyadenylation signal sequence가 위치하고 있다. 또한 pIEspHBVS2-dhfr 플라스미드는 MTX를 이용하여 HBsAg 유전자를 증폭시킬 수 있도록 DHFR 유전자를 포함하고 있다. DHFR 유전자의 5'과 3'쪽에는 SV40 promoter와 SV40 polyA signal sequence가 각각 위치하고 있다. CHO dhfr(-)세포에 pIEspHBVS2-dhfr가 안정적으로 도입된 세포주를 얻기 위하여 먼저 nucleosides가 없는 선별배지에서 DHFR 양성 세포주를 선발한 뒤 HBsAg 발현을 확인하여 DHFR과 HBsAg를 모두 발현하는 세포주를 확립하였다. DHFR과 HBsAg 모두를 발현하는 세포주를 MTX농도를 연속적으로 증가시키면서 배양하여 HBsAg의 발현이 증가된 세포주 IY-CHO-2, IY-CHO-11의 두 세포주를 선발하였다.**

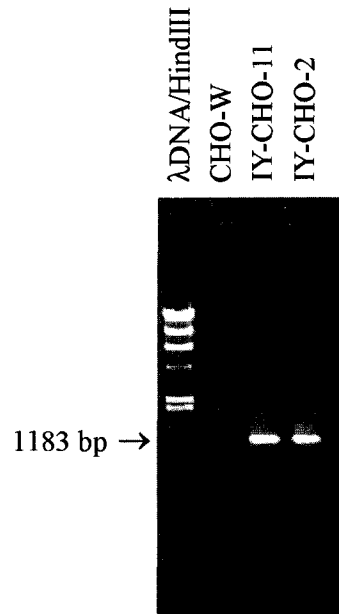
본 연구에서, 형질 전환 뒤 선별배지에서 선발된 DHFR 양성 세포주들은 모두가 HBsAg 단백질을 발현하는 것으로 나타났다. 이는 DHFR 유전자가 발현



**Fig. 1** - HBsAg and DHFR expression plasmid (pIEspHBVS2-dhfr). pIEspHBVS2-dhfr expresses HBsAg containing preS2 and S region from the HCMV immediate early enhancer promoter and DHFR from the SV40 early promoter. BamHI and SalI restriction sites are indicated.

시키고자 하는 HBsAg 유전자와 동일한 벡터 내에 존재하여 형질전환 시 동시에 CHO 세포 내로 도입되고 또한 염색체 DNA상의 동일 위치에 삽입되게 되어 동시 발현이 가능하였을 것으로 사료된다. 이러한 장점은 또한 DHFR 유전자를 증폭시켜나가는 과정에서 HBsAg 유전자도 함께 증폭될 확률을 높임으로서 HBsAg 유전자를 고 효율로 증폭시킬 수도 있으리라 본다. 또한 본 연구에서는 플라스미드를 미리 선형화시켜 형질 전환에 사용함으로써 플라스미드 DNA가 염색체 DNA 상으로 도입될 때 발생할 수 있는 플라스미드 DNA의 재배열 가능성을 감소시켰으며 그리하여 DHFR과 HBsAg 두 유전자를 고효율로 안정하게 동시 발현하는 세포주를 얻을 수 있었던 것으로 보인다.

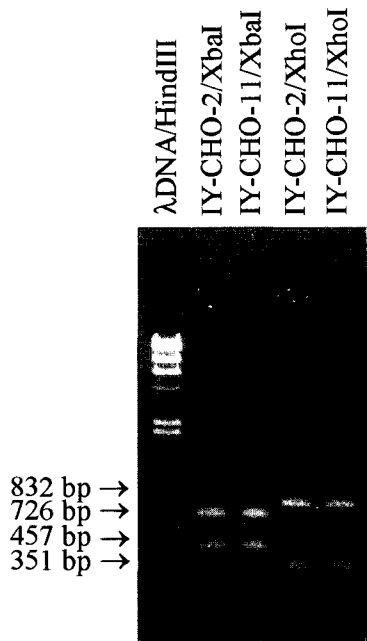
**CHO 세포에서 HBsAg mRNA 발현 확인 - HBsAg 유전자로 형질전환된 CHO 세포에서 HBsAg이 정상적으로 발현되는지 확인하기 위하여 먼저 RT-PCR**



