



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0085131
(43) 공개일자 2017년07월21일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/1063 (2013.01)
A61K 48/0016 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7017224</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년12월01일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년06월22일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/063174</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/089862
국제공개일자 2016년06월09일</p> <p>(30) 우선권주장
62/086,157 2014년12월01일 미국(US)
62/213,166 2015년09월02일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
더 트러스트스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너스트리트 3160
이노비오 파마수티컬즈, 인크.
미국 19462 펜실베니아주 폴리머스 미팅 스위트 110 저먼타운 파이크 660</p> <p>(72) 발명자
웨이너, 데이비드, 비.
미국 19066 펜실바니아, 메리온, 비콤 레인 717
무투마니, 카루피아
미국 08002 뉴 저지, 체리 힐, 아이비 레인 52
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인엠에이피에스</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 DNA 항체 작제물 및 그 이용 방법

(57) 요약

본원에 항체를 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물이 개시된다. 또한 본원에 상기 조성물을 대상체에 투여함으로써 대상체에서 합성 항체를 생성하는 방법이 개시된다. 본 개시내용 또한 상기 조성물 및 생성 방법을 사용하여 대상체에서 질병을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

대표도

IgG 중쇄를 암호화하는 최적화된 핵산 서열
GGATCCGCCACCATGGAAACCGACACTCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGGGTGCCCGGCTCAACAGGCGACGGC
GCTCAGGTCCAGCTGGTCCAGTCTGGAGCTGTGATCAAGACCCCTGGCAGCTCCGTCAAATTTCTTGCAGAGCAAGTG
GCTACAACCTCCGGGACTATAGCATCCACTGGGTGCGGCTGATTCCTGATAAGGGATTTGAGTGGATCGGCTGGATCAA
GCCACTGTGGGGCGCTGTGTCTACGCAAGGCAGCTGCAGGGGCGCGTCTCCATGACACGACAGCTGTCTCAGGACCC
AGACGATCCCGATTGGGGGGTGGCCTACATGGAGTTCAGTGGACTGACTCCCGCAGACACCGCCGAATATTTTTCGTG
CGGAGAGGCTCCTGCGACTACTGTGGGGATTTCCTATGGCAGTATGGTGTGACGGGAACGTGGTCTGTGGTCTCTAGTG
CATCAACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCATCAAGCAAAAAGTACATCAGGAGGAACTGCAGCTCTGGGAT
GTCTGGTGAAGGATTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTCACTGGAACTCCGGAGCACTGACCTCCGGAGTGCACACATT
TCCCGCTGTCTGCAGTCTCTGGGCTGTACTCTCTGAGTTCACTGGTCACTAGTGCCTAGCTCCTCTCTGGGCACCCAGA
CATATATCTGCAACGTCAATCATAAGCCAAGTAATACTAAAGTGGACAAGAAAGTCGAACCCAAATCATGTTACCCCT
ATGACGTGCTGATTATGCTTGATAACTCGAG (서열 번호:6)

(52) CPC특허분류

A61K 48/0066 (2013.01)
C07K 16/1081 (2013.01)
C07K 16/3069 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

플린게이, 세리케

미국 55411 미네소타, 미니애폴리스, 펜 애비뉴 노
스 1623

샤르데자이, 니란잔

미국 19422 펜실바니아, 블루 벨, 말라드 서클 480

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 합성 항체를 생성하는 방법으로서,

항체 또는 이의 단편을 암호화하는 제조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 제조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 발현되어 상기 합성 항체를 생성하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 및 경쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편은 제1 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편은 제2 핵산 서열에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제조합 핵산 서열은 상기 제1 핵산 서열 및 상기 제2 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제조합 핵산 서열은 상기 대상체에서 단일 전사체로 상기 제1 핵산 서열 및 상기 제2 핵산 서열을 발현하기 위한 프로모터를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 제조합 핵산 서열은 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 제3 핵산 서열을 추가로 포함하며, 그리고 상기 제3 핵산 서열은 상기 제1 핵산 서열 및 상기 제2 핵산 서열 사이에 배치되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 대상체의 상기 프로테아제는 상기 프로테아제 절단 부위를 인식하고 절단하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제조합 핵산 서열은 상기 대상체에서 발현되어 항체 폴리펩티드 서열을 생성하며, 상기 항체 폴리펩티드 서열은 상기 중쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 상기 프로테아제 절단 부위, 및 상기 경쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 포함하고,

상기 대상체에 의해 생산된 상기 프로테아제는 상기 항체 폴리펩티드 서열의 상기 프로테아제 절단 부위를 인식하고 절단하여 절단된 중쇄 폴리펩티드 및 절단된 경쇄 폴리펩티드를 생성하고, 상기 합성 항체는 상기 절단된 중쇄 폴리펩티드 및 상기 절단된 경쇄 폴리펩티드에 의해 생성되는, 방법.

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 제조합 핵산 서열은 제1 전사체로서 상기 제1 핵산 서열을 발현하기 위한 제1 프로모터 및 제2 전사체로서 상기 제2 핵산 서열을 발현하기 위한 제2 프로모터를 포함하며,

상기 제1 전사체는 제1 폴리펩티드로 번역되고, 그리고 상기 제2 전사체는 제2 폴리펩티드로 번역되며, 상기 합성 항체는 상기 제1 및 제2 폴리펩티드에 의해 생성되는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1 프로모터 및 상기 제2 프로모터는 동일한 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터인, 방법.

청구항 13

제2항에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역 및 불변 중쇄 영역 1을 포함하는, 방법.

청구항 14

제2항에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역, 불변 중쇄 영역 1, 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2 및 불변 중쇄 영역 3을 포함하는, 방법.

청구항 15

제2항에 있어서, 상기 경쇄 폴리펩티드는 가변 경쇄 영역 및 불변 경쇄 영역을 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열은 코작 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열은 면역글로불린(Ig) 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 Ig 신호 펩티드는 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 80 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 79 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 21

대상체에서 합성 항체를 생성하는 방법으로서,

중쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 제1 재조합 핵산 서열, 및 경쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 제2 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 제1 재조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 발현되어 제1 폴리펩티드를 생성하고, 상기 제2 재조합 핵산이 상기 대상체에서 발현되어 제2 폴리펩티드를 생성하고, 상기 합성 항체가 상기 제1 및 제2 폴리펩티드에 의해 생성되는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 제1 재조합 핵산 서열은 상기 대상체에서 상기 제1 폴리펩티드를 발현하기 위한 제1 프로모터를 추가로 포함하고, 상기 제2 재조합 핵산 서열은 상기 대상체에서 상기 제2 폴리펩티드를 발현하기 위한 제2 프로모터를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제1 프로모터 및 상기 제2 프로모터는 동일한 것인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터인, 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역 및 불변 중쇄 영역 1을 포함하는, 방법.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역, 불변 중쇄 영역 1, 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2 및 불변 중쇄 영역 3을 포함하는, 방법.

청구항 27

제21항에 있어서, 상기 경쇄 폴리펩티드는 가변 경쇄 영역 및 불변 경쇄 영역을 포함하는, 방법.

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 제1 재조합 핵산 서열 및 상기 제2 재조합 핵산 서열은 코작 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제21항에 있어서, 상기 제1 재조합 핵산 서열 및 상기 제2 재조합 핵산 서열은 면역글로불린(Ig) 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 Ig 신호 펩티드는 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 31

대상체에서 질환을 예방하거나 치료하는 방법으로서,

제1항 또는 제21항의 방법에 따라 대상체에서 합성 항체를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 합성 항체는 자가-항원에 특이적인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 자가-항원이 PSMA인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 80 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 79 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 36

제2항에 있어서, 류신에서 알라닌으로의 2개의 돌연변이가 Fc 영역의 CH2 영역에 도입되는, 방법.

청구항 37

제2항에 있어서, 생체내에서 생산된 항체가 탈푸코실화되는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되는, 생성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 생성물은 기능적 항체를 발현할 수 있는 단일 DNA 플라스미드인, 생성물.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 생성물이, 생체내에서 조합되어 기능성 항체를 형성하는 기능성 항체의 성분들을 발현할 수 있는 2 이상의 별개의 DNA 플라스미드로 이루어진 것인, 생성물.

청구항 41

병원체에 의한 감염에서 대상체를 치료하는 방법으로서,

상기 병원체에 특이적인 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 병원체의 항원을 투여하여 상기 대상체에서 면역 반응을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

ADCC를 유도하는 암 마커를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 44

서열 번호: 79에 제시된 핵산 서열의 전장에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는, 핵산 분자.

청구항 45

서열 번호: 79에 개시된 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는, 핵산 분자.

청구항 46

서열 번호: 80에 제시된 아미노산 서열의 전장에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는, 핵산 분자.

청구항 47

서열 번호: 80에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는, 핵산 분자.

청구항 48

제44항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 벡터를 포함하는, 핵산 분자.

청구항 49

제44항 내지 제48항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은, 이들 출원 그 전체가 본 명세서에 참고로 편입되는, 2014년 12월 1일 월요일 출원된 미국 가출원 번호 62/086,157 및 2015년 9월 2일 수요일 출원된 미국 가출원 번호 62/213,166의 우선권을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 생체내에서 반감기 연장을 갖는 합성 항체를 생성할 수 있고, 항체-의존적 항상을 제거할 수 있으며, 항체 의존적 세포독성을 향상시킬 수 있고, 이중특이적 결합을 제공할 수 있으며, 이중기능성(bifunctionality)을 제공할 수 있는, 항체에 대한 다양한 변형을 포함하는 합성 항체, 및 이의 기능성 단편을 생성하기 위한 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물, 및 상기 조성물을 투여함으로써 대상에서 질환을 예방하고/거나 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 면역글로불린 분자는 시스테인 잔기 간의 디설파이드 결합(S-S로 나타냄)에 의해 공유 연결된 각 유형의 두 경쇄(L) 및 중쇄(H)를 포함한다. 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 도메인은 항체 분자의 결합 부위에 기여한다. 중쇄 불변 영역은 최대 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3) 및 (가요성) 힌지 영역으로 이루어진다. 경쇄는 또한 불변 도메인(CL)을 갖는다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 4개의 틀 영역(FR; FR1, FR2, FR3 및 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(CDR; CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다. 따라서 이들은 생체내에서 조립하기 어려웠던 매우 복잡한 유전적 시스템이다.

[0006] 표적화된 단클론성 항체(mAb)는 지난 25년 간 가장 중요한 의학적 치료 진보 중 하나를 나타낸다. 상기 유형의 면역 기반 치료법은 이제 수많은 자가면역 질환, 암뿐만 아니라 감염성 질환의 치료를 위해 일상적으로 이용된다. 암에 있어서, 현재 이용되는 여러 면역글로불린(Ig) 기반 치료법은 종양에 대한 세포독성 화학치료법 요법과 조합된다. 상기 조합 접근은 전체적 생존을 크게 개선시켰다. 비호지킨성 림프종의 치료를 위해 CD20을 표적화하는 키메라 mAb인 리툽시맵(Rituxan), 및 CTLA-4를 차단하고 흑색종 및 다른 암의 치료에 이용된 인간 mAb인 이필리무맵(Yervoy)을 포함하는 여러 mAb 제조물이 특정 암에 대한 이용을 위해 허가받았다. 추가적으로, 베바시주맵(Avastin)은 VEGF 및 종양 신혈관형성을 표적화하고 결직장암의 치료에 이용된 또 다른 유명한 인간화된 mAb이다. 암 치료를 위해 가장 높은 프로파일의 mAb는 환자 서브세트에서 유방암에 대해 상당한 유효성을 가진 것으로 나타난, Her2/neu를 표적화하는 인간화된 제조물인 트라스투주맵(Herceptin)일 것이다. 또한 수많은 mAb가 자가면역 및 특정 혈액 장애의 치료를 위해 이용되고 있다.

[0007] 암 치료에 부가하여, 다클론성 Ig의 수동 전달은 디프테리아, A형 및 B형 간염, 광견병, 파상풍, 수두 및 호흡기 세포융합 바이러스(RSV)를 포함하는 여러 감염성 질환에 대한 보호 효능을 매개한다. 실제로, 몇몇 다클론성 Ig 제조물은 능동 백신접종을 통해 생성될 보호적 Ig를 위한 충분한 시간이 없는 상황에서, 질환 유행 지역으로 여행하는 개인에서 특정 감염 체제에 대한 일시적 보호를 제공한다. 또한 면역 결핍증이 있는 어린이에서, RSV 감염을 표적으로 하는 mAb인 팔리비주맵(Synagis)이 RSV에 대해 임상적으로 보호하는 것으로 나타났다.

[0008] 시중에 존재하는 현재 이용가능한 치료 항체는 인간 IgG1 이소형이다. 이들 항체는 항체 불변 영역(Fc)에 결합된 2개의 N-연결된 2분지(biantennary) 복합체-유형 올리고당을 갖는 당단백질을 포함하며, 상기 올리고당의 대부분은 코어-푸코실화되어 있다. 그것은 Fc 및 백혈구 수용체(FcγR) 또는 보체 중 어느 하나와의 상호작용을 통해 항체-의존적 세포독성(ADCC) 및 보체-의존적 세포독성(CDC)의 효과기 기능을 수행한다. 치료 항체의 생체내 효능이 감소하는 현상이 있으므로(시험관내와 비교하여), 대용량의 치료 항체가 필요하며, 때로는 매주 수백 밀리그램의 용량이 필요하다. 이는 혈청 IgG와 치료 항체가 자연 살해(NK) 세포 상의 FcγRIIIa에 결합하는데 경쟁하기 때문이다. 내인성 인간 혈청 IgG는 치료 항체에 의해 유도된 ADCC를 억제한다. 따라서, 인간에서 비-푸코실화된 치료 항체의 효능이 향상될 수 있다. 비-푸코실화된 치료 항체는 푸코실화된 인간 혈청 IgG보다 FcγRIIIa에 대한 결합친화도가 훨씬 더 높으며, 이는 인간 혈청 IgG에 의한 간섭을 극복하기 위한 바람직한 특성이다.

[0009] 항체 기반 치료에 위험이 없는 것은 아니다. 이와 같은 위험요소 중 하나는 항체-의존 감염증강(ADE)으로, 이것은 항바이러스 단백질이 숙주 세포로의 바이러스 진입을 촉진하여 상기 세포의 감염성의 증가를 초래할 경우 발

생한다. 일부 세포들은 바이러스가 진입로를 확보하기 위해 사용하는 일반적인 수용체를 그들의 표면에 갖고 있지 않다. 상기 항바이러스 단백질(즉, 항체)은 이들 세포들 중 일부가 혈장 막에 가지고 있는 항체 Fc 수용체에 결합한다. 바이러스는 상기 항체의 다른쪽 말단의 항원 결합 부위에 결합한다. 상기 바이러스는 이와 같은 메커니즘을 사용하여 인간 대식세포를 감염시킴으로써, 정상적으로는 온건한 바이러스 감염을 생명을 위협하는 것으로 만들 수 있다. 가장 널리 알려진 ADE의 예는 땡기 바이러스(DENV)의 감염 환경에서 발생한다. 이전에 DENV의 하나의 혈청형에 감염된 적이 있는 사람은 다른 혈청형에 의해 수 개월 후 또는 수년 후 감염됨이 관측된다. 이와 같은 경우에, 질병의 임상적 과정은 좀 더 중증이고, 이와 같은 사람들은 ADE가 발생하지 않았던 사람들과 비교하여 더 높은 바이러스 혈증을 갖는다. 이것은 1차(첫번째) 감염이 어린이에게서 가장 가벼운 질병(DF)을 유발하고, 2차 감염(훗날 재감염)이 어린이 및 성인 모두에서 중증 질환(DHF 및/또는 DSS)과 연관될 가능성이 더 크다는 관측을 설명한다. DENV에는 항원이 다른 4가지 혈청형이 있다(DENV-1~DENV-4). DENV 감염은 감염성 혈청형에 평생 면역을 제공하는 중화 동형(homotypic) 면역글로불린 G(IgG) 항체의 생산을 유도한다. DENV 감염은 또한 그 밖의 다른 3가지 혈청형에 대해 어느 정도의 교차 방어 면역성을 생산한다. DENV 감염은, 중화 이형(heterotypic) 항체를 유도할 뿐만 아니라, 또한 바이러스를 부분적으로만 중화(neutralize) 하거나 전혀 중화하지 못하는 이형 항체를 유도할 수 있다. 이와 같이 교차-반응적이지만 중화하지 못하는 항체의 생산은 좀 더 중증의 2차 감염의 원인이 될 수 있다. 일단 백혈구 내에서, 바이러스가 검출되지 않게 복제되고, 결국 중증 질환을 일으키는 아주 높은 바이러스 역가를 발생시킨다.

[0010] mAb 치료의 임상적 효과는 아주 인상적이다. 그러나 이와 같은 치료 접근법의 사용 및 배포를 제한시키는 문제들이 여전히 남아 있다. 이러한 문제들 중에는 이와 같은 복잡한 생물체계의 고비용 생산이 포함되는데, 이 때문에 더 많은 인구, 특히 큰 효과를 볼 수 있는 있는 개발도상국에서의 사용이 제한될 수 있다. 게다가, 효능을 얻고 유지하기 위해 mAb를 자주 반복적으로 투여해야 한다는 점이 물류 및 환자 순응의 측면에서 장애물일 수 있다. 혈청 IgG와의 경쟁 때문에 치료용 항체의 낮은 체내 효능을 감소시키거나 또는 이것을 제거할 새로운 항체가 요구된다. 땡기, HIV, RSV 및 기타 바이러스에서 항체 의존 증강을 제거할 수 있는 새로운 항체가 요구된다. 치료용 또는 예방용임을 입증할 수 있는 여러 기능을 수행하는 이중특이적 항체, 이작용기 항체 및 항체 각 테일이 요구된다. DNA 기반의 백신을 포함하는 백신을 이용한 면역화를 통해 숙주 시스템을 면역자극하는 것과 함께 본원에 기재된 합성 항체를 이용할 수 있는 조합 요법이 또한 필요하다. 추가적으로, 이와 같은 항체 체계의 장기적 안정성이 종종 짧고 최적에 미치지 못한다. 따라서, 안전하고 저렴하게 대상체에 전달될 수 있는 합성 항체 분자의 필요성이 당해기술에 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0011] 요약

[0012] 본 발명은 대상체에서 합성 항체의 생성 방법에 대한 것이다. 이 방법은 대상체에 항체 또는 그의 단편을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 합성 항체를 생성하기 위해 대상체에서 발현될 수 있다.

[0013] 생성된 합성 항체는 탈푸코실화될 수 있다. 생성된 합성 항체는 Fc 영역의 CH2 영역 내에 류신에서 알라닌으로의 2개의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0014] 항체는 중쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편, 및 경쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 중쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편은 제1 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있고, 경쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편은 제2 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다. 재조합 핵산 서열은 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 대상체에서 단일 전사체로 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열을 발현하기 위한 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터일 수 있다.

[0015] 재조합 핵산 서열은 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 제3 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 제3 핵산 서열은 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열 간에 배치될 수 있다. 대상체의 프로테아제는 프로테아제 절단 부위를 인식하고 절단할 수 있다.

[0016] 재조합 핵산 서열은 항체 폴리펩티드 서열을 생성하기 위해 대상체에서 발현될 수 있다. 항체 폴리펩티드 서열은 중쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편, 프로테아제 절단 부위, 및 경쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 대상체에 의해 생산된 프로테아제는 항체 폴리펩티드 서열의 프로테아제 절단 부위를 인식하고 절단하여 절단된 중쇄 폴리펩티드 및 절단된 경쇄 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 합성 항체는 절단된 중쇄 폴리펩티드 및 절단된 경쇄 폴리펩티드에 의해 생성될 수 있다.

- [0017] 재조합 핵산 서열은 제1 전사체로 제1 핵산 서열을 발현하기 위한 제1 프로모터 및 제2 전사체로 제2 핵산 서열을 발현하기 위한 제2 프로모터를 포함할 수 있다. 제1 전사체는 제1 폴리펩티드로 번역될 수 있고, 제2 전사체는 제2 폴리펩티드로 번역될 수 있다. 합성 항체는 제1 및 제2 폴리펩티드에 의해 생성될 수 있다. 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 동일할 수 있다. 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터일 수 있다.
- [0018] 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역 및 불변 중쇄 영역 1을 포함할 수 있다. 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역, 불변 중쇄 영역 1, 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2 및 불변 중쇄 영역 3을 포함할 수 있다. 경쇄 폴리펩티드는 가변 경쇄 영역 및 불변 경쇄 영역을 포함할 수 있다.
- [0019] 재조합 핵산 서열은 코작(Kozak) 서열을 추가로 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 면역글로불린(Ig) 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. Ig 신호 펩티드는 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0020] 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 1, 2, 5, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 및 80 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 3, 4, 6, 7, 40, 42, 44, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 63 및 79 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한 대상체에서 합성 항체의 생성 방법에 대한 것이다. 이 방법은 중쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 암호화하는 제1 재조합 핵산 서열, 및 경쇄 폴리펩티드, 또는 그의 단편을 암호화하는 제2 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 제1 재조합 핵산 서열은 제1 폴리펩티드를 생성하기 위해 대상체에서 발현될 수 있고, 제2 재조합 핵산 서열은 제2 폴리펩티드를 생성하기 위해 대상체에서 발현될 수 있다. 합성 항체는 제1 및 제2 폴리펩티드에 의해 생성될 수 있다.
- [0022] 제1 재조합 핵산 서열은 대상체에서 제1 폴리펩티드를 발현하기 위한 제1 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 제2 재조합 핵산 서열은 대상체에서 제2 폴리펩티드를 발현하기 위한 제2 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 동일할 수 있다. 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터일 수 있다.
- [0023] 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역 및 불변 중쇄 영역 1을 포함할 수 있다. 중쇄 폴리펩티드는 가변 중쇄 영역, 불변 중쇄 영역 1, 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2 및 불변 중쇄 영역 3을 포함할 수 있다. 경쇄 폴리펩티드는 가변 경쇄 영역 및 불변 경쇄 영역을 포함할 수 있다.
- [0024] 제1 재조합 핵산 서열 및 제2 재조합 핵산 서열은 코작 서열을 추가로 포함할 수 있다. 제1 재조합 핵산 서열 및 제2 재조합 핵산 서열은 면역글로불린(Ig) 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. Ig 신호 펩티드는 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한 대상체에서 질환의 예방 또는 치료 방법에 대한 것이다. 이 방법은 상기 방법 중 하나에 따른 대상체에서의 합성 항체의 생성 단계를 포함할 수 있다. 합성 항체는 외래 항원에 대해 특이적일 수 있다. 외래 항원은 바이러스에서 유래될 수 있다. 바이러스는 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 치쿤군야 바이러스(CHIKV) 또는 뎅기 바이러스일 수 있다.
- [0026] 바이러스는 HIV일 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 1, 2, 5, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 및 57 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 3, 4, 6, 7, 50, 52, 55, 56, 62, 및 63 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0027] 바이러스는 CHIKV일 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 59 및 61 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 58 및 60 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0028] 바이러스는 뎅기 바이러스일 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 45 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 44 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함한다.
- [0029] 합성 항체는 자가-항원에 대해 특이적일 수 있다. 자가-항원은 Her2일 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 41 및 43 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 40 및 42 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0030] 합성 항체는 자가-항원에 대해 특이적일 수 있다. 자가-항원은 PSMA일 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 80 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 79 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있다.

- [0031] 본 발명은 또한 상기 언급된 방법 중 어느 하나에 의해 생산된 생성물에 관한 것이다. 상기 생성물은 기능성 항체를 발현할 수 있는 단일 DNA 플라스미드일 수 있다. 상기 생성물은, 체내에서 조합되어 기능성 항체를 형성하는 기능성 항체의 성분들을 발현할 수 있는 두 개의 별개의 DNA 플라스미드로 이루어질 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한 병원체에 의한 감염에서 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 병원체에 특이적인 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 투여하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기 병원체의 항원을 투여하여 상기 대상체에서 면역 반응을 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한 ADCC를 유도하는 암 마커를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 투여하는 것을 포함하는, 대상체를 암으로부터 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명은 또한 서열 번호: 79에 제시된 핵산 서열의 전장에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명은 또한 서열 번호: 79에 개시된 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 또한 서열 번호: 80에 제시된 아미노산 서열의 전장에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명은 또한 서열 번호: 80에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0038] 상기 언급된 핵산 분자 중 어느 하나는 발현 벡터를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 또한 상기 기술된 핵산 분자 중 하나 또는 그 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제를 또한 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같은 IgG 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.
- 도 2는 실시예 1에 기재된 바와 같은 IgG 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.
- 도 3은 시간(hr) 대 OD 450nm(조직 배양 상청액의 1:100 희석액)를 도시한 그래프를 나타낸다.
- 도 4는 웨스턴 블롯 이미지를 나타낸다.
- 도 5는 pHIV-1Env-Fab의 발현의 생성 및 확인을 나타낸다. (도 5A & 도 5B) pHIV-1 Env Fab 항-gp120 Fab를 발현하는 작제물의 환형 플라스미드 지도는 VRC01 중쇄(H) 및 경쇄(L) 가변 Ig 유전자를 사용하여 설계되었다. 발현 수준을 증가시키기 위해 Fab 플라스미드의 구축 시 몇몇 변형이 포함되었다. 나타낸 바와 같은 Fab VL 및 VH 단편 유전자는 pVax1 벡터의 BamH1 및 Xho1 제한효소 부위 사이에 별도로 클로닝되었다. 도 5C는 pHIV-1 Env Fab의 시험관내 발현을 나타낸다. 이 그래프는 293T 세포의 형질감염 후 pHIV-1 Env Fab 발현의 경시적 역학을 나타내었다. 발현을 시사하는 나타낸 값은 3개 웰의 평균 OD450nm±SD이다. 대조군으로 293T 세포도 pVax1 골격으로 형질감염되었다.
- 도 6은 pHIV-1 Env Fab에 의한 항 HIV Env 특이적 Fab의 시간 생성의 측정을 나타낸다. 도 6A는 항-HIV1 Fab의 생성의 시간 경과를 나타낸다. pHIV-1 Env Fab의 투여 후, 특이적 Fab의 생산을 ELISA로 1:100의 최종 희석도에 서 혈청 중에 10일에 걸쳐 측정하고 OD450nm로 나타내었다. pVax1 투여된 마우스로부터의 혈청을 음성 대조군으로 사용하였다. 도 6B는 재조합 gp120(rgp120)으로 면역화 후 항-gp120 항체 반응의 비교 측정을 나타낸다. 실시예 2에 나타낸 바와 같이, rgp120의 단회 주사로 마우스를 면역접종한 뒤 항-gp120 항체 생산을 최대 10일에 걸쳐 측정하고 OD450nm 값으로 나타내었다. 이 연구에 대해서는 음성 대조군 주사로 PBS를 이용하였다. 도 6C는 면역블롯 분석에 의한 HIV1Env-Fab 결합의 확인을 보여준다. 실시예에 나타낸 바와 같이, 5 또는 10 μ g의 gp120을 SDS-PAGE 및 니트로셀룰로오스 블롯팅을 거친 후 블롯을 pHIV-1 Env Fab 투여 마우스로부터의 혈청과 항온처리하였다. 면역블롯은 실험 혈청이 결합된 rgp120을 인식함을 나타내어, 생성된 Fab의 특이성을 확인시켰다. 도 6D는 pHIV-1Env-Fab 투여 후 마우스 혈청에서 IgG1로서 측정된, 인간 IgG1Fab의 시간 정량을 나타낸다. IgG1을 나타낸 시점에 표준 ELISA 키트로 측정하고 Fab(μ g/mL)±SD로 표시하였다. pVax1-투여 마우스로부터의 혈청을 음성 대조군으로 이용하였다. 혈청 표본을 x축에 나타낸 시점에 분석하였다. 도 6A, 도 6B 및 도 6D에 현시된 그래프에 나타낸 화살표는 DNA 플라스미드 투여의 지점을 표지한다.

도 7은 A군 HIV Env 당단백질에 대한 HIV1 Env Fab의 FACS 결합 분석을 나타낸다. 도 7A는 HIV-1 클레이드 A Env 당단백질에 대한 항-HIV1Env-Fab의 결합을 나타내는 FACS 스캔을 보여준다. 공통(pCon-Env-A) 또는 "최적화된"(pOpt-Env-A) HIV-1 A군 외피를 발현하는 DNA를 293T 세포 내로 형질감염시켰다. 형질감염 2일 후, 세포를 정제된 천연 VRC01 Ig, pHIV-1 Env Fab로부터 생성된 혈청(단회 플라스미드 투여 48시간 후 수집됨) 또는 pIgG-E1M2 투여로 생성된 대조군 Ig로 염색하였다. 혈청 및 VRC01 항체를 50 μ l의 PBS에서 각각 1:4 또는 1:100으로 희석하고, 30분간 실온에서 항온처리하였다. 이어서 세포를 적절한 2차 피코에리트린(PE) 콘주게이트된 Ig로 염색한 뒤 단일선 및 살아있는 세포로 FACS 분석에 대해 관문화하였다. 양성 세포의 결합 백분율을 각 스캔에서 나타내었다. 도 7B는 FACS 결합 데이터의 그래픽 표현을 나타낸다. 각각의 Ig/혈청 시험군에서 염색된 세포의 수(즉 발현 수준을 시사함)를 배경 염색값으로 나누고 평가된 상이한 HIV A군 Env 제조물의 함수로서 y축 상에서 특이적 결합 백분율로 나타내었다.

도 8은 pHIV-1Env-Fab 투여 마우스로부터의 혈청에 의한 HIV-1의 중화 시간 경과를 나타낸다. 중화 활성 혈청의 분석에 이용된 혈청을 그래프에 나타낸 시점에 수집하였다. 중화 분석을 HIV-1 모조타이핑된(pseudotyped) 바이러스의 패널을 사용하여 TZM-BL 세포에서 수행하였다: Ba126(도 8A; 클레이드 B, 티어 1), Q23Env17(도 8B; 클레이드 A, 티어 1), SF162S(도 8C; 클레이드 B, 티어 1), 및 ZM53M(도 8D; 클레이드 C, 티어 2). 세포를 실시예 2에 묘사된 0.01의 MOI로 감염시키고, pHIV-1 Env Fab 투여로 생성된 Fab를 함유하는 혈청(최종 희석도 1:50)의 존재 하에 항온처리하였다. 중화값 백분율을 나타내고, 그 계산을 실시예 2에 기재하였다. 또한 실험 혈청이 50% 바이러스 중화를 매개한 근사 시점을 시사하는 수평선이 각 그래프에 제공된다.

도 9는 실시예 2-7에 기재된 HIV-1 Env Fab의 중쇄(VH-CH1)를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 10은 실시예 2-7에 기재된 HIV-1 Env Fab의 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 11은 HIV Env를 암호화하는 플라스미드로 형질감염된 세포의 면역형광도를 나타낸다. 세포를 pVAX1(왼쪽 패널) 또는 pHIV-Env-Fab(오른쪽 패널)로부터의 제조물로 염색하였다.

도 12는 항원 유형 대 혈청 농도(ng/mL)를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 13은 합성 인간 IgG1 항체를 암호화하는 작제물의 모식도를 나타낸다.

도 14는 도 13의 작제물에 의해 암호화된 조립된 항체(발현시)의 개요도를 나타낸다.

도 15는 VRC01 IgG의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 16A는 HIV-1 Env-PG9 Ig를 암호화하는 작제물의 도식을 나타내며; 도 16B는 도 16A의 작제물을 함유하는 벡터의 도식을 나타내며; 및 도 16C는 염색된 겔의 이미지를 나타낸다.

도 17A는 HIV-1 Env-4E10 Ig를 암호화하는 작제물의 도식을 나타내며; 도 17B는 도 17A의 작제물을 함유하는 벡터의 도식을 나타내며; 및 도 17C는 염색된 겔의 이미지를 나타낸다.

도 18은 퓨린에 의한 절단 전의 HIV-1 Env-PG9 Ig의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 19는 퓨린에 의한 절단 전의 HIV-1 Env-4E10 Ig의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 20A는 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1)를 암호화하는 작제물의 모식도; 및 도 20B는 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VL-CL)를 암호화하는 작제물의 모식도를 나타낸다.

도 21은 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1) 또는 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 작제물을 함유하는 발현 벡터의 모식도를 나타낸다.

도 22는 시간(hr) 대 OD450nm를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 23은 면역블롯(immunoblot) 이미지를 나타낸다.

도 24는 DNA 투여 및 채혈 전 및 채혈 수득 시점의 모식도를 나타낸다.

도 25는 시간(일) 대 OD450nm를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 26은 유발접종 후 일수 대 생존 백분율을 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 27은 마우스군 대 TNF- α (pg/mL)를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 28은 마우스군 대 IL-6(pg/mL)을 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 29는 VH-CH1을 암호화하고 프로모터의 제어 하에 있는 작제물을 예시하는 모식도를 나타낸다.

도 30은 VL-CL을 암호화하고 프로모터의 제어 하에 있는 작제물을 예시하는 모식도를 나타낸다.

도 31은 발현 벡터 내로 클로닝된 항-Her-2 Fab의 VH-CH1 또는 VL-CL을 암호화하는 작제물을 예시하는 모식도를 나타낸다.

도 32는 항-Her-2 Fab의 VH-CH1을 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 33은 도 32의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 (즉, 항-Her-2 Fab의 VH-CH1의 아미노산 서열)을 나타낸다.

도 34는 항-Her-2 Fab의 VL-CL을 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 35는 도 34의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 (즉, 항-Her-2 Fab의 VL-CL의 아미노산 서열)을 나타낸다.

도 36은 형질감염된 세포 유형 대 IgG 농도($\mu\text{g/mL}$)를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 37은 면역글로불린 G(IgG) 중쇄의 가변 중쇄 영역(VH), 가변 중쇄 불변 영역 1(CH1), 힌지 영역, 가변 중쇄 불변 영역 2(CH2), 가변 중쇄 불변 3(CH3)을 암호화하고, IgG 경쇄의 가변 경쇄 영역(VL) 및 가변 경쇄 불변 영역(CL)을 암호화하는 작제물을 예시하는 모식도를 나타낸다. IgG의 중쇄 및 경쇄는 프로테아제 절단 부위에 의해 분리되고, 각각의 앞에 신호 펩티드(리더 서열에 의해 암호화됨)이 선행한다.

도 38은 항-덴기 바이러스(DENV) 인간 IgG를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 39는 도 39의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 (즉, 항-DENV 인간 IgG의 아미노산 서열)을 나타낸다. 이 아미노산 서열에서, 중쇄 및 경쇄를 2개의 별개의 폴리펩티드로 분리하는 프로테아제 절단은 아직 발생하지 않았다.

도 40은 마우스군 대 OD 450nm를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 41은 주사 후 일수 대 인간 IgG 농도(ng/mL)를 도시하는 그래프를 나타낸다.

도 42는 도 1의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 6)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 아래 실시예 1에 기재된 IgG 중쇄의 아미노산 서열이다.

도 43은 도 2의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 7)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 아래 실시예 1에 기재된 IgG 경쇄의 아미노산 서열이다.

도 44는 도 9의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 3)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 실시예 2-7에 기재된 HIV-1 Env-Fab 중쇄(VH-CH1)의 아미노산 서열이다.

도 45는 도 10의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 4)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 실시예 2-7에 기재된 HIV-1 Env-Fab 경쇄(VL-CL)의 아미노산 서열이다.

도 46은 아래 실시예 11에 기재된 HIV-1 PG9 단일쇄 Fab(scFab)를 암호화하는 핵산 서열이다.

도 47는 도 46의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 50)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 이 아미노산 서열은 하기 실시예 11에 기재된 HIV-1 PG9 scFab의 아미노산 서열이다.

도 48은 아래 실시예 13에 기재된 HIV-1 4E10 단일쇄 Fab(scFab)를 암호화하는 핵산 서열이다.

도 49는 도 48의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 52)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 이 아미노산 서열은 하기 실시예 13에 기재된 HIV-1 4E10 scFab의 아미노산 서열이다.

도 50은 면역글로불린 G(IgG) 중쇄의 가변 중쇄 영역(VH), 가변 중쇄 불변 영역 1(CH1), 힌지 영역, 가변 중쇄 불변 영역 2(CH2), 가변 중쇄 불변 3(CH3)을 암호화하는 작제물을 예시하는 모식도를 나타낸다. IgG 중쇄를 암호화하는 핵산 서열 앞에 리더 서열이 선행한다.

도 51은 IgG 경쇄의 가변 경쇄 영역(VL) 및 가변 경쇄 불변 영역(CL)을 암호화하는 작제물을 예시하는 모식도를 나타낸다. IgG 경쇄를 암호화하는 핵산 서열 앞에 리더 서열이 선행한다.

도 52는 아래 실시예 9에 기재된 HIV-1 VRC01 IgG1 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 53은 도 52의 핵산 서열(즉, 서열 번호: 54)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 아래 실시예 9에 기재된 HIV-1 VRC01 IgG1 중쇄의 아미노산 서열이다.

도 54는 아래 실시예 9에 기재된 HIV-1 VRC01 IgG 경쇄를 암호화하는 핵산 서열이다.

도 55는 도 54의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 (즉, 서열 번호: 56)을 나타낸다. 이 아미노산 서열은 하기 실시예 9에 기재된 HIV-1 VRC01 IgG 경쇄의 아미노산 서열이다.

도 56은 실시예 14에서 아래 기재된 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1)를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 57은 도 56 (즉, 서열 번호: 58)의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 아래 실시예 14에 기재된 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1)의 아미노산 서열이다.

도 58은 아래 실시예 14에서 기재된 CHIKV-Env-Fab의 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열이다.

도 59는 도 58의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 (즉, 서열 번호: 60)을 나타낸다. 상기 아미노산 서열은 아래 실시예 14에 기재된 CHIKV-Env-Fab의 경쇄(VL-CL)의 아미노산 서열이다.

도 60은 아래 실시예 12에 기재된 HIV-1 Env-4E10 Ig를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 61은 아래 실시예 10에 기재된 HIV-1 Env-PG9 Ig를 암호화하는 핵산 서열을 나타낸다.

도 62는 VRC01 IgG를 암호화하는 핵산 서열(서열 번호: 64)을 나타낸다.

도 63은 인간 항-PSMA 항체에 대한 작제물 설계로서 뉴클레오타이드 서열의 선형 배열의 개요도를 나타낸다.

도 64는 항-huPSMA-IgG1 항체의 시험관내 발현을 제공하는 그래프를 나타낸다. 좌측 그래프는 293T 형질감염된 세포에서 항-huPSMA 발현을 나타낸다. 우측 그래프는 huPSMA 단백질과 시험관내 형질감염된 세포와의 결합을 나타낸다(음성 대조군: pVax1-공 벡터, 및 양성 대조군: PSMA-mAb-상업적 단일클론 항체 대비).

도 65는 인간 PSMA 단백질에 대한 항-huPSMA-IgG1의 정량을 제공하는 그래프를 나타낸다.

도 66은 상부 패널에 Nu/J 마우스의 면역화 및 채혈 스케줄을 나타내며; 하부 패널은 Nu/J 마우스에서 항-huPSMA IgG1 결합의 생체내 동역학을 나타낸다.

도 67은 항-huPSMA IgG1결합을 확인시켜주는 웨스턴 블롯의 겔 그림을 나타낸다.

도 68은 상이한 대상의 몇 가지 유세포분석 그래프를 나타내며, 이는 인간 전립선(LNCaP) 세포에 결합하는, 처리된 마우스 혈청(Nu/J)에서 항-huPSMA IgG1의 특이성에 대한 정보를 제공한다.

도 69는 항-huPSMA IgG1: ADCC 활성을 상세히 설명하는 그래프를 나타낸다 (효과기 세포를 항-PSMA-IgG DNA로 처리된 마우스로부터의 혈청의 존재 또는 부존재하에 LnCap 세포에 대한 세포독성에 대해 시험하였을 때).

도 70은 항체 발현 플라스미드의 도식적 설계 및 CHIKV-Fab 발현 플라스미드의 단일 EP 매개 주사 후 항체의 발현 및 결합 운동속도론의 확인을 나타낸다. (A) 선택된 항-CHIKV 인간 단일클론의 가변 경쇄 및 중쇄(VL 및 VH) IgG 단편 유전자를 CHIKV-Fab 및 CHIKV-IgG에 대해 별도로 복제하여 최적화된 DNA 플라스미드 벡터를 만들었다. (B) 항-CHIKV VL 및 VH-Fab 유전자 또는 CHIKV-IgG를 암호화하는 DNA 플라스미드를, 이들 각각의 시험관내 발현을 ELISA에 의해 측정하기 위해, 293T 세포에 감염시켰다. 빈 대조군 pVax1 플라스미드에 감염된 세포는 음성대조군으로 작용하였다. (C) EP 매개 전달 후 항-CHIKV-IgG 항체의 시험관내 발현. 마우스(B6.Cg-Foxn1nu/J)에게 CHIKV-IgG 플라스미드(총 100 μ g)를 단일 근육내 주사로 투여하고, 이어서 EP를 투여하였다(n=5마리 (한 그룹당)). 공 pVax1 벡터의 주사를 음성 대조군으로 사용하였다. (D). CHIKV-Env 항원에 대한 특이적 결합을 CHIKV-IgG 및 재조합 CHIKV-Env 면역화된 마우스로부터의 수집된 혈청을 이용한 ELISA 분석을 통해 측정하였고, 상이한 시점에 개별 마우스에 대해 OD 450nm 값으로서 나타내었다. (E) 인간 IgG 농도의 혈청 수준을 물질 및 방법에 기재된 바와 같이 CHIKV-IgG가 근육내로 주사된 마우스에서 다양한 시점에 측정하였다. (F) 항체 결합 친화도 및 특이성의 평가. CHIKV-IgG 주사 마우스(14일째)에서 채취된 혈청의 표적 단백질에 대한 결합 친화도 작용성이, 하기 실시예들에서 기술된 바와 같이, CHIKV-감염 세포에서 유래된 세포 용해물을 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검사되었다.

도 71A-71C는 CHIKV-IgG 발현 플라스미드의 단일 전기천공 매개된 주사 후 IgG의 발현 및 결합 동역학을 나타낸다. 도 71A는 CHIKV-Fab 투여된 마우스로부터의 혈청이 CHIKV-Env 항원에 대해 특이적이라는 것을 보여준다. ELISA 플레이트는 재조합 CHIKV-Env 또는 HIV-1 Env(하위유형 B; MN) 단백질로 코팅되었고, CHIKV-IgG 또는

pVax1로 감염된 마우스의 단백질 및 혈청은 첫 번째 주사 후 명시된 바 대로 수득되었다. CHIKV-Env 항원에 대한 특이적 결합을 수집된 혈청을 이용한 ELISA 분석을 통해 측정하였고 상이한 시점에 개별 마우스에 대하여 OD 450nm 값으로 나타내었다. 도 71B는 CHIKV-Fab가 투여된 마우스로부터 생성된 CHIKV-Fab가 CHIKV-Env 당단백질에 결합할 수 있었음을 입증한 면역형광 분석(IFA) 결과를 나타낸다. CHIKV 감염된 베포 세포는 24시간 감염 후 고정된 후, CHIKV-Env 항원 발현(녹색)을 검출하기 위해 면역형광 분석되었다. 세포 핵을 DAPI(청색)로 염색하였다. 보통(moderate)의 양의 CHIKV-Env 단백질 발현이 CHIKV-Fab 항체를 갖는 베포 세포에서 관측되었다. pVax1 접종 마우스 혈청이 음성대조군으로 사용되었다. 도 71C는 CHIKV-감염된 세포에 대한 플라스미드 주사된 마우스로부터의 혈청의 결합의 FACS 분석을 나타낸다. x-축은 CHIKV-Env가 보충된 렌티바이러스 GFP 유사바이러스를 사용한 GFP 염색을 나타낸다. y-축은 마우스에서 생산된 시험된 인간 IgG의 염색을 나타낸다. 이중-양성 세포는 CHIKV 감염된 세포에 결합하는 혈청 결합의 표시/측정이다.

도 72는 CHIKV-IgG 및 EP가 주사된 마우스로부터의 혈청이 다수의 CHIKV 균주에 대한 중화 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. 도 72A-72F는 EP와 함께 CHIKV-IgG가 투여된 마우스로부터의 혈청의 중화 활성이 6개의 상이한 CHIKV 바이러스 균주에 대해 측정되었음을 보여준다: Ross, LR2006-OPY1, IND-63-WB1, PC-08, B448-China and Bianchi. 중화 항체(nAb) 역가는 베포 세포에서 CPE의 적어도 50% 억제율 야기한 혈청의 가장 높은 희석도로서 플롯팅된다. 유사한 결과들이 두 가지 독립적인 실험에서 관측되었다(각 실험의 경우 그룹 당 최소한 마우스 10 마리였다). IC-50 값이 Prism GraphPad 소프트웨어로 수행되었다.

도 73은 CHIKV-Fab로 면역화 후 항-CHIKV-Env IgG 및 혈청 및 점막 IgG 반응의 내구성 및 IgG 발현 및 투여 연구를 나타낸다. (A) IgG 플라스미드 면역화 및 CHIKV-유발의 도식적 표현. (B-C) 0일째 BALB/c 마우스에 pVax1, CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Fab이 주사되었고, 2일째(B) 또는 30일째(C)에 CHIKV-De1-03 (JN578247) CHIKV 균주(총 부피 25 μ l 중 1×10^7 PFU)로 유발하였다. 마우스를 매일 모니터링하고, 바이러스 유발 후 20일 동안 생존율을 기록하였다. (D-E) CHIKV 바이러스 감염의 상이한 경로로부터의 마우스의 보호. 마우스의 2개의 그룹을 근육내(IM) 주사에 의해 100 μ g의 CHIKV-IgG로 면역화하였고, 2일째에 피하로(s.c) 투여하였으며 (D), 마우스의 또 다른 그룹은 CHIKV로 비강내(i.n) (E) 점종에 의해 투여하였다. 마우스를 매일 모니터링하고, 바이러스 유발 후 20일 동안 생존율을 기록하였다. \uparrow 는 DNA 투여를 표지하고; \star 는 바이러스 유발을 표지한다. 각 그룹은 10마리 마우스로 구성되었고, 상기 결과는 2개의 독립적 실험을 대표하였다.

도 74는 CHIKV-투여 연구를 통한 즉각적이고 영구적인 예방을 나타낸다. (A). CHIKV-IgG 백신접종 및 투여 연구의 도식적 표현. 그룹 I 유발: 0일째 BALB/c 마우스에 CHIKV-IgG, CHIKV-Env, 또는 pVax1이 주사되었고, 2일째 CHIKV-De1-03 (JN578247) 바이러스 균주(1×10^7 PFU, 총 부피 25 μ l 중)로 유발하였다. 그룹 II 유발: 그룹 I의 유발과 동일한 조건 하에서, BALB/c 마우스에 0일째 단일 CHIKV-IgG 점종을 하거나 또는 지정된 일자에 이중 CHIKV-Env 점종을 한 후, 이어서 35일째에 면역반응이 유도되었다. \uparrow 는 DNA 투여를 표지하고; \star 는 바이러스 유발을 표지한다. 각 연구의 경우, 마우스는 20일 동안 모니터링되었고, 생존율이 기록되었다. (B) 그룹 I 유발 연구에서 마우스의 생존 곡선. 100% 생존이 CHIKV-IgG-점종 마우스에서 기록되었음을 유의한다. (C) 그룹 II 유발 연구에서 마우스 생존 곡선. (D) CHIKV-IgG와 EP로 점종된 후, 항-CHIKV 인간 IgG 수치의 농도가 지정된 시점에 측정되었다. (E) 마우스에서 CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env 점종 후 지속적인 전신적인(systemic) 항-CHIKV-Env 항체의 유도.