**Fig. 2** - mRNA expression of HBsAg containing preS2 and S region in IY-CHO-2 and IY-CHO-11 cells. RT-PCR was performed with total RNA extracted from IY-CHO-2 and IY-CHO-11 cells. RT-PCR products were then analysed on a 1% agarose gel electrophoresis. Lane 1: HindIII digested λ DNA as a size marker. Lane 2: RT-PCR products with total RNA extracted from untransfected CHO cells. Lane 3 & 4: RT-PCR products with total RNA from IY-CHO-2 and IY-CHO-11, respectively.

를 수행하였다. Fig. 2에 제시된 것처럼 형질전환되지 않은 CHO 세포에서 분리한 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행했을 때는 증폭산물이 나타나지 않았으나, 형질 전환체 IY-CHO-2, IY-CHO-11에서 분리한 RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행하였을 때는 예상 증폭산물 크기 1,183 bp와 같은 크기의 band가 나타났다. 또한 증폭산물이 HBsAg 유전자인지를 확인하기 위하여 RT-PCR 산물을 *Xba*I 또는 *Xho*I로 절단하여 본 결과 예상한대로 *Xba*I로 절단했을 때는 457 bp와 726 bp의 절편이 나타났고 *Xho*I로 절단했을 때는 351 bp와 832 bp 절편이 나타나(Fig. 3), IY-CHO-2와 IY-CHO-11에서 HBsAg mRNA가 안정적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

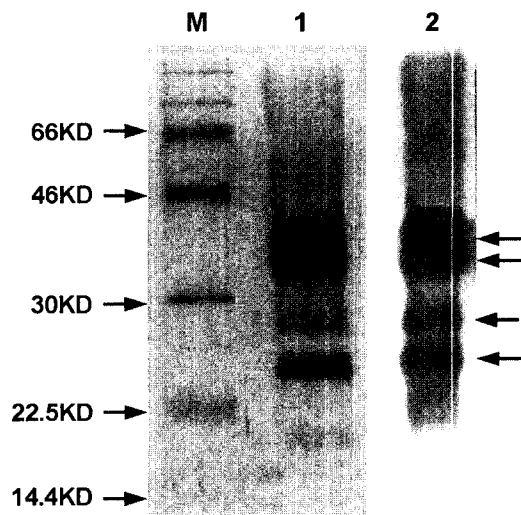
**CHO세포에서 생산, 정제된 HBsAg 단백질 확인** - IY-CHO-2를 배양한 후, 배양 상등액으로부터 항체-친화성 크로마토그래피로 정제한 HBsAg 단백질을 SDS-PAGE하여, silver staining과 Western blot을



**Fig. 3** - Confirmation for identity of RT-PCR product. RT-PCR products were digested with *Xba*I or *Xho*I and then analysed by 1% agarose gel electrophoresis. Lane 1: *Hind*III digested  $\lambda$  DNA as a size marker. Lane 2 & 3: RT-PCR products digested with *Xba*I (lane 2 for IY-CHO-2 and lane 3 for IY-CHO-11). Lane 4 & 5: RT-PCR products digested with *Xho*I (lane 4 for IY-CHO-2 and lane 5 for IY-CHO-11).