도 75는 CHIKV 감염에 대해 반응한, 생체의 사이토카인 생산을 나타낸다. (A) 45일(즉, 투여후 10일)에 그룹 II 투여 연구로부터 CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env 투여된 마우스에서의 바이러스 적정. 각 데이터 지점은 10마리의 마우스로부터의 평균 바이러스 적정을 나타낸다. 한 그룹의 pVax1 접종 마우스는 대조군 역할을 하였다. 바이러스 부하는 pVax1 마우스와 비교하여 CHIKV-IgG($p=0.0244$) 및 CHIKV-Env($p=0.0221$)에서 유의미하게 감소하였다. (B & C) CHIKV 감염된 마우스로부터 혈청 프로-염증성 사이토카인 수준(TNF- α 및 IL-6)의 규명. 사이토킨 수치가 특이적 ELISA 분석법에 의해 45일째(유발 15일 후) 마우스에서 측정되었다. CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env를 주사한 마우스는 대조군보다 유사하고 유의하게 더 낮은 TNF- α 및 IL-6의 혈청 수준을 가지고 있었다($p < 0.0001$). 데이터는 마우스 당 3개의 웰의 평균을 나타낸다(그룹당 $n = 10$). (D) 마우스의 CHIKV-IgG 및/또는 CHIKV-Env 면역화로 면역화된 다음 CHIKV-특이적 펩티드로 자극된 마우스의 비장세포에서의 T-세포 반응. 상기 나타난 데이터는 적어도 2개의 개별적인 실험을 대표한다.

도 76은 SNAPi에 의하여, mAb를 중화시키는 인간 항-DENV의 시험관내 발현을 나타낸다. (a) SNAPi에 대해 사용되는 DNA 플라스미드의 도식적 예시; 항체 중쇄 및 경쇄 서열은 퓨린 및 2A 절단 부위의 조합에 의하여 분리된다. (b) pDVSF-3 WT- 또는 LALA-형질감염 293T 세포의 상청액 내 인간 IgG의 ELISA 정량화 분석. (c) DVSF-3

WT를 함유한 pDVSF-3 WT-형질감염 293T 상청액의 웨스턴 블롯 분석. 항체를 단백질 A 스핀 컬럼에 의해 정제하고 환원(좌측) 및 비-환원(우측) 조건하에 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. (d) 베로 세포를 DENV1, 2, 3, 또는 4로 감염시키지 않거나(Mock) 또는 감염시킨 다음, 고정하고, 투과하고, pDVSF-3 WT- 또는 LALA-감염된 293T 세포의 상청액으로 염색하였다.

도 77은 SNAPi가 마우스 혈청에서 중화 DENV 항체의 장기간 발현을 야기한다는 것을 보여준다. (a) 항-DENV 인간 IgG 항체 DVSF-1을 암호화하는 DNA 플라스미드를 Foxn1/NuJ 면역결핍 마우스에게 단일 근육내 주사한 후, 인간 IgG의 총 혈청-검출가능한 수준을 ELISA에 의해 측정하였다. 각 선 (좌측) 또는 점 (우측)은 개별 마우스 ($n = 5$)를 나타낸다. (b) 혈청 내 총 인간 IgG를, 129/Sv 마우스 내 pDVSF-3 WT 또는 pDVSF-3 LALA 플라스미드의 근육내 주사 ($n = 4-5$ /그룹) 후, ELISA에 의하여 측정하였다. (c) 베로 세포를 DENV1, 2, 3, 또는 4로 감염시키지 않거나(Mock) 또는 감염시킨 다음, 고정하고, 투과하고, pDVSF-3 WT 또는 pDVSF-3 LALA ($n = 5$ /그룹)의 DNA 주사-후 제0일 또는 제7일에서 취해진 129/Sv 마우스 혈청으로 염색하였다. (d) 중화를, 베로 세포의 부가전, pDVSF-3 WT 또는 pDVSF-3 LALA ($n = 5$ /그룹)의 DNA 주사-후 제0일 또는 제7일에서 취해진 129/Sv 마우스 혈청의 일련의 희석으로 DENV1, 2, 3, 또는 4를 항온처리함으로써 평가하였다. 감염된 세포의 비율이 보여진다.

도 78은 SNAPi가 바이러스-단독 및 항체-증진 질환에 대해 보호작용하는 것을 나타낸다. (a) 바이러스-단독 유발: DENV2 S221의 준치사 용량의 투여 5일 전 (그룹당 $n = 5-6$; pDVSF-3 LALA 및 pDVSF-3 WT 간의 비교의 경우 $p \leq 0.0084$), pDVSF-3 WT, pDVSF-3 LALA, 또는 pVax 엡티 벡터를 AG129 마우스에 주사하였다. (b) 항체-의존적 증진 유발: 비-중화 항-DENV mAb 2H2의 증진 용량의 투여 5일 전, pDVSF-3 WT, pDVSF-3 LALA, 또는 pVax 엡티 벡터를 AG129 마우스에 주사하였다. 30분 후, 마우스는 치사량에 가까운 용량의 DENV2 S221(한 그룹 당 $n = 5-6$ 마리; pDVSF-3 LALA 및 pDVSF-3 WT를 비교할 때 $p \leq 0.0072$)으로 면역반응이 유도되었다. 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선이 나타나 있다 (a-b).

도 79는 pDVSF-3 WT 및 LALA-암호화 항체의 시험관내 작용성 분석을 나타낸다. (a) 정제 재조합 DENV E 단백질에 대한, pDVSF-3 WT- 또는 LALA-형질감염 293T 세포의 상청액 내 인간 IgG의 ELISA 결합 분석. (b) DENV1, 2, 3, 또는 4를 pDVSF-3 WT- 또는 LALA-감염된 293T 세포의 상청액의 연속 희석액과 함께 항온처리한 후 K562 세포의 부가하여 항체-의존적 항상을 평가하였다. 감염된 세포의 비율이 보여진다.

도 80은 SNAPi 전달 후 AG129 마우스에서 항-DENV 인간 IgG 수준의 투여전 수준을 나타낸다. (a) 혈청 내의 DVSF-3 WT 또는 DVSF-3 LALA의 총 인간 IgG를 AG129 마우스에서 각각의 플라스미드의 DNA 근육내 주사(DENV2 투여 전 1일) 및 EP 후 4일에 ELISA에 의해 측정하였다(그룹당 $n = 5-6$; pDVSF-3 WT 및 pVax 간의 비교의 경우 $p \leq 0.0005$; pDVSF-3 LALA 및 pVax간의 비교의 경우 $p \leq 0.0001$).

도 81은 마우스에서 다수의DENV 항체-암호화 플라스미드의 전달이 증가된 DENV1-4 항혈청을 생산한다는 것을 나타낸다. (a) 혈청 내의 DVSF-3 WT, DVSF-1 WT, 또는 DVSF-3 WT 및 DVSF-1 WT의 총 인간 IgG를 129/Sv 마우스에서 각각의 플라스미드의 DNA 근육내 주사 및 EP 후 7일에 ELISA에 의해 측정하였다(그룹당 $n = 5$; pDVSF-1 WT 및 pDVSF-1+3 간의 비교의 경우 $p \leq 0.0088$; pDVSF-3 WT 및 pDVSF-1+3 간의 비교의 경우 $p \leq 0.0240$).

도 82는 상부 패널에서 DVSF-3 WT가 인간 FcγR1a에 결합하는 반면, DVSF-3 LALA는 결합하지 않는다는 것을 나타낸다. 하부 4개의 패널은 항체-의존적 항상 분석의 결과를 나타내며: DENV와 DVSF-3 LALA와의 항온처리는 인간 단핵구(K562 세포주) 감염을 야기하지 않은 반면, DVSF-3 WT 항온처리는 감염을 향상시킨다.

도 83은 수집된 혈청 내의 인간 IgG의 농도($\mu\text{g/mL}$)에 대한 C57BL/6 누드(B6.Cg-Foxn1nu/J) 마우스 내로 항-PSMA 플라스미드의 주사 후 일자를 플롯팅하는 그래프를 나타낸다.

도 84는 OD 450 nm에 대한 시간(일)을 플롯팅한 그래프를 나타낸다. 상기 그래프 결과는 인간 재조합 PSMA에 대한 생체내 항-PSMA 항체의 결합을 조사하는 ELISA로부터 취득된다.

도 85는 인간 IgG의 농도($\mu\text{g/mL}$)에 대한 C57BL/6 마우스 내로의 항-PSMA 플라스미드의 주사 후 일자를 플롯팅한 그래프를 나타낸다. 각 마우스는 범례에 표시된 바와 같이 별도의 선으로 표시되어 있다.

도 86는 인간 IgG의 농도($\mu\text{g/mL}$)에 대한 C57BL/6 마우스 내로의 항-PSMA 플라스미드의 주사 후 일자를 플롯팅한 그래프를 나타낸다. 상기 도시된 결과는 그룹화된 마우스이다.

도 87은 상대적 광 단위(RLU)의 발광에 대한 항-PSMA 항체의 농도(g/mL ; \log_{10})를 플롯팅한 그래프를 나타낸다.

도 88은 루시페라아제 활성의 배수 유도에 대한 샘플 유형을 플롯팅한 그래프를 나타낸다.

도 89는 pVax1 또는 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화된 마우스에 대한 종양 이식(0일), 면역화(5일 또는 7일), 및 종양 측정(7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일, 49일, 56일, 및 63일)의 시각표를 나타낸다.

도 90은 종양 이식 후 5일에 pVax1로 면역화된 마우스에 대한 종양 이식 후 일자 및 종양 부피(mm^3)를 플롯팅한 그래프를 나타낸다.

도 91은 종양 이식 후 5일에 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화된 마우스에 대한 종양 부피(mm^3)에 대한 종양 이식 후 일자를 플롯팅한 그래프를 나타낸다.

도 92은 종양 이식 후 7일에 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화된 마우스에 대한 종양 부피(mm^3)에 대한 종양 이식 후 일자를 플롯팅한 그래프를 나타낸다.

도 93은 종양을 갖는 마우스 및 각각의 종양의 측정의 이미지를 나타낸다. 마우스는 (1) 종양 이식 후 5일에 pVax1로 면역화된 마우스, (2) 종양 이식 후 5일에 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화된 마우스, 또는 (3) 종양 이식 후 7일에 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화된 마우스였다.

도 94는 마우스의 표시된 그룹에 대하여 종양 부피(mm^3)에 대한 종양 이식 후 일자를 플롯팅한 그래프를 나타낸다.

도 95A-95E는 최적화된 PSMA-dMAb 플라스미드가 *시험관내*에서 높은 수준의 IgG 생산을 유도한다는 것을 나타낸다. 도 95A는 본원에서 PSMA-dMAb로 지칭된 항-PSMA 단일클론 항체를 암호화하는 최적화된 항-PSMA-IgG 플라스미드의 설계를 나타낸다. 도 95B는 정량 ELISA를 나타내고, 도 95C는 pVax1-또는 PSMA-dMAb-형질감염된 293T 세포로부터 48시간에 수집된 상청액의 1:50 희석의 결합 ELISA를 나타낸다. 도 95D는 pVax1 또는 PSMA-dMAb-형질감염된 293T 세포로부터의 48시간 상청액의 적정 결합 ELISA를 나타낸다. 도 95E는 PSMA-dMAb-형질감염된 293T 세포로부터의 상청액의 1:50 희석액으로 프로빙된 재조합 PSMA(rPSMA) 또는 무관한 재조합 HIV-Env(rHIV-Env) 단백질의 웨스턴 블롯 분석이 293T 세포에서 생산된 PSMA-dMAb-IgG의 특이적 결합을 나타낸다는 것을 보여준다.

도 96A-96C는 또한 PSMA-dMAb 플라스미드가 마우스에서 높은 수준의 IgG 생산을 유도한다는 것을 나타낸다. 도 96A는 100ug PSMA-dMAb 플라스미드의 단일 주사를 근육내로 접종한 후 EP를 접종한 C57BL/6 누드(B6.Cg-Foxn1nu/J) 마우스로부터 수집된 혈청 상에서 수행된 정량 ELISA를 나타낸다. 1.2 ug/ml의 피크 IgG 농도를 C57BL/6 누드에 대해 14일에 수득하였다. 도 96B는 재조합 인간 PSMA에 대해 시험된 마우스로부터 수집된 혈청의 적정 결합 ELISA를 나타낸다. 도 96C는 PSMA-dMAb-접종된 마우스로부터의 혈청의 1:50 희석액으로 프로빙된 재조합 PSMA(rPSMA) 또는 무관한, 재조합 HIV-Env(rHIV-Env) 단백질의 웨스턴 블롯 분석이 마우스에서 생산된 PSMA-dMAb IgG의 특이적 결합을 나타낸다는 것을 보여준다.

도 97A-97B는 누드 마우스에서 생산된 PSMA-dMAb IgG가 PSMA 발현 세포주에 결합한다는 것을 나타낸다. 도 97A는 공 pVax1 벡터 또는 PSMA-dMAb 플라스미드가 접종된 마우스로부터의 14일 혈청의 1:50 희석액으로 염색된 PSMA를 발현하는 LNCaP 및 TRAMP-C2 세포주의 유세포분석을 나타낸다. 도 97B는 LNCaP 및 TRAMP-C2 세포 염색의 평균 형광 지수(MFI)의 정량을 나타낸다.

도 98은 C57BL/6 누드 마우스에서 생산된 PSMA-dMAb가 종양 조직 내의 PSMA를 염색한다는 것을 나타낸다.

도 99A-99C는 PSMA-dMAb가 LNCaP 세포 상에서 ADCC를 매개한다는 것을 나타낸다. 도 99A는 PSMA-dMAb의 ADCC 활성이 ADCC 리포터 분석을 사용하여 조사되었음을 보여준다. 도 99B는 항체가 없는 음성 대조군과 비교하여 PSMA-dMAb 면역화된 마우스 혈청에 의해 유도된 ADCC의 유도 배수를 나타낸다. 도 99C는 LNCaP 세포의 세포 사멸에 대한 PSMA-dMAb 혈청의 효과를 분석하기 위한 유세포분석을 나타낸다.

도 100A-100D는 PSMA-dMAb가 TRAMP-C2 종양 투여 마우스 모델에서 항종양 면역을 유도한다는 것을 보여준다. 도 100A는 C57BL/6 마우스 내로 종양 투여 및 pVax1 또는 PSMA-dMAb 플라스미드 투여의 개요를 보여준다. 도 100B는 종양 투여 후 10주까지 캘리퍼스로 매주 측정된 종양 부피를 나타낸다. 도 100C는 종양 투여 후 50일에 pVax1 및 PSMA-dMAb 그룹으로부터 종양을 갖는 대표적인 마우스를 나타낸다. 도 100D는 PSMA-dMAb 투여 전 항-NK1.1 IgG의 단일 주사를 이용한 NK 세포의 고갈이 종양 살상에 대한 PSMA-dMAb의 보호 효과를 폐지하였음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] **상세한 설명**
- [0042] 본 발명은 항체, 그의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 합성 항체의 생체내 발현 및 형성을 촉진하기 위해 이를 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다.
- [0043] 특히, 재조합 핵산 서열로부터 발현된 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드는 합성 항체로 조립될 수 있다. 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드는 조립으로 항원과 결합할 수 있고, 본원에 기재된 조립되지 않은 항체에 비해 면역원성이 더 크며, 항원에 대해 면역 반응을 야기하거나 유도할 수 있는 합성 항체를 생성하도록 서로 상호작용할 수 있다.
- [0044] 추가적으로, 이들 합성 항체는 항체 유도된 면역 반응에 반응하여 생산되는 항체에 비해 대상체에서 보다 신속히 생성된다. 합성 항체는 광범위한 항원에 효과적으로 결합하고 이를 중화시킬 수 있다. 합성 항체는 또한 질환에 대해 효과적으로 보호하고/하거나 생존을 촉진할 수 있다.
- [0045] **1. 정의**
- [0046] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 상충 시, 정의를 포함하여 본 문서가 우선이 될 것이다. 바람직한 방법 및 재료가 아래 기재되지만, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 평가에서 이용될 수 있다. 본원에서 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 이의 전문이 참조로 도입된다. 본원에 제시된 재료, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것이 아니다.
- [0047] 본원에서 이용되는 용어 "포함한다", "포함된다", "갖는", "갖는다", "수 있다", "함유한다" 및 이의 변형은 추가적인 행위 또는 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형 전이 어구, 용어 또는 단어로 의도된다. 문맥 상 뚜렷이 달리 나타내지 않는 한, 단수 형태에는 복수 참조물이 포함된다. 본 개시는 또한 명시적으로 나타내진 나타내지 않건, 본원에 명시된 구현에 또는 요소를 "포함하는", "이로 구성된다" 및 "본질적으로 이로 구성된다" 다른 구현예를 고려한다.
- [0048] "항체"는 Fab, F(ab')₂, Fd, 및 단일쇄 항체, 및 이의 유도체를 포함하는 클래스 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE의 항체, 또는 단편, 그의 단편 또는 유도체를 의미할 수 있다. 항체는 원하는 에피토프 또는 이로부터 유래된 서열에 충분한 결합 특이성을 나타내는 포유류 혈청 표본에서 단리된 항체, 다클론성 항체, 친화도 정제된 항체, 또는 이의 혼합물일 수 있다.
- [0049] 본원에서 상호 교환적으로 이용되는 "항체 단편" 또는 "항체의 단편"은 항원-결합 부위 또는 가변 영역을 포함하는 온전한 항체의 일부를 나타낸다. 이 일부에는 온전한 항체의 Fc 영역의 불변 중쇄 도메인(즉, 항체 이소형에 따라 CH₂, CH₃, 또는 CH₄)이 포함되지 않는다. 항체 단편의 예에는 비제한적으로 Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 단일쇄 Fv(scFv) 분자, 하나의 경쇄 가변 도메인만 함유하는 단일쇄 폴리펩티드, 경쇄 가변 도메인의 세 CDR을 함유하는 단일쇄 폴리펩티드, 하나의 중쇄 가변 영역만 함유하는 단일쇄 폴리펩티드, 및 중쇄 가변 영역의 세 CDR을 함유하는 단일쇄 폴리펩티드가 포함된다.
- [0050] "항원"은 숙주에서 면역 반응을 생성하는 능력을 갖는 단백질을 나타낸다. 항원은 항체에 의해 인식되고 이에 결합될 수 있다. 항원은 체내에서 또는 외부 환경에서 유래될 수 있다.
- [0051] 본원에서 이용되는 "암호화 서열" 또는 "암호화 핵산"은 본원에 나타난 바와 같은 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미할 수 있다. 암호화 서열에는 핵산이 투여되는 개인 또는 포유류의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호가 추가로 포함될 수 있다. 암호화 서열에는 신호 펩티드를 암호화하는 서열이 추가로 포함될 수 있다.
- [0052] 본원에서 이용되는 "상보체" 또는 "상보적인"은 핵산이 핵산 분자의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 간 왓슨-크릭(예로, A-T/U 및 C-G) 또는 후그스틴(Hoogsteen) 염기쌍 형성을 의미할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0053] 본원에서 이용되는 "정전류"는 조직 또는 상기 조직을 정의하는 세포가 동일한 조직에 전달되는 전기 자극 기간에 걸쳐 수신하거나 경험하는 전류를 정의하기 위한 것이다. 전기 자극은 본원에 기재된 전기친공 장치로부터 전달된다. 상기 전류는 본원에 제공된 전기친공 장치가 피드백 요소, 바람직하게는 즉각적인 피드백을 가지므로, 전기 자극의 수명에 걸쳐 상기 조직에서 정전류량으로 유지된다. 피드백 요소는 자극 기간에 걸쳐 조직(또는 세포)의 저항을 측정하고, 전기친공장치가 그 전기 에너지 출력을 변경하도록(예로 전압을 증가하도록)

유도하여 동일한 조직에서의 전류가 전기 자극 동안(마이크로초 수준) 그리고 자극 별로 변하지 않고 유지될 수 있다. 일부 구현예에서, 피드백 요소는 컨트롤러를 포함한다.

[0054] 본원에서 이용되는 "전류 피드백" 또는 "피드백"은 상호 교환적으로 이용될 수 있고 제공된 전기전공 장치의 능동 반응을 의미할 수 있으며, 이는 전극 간에 조직에서 전류를 측정하는 단계 및 전류를 불변 수준으로 유지하기 위해 이에 따라 EP 장치에 의해 전달되는 에너지 출력을 변경하는 단계를 포함한다. 상기 불변 수준은 자극 순서 또는 전기 처리의 개시 전에 사용자에게 의해 사전 설정된다. 내부 전기 회로가 전극 간에 조직 내 전류를 연속적으로 모니터링하고 이 모니터링된 전류(또는 조직 내 전류)를 사전 설정된 전류와 비교하여 모니터링된 전류를 사전 설정된 수준으로 유지하기 위해 연속적으로 에너지-출력 조절을 수행할 수 있으므로, 피드백은 전기전공 장치의 전기전공 성분, 예로 컨트롤러에 의해 수행될 수 있다. 피드백 루프는 이것이 아날로그 폐쇄 루프 피드백이므로, 즉각적일 수 있다.

[0055] 본원에서 이용되는 "분산된 전류"는 본원에 기재된 전기전공 장치의 다양한 바늘 전극 어레이로부터 전달되는 전기적 전류 패턴을 의미할 수 있고, 여기서 이 패턴은 조직이 전기전공되는 임의 영역 상에서 전기전공 관련된 열 스트레스의 발생을 최소화하거나 바람직하게는 제거한다.

[0056] 본원에서 상호 교환적으로 이용되는 "전기전공", "전기-투과화", 또는 "전기-역학 증강"("EP")은 생체막에서 미시적 경로(구멍)를 유도하기 위한 막통과 전기장 자극의 이용을 나타낼 수 있다; 이의 존재는 생체분자, 예컨대 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온, 및 물이 세포막의 한 쪽에서 다른 쪽으로 이동할 수 있게 한다.

[0057] 본원에서 이용되는 "내인성 항체"는 체액성 면역 반응의 유도를 위해 유효 용량의 항원이 투여되는 대상체에서 생성되는 항체를 나타낼 수 있다.

[0058] 본원에서 이용되는 "피드백 기전"은 소프트웨어 또는 하드웨어(또는 펌웨어)에 의해 수행되는 절차를 나타낼 수 있고, 이 절차는 본 발명의 값, 바람직하게는 전류로 원하는 조직의 임피던스를 (에너지 자극 전달 이전, 동안, 및/또는 이후) 수신하고 비교하며, 사전 설정된 값을 달성하기 위해 전달된 에너지 자극을 조정한다. 피드백 기전은 아날로그 폐쇄 루프 회로에 의해 수행될 수 있다.

[0059] "단편"은 기능하고, 즉 원하는 표적에 결합할 수 있고, 전장 항체와 동일한 목적 효과를 갖는 항체의 폴리펩티드 단편을 의미할 수 있다. 항체의 단편은 N 및/또는 C 말단에서 적어도 하나의 아미노산이 없는 것을 제외하고는 전장과 100% 동일할 수 있고, 각각의 경우 위치 1에 신호 펩티드 및/또는 메티오닌을 갖거나 갖지 않는다. 단편은 부가된 임의의 이중성 신호 펩티드를 제외하고, 특정한 전장 항체 길이의 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 백분율을 포함할 수 있다. 단편은 항체와 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 폴리펩티드의 단편을 포함하며, 추가적으로 동일성 백분율 계산 시 포함되지 않는 N 말단 메티오닌 또는 이중성 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 단편은 추가로 N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩티드, 예컨대 면역글로불린 신호 펩티드, 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함할 수 있다. N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩티드는 항체의 단편에 연결될 수 있다.

[0060] 항체를 암호화하는 핵산 서열의 단편은 5' 및/또는 3' 말단에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 없는 것을 제외하고는 전장과 100% 동일할 수 있고, 각각의 경우 위치 1에 신호 펩티드 및/또는 메티오닌을 암호화하는 서열을 갖거나 갖지 않는다. 단편은 부가된 임의의 이중성 신호 펩티드를 제외하고, 특정한 전장 암호화 서열 길이의 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 백분율을 포함할 수 있다. 단편은 항체와 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 폴리펩티드를 암호화하는 단편을 포함하고 선택적으로는 동일성 백분율 계산 시 포함되지 않는 N 말단 메티오닌 또는 이중성 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 단편은 추가로 N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩티드, 예컨대 면역글로불린 신호 펩티드, 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 펩티드에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩티드를 암호화하는 암호화 서열이 항체 서열의 단편에 연결될 수 있다.

[0061] 본원에서 이용되는 "유전적 작제물"은 단백질, 예컨대 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 나타낸다. 암호화 서열에는 핵산 분자가 투여되는 개인의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로

모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호가 포함된다. 본원에서 이용되는 용어 "발현 가능한 형태"는 개인의 세포에 존재하는 경우, 암호화 서열이 발현되도록 단백질을 암호화하는 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된 필요한 조절 요소를 함유하는 유전자 작제물을 나타낸다.

[0062] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 맥락에서 본원에서 이용되는 "동일한" 또는 "동일성"은 서열이 명시된 영역에 걸쳐 동일한 명시된 잔기 백분율을 가짐을 의미할 수 있다. 백분율은 두 서열을 최적 정렬하고, 명시된 영역에 걸쳐 두 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 잔기가 나오는 위치의 수를 결정하여 매치된 위치의 수를 산출하고, 매치된 위치의 수를 명시된 영역에서 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱해서 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 두 서열이 상이한 길이어거나 정렬로 하나 이상의 엇갈린 말단이 생성되고 명시된 비교 영역에 하나의 서열만 포함되는 경우, 단일 서열의 잔기는 계산의 분모에는 포함되지만 분자에는 포함되지 않는다. DNA 및 RNA를 비교하는 경우, 티민(T) 및 우라실(U)은 동등한 것으로 간주될 수 있다. 동일성은 수작업으로 또는 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 서열 알고리즘을 이용하여 수행될 수 있다.

[0063] 본원에서 이용되는 "임피던스"는 피드백 기전을 논의할 때 이용될 수 있고, 옴의 법칙에 따라 전류값으로 전환되어 사전 설정된 전류와의 비교를 가능케 할 수 있다.

[0064] 본원에서 이용되는 "면역 반응"은 하나 이상의 핵산 및/또는 펩티드의 도입에 반응하는 숙주의 면역계, 예로 포유류의 면역계 활성화를 의미할 수 있다. 면역 반응은 세포성 또는 체액성 반응의 형태 또는 둘 다일 수 있다.

[0065] 본원에서 이용되는 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 서로 공유 연결된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 단일 가닥의 도시는 또한 상보 가닥의 서열을 정의한다. 따라서 핵산은 또한 도시된 단일 가닥의 상보 가닥을 포괄한다. 핵산의 여러 변이체가 주어진 핵산과 동일한 목적을 위해 이용될 수 있다. 따라서 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 상보체를 포괄한다. 단일체는 엄격한 혼성화 조건 하에 표적 서열에 혼성화할 수 있는 탐침을 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 프로브를 포함한다.

[0066] 핵산은 단일체 또는 이중체일 수도 있고, 또는 이중체 및 단일체 서열을 모두 일부 함유할 수도 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA 둘 다, RNA, 또는 하이브리드일 수 있고, 여기서 핵산은 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오타이드의 조합 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 잔틴 하이포잔틴, 이소시토신 및 이소구아닌을 포함하는 염기의 조합을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법에 의해 또는 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0067] 본원에서 이용되는 "작동 가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 이것이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있음을 의미할 수 있다. 프로모터는 그 제어 하 유전자의 5'(상류) 또는 3'(하류)에 배치될 수 있다. 프로모터 및 유전자 간 거리는 프로모터가 유래된 유전자에서 이것이 제어하는 유전자 및 프로모터 간 거리와 대략 동일할 수 있다. 당분야에 공지된 바와 같이, 상기 거리의 변동은 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

[0068] 본원에서 이용되는 "펩티드", "단백질", 또는 "폴리펩티드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있고, 천연, 합성, 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0069] 본원에서 이용되는 "프로모터"는 세포 내 핵산의 발현을 부여하거나, 활성화하거나, 증강시킬 수 있는 합성 또는 천연 유래 분자를 의미할 수 있다. 프로모터는 발현을 추가 증강시키고/시키거나 그 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경시키기 위해 하나 이상의 특정 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 원위 인핸서 또는 억제유전자 요소를 포함할 수 있고, 이는 전사 개시 부위에서 수천 개 염기쌍만큼 떨어져 배치될 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함하는 원천에서 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 기관에 대해, 발현이 일어나는 발생 단계에 대해, 또는 외부 자극, 예컨대 생리적 스트레스, 병원체, 금속 이온 또는 유도제에 반응하여 항상적으로 또는 차별적으로 유전자 성분의 발현을 조절할 수 있다. 프로모터의 대표예에는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 작동유전자-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 조기 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, SV40 조기 프로모터 또는 SV 40 후기 프로모터 및 CMV IE 프로모터가 포함된다.

[0070] "신호 펩티드" 및 "리더 서열"은 본원에서 상호 교환적으로 이용되며, 본원에 나타난 단백질의 아미노 말단에 연결될 수 있는 아미노산 서열을 나타낸다. 신호 펩티드/리더 서열은 전형적으로 단백질의 위치선정을 지시한다. 본원에서 이용된 신호 펩티드/리더 서열은 바람직하게는 이것이 생산되는 세포로부터 단백질의 분비를 촉진한다. 신호 펩티드/리더 서열은 종종 세포로부터의 분비 시, 종종 성숙 단백질로 불리는 단백질의 나머지로부터 절단된다. 신호 펩티드/리더 서열은 단백질의 N 말단에 연결된다.

- [0071] 본원에서 이용되는 "엄격한 혼성화 조건"은 제1 핵산 서열(예로, 탐침)이 제2 핵산 서열(예로, 표적)에, 예컨대 핵산의 복합 혼합물로 혼성화할 조건을 의미할 수 있다. 엄격한 조건은 서열 의존적이며, 상이한 상황에서 상이할 것이다. 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열 용융점(T_m)보다 약 5-10°C 더 낮게 선택될 수 있다. T_m 은 표적에 상보적인 탐침의 50%가 평형 시(표적 서열이 과량으로 존재하므로, T_m 에서 탐침의 50%가 평형 시 점유됨) 표적 서열에 혼성화하는 온도(정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에)일 수 있다. 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01-1.0 M 나트륨 이온 농도 (또는 다른 염)과 같이, 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온 미만이고, 온도가 짧은 프로브 (예를 들면, 약 10-50 뉴클레오티드)의 경우 적어도 약 30°C이고 긴 프로브 (예를 들면, 약 50 뉴클레오티드 초과)의 경우 적어도 약 60°C인 조건일 수 있다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 탈안정화제의 첨가로 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화를 위해, 양성 신호는 배경 혼성화의 적어도 2 내지 10배일 수 있다. 예시적인 엄중 하이브리드화 조건은 하기를 포함한다: 50% 포름아미드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42°C에서 항온처리, 또는 5x SSC, 1% SDS, 65°C에서 항온처리, 65°C에서 0.2x SSC, 및 0.1% SDS에서 세척.
- [0072] 본원에서 상호 교환적으로 이용되는 "대상체" 및 "환자"는 비제한적으로 포유류(예로, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아피크, 고양이, 개, 래트 및 마우스, 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 예컨대 게잡이 또는 붉은털 원숭이, 침팬지 등) 및 인간)를 포함하는 임의의 척추동물을 나타낸다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 또는 비-인간일 수 있다. 대상체 또는 환자는 다른 형태의 치료를 거치고 있을 수 있다.
- [0073] 본원에서 이용되는 "실질적으로 상보적인"은 제1 서열이 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100개 또는 그 초과 뉴클레오티드 또는 아미노산 영역에 걸쳐 제2 서열의 상보체에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일함을, 또는 두 서열이 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화함을 의미할 수 있다.
- [0074] 본원에서 이용되는 "실질적으로 동일한"은 제1 서열이 제2 서열의 상보체에 실질적으로 상보적인 경우, 제1 및 제2 서열이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100개 또는 그 초과 뉴클레오티드 또는 아미노산 영역에 걸쳐 또는 핵산에 대해 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%임을 의미할 수 있다.
- [0075] 본원에서 이용되는 "합성 항체"는 본원에서 기재된 재조합 핵산 서열에 의해 암호화되고 대상체에서 생성되는 항체를 나타낸다.
- [0076] 본원에서 이용되는 "치료" 또는 "치료하는"은 질환의 예방, 억제, 진압 또는 완전 제거 수단을 통한 대상체의 질환으로부터의 보호를 의미할 수 있다. 질환의 예방에는 질환의 개시 전에 대상체에 대한 본 발명의 백신 투여가 관여된다. 질환의 억제에는 질환의 유도 후 그러나 그 임상적 출현 전에 대상체에 대한 본 발명의 백신 투여가 관여된다. 질환의 진압에는 질환의 임상적 출현 후 대상체에 대한 본 발명의 백신 투여가 관여된다.
- [0077] 핵산에 대해 본원에서 이용되는 "변이체"는 (i) 참조된 뉴클레오티드 서열의 일부 또는 단편; (ii) 참조된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부의 상보체; (iii) 참조된 핵산 또는 이의 상보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 참조된 핵산, 이의 상보체, 또는 이들과 실질적으로 동일한 서열에 엄격한 조건 하에 혼성화하는 핵산을 의미할 수 있다.
- [0078] 펩티드 또는 폴리펩티드에 대한 "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산을 갖는 참조된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉 유사한 특성(예로, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산을 이용한 아미노산 대체는 당분야에서 전형적으로 작은 변화가 관여되는 것으로 인식된다. 이러한 작은 변화는, 부분적으로 당분야에 이해되는 바와 같이 아미노산의 수치 지수를 고려하여 확인될 수 있다. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). 아미노산의 수치 지수는 그 소수성 및 전하의 고려에 기반한다. 유사한 수치 지수의 아미노산이 치환되고 여전히 단백질 기능을 보유할 수 있음이 당분야에 공지되어 있다. 하나의 측면에서, ± 2 의 수치 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 생성할

치환을 드러내기 위해 이용될 수 있다. 펩티드의 맥락에서 아미노산의 친수성 고려는 항원성 및 면역원성과 잘 연관되는 것으로 보고된 유용한 척도인 해당 펩티드의 가장 큰 국소 평균 친수성 계산을 허용한다. 미국 특허 번호 4,554,101, 이는 전체가 본원에 참고로 포함되어 있다. 당분야에서 이해되는 바와 같은, 유사한 친수성값을 갖는 아미노산의 치환은 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 보유하는 펩티드를 생성할 수 있다. 치환은 서로 ± 2 내의 친수성값을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성값은 모두 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향을 받는다. 그 관찰과 일치하게, 생물학적 기능과 상용성인 아미노산 치환은 아미노산의 상대적 유사성, 특히 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성으로 드러나는 바와 같은 이들 아미노산의 측쇄에 근거하는 것으로 이해된다.

[0079] 변이체는 전체 유전자 서열의 전장 또는 그의 단편에 걸쳐 실질적으로 동일한 핵산 서열일 수 있다. 핵산 서열은 유전자 서열의 전장 또는 그의 단편에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다. 변이체는 아미노산 서열의 전장 또는 그의 단편에 걸쳐 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 아미노산 서열의 전장 또는 그의 단편에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상동할 수 있다.

[0080] 본원에서 이용되는 "백터"는 복제 기원을 함유하는 핵산 서열을 의미할 수 있다. 백터는 플라스미드, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 백터는 DNA 또는 RNA 백터일 수 있다. 백터는 자가-복제 염색시험관내 백터 또는 숙주 계놈 내로 통합되는 백터일 수 있다.

[0081] 본원에서 수치 범위의 언급에 있어서, 동일한 정도의 정밀도를 갖는 그 사이의 각각의 개입 숫자가 명시적으로 고려된다. 예를 들어, 6-9의 범위에 있어서, 숫자 7 및 8은 6 및 9에 부가하여 고려되며, 범위 6.0-7.0에 있어서, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 및 7.0이 명시적으로 고려된다.

[0082] 2. 조성물

[0083] 본 발명은 항체, 그의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 이를 필요로 하는 대상체에 투여되는 경우, 조성물은 대상체에서 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다. 합성 항체는 대상체에 존재하는 표적 분자(즉, 항원)에 결합할 수 있다. 이러한 결합은 항원을 중화시키거나, 다른 분자, 예를 들어 단백질 또는 핵산에 의한 항원의 인식을 차단하거나, 항원에 대한 면역 반응을 야기 또는 유도할 수 있다.

[0084] 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 질환에 대해 치료, 예방 및/또는 보호할 수 있다. 항원에 결합함으로써, 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 질환에 대해 치료, 예방 및/또는 보호할 수 있다. 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 질환 생존을 촉진할 수 있다. 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 질환 생존을 제공할 수 있다. 다른 구현예에서, 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 적어도 약 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 또는 80%의 질환 생존을 제공할 수 있다.

[0085] 조성물은 대상체에 대한 조성물 투여의 적어도 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 20시간, 25시간, 30시간, 35시간, 40시간, 45시간, 50시간, 또는 60시간 내에 대상체에서 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다. 조성물은 대상체에 대한 조성물 투여의 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 또는 10일 내에 대상체에서 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다. 조성물은 대상체에 대한 조성물 투여의 약 1시간 내지 약 6일, 약 1시간 내지 약 5일, 약 1시간 내지 약 4일, 약 1시간 내지 약 3일, 약 1시간 내지 약 2일, 약 1시간 내지 약 1일, 약 1시간 내지 약 72시간, 약 1시간 내지 약 60시간, 약 1시간 내지 약 48시간, 약 1시간 내지 약 36시간, 약 1시간 내지 약 24시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 또는 약 1시간 내지 약 6시간 내에 대상체에서 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다.

[0086] 이를 필요로 하는 대상체에 투여되는 경우, 조성물은 체액성 면역 반응을 유도하기 위해 항원이 투여된 대상체에서 내인성 항체의 생성보다 더 신속하게 대상체에서 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다. 조성물은 체액성 면역 반응을 유도하기 위해 항원이 투여된 대상체에서 내인성 항체 생성의 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 또는 10일 전에 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다.

[0087] 본 발명의 조성물은 조성물이 질병 또는 사망을 유도하지 않으므로 안전하고; 질병에 대해 보호하며; 투여 용이성, 적은 부작용, 생물학적 안정성 및 낮은 용량 별 비용을 제공하는 것과 같이 효과적인 조성물에 요구되는 특징을 가질 수 있다.

[0088] **3. 재조합 핵산 서열**

[0089] 상술된 바와 같이, 조성물은 재조합 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 항체, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합을 암호화할 수 있다. 항체는 아래에 보다 상세히 기재된다.

[0090] 재조합 핵산 서열은 이중성 핵산 서열일 수 있다. 재조합 핵산 서열에는 적어도 하나의 이중성 핵산 서열 또는 하나 이상의 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다.

[0091] 재조합 핵산 서열은 최적화된 핵산 서열일 수 있다. 이러한 최적화는 항체의 면역원성을 증가시키거나 변경할 수 있다. 최적화는 또한 전사 및/또는 번역을 개선할 수 있다. 최적화에는 하기 중 하나 이상이 포함될 수 있다: 전사를 증가시키기 위한 낮은 GC 함량의 리더 서열; mRNA 안정성 및 코돈 최적화; 증가된 번역을 위한 코작 서열(예로, GCC ACC)의 부가; 신호 펩티드를 암호화하는 면역글로불린 (Ig) 리더 서열의 부가; 및 시스-작용 서열 모티프(즉 내부 TATA 박스)가 작용 가능한 범위까지의 제거.

[0092] **a. 재조합 핵산 서열 작제물**

[0093] 재조합 핵산 서열에는 하나 이상의 재조합 핵산 서열 작제물이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 성분이 포함될 수 있고, 이는 아래에 보다 상세히 기재된다.

[0094] 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩티드, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합을 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 경쇄 폴리펩티드, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합을 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 또한 프로테아제 또는 펩티다아제 절단 부위를 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 리더 서열이 포함될 수 있고, 여기서 각각의 리더 서열은 신호 펩티드를 암호화한다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 프로모터, 하나 이상의 인트론, 하나 이상의 전사 종결 영역, 하나 이상의 개시 코돈, 하나 이상의 종결 또는 정지 코돈, 및/또는 하나 이상의 폴리아데닐화 신호가 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 또한 하나 이상의 링커 또는 태그 서열이 포함될 수 있다. 태그 서열은 헤마글루티닌(HA) 태그를 암호화할 수 있다.

[0095] **(1) 중쇄 폴리펩티드**

[0096] 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩티드, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합을 암호화하는 이중성 핵산이 포함될 수 있다. 중쇄 폴리펩티드에는 가변 중쇄(VH) 영역 및/또는 적어도 하나의 불변 중쇄(CH) 영역이 포함될 수 있다. 적어도 하나의 불변 중쇄 영역에는 불변 중쇄 영역 1(CH1), 불변 중쇄 영역 2(CH2), 및 불변 중쇄 영역 3(CH3), 및/또는 힌지 영역이 포함될 수 있다.

[0097] 일부 구현예에서, 중쇄 폴리펩티드에는 VH 영역 및 CH1 영역이 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 중쇄 폴리펩티드에는 VH 영역, CH1 영역, 힌지 영역, CH2 영역, 및 CH3 영역이 포함될 수 있다.

[0098] 중쇄 폴리펩티드에는 상보성 결정 영역("CDR") 세트가 포함될 수 있다. CDR 세트는 VH 영역의 3개의 고가변 영역을 함유할 수 있다. 중쇄 폴리펩티드의 N-말단에서 시작하여, 이들 CDR은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 표시된다. 중쇄 폴리펩티드의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항원의 결합 또는 인식에 기여할 수 있다.

[0099] **(2) 경쇄 폴리펩티드**

[0100] 재조합 핵산 서열 작제물에는 경쇄 폴리펩티드, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합을 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 경쇄 폴리펩티드에는 가변 경쇄(VL) 영역 및/또는 불변 경쇄(CL) 영역이 포함될 수 있다.

[0101] 경쇄 폴리펩티드에는 상보성 결정 영역("CDR") 세트가 포함될 수 있다. CDR 세트는 VL 영역의 3개의 고가변 영역을 함유할 수 있다. 경쇄 폴리펩티드의 N-말단에서 시작하여, 이들 CDR은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 표시된다. 경쇄 폴리펩티드의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항원의 결합 또는 인식에 기여할 수 있다.

[0102] **(3) 프로테아제 절단 부위**

[0103] 재조합 핵산 서열 작제물에는 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 프로테아제 절단 부위는 프로테아제 또는 펩티다아제에 의해 인식될 수 있다. 프로테아제는 엔도펩티다아제 또는 엔도 프로테아제, 예를 들어 비제한적으로 푸린, 엘라스타아제, HtrA, 칼파인, 트립신, 키모트립신, 트립신, 및 펩신 일 수 있다. 프로테아제는 푸린일 수 있다. 다른 구현예에서, 프로테아제는 세린 프로테아제, 트레오닌 프로테

아제, 시스테인 프로테아제, 아스파르테이트 프로테아제, 메탈로프로테아제, 글루탐산 프로테아제, 또는 내부 펩티드 결합을 절단하는(즉, N-말단 또는 C-말단 펩티드 결합을 절단하지 않는) 임의의 프로테아제일 수 있다.

[0104] 프로테아제 절단 부위에는 절단 효율을 촉진하거나 증가시키는 하나 이상의 아미노산 서열이 포함될 수 있다. 하나 이상의 아미노산 서열은 별도의 폴리펩티드를 형성 또는 생성하는 효율을 촉진하거나 증가시킬 수 있다. 하나 이상의 아미노산 서열에는 2A 펩티드 서열이 포함될 수 있다.

[0105] (4) 링커 서열

[0106] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 링커 서열이 포함될 수 있다. 링커 서열은 본원에 기재된 하나 이상의 성분을 공간적으로 분리하거나 연결할 수 있다. 다른 구현예에서, 링커 서열은 두 개 이상의 폴리펩티드를 공간적으로 분리하거나 연결하는 아미노산 서열을 암호화할 수 있다.

[0107] (5) 프로모터

[0108] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 프로모터가 포함될 수 있다. 하나 이상의 프로모터는 유전자 발현을 유도하고 유전자 발현을 조절할 수 있는 임의의 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 DNA 의존적 RNA 폴리머라아제를 통해 전사에 필요한 시스-작용 서열 요소이다. 유전자 발현을 지시하기 위해 이용된 프로모터의 선택은 구체적 용도에 의존한다. 프로모터는 이것이 그 천연 설정에서 전사 개시 부위로부터 유래되므로, 재조합 핵산 서열 작제물에서 전사 개시로부터 대략 동일한 거리에 배치될 수 있다. 그러나 상기 거리의 변동이 프로모터의 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

[0109] 프로모터는 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터는 진핵 세포에서 발현에 효과적으로 나타난 프로모터일 수 있다. 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 CMV 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40)에서 유래된 프로모터, 예컨대 SV40 초기 프로모터 및 SV40 후기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 프로모터, 예컨대 소 면역결핍 바이러스(BIV) 긴 말단 반복서열(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈증 바이러스(ALV) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 예컨대 CMV 최조기 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 또는 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 인간 유전자, 예컨대 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 인간 폴리헤드린, 또는 인간 메탈로티오나인에서 유래된 프로모터일 수 있다.

[0110] 프로모터는 항상적 프로모터 또는 숙주 세포가 일부 특정 외부 자극에 노출되는 경우에만 전사를 개시하는 유도 가능한 프로모터일 수 있다. 다세포 대상체의 경우, 프로모터는 또한 특정 조직 또는 기관 또는 발달 단계에 특이적일 수 있다. 프로모터는 또한 천연 또는 합성의 조직 특이적 프로모터, 예컨대 근육 또는 피부 특이적 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터의 예는 미국 특허 출원 공개 번호 US20040175727에 기재되며, 그 내용은 전문이 본원에 도입된다.

[0111] 프로모터는 인핸서와 연관될 수 있다. 인핸서는 암호화 서열의 상류에 배치될 수 있다. 인핸서는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 또는 바이러스 인핸서, 예컨대 CMV, FMDV, RSV 또는 EBV 유래의 인핸서일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 기능 증강은 미국 특허 번호 5,593,972, 5,962,428, 및 W094/016737에 기재되며, 각각의 내용은 전체가 참조로 도입된다.

[0112] (6)인트론

[0113] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 인트론이 포함될 수 있다. 각각의 인트론에는 기능적 스플라이스 공여체 및 수신체 부위가 포함될 수 있다. 인트론에는 스플라이싱 인핸서가 포함될 수 있다. 인트론에는 효율적인 스플라이싱을 위해 필요한 하나 이상의 신호가 포함될 수 있다.

[0114] (7) 전사 종결 영역

[0115] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 전사 종결 영역이 포함될 수 있다. 전사 종결 영역은 효율적인 종결을 제공하기 위해 암호화 서열의 하류일 수 있다. 전사 종결 영역은 상술된 프로모터와 동일한 유전자에서 수득될 수도 있고, 또는 하나 이상의 상이한 유전자에서 수득될 수도 있다.

[0116] (8) 개시 코돈

[0117] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 개시 코돈이 포함될 수 있다. 개시 코돈은 암호화 서열의 상류에 배치될 수 있다. 개시 코돈은 암호화 서열과 같은 틀에 있을 수 있다. 개시 코돈은 효율적인 번역 개시를 위해 필

요한 하나 이상의 신호, 예를 들어 비제한적으로 리보솜 결합 부위에 연합될 수 있다.

[0118] (9) 종결 코돈

[0119] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 종결 또는 정지 코돈이 포함될 수 있다. 종결 코돈은 암호화 서열의 하류일 수 있다. 종결 코돈은 암호화 서열과 같은 틀에 있을 수 있다. 종결 코돈은 효율적인 번역 종결을 위해 필요한 하나 이상의 신호에 연합될 수 있다.