실시하였다. 천연 간염 바이러스에서 전체 H3sAg 유전자(preS1+preS2+S)가 발현되면 24 kDa, 33 kDa, 42 kDa 단백질과 이들 각각의 당 결합 형태인 27 kDa, 36 kDa, 44 kDa의 총 6종류 크기의 단백질이 발현된다. 그러나, preS2와 S 부위만 발현되도록 구축된 IY-CHO-2 세포주에서 생성된 HBsAg 예상 분자량은 24 kDa, 33 kDa과 이들의 당 결합 형태인 27 kDa, 36 kDa로 예상된다.<sup>2)</sup> 결과는 예상한대로 IY-CHO-2에서 발현된 HBsAg은 24 kDa, 27 kDa, 33 kDa, 36 kDa 크기의 단백질이 발현되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서, HBsAg 발현백터로 형질전환된 CHO세포에서 발현된 HBsAg은 천연 간염 바이러스에서 발현되는 HBsAg과 같은 크기의 단백질이며 또한 당결합도 비슷하게 이루어짐을 보여준다. 또한 preS2 부위에 해당하는 33 kDa과 36 kDa의 단백질이 높은 수준으로 발현되는 양상이 확인되었다. 이것은 발현백터인 pIEspHBVS2-*dhfr*에 포함되어 있는 HBsAg 부분의 위치가 단백질 발현과 관계가 있기 때문이라고 여겨진다.

**발현된 재조합 HBsAg의 항체형성능 확인** - 발현된



**Fig. 4** - Confirmation for HBsAg produced in IY-CHO-2 cells. HBsAg were purified from the culture medium of IY-CHO-2 cells by antibody affinity chromatography. Purified protein were applied on to a SDS/PAGE and were then subjected to either silver staining or Western blotting. M: high molecular weight size marker. Lane 1: HBsAg with silver staining. Lane 2: HBsAg with antibody hybridization in Western blotting.

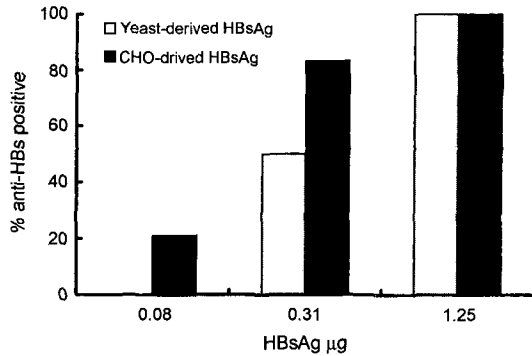


Fig. 5 - Antibody productivity of HBsAg produced in IY-CHO-2 cells. ELISA was performed with the serum drawn from the mice intraperitoneally injected with HBsAg produced in IY-CHO-2 cells or in yeasts. Data were expressed as a percentage of mice produced antibody against HBsAg protein to the total number of mice in a group.

HBsAg이 항체 유발능력이 있는지를 확인하기 위하여 Balb/c마우스에서 항체생성율을 조사하였다. 실험군은 IY-CHO-2 배양 상등액으로부터 분리 정제된 HBsAg을 사용하였고, 대조군은 S 부위만 포함된 효모유래 HBsAg을 사용하였다. 마우스의 복강 내로 투여한 후 혈청을 얻어 HBsAg에 대한 항체를 이용한 ELISA법으로 마우스 혈청 중 항-HBsAg 항체 농도를 검사하였다. 그 결과, 1.25  $\mu\text{g}/\text{m}$ 군은 IY-CHO-2과 대조군 모두에서 100%의 항체 생성율을 나타내었고, 0.312  $\mu\text{g}/\text{m}$ 군에서는 IY-CHO-2은 83.3%, 대조군은 50%의 항체 생성율을 나타내었다. 그러나, 0.078  $\mu\text{g}/\text{m}$ 군은 IY-CHO-2에서만 항체가 생성되었다(Fig. 5). 따라서, IY-CHO-2 유래 HBsAg은 고농도에서 효모유래 HBsAg과 항체 생성율은 같으나, 낮은 농도에서는 더욱 효과적인 항체 생성 능력을 가지고 있음이 확인되었다. 이것은 IY-CHO-2에서 생산된 HBsAg이 preS2 부위를 함유하고 있고 또한 yeast system에서 보다는 당쇄결합이 효율적으로 일어나기 때문일 것으로 예상된다.

## 결 론

본 연구에서 제작된 CHO 세포주에서 생산된 HBsAg는 preS2 부위를 함유하고 있으며 이 단백질은 효모에서 생산된 S 부위만 포함하고 있는 HBsAg 보다 저농도에서 항체 생성능이 뛰어나 preS가 첨가된

CHO 세포 유래 단백질이 간염 바이러스에 대하여 면역능을 증가시킬 수 있다.

## 감사의 말씀

본 논문을 교정해주신 정명일 박사님께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Tiollais, P. and Buendia, M. A. : Hepatitis B virus. *Scient. Amer.* 4, 48 (1991).
- 2) Tiollais, P., Christine, P. and Dejean, A. : The hepatitis B virus. *Nature.* 317, 489 (1985).
- 3) Maupas, P., Goudeau, A., Coursaget, P., Drucker, J. and Bagros, P. : Immunization against hepatitis B in man. *Lancet.* 1, 1367 (1976).
- 4) Valenzuela, P., Coit, D. and Medina-Selby, M. A. : Antigen engineering in yeast: Synthesis and assembly of hybrid hepatitis B surface antigen-herpes simplex IgD particles. *Bio Technology.* 3, 323 (1985).
- 5) Werner, B. G., Dienstag, J. L., Kuter, B. J., Polk, B. F. : Isolated antibody to hepatitis B surface antigen and response to hepatitis B vaccination. *Ann. Intern. Med.* 103, 201 (1985).
- 6) Neurath, A. R., Kent, S. B. H., Strick, N., Stark, D. and Sproul, P. : Genetic restriction of immune responsiveness to synthetic peptides corresponding to sequences in the pre-S region of the hepatitis B virus (HBV) envelope gene. *J. Med. Virol.* 17, 119 (1985).
- 7) Milich, D. R., Mclachlan, A., Chisari, F. V., Kent, B. H. and Thornton, G. B. : Immune response to the pre-S(1) region of the hepatitis B surface antigen (HBsAg): PreS(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HBsAg. *J. Immunol.* 137, 315 (1986).
- 8) Budkowska, A., Dubreuil, P., Capel, F. and Pillot, J. : Hepatitis B virus pre-S gene-encoded antigenic specificity and anti-pre-S antibody: relationship between anti-pre-S response and recovery. *Hepatology.* 6, 360 (1986).
- 9) Neurath, A. R., Kent, S. B. H., Strick, N. and Parker, K. : Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell.*

- 46, 429 (1986a).
- 10) Neurath, A. R., Seto, B. and Strick, N. : Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein are virus-neutralizing and protective. *Vaccine*. **7**, 234 (1989).
  - 11) Hemmerling, A. E., Muller, R., Firusian, N., Grtz, J., Haubitz, M. and Thoma, H. A. : Clinical experience with the preS1-containing hepatitis B vaccine (HG-3) in different nonresponders groups. In: Nishioka, K., Suzuki, H., Mishiro, S., Oda (Eds.), *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Springer, Tokyo, 540 (1994).
  - 12) Shouval, D., Ilan, Y. and Adler, R. : Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine*. **12**, 1453 (1994).
  - 13) Yerushalmi, B., Raz, R., Blondheim, O., Shumov, E., Koren, R. and Dagan, R. : Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in neonates. *Pediatr. Infect. Disease J.* **16**, 587 (1997).
  - 14) Pride, M. W., Bailey, C. R., Muchmore, E. and Thanavala, Y. : Evaluation of B and T-cell responses in chimpanzees immunized with Hepagene R, a hepatitis B vaccine containing pre-S1, pre-S2 and S gene products. *Vaccine*. **16**, 543 (1998).
  - 15) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).