[0120] (10) 폴리아데닐화 신호

[0121] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 폴리아데닐화 신호가 포함될 수 있다. 폴리아데닐화 신호에는 전사체의 효율적인 폴리아데닐화를 위해 필요한 하나 이상의 신호가 포함될 수 있다. 폴리아데닐화 신호는 암호화 서열의 하류에 배치될 수 있다. 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호, 또는 인간 β -글로빈 폴리아데닐화 신호일 수 있다. SV40 폴리아데닐화 신호는 pCEP4 플라스미드(Invitrogen, San Diego, CA)로부터의 폴리아데닐화 신호일 수 있다.

[0122] (11) 리더 서열

[0123] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 리더 서열이 포함될 수 있다. 리더 서열은 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린(Ig) 신호 펩티드, 예를 들어 비제한적으로 IgG 신호 펩티드 및 IgE 신호 펩티드일 수 있다.

[0124] b. 재조합 핵산 서열 작제물의 배열

[0125] 상술된 바와 같이, 재조합 핵산 서열에는 하나 이상의 재조합 핵산 서열 작제물이 포함될 수 있으며, 여기서 각각의 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 성분이 포함될 수 있다. 하나 이상의 성분이 상기에 상세히 기재된다. 재조합 핵산 서열 작제물에 포함되는 경우, 하나 이상의 성분은 서로에 대해 임의의 순서로 배열될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 성분은 아래 기재된 바와 같이 재조합 핵산 서열 작제물에 배열될 수 있다.

[0126] (1) 배열 1

[0127] 하나의 배열에서, 제1 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있고, 제2 재조합 핵산 서열 작제물에는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다.

[0128] 제1 재조합 핵산 서열 작제물은 벡터에 배치될 수 있다. 제2 재조합 핵산 서열 작제물은 제2 또는 별도의 벡터에 배치될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물의 벡터 내로의 배치는 아래에 보다 상세히 기재된다.

[0129] 제1 재조합 핵산 서열 작제물에는 또한 프로모터, 인트론, 전사 종결 영역, 개시 코돈, 종결 코돈, 및/또는 폴리아데닐화 신호가 포함될 수 있다. 제1 재조합 핵산 서열 작제물에는 추가로 리더 서열이 포함될 수 있고, 여기서 리더 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열의 상류(또는 5')에 배치된다. 따라서 리더 서열에 의해 암호화된 신호 펩티드는 중쇄 폴리펩티드에 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있다.

[0130] 제2 재조합 핵산 서열 작제물에는 또한 프로모터, 개시 코돈, 종결 코돈, 및 폴리아데닐화 신호가 포함될 수 있다. 제2 재조합 핵산 서열 작제물에는 추가로 리더 서열이 포함될 수 있고, 여기서 리더 서열은 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열의 상류(또는 5')에 배치된다. 따라서 리더 서열에 의해 암호화된 신호 펩티드는 경쇄 폴리펩티드에 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있다.

[0131] 따라서 배열 1의 하나의 예에는 VH 및 CH1이 포함되는 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 제1 벡터(및 이에 따른 제1 재조합 핵산 서열 작제물), 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 제2 벡터(및 이에 따른 제2 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있다. 배열 1의 제2 예에는 VH, CH1, 힌지 영역, CH2, 및 CH3이 포함되는 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 제1 벡터(및 이에 따른 제1 재조합 핵산 서열 작제물), 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 제2 벡터(및 이에 따른 제2 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있다.

[0132] (2) 배열 2

[0133] 제2 배열에서, 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열은 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열의 상류(또는 5')에 배치될 수 있다. 대안적으로, 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열의 상류(또는 5')에 배치될 수

있다.

- [0134] 재조합 핵산 서열 작제물은 아래에 보다 상세히 기재된 바와 같이 벡터에 배치될 수 있다.
- [0135] 재조합 핵산 서열 작제물에는 프로테아제 절단 부위 및/또는 링커 서열을 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에 포함되는 경우, 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이중성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 간에 배치될 수 있다. 따라서 프로테아제 절단 부위는 발현 시 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드의 다른 폴리펩티드로의 분리를 허용한다. 다른 구현예에서, 링커 서열이 재조합 핵산 서열 작제물에 포함되는 경우, 링커 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 간에 배치될 수 있으며, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 등몰 발현을 촉진시킬 수 있다.
- [0136] 재조합 핵산 서열 작제물에는 또한 프로모터, 인트론, 전사 종결 영역, 개시 코돈, 종결 코돈, 및/또는 폴리아데닐화 신호가 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 프로모터가 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나의 프로모터가 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열에 연관될 수 있고 제2 프로모터가 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열에 연관될 수 있도록 두 프로모터가 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열에 연관된 하나의 프로모터가 포함될 수 있다.
- [0137] 재조합 핵산 서열 작제물에는 2개의 리더 서열이 추가로 포함될 수 있고, 여기서 제1 리더 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열의 상류(또는 5')에 배치되고 제2 리더 서열은 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열의 상류(또는 5')에 배치된다. 따라서 제1 리더 서열에 의해 암호화된 제1 신호 펩티드가 중쇄 폴리펩티드에 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있고, 제2 리더 서열에 의해 암호화된 제2 신호 펩티드가 경쇄 폴리펩티드에 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있다.
- [0138] 따라서 배열 2의 하나의 예에는 VH 및 CH1이 포함되는 중쇄 폴리펩티드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 링커 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 간에 배치된다.
- [0139] 배열 2의 제2 예에는 VH 및 CH1이 포함되는 중쇄 폴리펩티드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이중성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 간에 배치된다.
- [0140] 배열 2의 제3 예에는 VH, CH1, 힌지 영역, CH2, 및 CH3이 포함되는 중쇄 폴리펩티드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 링커 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 간에 배치된다.
- [0141] 배열 2의 제4 예에는 VH, CH1, 힌지 영역, CH2, 및 CH3이 포함되는 중쇄 폴리펩티드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이중성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 간에 배치된다.
- [0142] **c. 재조합 핵산 서열 작제물로부터의 발현**
- [0143] 상술된 바와 같이, 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 성분 가운데, 중쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 이중성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 따라서 재조합 핵산 서열 작제물은 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드의 발현을 촉진할 수 있다.
- [0144] 상술된 바와 같은 배열 1이 이용되는 경우, 제1 재조합 핵산 서열 작제물은 중쇄 폴리펩티드의 발현을 촉진할 수 있고, 제2 재조합 핵산 서열 작제물은 경쇄 폴리펩티드의 발현을 촉진할 수 있다. 상술된 바와 같은 배열 2가 이용되는 경우, 재조합 핵산 서열 작제물은 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드의 발현을 촉진할 수 있다.
- [0145] 예를 들어 비제한적으로 세포, 대상체 또는 포유류에서의 발현 시, 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드는 합성 항체로 조립될 수 있다. 특히, 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드는 조립으로 항원에 결합할 수 있는 합성 항체가 생성되도록 서로 상호작용할 수 있다. 다른 구현예에서, 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드는 조립으로 본원에 기재된 바와 같이 조립되지 않은 항체에 비해 더 면역원성이 높은 합성 항체를 생성하도록 서로 상호작용

용할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드는 조립으로 항원에 대해 면역 반응을 야기하거나 유도할 수 있는 합성 항체를 생성하도록 서로 상호작용할 수 있다.

[0146] **d. 벡터**

[0147] 상술된 재조합 핵산 서열 작제물은 하나 이상의 벡터에 배치될 수 있다. 하나 이상의 벡터는 복제 기원을 함유할 수 있다. 하나 이상의 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 하나 이상의 벡터는 자가 복제 염색시험관내 벡터, 또는 숙주 게놈 내로 통합되는 벡터일 수 있다.

[0148] 하나 이상의 벡터는 이중성 발현 작제물일 수 있고, 이는 일반적으로 표적 세포 내로 특정 유전자를 도입하기 위해 이용되는 플라스미드이다. 일단 발현 벡터가 세포 내로 들어가면, 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화되는 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드가 세포-전사 및 번역 기전 리보솜 복합체에 의해 생성된다. 하나 이상의 벡터는 다량의 안정한 메신저 RNA, 그리고 이에 따라 단백질을 발현할 수 있다.

[0149] **(1) 발현 벡터**

[0150] 하나 이상의 벡터는 원형 플라스미드 또는 선형 핵산일 수 있다. 원형 플라스미드 및 선형 핵산은 적절한 대상체 세포에서 특정 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시할 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물을 포함하는 하나 이상의 벡터는 키메라일 수 있다, 즉 그 성분의 적어도 하나가 그 다른 성분의 적어도 하나에 대해 이중성이다.

[0151] **(2) 플라스미드**

[0152] 하나 이상의 벡터는 플라스미드일 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 서열 작제물로 세포를 형질감염하기 위해 유용할 수 있다. 플라스미드는 대상체 내로 재조합 핵산 서열 작제물을 도입하기 위해 유용할 수 있다. 플라스미드는 또한 조절 서열을 포함할 수 있고, 이는 플라스미드가 투여되는 세포에서 유전자 발현에 매우 적합할 수 있다.

[0153] 플라스미드는 또한 염색시험관내로 플라스미드를 유지하고 세포에서 복수의 플라스미드 사본을 생산하기 위해 포유류 복제 기원을 포함할 수 있다. 플라스미드는 Invitrogen(San Diego, CA)의 pVAX1, pCEP4 또는 pREP4일 수 있고, 이는 엡스타인 바 바이러스 복제 기원 및 핵 항원 EBNA-1 암호화 영역을 포함할 수 있고, 이는 통합 없이 고사본 에피솜 복제를 생산할 수 있다. 플라스미드 골격은 pAV0242일 수 있다. 플라스미드는 복제 결함 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 플라스미드일 수 있다.

[0154] 플라스미드는 pSE420(Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있고, 이는 *에스케리치아 콜리*(*E.coli*)에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다. 플라스미드는 또한 p YES2(Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있으며, 이는 효모의 사카로마이세스 세레비시에 균주에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다. 플라스미드는 또한 MAXBAC™ 완전 배콜로바이러스 발현 시스템(Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있고, 이는 곤충 세포에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다. 플라스미드는 또한 pcDNA1 또는 pcDNA3(Invitrogen, San Diego, Calif.)일 수 있고, 이는 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다.

[0155] **(3) 원형 및 선형 벡터**

[0156] 하나 이상의 벡터는 원형 플라스미드일 수 있고, 이는 세포 게놈 내로의 통합에 의해 표적 세포를 형질전환시키거나 염색시험관내(예로 복제 기원이 있는 자가 복제 플라스미드)로 존재할 수 있다. 벡터는 pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 발현할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

[0157] 또한 선형 핵산, 또는 선형 발현 카세트("LEC")가 본원에 제공되며, 이는 전기천공을 통해 대상체에 효율적으로 전달되고 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 발현할 수 있다. LEC는 임의의 인산염 골격이 없는 임의의 선형 DNA일 수 있다. LEC는 임의의 항생제 내성 유전자 및/또는 인산염 골격을 함유하지 않을 수 있다. LEC는 원하는 유전자 발현에 관련되지 않은 다른 핵산 서열을 함유하지 않을 수 있다.

[0158] LEC는 선형화될 수 있는 임의의 플라스미드에서 유래될 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 발현할 수 있다. 플라스미드는 pNP(Puerto Rico/34) 또는 pM2(New Caledonia/99)일 수 있다. 플라스미드는 WL009, pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 발현할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

- [0159] LEC는 pcrM2일 수 있다. LEC는 pcrNP일 수 있다. pcrNP 및 pcrMR은 각각 pNP(Puerto Rico/34) 및 pM2(New Caledonia/99)에서 유래될 수 있다.
- [0160] **(4) 벡터의 제조 방법**
- [0161] 제조합 핵산 서열 작제물이 배치된 하나 이상의 벡터의 제조 방법이 본원에 제공된다. 최종 서브클로닝 단계 후, 벡터는 당분야에 공지된 방법을 이용하여 대규모 발효 탱크에서 세포 배양에 접종하기 위해 이용될 수 있다.
- [0162] 다른 구현예에서, 최종 서브클로닝 단계 후, 벡터는 하나 이상의 전기천공(EP) 장치와 함께 이용될 수 있다. EP 장치는 아래에 보다 상세히 기재된다.
- [0163] 하나 이상의 벡터는 공지된 장치 및 기법의 조합을 이용하여 제형화되거나 제조될 수 있지만, 바람직하게는 2007. 5. 23.에 출원된, 라이선스 받고 공동 계류중인 미국 가출원 미국 일련 번호 60/939,792에 기재된 플라스미드 제조 기법을 이용하여 제조된다. 일부 예에서, 본원에 기재된 DNA 플라스미드는 10mg/mL 이상의 농도로 제형화될 수 있다. 제조 기법에는 또한 미국 일련 번호 60/939792에 기재된 것에 더하여, 2007. 7. 3.에 허여된 라이선스 받은 특허, 미국 특허 번호 7,238,522에 기재된 것들을 포함하는 당업자에게 일반적으로 공지된 다양한 장치 및 프로토콜이 포함되거나 도입된다. 상기-참조된 출원 및 특허, 미국 일련 번호 60/939,792 및 미국 특허 번호 7,238,522는 각각 이의 전문이 본원에 도입된다.
- [0164] **4. 항체**
- [0165] 상술된 바와 같이, 제조합 핵산 서열은 항체, 그의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합을 암호화할 수 있다. 항체는 항원에 결합하거나 이와 반응할 수 있고, 이는 아래에 보다 상세히 기재된다.
- [0166] 항체는 CDR에 대한 지지를 제공하고 서로에 대해 CDR의 공간적 관계를 정의하는 중쇄 및 경쇄 틀("FR") 세트 사이에 각각 배치된 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역("CDR") 세트를 포함할 수 있다. CDR 세트는 중쇄 또는 경쇄 V 영역의 3개의 고가변 영역을 함유할 수 있다. 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에서 시작하여, 이들 영역은 각각 "CDR1", "CDR2" 및 "CDR3"으로 표시된다. 따라서 항원-결합 부위에는 중쇄 또는 경쇄 V 영역 각각으로부터의 CDR 세트를 포함하는 6개의 CDR이 포함될 수 있다.
- [0167] 단백질 분해 효소 파괴인은 우선적으로 IgG 분자를 절단하여 몇몇 단편을 생성하며, 그 중 둘(F(ab) 단편)은 각각 온전한 항원-결합 부위가 포함되는 공유 이중이량체를 포함한다. 효소 펩신은 IgG 분자를 절단하여 F(ab')₂ 단편을 포함하는 몇몇 단편을 제공할 수 있고, 이는 두 항원-결합 부위를 모두 포함한다. 따라서 항체는 Fab 또는 F(ab')₂ 일 수 있다. Fab에는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드가 포함될 수 있다. Fab의 중쇄 폴리펩티드에는 VH 영역 및 CH1 영역이 포함될 수 있다. Fab의 경쇄에는 VL 영역 및 CL 영역이 포함될 수 있다.
- [0168] 항체는 면역글로불린(Ig)일 수 있다. Ig는, 예를 들어 IgA, IgM, IgD, IgE, 및 IgG일 수 있다. 면역글로불린에는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드가 포함될 수 있다. 면역글로불린의 중쇄 폴리펩티드에는 VH 영역, CH1 영역, 힌지 영역, CH2 영역, 및 CH3 영역이 포함될 수 있다. 면역글로불린의 경쇄 폴리펩티드에는 VL 영역 및 CL 영역이 포함될 수 있다.
- [0169] 항체는 다클론성 또는 단클론성 항체일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 단일쇄 항체, 친화도 성숙된 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 인간화된 항체는 비인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 틀 영역을 갖고 원하는 항원에 결합하는 비인간 종으로부터의 항체일 수 있다.
- [0170] 상기 항체는 하기에 좀 더 상세히 기술되는 이중특이적 항체일 수 있다. 상기 항체는 하기에 좀 더 상세히 기술되는 이작용성 항체일 수 있다.
- [0171] 앞서 기술된 바와 같이, 상기 항체는 상기 조성물을 상기 대상체에 투여할 때 상기 대상체에서 생성될 수 있다. 상기 항체는 상기 대상체 내에서 반감기를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 대상체 내에서 이의 반감기를 늘리거나 줄이기 위해 변형될 수 있다. 이와 같은 변형이 아래 좀 더 상세히 기술된다.
- [0172] 상기 항체는 하기에 상세히 기재된 바와 같이 탈푸코실화될 수 있다.
- [0173] 상기 항체는 하기에 상세히 기재된 바와 같이 항원과 관련된 질환의 항체-의존적 항상(ADE)을 감소시키거나 방지하도록 변형될 수 있다.

[0174] **a. 이중특이적 항체**

[0175] 상기 제조합 핵산 서열은 이중특이적 항체, 이의 단편, 이것이 변형체, 또는 이의 조합물을 암호화할 수 있다. 상기 이중특이적 항체는 두 개 항원, 예컨대, 아래서 좀 더 상세히 기술되는 2가지 항원과 결합하거나 반응할 수 있다. 상기 이중특이적 항체는 본원에 기술된 2가지 항체의 단편으로 구성될 수 있음으로써, 상기 이중특이적 항체가, 상기 항원(아래 좀 더 상세히 기술됨), 리간드(수용체용 리간드 포함), 수용체(수용체 상의 리간드-결합 부위 포함), 리간드-수용체 복합체, 및 마커(암 마커 포함)를 포함할 수 있는, 원하는 표적 분자와 결합하거나 또는 반응할 수 있게 한다.

[0176] **b. 이작용성 항체**

[0177] 상기 제조합 핵산 서열은 이작용성 항체, 이의 단편, 이의 변형체, 또는 이의 조합물을 암호화할 수 있다. 상기 이작용성 항체는 하기 기술된 항원과 결합하거나 또는 반응할 수 있다. 상기 이작용성 항체는 또한 상기 항원의 인식 및 결합 이외에 상기 항체에 추가적인 기능을 제공하도록 변형될 수도 있다. 이와 같은 변형에는, 비제한적으로, 인자 H 또는 이의 단편과의 결속이 포함될 수 있다. 인자 H는 보완 활성의 용해성 조절제이고, 그렇기 때문에 보완-매개 용해(CML)를 통해 면역 반응에 기여할 수 있다.

[0178] **c. 항체 반감기의 확장**

[0179] 앞서 기술된 바와 같이, 상기 항체는 상기 대상체에서 상기 항체의 반감기를 늘리거나 줄이도록 변형될 수 있다. 상기 변형은 상기 대상체의 혈청에서 상기 항체의 반감기를 늘리거나 또는 줄일 수 있다.

[0180] 상기 변형은 상기 항체의 불변영역에 존재할 수 있다. 상기 변형은 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하지 않은 항체의 반감기와 비교하여, 상기 항체의 반감기를 늘리는 상기 항체의 불변 영역의 하나 이상의 아미노산 치환일 수 있다. 상기 변형은 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하지 않은 항체의 반감기와 비교하여, 상기 항체의 반감기를 늘리는 상기 항체의 CH2 부위의 하나 이상의 아미노산 치환일 수 있다.

[0181] 일부 구현예에서, 불변영역의 상기 하나 이상의 아미노산 치환은 상기 불변영역의 메티오닌 잔기를 타이로신 잔기로, 상기 불변영역의 세린 잔기를 트레오닌 잔기로, 상기 불변영역의 트레오닌 잔기를 글루타메이트 잔기로, 또는 이의 조합물로 대체하는 것을 포함함으로써, 상기 항체의 반감기를 확장할 수 있다.

[0182] 기타 구현예에서, 상기 불변영역에서 하나 이상의 아미노산 치환은 상기 CH2 부위의 메티오닌 잔기를 타이로신 잔기로, 상기 CH2 부위의 세린 잔기를 트레오닌 잔기로, 상기 CH2 부위의 트레오닌 잔기를 글루타메이트 잔기로, 또는 이의 조합으로 대체하는 것을 포함함으로써, 상기 항체의 반감기를 확장할 수 있다.

[0183] **d. 탈푸코실화**

[0184] 제조합 핵산 서열은 푸코실화되지 않은 항체(즉, 탈푸코실화된 항체 또는 비-푸코실화된 항체), 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합을 암호화할 수 있다. 푸코실화는 당 푸코스를 분자에게 부가하는 것, 예를 들어, 푸코스를 N-글리칸, O-글리칸 및 당지질에 부착시키는 것을 포함한다. 따라서, 탈푸코실화된 항체에서, 푸코스는 불변 영역의 탄수화물 사슬에 부착되지 않는다. 결국, 이러한 푸코실화의 결여는 푸코실화된 항체와 비교하여 FcγRIIIa 결합 및 항체에 의한 항체 유도된 세포독성(ADCC) 활성을 개선할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 비-푸코실화된 항체는 푸코실화된 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 나타낼 수 있다.

[0185] 항체는 항체의 푸코실화를 방지하거나 억제하기 위해 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 변형된 항체는 변형되지 않은 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 나타낼 수 있다. 상기 변형은 중쇄, 경쇄, 또는 이의 조합에서 이뤄질 수 있다. 상기 변형은 중쇄에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 경쇄에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0186] **e. 감소된 ADE 반응**

[0187] 항체는 항원과 관련된 질환의 항체-의존적 항상(ADE)을 감소시키거나 방지하지만, 여전히 항원을 중화시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체는 하기에 상세히 기재된 DENV와 관련된 질환의 ADE를 감소시키거나 방지하지만 여전히 DENV를 중화시키도록 변형될 수 있다.

[0188] 일부 구현예에서, 항체는 FcγR1a에 대한 항체의 결합을 감소시키거나 방지하는 하나 이상의 치환을 포함하도록 변형될 수 있다. 하나 이상의 치환은 항체의 불변 영역 내에 있을 수 있다. 하나 이상의 아미노산 치환은, 류신 잔기를, 항체의 불변 영역 내의 알려진 잔기(즉, 본원에서 LA, LA 돌연변이, 또는 LA 치환으로 또한 알려짐)으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 아미노산 치환은, 2개의 류신 잔기를, 각각 항체의 불변 영역

내의 알라닌 잔기 (즉, 본원에서 LALA, LALA 돌연변이, 또는 LALA 치환으로 또한 알려짐)으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. LALA 치환의 존재는 FcyR1a에 대한 결합으로부터 항체를 방지 또는 차단할 수 있으며, 그러므로, 변형된 항체는 상기 항원과 연관된 질환의 ADE를 야기하지는 않으나, 여전히 상기 항원을 중화시킨다.

[0189] **5. 항원**

[0190] 합성 항체는 항원 또는 그의 단편 또는 변이체에 대한 것이다. 항원은 핵산 서열, 아미노산 서열, 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산 서열은 DNA, RNA, cDNA, 이의 변이체, 그의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다. 아미노산 서열은 단백질, 펩티드, 이의 변이체, 그의 단편, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0191] 항원은 임의의 수의 대상체, 예를 들어 바이러스, 기생충, 박테리아, 진균, 또는 포유류에서 유래될 수 있다. 항원은 자가면역 질환, 알러지, 또는 천식에 연관될 수 있다. 다른 구현예에서, 항원은 암, 헤르페스, 독감, B형 간염, C형 간염, 인간 유두종 바이러스(HPV), 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 연관될 수 있다.

[0192] 일부 구현예에서, 항원은 외래의 것이다. 일부 구현예에서, 항원은 자가-항원이다.

[0193] **a. 외래 항원**

[0194] 일부 구현예에서, 항원은 외래의 것이다. 외래 항원은, 체내로 도입되는 경우 면역 반응을 자극할 수 있는 임의의 비-자가 물질(즉, 대상체 외부에서 유래됨)이다.

[0195] **(1) 바이러스 항원**

[0196] 외래 항원은 바이러스 항원, 또는 그의 단편, 또는 이의 변이체일 수 있다. 바이러스 항원은 하기 패밀리 중 하나로부터의 바이러스로부터 유래될 수 있다: *아데노바이러스*, *아레나바이러스*, *분야바이러스*, *칼리시바이러스*, *코로나바이러스*, *폴리바이러스*, *헤파드나바이러스*, *헤르페스바이러스*, *오르토크소바이러스*, *파포바바이러스*, *파라믹소바이러스*, *파르보바이러스*, *피코르나바이러스*, *포스바이러스*, *레오바이러스*, *레트로바이러스*, *랍도바이러스*, 또는 *토가바이러스*. 바이러스 항원은 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 치쿤군야 바이러스(CHIKV), 뎅기열 바이러스, 유두종 바이러스, 예를 들어 인간 유두종 바이러스(HPV), 폴리오 바이러스, 간염 바이러스, 예를 들어 A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV), 및 E형 간염 바이러스(HEV), 천연두 바이러스(바리올라 메이저 및 마이너), 백시니아 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 리노바이러스, 말 뇌염 바이러스, 루벨라 바이러스, 황열 바이러스, 노위크 바이러스, A형 간염 바이러스, 인간 T-세포 백혈병 바이러스(HTLV-I), 털세포 백혈병 바이러스(HTLV-II), 캘리포니아 뇌염 바이러스, 한타 바이러스 (출혈열), 광견병 바이러스, 에볼라열 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 단순 헤르페스 1(구강 헤르페스), 단순 헤르페스 2(생식기 헤르페스), 헤르페스 조스터(바리셀라-조스터, 수두로도 알려짐), 사이토메갈로바이러스(CMV), 예를 들어 인간 CMV, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 플라비바이러스, 구제역 질환 바이러스, 라사 바이러스, 아레나바이러스, 또는 암 유발 바이러스에서 유래될 수 있다.

[0197] **(a) 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항원**

[0198] 바이러스 항원은 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 바이러스에서 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, HIV 항원은 하위유형 A 외피 단백질, 하위유형 B 외피 단백질, 하위유형 C 외피 단백질, 하위유형 D 외피 단백질, 하위유형 B Nef-Rev 단백질, Gag 하위유형 A, B, C, 또는 D 단백질, MPoI 단백질, Env A, Env B, Env C, Env D, B Nef-Rev, Gag의 핵산 또는 아미노산 서열, 또는 임의의 이의 조합일 수 있다.

[0199] HIV에 특이적인 합성 항체에는 서열 번호: 3의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 48의 아미노산 서열, 및 서열 번호: 4의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 Fab 단편이 포함될 수 있다. 합성 항체는 서열 번호: 6의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 46의 아미노산 서열 및 서열 번호: 7의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. Fab 단편은 서열 번호: 50의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. Fab는 서열 번호: 52의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0200] HIV에 특이적인 합성 항체에는 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 Ig가 포함될 수 있다. Ig는 서열 번호: 62의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. Ig는 서열 번호: 63의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. Ig는 서열 번호: 54의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 55의 아미노산 서열, 및 서열 번호: 56의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서

열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0201] **(b) 치쿤군야 바이러스**

[0202] 바이러스 항원은 치쿤군야 바이러스에서 유래될 수 있다. 치쿤군야 바이러스는 토가바이러스과의 알파바이러스 속에 속한다. 치쿤군야 바이러스는 *아에테스(Aedes)* 속과 같은 감염된 모기가 물어서 인간으로 전파된다.

[0203] CHIKV에 특이적인 합성 항체에는 서열 번호: 58의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 59의 아미노산 서열, 및 서열 번호: 60의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 Fab 단편이 포함될 수 있다.

[0204] **(c) 뎅기 바이러스**

[0205] 바이러스 항원은 뎅기 바이러스 유래될 수 있다. 뎅기 바이러스 항원은 바이러스 입자를 형성하는 3가지 단백질 또는 폴리펩티드(C, prM, 및 E) 중 하나일 수 있다. 뎅기 바이러스 항원은 바이러스 복제에 관여되는 7가지 다른 단백질 또는 폴리펩티드(NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) 중 하나일 수 있다. 뎅기 바이러스는 DENV-1, DENV-2, DENV-3 및 DENV-4를 포함하는 바이러스의 5가지 계통 또는 혈청형 중 하나일 수 있다. 항원은 복수의 뎅기 바이러스 항원의 임의 조합일 수 있다.

[0206] 뎅기 바이러스에 특이적인 합성 항체에는 서열 번호: 44의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 Ig가 포함될 수 있다.

[0207] **(d) 간염 항원**

[0208] 바이러스 항원에는 간염 바이러스 항원(즉, 간염 항원), 또는 그의 단편, 또는 그의 변이체가 포함될 수 있다. 간염 항원은 A형 간염 바이러스(HAV), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV), 및/또는 E형 간염 바이러스(HEV) 중 하나 이상으로부터의 항원 또는 면역원일 수 있다.

[0209] 간염 항원은 HAV로부터의 항원일 수 있다. 간염 항원은 HAV 캡시드 단백질, HAV 비구조 단백질, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0210] 간염 항원은 HCV로부터의 항원일 수 있다. 간염 항원은 HCV 캡시드 단백질(즉, 핵심 단백질), HCV 외피 단백질(예로, E1 및 E2), HCV 비구조 단백질(예로, NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, 및 NS5b), 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0211] 간염 항원은 HDV로부터의 항원일 수 있다. 간염 항원은 HDV 델타 항원, 그의 단편, 또는 그의 변이체일 수 있다.

[0212] 간염 항원은 HEV로부터의 항원일 수 있다. 간염 항원은 HEV 캡시드 단백질, 그의 단편, 또는 그의 변이체일 수 있다.

[0213] 간염 항원은 HBV로부터의 항원일 수 있다. 간염 항원은 HBV 핵심 단백질, HBV 표면 단백질, HBV DNA 폴리머라아제, 유전자 X에 의해 암호화된 HBV 단백질, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합일 수 있다. 간염 항원은 HBV 유전형 A 핵심 단백질, HBV 유전형 B 핵심 단백질, HBV 유전형 C 핵심 단백질, HBV 유전형 D 핵심 단백질, HBV 유전형 E 핵심 단백질, HBV 유전형 F 핵심 단백질, HBV 유전형 G 핵심 단백질, HBV 유전형 H 핵심 단백질, HBV 유전형 A 표면 단백질, HBV 유전형 B 표면 단백질, HBV 유전형 C 표면 단백질, HBV 유전형 D 표면 단백질, HBV 유전형 E 표면 단백질, HBV 유전형 F 표면 단백질, HBV 유전형 G 표면 단백질, HBV 유전형 H 표면 단백질, 그의 단편, 그의 변이체, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0214] 일부 구현예에서, 간염 항원은 HBV 유전형 A, HBV 유전형 B, HBV 유전형 C, HBV 유전형 D, HBV 유전형 E, HBV 유전형 F, HBV 유전형 G, 또는 HBV 유전형 H로부터의 항원일 수 있다.

[0215] **(e) 인간 유두종 바이러스(HPV) 항원**

[0216] 바이러스 항원은 HPV로부터의 항원을 포함할 수 있다. HPV 항원은 자궁경부암, 직장암, 및/또는 다른 암을 유도하는 HPV 유형 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 및 58에서 유래될 수 있다. HPV 항원은 생식기 사마귀를 유도하며 두부암 및 경부암의 원인으로 알려져 있는 HPV 유형 6 및 11에서 유래될 수 있다.

[0217] HPV 항원은 각각의 HPV 유형으로부터의 HPV E6 또는 E7 도메인일 수 있다. 예를 들어 HPV 유형 16(HPV16)에 있어서, HPV16 항원에는 HPV16 E6 항원, HPV16 E7 항원, 단편, 변이체, 또는 그의 조합이 포함될 수 있다. 유사하게는, HPV 항원은 HPV 6 E6 및/또는 E7, HPV 11 E6 및/또는 E7, HPV 18 E6 및/또는 E7, HPV 31 E6 및/또는 E7,

HPV 33 E6 및/또는 E7, HPV 52 E6 및/또는 E7, 또는 HPV 58 E6 및/또는 E7, 그의 단편, 변이체, 또는 조합일 수 있다.

(f) RSV 항원

바이러스 항원은 RSV 항원을 포함할 수 있다. RSV 항원은 인간 RSV 융합 단백질(또한 여기서 "RSV F", "RSV F 단백질" 및 "F 단백질"으로 언급됨), 또는 그의 단편이나 변형체일 수 있다. 인간 RSV 융합 단백질은 RSV 하위유형 A 및 B 간에 보존될 수 있다. RSV 항원은 RSV Long 균주(GenBank AAX23994.1)로부터의 RSV F 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 RSV A2 균주(GenBank AAB59858.1)의 RSV F 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 RSV F 단백질의 단량체, 이량체 또는 삼량체, 또는 그의 단편이나 변형체일 수 있다.

RSV F 단백질은 융합-전 형태 또는 융합-후 형태일 수 있다. RSV F의 융합-후 형태는 면역화된 동물에서 높은 역가의 중화 항체를 생성하고 동물을 RSV 유발접종으로부터 보호한다.

RSV 항원은 또한 인간 RSV 부착 당단백(또한 여기서 "RSV G", "RSV G 단백질" 및 "G 단백질"으로 언급됨), 또는 그의 단편이나 변형체일 수 있다. 인간 RSV G 단백질은 RSV 하위유형 A 내지 B에서 가변할 수 있다. 항원은 RSV 롱(Long) 균주(GenBank AAX23993)로부터의 RSV G 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 하기 유래의 RSV G 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다 RSV 하위유형 B 단리체 H5601, RSV 하위유형 B 단리체 H1068, RSV 하위유형 B 단리체 H5598, RSV 하위유형 B 단리체 H1123.

다른 구현예에서, RSV 항원은 인간 RSV 비구조 단백질 1("NS1 단백질"), 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 계통(GenBank AAX23987.1)으로부터의 RSV NS1 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 인간 RSV 항원은 또한 RSV 비구조 단백질 2("NS2 단백질"), 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 계통(GenBank AAX23988.1)으로부터의 RSV NS2 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 추가로 인간 RSV 핵캡시드("N") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 균주(GenBank AAX23989.1)으로부터의 RSV N 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 인간 RSV 인단백질("P") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 균주(GenBank AAX23990.1)으로부터의 RSV P 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 또한 인간 RSV 기질 단백질("M") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 균주(GenBank AAX23991.1)으로부터의 RSV M 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다.

또 다른 구현예에서, RSV 항원은 인간 RSV 작은 소수성("SH") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 균주(GenBank AAX23992.1)으로부터의 RSV SH 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 또한 인간 RSV 기질 단백질 2-1("M2-1") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 계통(GenBank AAX23995.1)으로부터의 RSV M2-1 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. RSV 항원은 추가로 인간 RSV 기질 단백질 2-2("M2-2") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 계통(GenBank AAX23997.1)으로부터의 RSV M2-2 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 인간 RSV 항원은 RSV 폴리머라아제 L("L") 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 예를 들어, RSV 항원은 RSV Long 균주(GenBank AAX23996.1)으로부터의 RSV L 단백질, 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다.

추가 구현예에서, RSV 항원은 NS1, NS2, N, P, M, SH, M2-1, M2-2, 또는 L 단백질의 최적화된 아미노산 서열을 가질 수 있다. RSV 항원은 인간 RSV 단백질 또는 재조합 항원, 예컨대 인간 RSV 계놈에 의해 암호화된 단백질 중 임의의 하나일 수 있다.

다른 구현예에서, RSV 항원은 비제한적으로 RSV Long 균주로부터의 RSV F 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV G 단백질, 최적화된 아미노산 RSV G 아미노산 서열, RSV Long 균주의 인간 RSV 계놈, 최적화된 아미노산 RSV F 아미노산 서열, RSV Long 균주로부터의 RSV NS1 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV NS2 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV N 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV P 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV M 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV SH 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV M2-1 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV M2-2 단백질, RSV Long 균주로부터의 RSV L 단백질, RSV 하위유형 B 단리체 H5601로부터의 RSV G 단백질, RSV 하위유형 B 단리체 H1068로부터의 RSV G 단백질, RSV 하위유형 B 단리체 H5598로부터의 RSV G 단백질, RSV 하위유형 B 단리체 H1123으로부터의 RSV G 단백질, 또는 그의 단편, 또는 그의 변이체일 수

있다.

[0226] **(g) 인플루엔자 항원**

[0227] 바이러스 항원은 인플루엔자 바이러스로부터의 항원을 포함할 수 있다. 인플루엔자 항원은 하나 이상의 인플루엔자 혈청형에 대해 포유류에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 것들이다. 항원은 전장 번역 생성물 HA0, 서브유닛 HA1, 서브유닛 HA2, 이의 변이체, 그의 단편 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 인플루엔자 헤마글루티닌 항원은 여러 균주의 인플루엔자 A 혈청형 H1, 혈청형 H2, 여러 균주의 인플루엔자 A 혈청형 H1의 상이한 세트로부터 유래되거나 여러 균주의 인플루엔자 B로부터 유래된 하이브리드 서열로부터 유래될 수 있다. 인플루엔자 헤마글루티닌 항원은 인플루엔자 B로부터 유래될 수 있다.

[0228] 인플루엔자 항원은 또한 면역 반응이 유도될 수 있는 특정 인플루엔자 면역원에 대해 효과적일 수 있는 적어도 하나의 항원성 에피토프를 함유할 수 있다. 항원은 온전한 인플루엔자 바이러스에 존재하는 면역원성 부위 및 에피토프의 전체 레퍼토리를 제공할 수 있다. 항원은 한 혈청형의 복수의 인플루엔자 A 바이러스 균주, 예컨대 혈청형 H1 또는 혈청형 H2의 복수의 인플루엔자 A 바이러스 균주으로부터의 헤마글루티닌 항원 서열에서 유래될 수 있다. 항원은 두 상이한 헤마글루티닌 항원 서열 또는 이의 일부의 조합으로부터 유래되는 하이브리드 헤마글루티닌 항원 서열일 수 있다. 각각의 두 상이한 헤마글루티닌 항원 서열은 한 혈청형의 복수의 인플루엔자 A 바이러스 균주, 예컨대 혈청형 H1의 복수의 인플루엔자 A 바이러스 균주의 상이한 세트로부터 유래될 수 있다. 항원은 복수의 인플루엔자 B 바이러스 균주으로부터의 헤마글루티닌 항원 서열에서 유래된 헤마글루티닌 항원 서열일 수 있다.

[0229] 일부 구현예에서, 인플루엔자 항원은 H1 HA, H2 HA, H3 HA, H5 HA, 또는 BHA 항원일 수 있다.

[0230] **(h) 에볼라 바이러스**

[0231] 바이러스 항원은 에볼라 바이러스에서 유래될 수 있다. 에볼라 바이러스 질환(EVD) 또는 에볼라 출혈열(EHF)에는 분디부교 바이러스(BDBV), 에볼라 바이러스(EBOV), 수단 바이러스(SUDV), 및 타이 숲 바이러스(TAFV, 또한 코트디부아르 에볼라 바이러스(아이보리 해안 에볼라바이러스, CIEBOV)로도 불림)를 포함하는 5가지 공지된 에볼라 바이러스 중 임의의 4가지가 포함된다.

[0232] **(2) 박테리아 항원**

[0233] 외래 항원은 박테리아 항원 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 박테리아는 하기 문(phyla) 중 임의의 하나에서 유래될 수 있다: 아시도박테리아, 액티노박테리아, 아쿠이피캐, 박테로이데티스, 칼디세리카, 클라미디아, 클로로비, 클로로플렉시, 크리스오제네티스, 시아노박테리아, 데페리박테리스, 다이노코커스-썬무스, 덕티오글로미, 엘루시마이크로비아, 파이프록박테리스, 퍼미큐티스, 푸소박테리아, 켄타모나데티스, 렌티스페레, 니트로스피라, 플랑크토마이세티스, 프로테오박테리아, 스피로케테스, 시너지스테티스, 테네리큐티스, 썬모데실포박테리아, 썬모토개 및 베루코마이크로비아.

[0234] 박테리아는 그람 양성 박테리아 또는 그람 음성 박테리아일 수 있다. 박테리아는 호기성 박테리아 또는 혐기성 박테리아일 수 있다. 박테리아는 자력영양 박테리아 또는 종속영양 박테리아일 수 있다. 박테리아는 중온균, 중성친화균, 극한서식균, 호산균, 호염기균, 호열균, 한냉균, 호염균, 또는 호삼투균일 수 있다.

[0235] 박테리아는 탄저병 박테리아, 항생제 내성 박테리아, 질환 유도 박테리아, 식중독 박테리아, 감염성 박테리아, 살모넬라 박테리아, 스탕필로코커스 박테리아, 스트렙토코커스 박테리아, 또는 과상풍 박테리아일 수 있다. 박테리아는 미코박테리아, *클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani)*, *예르시니아 페스티스(Yersinia pestis)*, *바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis)*, 메티실린 내성 *스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus)* (MRSA), 또는 *클로스트리디움 디피실(Clostridium difficile)*일 수 있다. 박테리아는 미코박테리아 *투베르쿨로시스(Mycobacteria tuberculosis)*일 수 있다.

[0236] **(a) 미코박테리아 투베르쿨로시스 항원**

[0237] 박테리아 항원은 *미코박테리아 투베르쿨로시스(Mycobacteria tuberculosis)* 항원(즉, TB 항원 또는 TB 면역원), 또는 그의 단편, 또는 이의 변이체일 수 있다. TB 항원은 TB 항원의 Ag85 패밀리, 예를 들어 Ag85A 및 Ag85B에서 유래될 수 있다. TB 항원은 TB 항원의 Esx 패밀리, 예를 들어 EsxA, EsxB, EsxC, EsxD, EsxE, EsxF, EsxH, EsxO, EsxQ, EsxR, EsxS, EsxT, EsxU, EsxV, 및 EsxW에서 유래될 수 있다.

[0238] **(3) 기생충 항원**

- [0239] 외래 항원은 기생충 항원 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 기생충은 원충, 연충, 또는 외부기생충일 수 있다. 연충(즉, 벌레)은 편형충(예로, 흡충 및 촌충), 구두충, 또는 회충(예로, 요충)일 수 있다. 외부기생충은 이, 벼룩, 진드기 및 응애류 진드기(mite)일 수 있다.
- [0240] 기생충은 하기 질병을 유발하는 임의의 기생충일 수 있다: 가시아메바 각막염, 아메바증, 회충증, 바베스열원충증, 대장섬모충증, 너구리회충증, 샤가스 질환, 간흡충증, 코클리오마리아, 작은와포자충, 열두조충증, 드라쿤쿨루스증, 포충증, 코끼리피부병, 요충증, 간질증, 비대흡충증, 사상충증, 람블편모충증, 악구충증, 막양조충증, 이소스포라증, 카타야마열, 라이쉬마니증, 라임병, 말라리아, 흡충증, 구더기증, 사상충증, 이깁염증, 옴, 주혈흡충증, 수면병, 간충증, 조충증, 톡소카라증, 톡소플라스마증, 선모충증, 및 편충증.
- [0241] 기생충은 하기일 수 있다: 가시아메바, 아니사키스, 회충, 쇠파리, 발란티듐 콜리, 빈대, 조충 (촌충), 양충, 코클리오마리아 호미니보락스, 이질아메바, 파스시올라 헤파티카, 람블편모충, 구충, 라이쉬마니아, 린구아툴라 세라타, 간 흡충, 로아사상충, 파라고니무스 - 페 흡충, 요충, 플라스모디움 팔시파룸, 주혈흡충, 스트론길로이데스 스테르코칼리스, 진드기, 촌충, 톡소플라스마 곤디이, 트라이파노소마, 편충, 또는 반크롭트 사상충.
- [0242] **(a) 말라리아 항원**
- [0243] 외래 항원은 말라리아 항원(즉, PF 항원 또는 PF 면역원), 또는 그의 단편, 또는 그의 변이체일 수 있다. 항원은 말라리아를 유도하는 기생충에서 유래될 수 있다. 말라리아 유도 기생충은 *플라스모디움 팔시파룸* (*Plasmodium falciparum*)일 수 있다. *플라스모디움 팔시파룸* (*Plasmodium falciparum*) 항원에는 포자소체(CS) 항원이 포함될 수 있다.
- [0244] 일부 구현예에서, 말라리아 항원은 *P. 팔시파룸* 면역원 CS; LSA1; TRAP; CelTOS; 및 Ama1 중 하나일 수 있다. 면역원은 전장 또는 전장 단백질의 면역원성 단편일 수 있다.
- [0245] 다른 구현예에서, 말라리아 항원은 SSP2로도 불리는 TRAP일 수 있다. 다른 구현예에서, 말라리아 항원은 Ag2로도 불리며 고도로 보존된 *플라스모디움* 항원인 CelTOS일 수 있다. 추가 구현예에서, 말라리아 항원은 고도로 보존된 *플라스모디움* 항원인 Ama1일 수 있다. 일부 구현예에서, 말라리아 항원은 CS 항원일 수 있다.
- [0246] 다른 구현예에서, 말라리아 항원은 본원에 나타난 PF 단백질의 둘 이상의 조합을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 서로 직접 인접하여 연결되거나 그 사이에 스페이서 또는 하나 이상의 아미노산으로 연결된 CS 면역원, ConLSA1 면역원, ConTRAP 면역원, ConCelTOS 면역원, 및 ConAma1 면역원 중 둘 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 2개의 PF 면역원을 포함한다; 일부 구현예에서 융합 단백질은 3개의 PF 면역원을 포함하며, 일부 구현예에서 융합 단백질은 4개의 PF 면역원을 포함하고, 일부 구현예에서 융합 단백질은 5개의 PF 면역원을 포함한다. 2개의 PF 면역원을 갖는 융합 단백질은 하기를 포함할 수 있다: CS 및 LSA1; CS 및 TRAP; CS 및 CelTOS; CS 및 Ama1; LSA1 및 TRAP; LSA1 및 CelTOS; LSA1 및 Ama1; TRAP 및 CelTOS; TRAP 및 Ama1; 또는 CelTOS 및 Ama1. 3개의 PF 면역원을 갖는 융합 단백질은 하기를 포함할 수 있다: CS, LSA1 및 TRAP; CS, LSA1 및 CelTOS; CS, LSA1 및 Ama1; LSA1, TRAP 및 CelTOS; LSA1, TRAP 및 Ama1; 또는 TRAP, CelTOS 및 Ama1. 4개의 PF 면역원을 갖는 융합 단백질은 하기를 포함할 수 있다: CS, LSA1, TRAP 및 CelTOS; CS, LSA1, TRAP 및 Ama1; CS, LSA1, CelTOS 및 Ama1; CS, TRAP, CelTOS 및 Ama1; 또는 LSA1, TRAP, CelTOS 및 Ama1. 5개의 PF 면역원을 갖는 융합 단백질은 CS 또는 CS-alt, LSA1, TRAP, CelTOS 및 Ama1을 포함할 수 있다.
- [0247] **(4) 진균 항원**
- [0248] 외래 항원은 진균 항원 또는 그의 단편 또는 변이체일 수 있다. 진균류는 하기일 수 있다: 아스페르길루스 종, 블라스토마이세스 더마티티디스, 칸디다 효모 (예를 들면, 칸디다 알비칸스), 콕시디오이데스, 크립토코쿠스 네오포르만스, 크립토코쿠스 가티이, 피부사상균, 푸사리움 종, 히스토플라스마 캡슐라툼, 뮤코로미코티나, 뉴모사이스티스 지로베시이, 스포로트릭스 센키, 엑세로hil름, 또는 클라도스포리움.
- [0249] **b. 자가 항원**
- [0250] 일부 구현예에서, 항원은 자가 항원이다. 자가 항원은 면역 반응을 자극할 수 있는 대상체 자신의 몸의 구성성분일 수 있다. 일부 구현예에서, 자가 항원은 대상체가 질환 상태, 예로 자가면역 질환에 있지 않는 한, 면역 반응을 유발하지 않는다.
- [0251] 자가 항원에는 비제한적으로 시토카인, 바이러스, 예컨대 HIV 및 Dengue를 포함하여 상술된 것들에 대한 항체, 암

진행 또는 발생에 영향을 미치는 항원, 및 세포 표면 수용체 또는 막통과 단백질이 포함될 수 있다.

[0252] (1) WT-1

[0253] 자가-항원 항원은 윌름 종양 억제인자 유전자 1(WT1), 그의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 조합일 수 있다. WT1은 N-말단에 프롤린/글루타민-풍부 DNA-결합 도메인을, 그리고 C-말단에 4개의 아연 핑거 모티프를 함유하는 전사 인자이다. WT1은 비노생식계의 정상 발달에서 역할을 수행하며, 여러 인자, 예를 들어 공지된 종양 억제인자인 p53 및 세포독성 약물의 처리 후 여러 부위에서 WT1을 절단하는 세린 프로테아제 HtrA2와 상호작용한다. WT1의 돌연변이는 종양 또는 암 형성, 예를 들어 윌름 종양 또는 WT1을 발현하는 종양을 야기할 수 있다.

[0254] (2) EGFR

[0255] 자가-항원에는 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 또는 그의 단편 또는 변이체가 포함될 수 있다. EGFR(ErbB-1 및 HER1로도 불림)은 세포외 단백질 리간드의 표피 성장 인자 패밀리의 구성원에 대한 세포-표면 수용체이다. EGFR은 ErbB 수용체 패밀리의 구성원이며, 여기에는 4가지 밀접하게 관련된 수용체 티로신 키나아제가 포함된다: EGFR(ErbB-1), HER2/c-neu(ErbB-2), Her 3(ErbB-3), 및 Her 4(ErbB-4). EGFR 발현 또는 활성화에 영향을 미치는 돌연변이는 암을 일으킬 수 있다.

[0256] 항원에는 ErbB-2 항원이 포함될 수 있다. Erb-2(인간 표피 성장 인자 수용체 2)는 Neu, HER2, CD340(분화 클러스터 340), 또는 p185로도 알려져 있고, ERBB2 유전자에 의해 암호화된다. 상기 유전자의 증폭 또는 과발현은 특정한 공격적 유형의 유방암의 발생 및 진행에 역할을 담당하는 것으로 나타났다. 유방암 여성의 대략 25-30%에서, ERBB2 유전자에 유전적 변형이 일어나서 종양 세포 표면 상에 증가된 양의 HER2 생성을 유도한다. 이러한 HER2의 과발현은 신속한 세포 분열을 촉진하고, 이에 따라 HER2는 종양 세포를 표시한다.

[0257] HER2에 특이적인 합성 항체에는 서열 번호: 40의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 41의 아미노산 서열, 및 서열 번호: 42의 핵산 서열에 의해 암호화되는 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 Fab 단편이 포함될 수 있다.

[0258] (3) 코카인

[0259] 자가-항원은 코카인 수용체 항원일 수 있다. 코카인 수용체에는 도파민 수송체가 포함된다.

[0260] (4) PD-1

[0261] 자가-항원에는 프로그래밍된 사멸 1(PD-1)이 포함될 수 있다. 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 및 그 리간드, PD-L1 및 PD-L2는 T 세포 활성화, 내성 및 면역병리 간 균형을 조절하는 억제 신호를 전달한다. PD-1은 세포외 IgV 도메인에 이어 막통과 영역 및 세포내 꼬리를 포함하는 288개 아미노산의 세포 표면 단백질 분자이다.

[0262] (5) 4-1BB

[0263] 자가-항원에는 4-1BB 리간드가 포함될 수 있다. 4-1BB 리간드는 TNF 수퍼패밀리에 속하는 유형 2 막통과 당단백질이다. 4-1BB 리간드는 활성화된 T 림프구 상에서 발현될 수 있다. 4-1BB는 활성화-유도된 T-세포 공-자극 분자이다. 4-1BB를 통한 신호전달은 생존 유전자를 상향조절하고, 세포 분열을 증강시키고, 시토카인 생산을 유도하고, T 세포에서 활성화-유도된 세포사를 예방한다.

[0264] (6) CTLA4

[0265] 자가-항원에는 CD152(분화 클러스터 152)로도 알려져 있는 CTLA-4(세포독성 T-림프구 항원 4)가 포함될 수 있다. CTLA-4는 T 세포 표면 상에서 발견되는 단백질 수용체로, 항원 상에서 세포성 면역 공격을 일으킨다. 항원은 CTLA-4의 단편, 예컨대 세포외 V 도메인, 막통과 도메인, 및 세포질 꼬리, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0266] (7) IL-6

[0267] 자가-항원에는 인터류킨 6(IL-6)이 포함될 수 있다. IL-6은 비제한적으로 당뇨병, 죽상경화, 우울증, 알츠하이머 질환, 전신성 홍반성 루푸스, 다중 골수종, 암, 베타트 질환 및 류마티스성 관절염을 포함하는 여러 질환에서 염증 및 자가-면역 절차를 자극한다.

[0268] (8) MCP-1

[0269] 자가-항원에는 단백질 화학주성 단백질-1(MCP-1)이 포함될 수 있다. MCP-1은 케모카인(C-C 모티프) 리간드 2(CCL2) 또는 작은 유도 가능한 시토카인 A2로도 불린다. MCP-1은 CC 케모카인 패밀리에 속하는 시토카인이다.

MCP-1은 조직 부상 또는 감염에 의해 생산되는 염증 부위로 단핵구, 메모리 T 세포 및 수지상 세포를 모집한다.

[0270] (9) 아밀로이드 베타

[0271] 자가-항원에는 아밀로이드 베타(A β) 또는 그의 단편 또는 변이체가 포함될 수 있다. A β 항원은 A β (X-Y) 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 인간 서열 A β 단백질의 아미노산 위치 X부터 아미노산 Y까지의 아미노산 서열은 X 및 Y 둘 다, 특히 아미노산 서열 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAIVIVI (아미노산 위치 1 내지 47에 대응; 인간 조화 서열)의 아미노산 위치 X부터 아미노산 Y까지의 아미노산 서열 또는 그의 변이체를 포함한다. A β 항원은 A β (X-Y) 폴리펩티드의 A β 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 X는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 또는 32일 수 있고, Y는 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 또는 15일 수 있다. A β 폴리펩티드는 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 36, 적어도 37, 적어도 38, 적어도 39, 적어도 40, 적어도 41, 적어도 42, 적어도 43, 적어도 44, 적어도 45, 또는 적어도 46 아미노산인 단편을 포함할 수 있다.

[0272] (10) IP-10

[0273] 자가-항원에는 인터페론(IFN)-감마-유도된 단백질 10(IP-10)이 포함될 수 있다. IP-10은 작은-유도 가능한 시토카인 B10 또는 C-X-C 모티프 케모카인 10(CXCL10)으로도 알려져 있다. CXCL10은 IFN- γ 에 반응하여 몇몇 세포 유형, 예컨대 단핵구, 내피 세포 및 섬유아세포에 의해 분비된다.

[0274] (11) PSMA

[0275] 자가-항원에는 전립선-특이적 막 항원(PSMA)이 포함될 수 있다. PSMA는 글루타메이트 카르복시펩티다아제 II(GCPII), N-아세틸-L-아스파르틸-L-글루타메이트 펩티다아제 I(NAALADase I), NAAG 펩티다아제, 또는 폴레이트 가수분해효소(FOLH)로도 알려져 있다. PSMA는 전립선암 세포에 의해 고도 발현되는 통합 막 단백질이다.

[0276] 일부 구현예에서, PSMA에 대한 항체(항-PSMA 항체)를 암호화하는 핵산 서열은 배열 2의 제조합 핵산 서열 작제물을 포함하는 제조합 핵산 서열일 수 있으며, 이는 상기에 상세히 기재되어 있으며 도 63에 나타나 있다. 도 63은 프로모터, 리더 서열, IgG 중쇄, 절단 부위, 제2 리더 서열, IgG 경쇄 및 폴리(A) 테일을 포함하는 제조합 핵산 서열 작제물을 나타낸다.

[0277] 또 다른 구현예에서, 상기 제조합 핵산 서열에 의해 암호화된 항-PSMA 항체는 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다. 이러한 한 가지 변형은 실시예에서 입증된 바와 같이 상업적 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 나타낸 탈푸코실화된 항체이다. 상기 변형은 중쇄, 경쇄, 또는 그의 조합에서 이뤄질 수 있다. 상기 변형은 중쇄에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 경쇄에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0278] PSMA에 대해 특이적이며 푸코실화되지 않도록 변형된 항체는 서열 번호: 79에 제시된 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있다. 서열 번호: 79는 서열 번호: 80에 명시된 아미노산 서열을 암호화한다.

[0279] c. 다른 항원

[0280] 일부 구현예에서, 항원은 외래 항원 및/또는 자가-항원 이외의 항원이다.

[0281] (a) HIV-1 VRC01

[0282] 다른 항원은 HIV-1 VRC01일 수 있다. HIV-1 VRC01은 HIV에 대한 중화 CD4-결합 부위-항체이다. HIV-1 VRC01은 HIV-1의 gp120 루프 D, CD4 결합 루프, 및 V5 영역 내를 포함하는 HIV-1의 부분들과 접촉한다.

[0283] (b) HIV-1 PG9

[0284] 다른 항원은 HIV-1 PG9일 수 있다. HIV-1 PG9는 HIV(HIV-1) 외피(Env) 당단백질(gp) 삼량체에 우선적으로 결합하고 바이러스를 광범위하게 중화시키는 글리칸-의존적 인간 항체의 확장된 패밀리 시조 구성원이다.

[0285] (c) HIV-1 4E10

[0286] 다른 항원은 HIV-1 4E10일 수 있다. HIV-1 4E10은 중화 항-HIV 항체이다. HIV-1 4E10은 gp41 외-도메인의 C 말단에 위치하는 HIV-1의 막-근처 외부 영역(MPER)에 맵핑된 선형 에피토프에 대한 것이다.

[0287] (d) DV-SF1

[0288] 다른 항원은 DV-SF1일 수 있다. DV-SF1은 4가지 탱기 바이러스 혈청형의 외피 단백질에 결합하는 중화 항체이다.

[0289] (e) DV-SF2

[0290] 다른 항원은 DV-SF2일 수 있다. DV-SF2는 탱기 바이러스의 에피토프에 결합하는 중화 항체이다. DV-SF2는 DENV4 혈청형에 특이적일 수 있다.

[0291] (f) DV-SF3

[0292] 다른 항원은 DV-SF3일 수 있다. DV-SF3은 탱기 바이러스 외피 단백질의 EDIII A 가닥에 결합하는 중화 항체이다.

[0293] 6. 조성물의 부형제 및 다른 성분

[0294] 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 부형제는 기능적 분자, 예컨대 운반체, 담체, 또는 희석제일 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 부형제는 형질감염 촉진 제제일 수 있고, 여기에는 표면 활성 제제, 예컨대 면역 자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 보강제, LPS 유사체, 예컨대 모노포스포릴 지질 A, 무라밀 펩티드, 퀴논 유사체, 소포체, 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 히알루론산, 지질, 리포솜, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중 음이온, 다중 양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질감염 촉진 제제가 포함될 수 있다.

[0295] 형질감염 촉진 제제는 다중 음이온, 다중 양이온, 예컨대 폴리-L-글루타메이트(LGS), 또는 지질이다. 형질감염 촉진 제제는 폴리-L-글루타메이트이고, 폴리-L-글루타메이트는 6mg/ml 미만의 농도로 조성물에 존재할 수 있다. 형질감염 촉진 제제에는 또한 표면 활성 제제, 예컨대 면역-자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 보강제, LPS 유사체, 예컨대 모노포스포릴 지질 A, 무라밀 펩티드, 퀴논 유사체 및 소포체, 예컨대 스쿠알렌 및 스쿠알렌이 포함될 수 있고, 히알루론산이 또한 조성물과 함께 투여되어 이용될 수 있다. 조성물에는 또한 형질감염 촉진 제제, 예컨대 지질, 리포솜, 예컨대 레시틴 리포솜 또는 당분야에 공지된 다른 리포솜, 예컨대 DNA-리포솜 혼합물(예를 들어 W09324640 참고), 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중 음이온, 다중 양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질감염 촉진 제제가 포함될 수 있다. 형질감염 촉진 제제는 다중 음이온, 다중 양이온, 예컨대 폴리-L-글루타메이트(LGS), 또는 지질이다. 백신 중 형질감염 제제의 농도는 4mg/ml 미만, 2mg/ml 미만, 1mg/ml 미만, 0.750mg/ml 미만, 0.500mg/ml 미만, 0.250mg/ml 미만, 0.100mg/ml 미만, 0.050mg/ml 미만, 또는 0.010mg/ml 미만이다.

[0296] 조성물은 전문이 참조로 도입되는 1994. 4. 1.에 출원된 미국 일련 번호 021,579에 기재된 바와 같은 유전적 촉진 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0297] 조성물은 약 1나노그램 내지 100밀리그램; 약 1마이크로그램 내지 약 10밀리그램; 또는 바람직하게는 약 0.1마이크로그램 내지 약 10밀리그램; 또는 보다 바람직하게는 약 1밀리그램 내지 약 2밀리그램인 양으로 DNA를 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물은 약 5나노그램 내지 약 1000마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 약 10나노그램 내지 약 800마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 약 0.1 내지 약 500마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 약 1 내지 약 350마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 약 25 내지 약 250마이크로그램, 약 100 내지 약 200마이크로그램, 약 1나노그램 내지 100밀리그램; 약 1마이크로그램 내지 약 10밀리그램; 약 0.1마이크로그램 내지 약 10밀리그램; 약 1밀리그램 내지 약 2밀리그램, 약 5나노그램 내지 약 1000마이크로그램, 약 10나노그램 내지 약 800마이크로그램, 약 0.1 내지 약 500마이크로그램, 약 1 내지 약 350마이크로그램, 약 25 내지 약 250마이크로그램, 약 100 내지 약 200마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다.

[0298] 조성물은 사용될 투여 경로에 따라 제형화될 수 있다. 주사 가능한 약학 조성물은 멸균이며, 발열원이 없고 입자가 없을 수 있다. 등장성 제형물 또는 용액이 이용될 수 있다. 등장성을 위한 첨가제에는 나트륨 클로라이드, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨, 및 락토오스가 포함될 수 있다. 조성물은 혈관수축 제제를 포함할 수 있다. 등장성 용액에는 인산염 완충 식염수가 포함될 수 있다. 조성물은 젤라틴 및 알부민을 포함하는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. LGS 또는 다중 양이온 또는 다중 음이온을 포함하는 안정화제는 제형이 연장된 시기 동안 실온 또는 상온에서 안정하도록 할 수 있다.

[0299] 7. 합성 항체의 생성 방법

- [0300] 본 발명은 또한 합성 항체의 생성 방법에 대한 것이다. 방법에는 아래에 보다 상세히 기재된 전달 방법을 이용함으로써 이를 필요로 하는 대상체에 조성물을 투여하는 단계가 포함될 수 있다. 따라서 합성 항체는 대상체에 대한 조성물의 투여 시 생체내 또는 대상체에서 생성된다.
- [0301] 방법에는 또한 하나 이상의 세포 내로 조성물을 투여하는 단계가 포함될 수 있고, 이에 따라 합성 항체는 하나 이상의 세포에서 생성되거나 생산될 수 있다. 방법에는 하나 이상의 조직, 예를 들어 비제한적으로 피부 및 근육 내로 조성물을 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 이에 따라 합성 항체는 하나 이상의 조직에서 생성되거나 생산될 수 있다.
- [0302] **8. 항체에 대한 확인 또는 스크리닝 방법**
- [0303] 본 발명은 추가로 상술된 항원에 반응성이거나 이에 결합하는 상술된 항체의 확인 또는 스크리닝 방법에 관한 것이다. 항체의 확인 또는 스크리닝 방법은 항체를 확인하거나 스크리닝하기 위해 당분야 숙련자에게 공지된 방법론으로 항원을 이용할 수 있다. 이러한 방법론에는 비제한적으로 라이브러리(예로 파지 디스플레이)로부터의 항체 선택 및 동물의 면역화 이후 항체의 단리 및/또는 정제가 포함될 수 있다.
- [0304] **9. 조성물의 전달 방법**
- [0305] 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상체에 조성물을 전달하는 방법에 관한 것이다. 전달 방법에는 대상체에 조성물을 투여하는 단계가 포함될 수 있다. 투여에는 비제한적으로 생체내 전기천공을 포함하는 및 포함하지 않는 DNA 주사, 리포좀 매개된 전달 및 나노입자 촉진된 전달이 포함될 수 있다.
- [0306] 조성물 전달을 수신하는 포유류는 인간, 영장류, 비인간 영장류, 젓소, 육우, 양, 염소, 영양, 유령들소, 물소, 유령들소, 소과, 사슴, 고슴도치, 코끼리, 라마, 알파카, 마우스, 래트 및 닭일 수 있다.
- [0307] 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입을 통해, 협측 투여를 통해, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내 경막내, 및 관절내 또는 이의 조합을 포함하는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 수의학적 용도를 위해, 조성물은 정상적인 수의학적 관례에 따라 적합하게 허용 가능한 제형으로 투여될 수 있다. 수의사는 특정 동물에 가장 적절한 투여 방식 및 투여 경로를 쉽게 결정할 수 있다. 조성물은 전통적인 주사기, 무바늘 주사 장치, "마이크로돌출형 폭탄 곤 건", 또는 다른 물리적 방법, 예컨대 전기천공("EP"), "수력학적 방법", 또는 초음파에 의해 투여될 수 있다.
- [0308] **a. 전기천공**
- [0309] 전기천공을 통한 조성물의 투여는 가역적 구멍을 세포막에 형성하기 위해 효과적인 에너지 자극을 원하는 포유류 조직으로 전달하도록 배치될 수 있는 전기천공 장치를 이용해서 달성될 수 있고, 바람직한 에너지 자극은 사용자에게 의해 사전 설정된 전류 입력과 유사한 정전류이다. 전기천공 장치는 전기천공 성분 및 전극 어셈블리 또는 핸들 어셈블리를 포함한다. 전기천공 성분에는 하기를 포함하는 전기천공 장치의 다양한 요소의 하나 이상이 포함되고 도입될 수 있다: 컨트롤러, 전류 파형 생성기, 임피던스 평가기, 파형 로거, 입력 요소, 상태 보고 요소, 커뮤니케이션 포트, 메모리 성분, 전원 및 전력 스위치. 전기천공은 플라스미드에 의한 세포의 형질감염을 촉진하기 위해, 생체내 전기천공 장치, 예를 들어 CELLECTRA EP 시스템(Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA) 또는 Elgen 전기천공기(Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA)를 이용해서 달성될 수 있다.
- [0310] 전기천공 성분은 전기천공 장치의 하나의 요소로 기능할 수 있고, 다른 요소가 전기천공 성분과 커뮤니케이션하는 별도의 요소(또는 성분)이다. 전기천공 성분은 전기천공 장치의 둘 이상의 요소로 기능할 수 있고, 이는 전기천공 성분과 별도의 전기천공 장치의 다른 요소와 여전히 커뮤니케이션할 수 있다. 하나의 전기기계적 또는 기계적 장치의 일부로 존재하는 전기천공 장치의 요소는 요소가 하나의 장치로 또는 서로 커뮤니케이션하는 별도 요소로서 기능할 수 있는 것으로 제한되지 않을 수 있다. 전기천공 성분은 원하는 조직에서 정전류를 생성하는 에너지 자극을 전달할 수 있고, 피드백 기전이 포함된다. 전극 어셈블리에는 복수 전극을 공간적 배열로 갖는 전극 어레이가 포함될 수 있고, 여기서 전극 어셈블리는 전기천공 성분으로부터 에너지 자극을 수신하고, 이를 전극을 통해 원하는 조직으로 전달한다. 적어도 하나의 복수 전극은 에너지 자극의 전달 동안 중성이고, 원하는 조직에서 임피던스를 측정하고 전기천공 성분으로 임피던스를 커뮤니케이션한다. 피드백 기전은 측정된 임피던스를 수신할 수 있고, 정전류를 유지하기 위해 전기천공 성분에 의해 전달된 에너지 자극을 조절할 수 있다.
- [0311] 복수의 전극은 분산된 패턴으로 에너지 자극을 전달할 수 있다. 복수의 전극은 프로그래밍된 순서로 전극 제어

를 통해 분산된 패턴으로 에너지 자극을 전달할 수 있고, 프로그래밍된 순서는 전기천공 성분으로 사용자에게 의해 입력된다. 프로그래밍된 순서는 순서대로 전달된 복수의 자극을 포함할 수 있고, 여기서 복수 자극의 각각의 자극은 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 2개의 활성 전극에 의해 전달되며, 복수 자극의 후속 자극은 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 2개의 활성 전극 중 다른 것에 의해 전달된다.

[0312] 피드백 기전은 하드웨어 또는 소프트웨어에 의해 수행될 수 있다. 피드백 기전은 아날로그 폐쇄-루프 회로에 의해 수행될 수 있다. 피드백은 $50\mu s$, $20\mu s$, $10\mu s$ 또는 $1\mu s$ 마다 일어나지만, 바람직하게는 실시간 피드백이거나 순간적이다(즉, 반응 시간을 결정하기 위해 이용 가능한 기법에 의해 결정되는 바에 따라 실질적으로 순간적임). 중성 전극은 원하는 조직에서 임피던스를 측정하고 피드백 기전으로 임피던스를 커뮤니케이션할 수 있고, 피드백 기전은 임피던스에 반응하여 정전류를 사전 설정된 전류와 유사한 값으로 유지하기 위해 에너지 자극을 조정한다. 피드백 기전은 에너지 자극의 전달 동안 연속적으로 및 순간적으로 정전류를 유지할 수 있다.

[0313] 본 발명의 조성물의 전달을 촉진할 수 있는 전기천공 장치 및 전기천공 방법의 예는, 이의 내용 전체가 본원에 참조로써 통합되어 있는, 미국 특허 번호 7,245,963 (Draghia-Akli, et al.), 미국 특허 공보 제2005/0052630호 (Smith, 등에 의해 제출됨)에 기술된 것을 포함한다. 조성물의 전달을 촉진하기 위해 이용될 수 있는 다른 전기천공 장치 및 전기천공 방법에는 하기에서 제공된 것들이 포함된다: 공동-계류 및 공동-소유 미국 특허 출원, 일련 번호 11/874072 (2007년 10월 17일 출원) (35 USC 119(e) 하에서 하기의 이점을 주장함: 미국 임시 출원 일련 번호 60/852,149 (2006년 10월 17일 출원됨), 및 60/978,982 (2007년 10월 10일 출원됨) (이의 전문은 본원에 그 전체가 참고로 편입됨).

[0314] 미국 특허 번호 7,245,963(Draghia-Akli et al.)은 체내 또는 식물에서 선택된 조직 세포 내 생체분자의 도입을 촉진하기 위한 모듈형 전극 시스템 및 이의 용도를 기재한다. 상기 모듈식 전극 시스템은 복수의 니들 전극; 피하 주사침; 프로그램가능한 정전류 펄스 컨트롤러로부터 복수의 니들 전극까지 전도성 링크를 제공하는 전기적 커넥터; 및 전원 공급원을 포함할 수 있다. 오퍼레이터는 지지 구조 상에 실장된 복수의 바늘 전극을 쥐고 이들을 체내 또는 식물에서 선택된 조직 내로 단단히 삽입할 수 있다. 이어서 생체분자는 피하 바늘을 통해 선택된 조직 내로 전달된다. 프로그래밍 가능한 정전류 자극 컨트롤러가 활성화되며 정전류 전기 자극이 복수의 바늘 전극에 적용된다. 적용된 정전류 전기 자극은 복수의 전극 간에서 세포 내로 생체분자의 도입을 촉진한다. 미국 특허 번호 7,245,963의 전체 내용이 본원에 참조로 도입된다.

[0315] 미국 특허 공보 2005/0052630(Smith, et al에 의해 출원됨)은 몸 또는 식물에서 선택된 조직의 세포 내로 생체분자의 도입을 효과적으로 촉진하는데 사용될 수 있는 전기천공 장치를 기술한다. 전기천공 장치는 그 작동이 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 특정되는 전기-역학 장치("EKD 장치")를 포함한다. EKD 장치는 자극 파라미터의 입력 및 사용자 제어에 기반하여 어레이 내 전극 간에 일련의 프로그래밍 가능한 정전류 자극 패턴을 생성하며, 전류 파형 데이터의 저장 및 획득을 허용한다. 전기천공 장치는 또한 바늘 전극 어레이, 주사 바늘을 위한 중심 주사 채널, 및 제거 가능한 가이드 디스크를 갖는 대체 가능한 전극 디스크를 포함한다. 미국 특허 공보의 전체 내용은 2005/0052630은 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0316] 미국 특허 제7,245,963 및 미국 특허 공보에 기술되어 있는 전극 어레이 및 방법은 제2005/0052630호에 기재된 전극 어레이 및 방법은 근육과 같은 조직 뿐만 아니라 다른 조직 또는 기관 내로 깊이 침투시키는데 조정될 수 있다. 전극 어레이의 배치 때문에, 주사 바늘 (선택한 생체분자를 전달함)은 또한 표적 장기 내로 완전히 삽입되며, 주사는 전극에 의해 미리 기술된 영역 내에서, 표적 조직에 수직으로 전달된다. 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 2005/005263에 기술된 전극은 바람직하게는 20 mm 길이 및 21 게이지이다.

[0317] 부가적으로, 전기천공 장치 및 이의 용도를 포함하는 일부 구현예에서, 하기 특허에 기재된 전기천공 장치가 고려된다: US 특허 제5,273,525호(1993년 12월 28일 발행), US 특허 제6,110,161호(2000년 8월 29일 발행), 제6,261,281호(2001년 7월 17일 발행), 및 제6,958,060호(2005년 10월 25일 발행), 및 US 특허 제6,939,862호(2005년 9월 6일 발행). 더욱이, 2004. 2. 24.에 허여된 미국 특허 6,697,669, 및 DNA의 주입 방법에 대한 2008. 2. 5.에 허여된 미국 특허 7,328,064에서 제공된 요지를 포괄하는 특허가 본원에서 고려된다. 상기-특허는 이의 전문이 참조로 도입된다.

[0318] 10. 치료 방법

[0319] 또한 대상체에서 합성 항체를 생성함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 질환의 치료, 보호 및/또는 예방 방법이 본원에 제공된다. 방법에는 대상체에 대한 조성물의 투여 단계가 포함될 수 있다. 대상체에 대한 조성물의

투여는 상술된 전달 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0320] 대상체에서 합성 항체의 생성 시, 합성 항체는 항원에 결합하거나 이와 반응할 수 있다. 이러한 결합은 항원을 중화시키거나, 다른 분자, 예를 들어 단백질 또는 핵산에 의한 항원의 인식을 차단하거나, 항원에 대한 면역 반응을 야기 또는 유도하여 대상체에서 항원에 연관된 질환을 치료, 보호 및/또는 예방할 수 있다.

[0321] 조성물 용량은 1 μ g 내지 10mg의 활성 성분/체중kg/시간일 수 있고, 20 μ g 내지 10mg 성분/체중kg/시간일 수 있다. 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31일마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료를 위한 조성물 투여 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 수 있다.

[0322] 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 예시되는 여러 측면을 갖는다.

[0323] 11. 실시예

[0324] 본 발명이 하기 실시예에서 추가로 예시된다. 이들 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 반면, 단지 예로서 주어짐이 이해되어야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당분야 숙련가는 본 발명의 본질적 특징을 확인할 수 있고, 이의 요지 및 범위에서 벗어나지 않고 다양한 이용 및 조건에 이를 채택하기 위해 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 수행할 수 있다. 따라서, 본원에 제시되고 기술된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형들은 전술한 설명으로부터 당해분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 또한 첨부된 특허청구범위의 범위 내에 속하는 것이다.

[0325] 실시예 1

[0326] 생체내 면역글로불린 (Ig) 생성을 위한 고발현 시스템을 구축하였다. 특히 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 폴리펩티드가 포함된 완전 조립된 Ig 분자의 생체내 발현을 개선하기 위해 Ig 중쇄 및 경쇄 서열을 변형하였다. gp120IgG-중쇄 및 경쇄 분자의 작제물을 생성하고, 별도로 pVAX1 벡터(Life Technologies, Carlsbad, CA)에 삽입하였다. 상기 항체는 아래에 기재된 바와 같은 특징분석 연구에 이용할 수 있도록 정의된 특성을 갖는다. 생체내 Ig 발현을 최적화하기 위한 작제물 생성 시 몇몇 변형을 포함시켰다. 최적화에는 코돈 최적화 및 코작 서열(GCC ACC)의 도입이 포함되었다. Ig의 중쇄 및 경쇄에 대한 최적화된 작제물의 핵산 서열을 각각 서열 번호: 6 및 서열 번호: 7에 나타낸다(각각 도 1 및 2, 각각). 도 1 및 2에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 작제물을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 6은 서열 번호: 46에 나타난 아미노산 서열, 즉 IgG 중쇄의 아미노산 서열을 암호화한다 (도 42). 서열 번호: 7은 서열 번호: 47에 나타난 아미노산 서열, 즉 IgG 경쇄의 아미노산 서열을 암호화한다 (도 43).

[0327] 세포를 천연 Ig 작제물(즉, 최적화되지 않은 것) 또는 서열 번호: 6 및 7을 함유하는 작제물(즉, 최적화된 것)로 형질감염시켰다. 형질감염 후, IgG 분비를 형질감염된 세포로부터 측정하고, IgG 합성 역학을 도 3에 나타낸다. 도 3에 나타난 바와 같이, 최적화되지 않은, 그리고 최적화된 작제물 모두 Ig의 중쇄 및 경쇄를 발현하여 IgG를 형성하였으나, 최적화된 작제물이 더 빠른 IgG 항체 축적을 일으켰다. 서열 번호: 6 및 7(즉, 최적화된 Ig 서열)을 함유하는 플라스미드로 형질감염된 세포는 최적화되지 않은 Ig 서열을 함유하는 플라스미드로 형질감염된 세포보다 완전 조립된 Ig 분자의 더 많은 생산을 나타내었다. 따라서 작제물의 최적화 또는 변형은 실질적으로 Ig 발현을 증가시켰다. 다시 말하면, 서열 번호: 6 및 7을 함유하는 작제물은 서열 번호: 6 및 7을 생성하기 위해 이용된 최적화 또는 변형로 인해 천연 작제물에 비해 실질적으로 더 큰 Ig 발현을 제공하였다. 이들 데이터는 또한 Ig의 중쇄 및 경쇄가 플라스미드 시스템으로부터 생체내에서 효율적으로 조립될 수 있음을 나타내었다.

[0328] 서열 번호: 6 및 7을 함유하는 작제물을 추가 조사하기 위해, 마우스에 서열 번호: 6 및 7에 나타난 서열을 함유하는 플라스미드를 투여하였다. 특히 플라스미드를 전기천공을 이용하여 투여하였다. 투여 후, 면역접종된 마우스에서 면역 반응(즉, IgG 수준)의 유도를 웨스턴 블롯으로 평가하였다(즉, 마우스의 혈청을 이용하여 gp120 항원을 검출하였다). 도 4에 나타난 바와 같이, 서열 번호: 6 및 7을 함유하는 플라스미드가 투여된 마우스는 웨스턴 블롯 분석에서 항체 결합이 관찰되었으므로, 강한 항체 생산을 일으켰다. 상기 항체 생산을 관찰하기 위해서는 1회 투여만 필요하였다.

[0329] 요약하면, 이들 데이터는 Ig 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산 서열이 발현 벡터, 예컨대 pVAX1에 포함되는 경우, 형질감염된 세포 및 발현 벡터가 투여된 마우스에서 조립된 IgG의 발현을 일으킴을(즉 중쇄 및 경쇄가 함께 모여 그 항원에 결합하는 항체를 형성함) 나타내었다. 이들 데이터는 또한 Ig 중쇄 및 경쇄를 암호화하는

핵산 서열의 최적화 또는 변형이 Ig 생산을 유의미하게 증가시킴을 나타내었다.

[0330] 실시예 2

[0331] 실시예 3-7에 대한 재료 및 방법

[0332] 세포 및 시약. 293T 및 TZM-B1 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 항생제가 보강된 Dulbecco 변형 Eagle 배지 (DMEM; Gibco-Invitrogen, CA) 중에 유지하고 용합 시 계대하였다. 제조합 HIV-1 p24 및 gp120 Env(rgp120) 단백질은 Protein Science Inc.에서 입수하고 페록시다아제-콘주게이트된 스트렙타비딘을 Jackson Laboratory에서 입수하였다. 기재된 세포주 및 다른 시약은 AIDS Research and Reference Reagent Program(Division of AIDS, NIAID, NIH)에서 입수하였다.

[0333] 동물 및 단백질 및 플라스미드 투여 및 전달. 암컷 BALB/c 마우스(8주령)를 Taconic Farms(Germantown, NY)에서 구입하였다. 이들 투여를 위해, 50 μ l 부피(pVax1 또는 pHIV-1Env-Fab) 중 25 μ g의 플라스미드 DNA를 근육내 (IM) 주사한 뒤 MID-EP 시스템(CELLECTRA®; Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA)에 의해 EP 매개된 증강 전달을 이용하였다. 전달을 위한 펄스화 파라미터는 다음과 같았다: 0.5Amp 정전류 3회 자극, 1초 간격 및 52ms 길이. 각 동물은 실험 또는 대조군 플라스미드 제형물의 단회 투여를 받았다. 단백질 면역화 분석을 위해, JRFL 균주의 HIV-1 제조합 gp120(rgp120)(Immune Technology Corp, NY에서 구매)을 이용하였다. 단백질 면역화 연구에서, 단회 25 μ g 용량의 rgp120을 TiterMax 보강제와 혼합하고 피하 주사하였다. pHIV-1 Env Fab 또는 rgp120-투여된 마우스로부터의 혈청을 구체적 분석에 따라 상이한 시점에 수집하였다.

[0334] HIV-1Env-Fab 플라스미드 DNA의 구축. 항-Env VRC01 인간 mAb로부터의 HIV-1 Env-Fab 서열(VH 및 VL)을 몇몇 변형을 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드의 이용에 의해 생성하였다. 중쇄(VH-CH1)는 서열 번호: 3에 나타난 핵산 서열에 의해 암호화되며, 경쇄(VL-CL)는 서열 번호: 4에 나타난 핵산에 의해 암호화된다(도 9 및 10, 각각). 도 9 및 10에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 암호화 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 HindIII(AAG CTT) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA 또는 TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 3은 서열 번호: 48에 나타난 아미노산 서열, 즉 HIV-1 Env-Fab의 VH-CH1의 아미노산 서열을 암호화한다 (도 44). 서열 번호: 4는 서열 번호: 49에 나타난 아미노산 서열, 즉 HIV-1 Env-Fab의 VL-CL의 아미노산 서열(도 45)을 암호화한다.

[0335] 효율적인 IgE 리더 서열(서열 번호: 66 단백질을 암호화하는 서열 번호: 65 뉴클레오타이드)을 발현을 개선하기 위해 Env 항원 유전자 서열 내로 도입하였다. 생성된 변형되고 증강된 HIV-1Env-Fab DNA 면역원은 코돈- 및 RNA-최적화되었으며, 이어서 GenScript(Piscataway, NJ)에 의해 pVax1 발현 벡터 내로 클로닝되고 이들 작제물의 대규모 생산이 이어졌다. VH 및 VL 유전자(각각 서열 번호: 3 및 4)를 BamHI 및 XhoI 제한 효소 부위 간에 삽입하였다. 이어서 정제된 플라스미드 DNA를 마우스로의 후속 투여를 위해 수증 제형화하였다. 음성 대조군 플라스미드로서, "미관련"/대조군 Ig를 생성하는 pIgG-E1M2를 이용하였다.

[0336] HIV-1Env-Fab 발현 및 면역블롯 분석. 293T 세포주를 제조업체에서 권장된 바와 같은 방법에 의해 비-리포좀 FuGENE6 형질감염 시약(Promega, WI)을 이용하여 발현 분석을 위해 이용하였다. 간략하게, 세포를 5 μ g의 pVax1 대조군 또는 pHIV-1Env-Fab를 이용한 후속 형질감염 24시간 전에 50-70% 융합성으로 접종하였다(35mm 배양 디쉬의 웰 당 1-3x10⁵ 세포/2mL). 상청액을 70시간까지 다양한 시점에 수집하고, 표준 ELISA 방법에 의해 특정 Fab 분자 수준에 대해 평가하였다. pVax1 형질감염된 세포로부터의 상청액을 음성 대조군으로 이용하였다. 또한, 293T 세포를 HIV gp160 Env 단백질에 대한 유전자로 형질감염시켰다.

[0337] 생성된 Fab에 의한 천연 HIV-1 Env 단백질 인식의 추가 확인을 면역블롯 분석으로 수행하였다. 상기 연구를 위해, 상술된 rgp120을 12% SDS-PAGE 상에서 전기영동하였다. 겔을 니트로셀룰로오스 막 상에 블롯팅하고 (Millipore, Bedford, MA) PBS-T(0.05%) 중 5% w/v 탈지 분유로 차단하였다. 이어서 니트로셀룰로오스를 분석을 위해 개별 스트립으로 후속 절단하였다. pHIV-1 Env Fab 투여된 마우스로부터의 혈청을 투여 48시간 후 수집하고, PBS 중 1:100으로 희석하고, 1시간 동안 개별 니트로셀룰로오스 스트립과 반응시켰다. 이어서 스트립을 Tris-완충 식염수-0.2% Tween으로 4회 세척하고, 마우스 IgG에 대한 페록시다아제-커플링된 항혈청(Jackson Laboratories, ME)과 반응시키고, 디아미노벤지딘 기질(Sigma, St. Louis, MO)과 항온처리하여 생성된 HIV-1 Env Fab의 gp120에 대한 적절한 결합을 가시화하였다.

[0338] Ig 결합 분석 - ELISA. ELISA에 의해 DNA 플라스미드 생성된 Fab 또는 항-rgp120 항체의 rgp120에 대한 결합 확인을 평가하였다. Ig 결합 분석을 pHIV-1 Env Fab, pVax1 또는 rgp120 단백질이 투여된 개별 동물로부터의 혈청으로 수행하였다. 다시, 상기 기본 Ig 면역분석을 위해, 혈청 표본을 단회 DNA 플라스미드 투여 48시간 후 수

집하였다. 간략하게, 96-웰 고결합 폴리스티렌 플레이트(Corning, NY)를 하룻밤 동안 4℃에서 PBS 중에 희석된 B군 HIV MN rgp120(2 μ g/mL)으로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 PBS-T(PBS, 0.05% Tween 20)로 세척하고, 1 시간 동안 PBS-T 중의 3% BSA로 차단하고, 1시간 동안 37℃에서 면역화된 및 면역화되지 않은 마우스로부터의 혈청의 1:100 희석액과 함께 항온처리하였다. 결합된 IgG를 1:5,000의 희석도로 염소 항-마우스 IgG-HRP(Research Diagnostics, NJ)를 이용해서 검출하였다. 결합된 효소를 발색원 기질 용액 TMB(R&D Systems)의 첨가에 의해 검출하고, Biotek EL312e Bio-Kinetics 판독기 상에서 450nm에서 판독하였다. 모든 혈청 시료를 이중으로 검사하였다. 시판 IgG1 정량 ELISA 키트를 이용해서 pHIV-1 Env Fab 투여된 마우스로부터의 혈청 중 Fab 농도를 정량하는 추가 면역 분석을 수행하였다. 상기 분석은 제조업체의 명세에 따라 수행하였다.

[0339] **유세포 측정 분석(FACS).** 유세포 측정 분석(FACS)을 위해, 293T 세포를 공통 A군 Env 플라스미드(pCon-Env-A) 또는 일차 바이러스 단리체(Q23Env17)로부터 Env를 발현하는 최적화된 A군 플라스미드(pOpt-Env-A)로 형질감염 시켰다. 형질감염을 표준 방법에 의해 수행하였다. 형질감염 확인 후, 세포를 빙냉 완충액 A(PBS/0.1% BSA/0.01% NaN₃)로 세척하고 20분 동안 4℃에서 일차 Ig의 1:100 희석액(플라스미드 투여 48시간 후 수집된, pHIV-1 Env Fab 또는 대조군 pIgG-E1M2 플라스미드가 주사된 마우스로부터의 혈청 또는 정제된 VRC01)과 항온처리하였다. 이어서 세척하고, 다시 20분 동안 피코에리트린(PE)에 콘주게이트된 1:100 희석된 형광-표지된 이차 Ig 50 μ l과 항온처리하였다. 이어서 세포를 세척하고, 즉시 유세포 측정기(Becton Dickinson FACS) 상에서 분석하였다. 모든 항온처리 및 세척은 빙냉된 완충액 A를 이용하여 4℃에서 수행하였다. 세포를 단신 상에서 살아 있는 세포에 대해 관문화하였다. GFP 발현을 평가하기 위해, GFP-양성 세포를 CellQuest 소프트웨어(BD Bioscience)를 이용하여 FACS-LSR 기구로 수행하였다. 데이터를 Flow Jo 소프트웨어로 분석하였다.

[0340] **단화-사이클 HIV-1 중화 분석.** 실험 또는 대조군 혈청의 존재 또는 부재 하 Env-가유행 바이러스를 이용한 단화 감염 후 중화 종결점으로 루시퍼라아제 유전자 발현 감소가 이용되는 TZM-B1(HeLa 세포 유래)기반 분석으로 Fab 매개된 HIV-1 중화 분석을 측정하였다. TZM-B1 세포를 조작하여 CD4 및 CCR5를 발현시키고, 초파리 루시퍼라아제에 대한 리포터 유전자를 포함시켰다. 상기 검정에서, pVax1만 또는 pHIV-1Env Fab가 투여된 마우스로부터의 혈청을 웰 당 1:50으로 희석한 뒤 다중 감염도 (MOI) 0.01로 가유행 HIV-1 Bal26, Q23Env17, SF162S 또는 ZM53M 무세포 바이러스를 첨가하였다. Bal26 및 SF162S는 모두 B군 티어 1 바이러스이고, 상기 티어 상태는 바이러스가 중화에 대해 높거나 평균을 초과하는 감수성을 가졌음을 나타낸다. Q23Env17 및 ZM53M은 각각 A군, 티어 1 및 C군, 티어 2 바이러스이다. 티어 2 상태는 바이러스가 중화에 대해 평균 또는 중등 감수성을 가짐을 나타내었다. 상기 분석에 이어, 10⁴ TZM-BL 세포를 각 웰에 첨가하고, 48시간 동안 항온처리하고, 용해시킨 뒤 100 μ l의 Bright-Glo 기질(루시퍼라아제 분석 시스템, Promega, WI)을 첨가하고, 이어서 발광측정계를 이용하여 루시퍼라아제를 정량하였다. 상기 분석의 판독치는 RLU(상대 광 단위)였다. RLU 감소 백분율을 다음과 같이 계산하였다: (1-(실험 표본의 평균 RLU-대조군)/대조군으로부터의 평균 RLU-무첨가 대조군 웰)) x 100. 이어서 HIV-1 중화를 RLU 감소 백분율로 표시하였고, 이는 감염 억제 백분율을 나타낸다.

[0341] **실시예 3**

[0342] **항-HIV-1 Env-Fab 발현 작제물의 생성**

[0343] 인간 mAb VRC01을 광범위하게 중화하는 항-HIV-1 외피에 대한 VH 및 VL-Ig(면역글로불린) 사슬 암호화 서열 둘 다에 대한 cDNA를 NIH AIDS 연구 및 참조 시약 프로그램(Research and Reference Reagent Program)을 통해 VRC(Vaccine Research Center, NIH)에서 획득한 뒤 pVax1 벡터 내로 클로닝하였다. 상기 실시예 2에 나타난 바와 같이, 몇몇 변형을 생물학적 활성 Ig 분자의 생산을 최대화 및 최적화하기 위해 발현 벡터 내에 도입하였다. 특히, 이들 변형에는 코돈 및 RNA 최적화 및 안정화가 포함되었고, 리더 서열 이용, 고농도에서의 플라스미드 생산이 증강되었으며, EP를 통해 생체내 플라스미드 전달을 촉진하였다. 생성된 작제물을 포유류 세포 및 조직에서의 적절한 효율적인 발현을 위해 중요한 인간 사이토메갈로바이러스(CMV)로부터의 최조기 프로모터의 제어 하에 배치하였다. 이 연구에 이용된 작제물의 모식적 지도를 도 5A 및 5B에 나타낸다.

[0344] 추가적으로, 항-HIV-1 Env Fab를 pHIV-Env-Fab로부터 제조하고, HIV Env를 암호화하는 플라스미드로 형질감염된 세포를 염색하기 위해 이용하였다. pVAX1을 양성 대조군으로 이용하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, 면역형광 염색은 항-HIV-1 Env Fab가 HIV Env를 암호화하는 플라스미드로 형질감염된 세포를 염색시켰으므로, 벡터 pHIV-Env-Fab가 항-HIV-1 Env Fab의 제조를 허용함을 나타내었다. 따라서 항-HIV-1 Env Fab는 HIV Env 당단백질에 대한 결합에 특이적이었다.

[0345] **실시예 4**

[0346] **형질감염된 세포에 의한 Ig 생산**

[0347] pHIV-1Env-Fab의 발현을 평가하기 위해, 작제물을 293T 세포 내에 형질감염시켰다. 공통 HIV-1 B군 gp120 단백질을 이용하는 ELISA 면역분석은 형질감염 후 24시간만큼 빨리, 형질감염된 293 T 세포로부터의 상청액 중 항-HIV-1 Env-Fab의 존재를 확인시켰다(도 5C). 높은 OD450nm값(즉 약 0.5 내지 0.8 범위)이 형질감염 후 24 내지 72시간에 세포 추출물에서 검출되었고, 이어서 48시간에 피크 및 정체기에 도달하였다. 이들 결과는 HIV Env 당 단백질에 대한 항-HIV-1 Env Fab의 특이성을 확인시켰다. 도 5C에 나타난 데이터의 통계 분석은 다음과 같다: pHIV-1 Env-Fab 주사된 마우스로부터의 혈청에 대한 OD450nm값은 22 내지 72 시간 시점의 측정에서 pVax1 대조군에 비해 유의미하였다($p < 0.05$, 스튜던트 t 시험).

[0348] **실시예 5**

[0349] **HIV-1 Env Fab의 생체내 특징분석**

[0350] DNA 플라스미드로부터 생체내 Fab 생산을 나타내기 위해, 마우스에 근육내 경로에 의해 pHIV-1 Env Fab를 투여한 뒤 EP를 통해 전달을 증강시켰다. DNA 플라스미드의 단회 주사를 전달하고, 혈청을 투여 후 12시간 및 1, 2, 3, 4 7 및 10일에 수집하였다. 이어서 혈청(1:100 희석도로)을 도 6A에 나타난 바와 같이 ELISA 분석에 의해 Ig/Fab 수준에 대해 후속 평가하였다. 도 6A에서의 데이터를 OD450nm으로 나타내며, Ig/Fab 수준과 비례하였다(pVax1 및 HIV-1 Env-Fab군 모두에서 개별 마우스로부터). 이들 데이터는 pHIV-1Env-Fab의 단회 투여 후 Fab의 상대 수준이 1일에 검출 가능해지고, 이어서 경시적으로 증가하였음을 나타내었다. 비교 목적으로, 실시예 2에 상술된 바와 같이 rgp120의 단회 투여/면역화를 Balb/C 마우스 내로 수행하고, 이어서 특이적 항-gp120 항체 수준의 범위 및 수명을 결정하기 위해 후속 혈청 수집 및 ELISA에 의한 경시적인 분석(1:100 희석도로)을 수행하였다. 도 6B는 결과를 나타낸다.

[0351] 상기 단백질 전달 연구에서, 배경 대비 항원 특이적인 Ig 수준은 면역화 후 10일에서야 검출 가능하였다. 이것은 OD450nm 값이 투여 후 1일에 적어도 0.1 OD450nm 단위에 이르고 10일에 0.28 내지 0.35 OD 단위의 수준에서 안정 상태를 유지하는, pHIV-1 Env Fab 투여(도 6A)에 의해 유발된 Fab 수준과 대조적이었다. 따라서 pHIV-1 Env Fab의 전달은 통상적인 단백질 면역화에 비해 특이적 Fab의 보다 신속한 생성을 일으켰다. 상기 발견은 생물학적 활성 Ig의 생성을 위한 상기 DNA 플라스미드 전달 방법의 잠재적인 임상적 유용성을 강조하였다.

[0352] DNA 전달 기술에 의해 생산된 재조합 Fab의 양뿐만 아니라 품질을 확인하기 위해 추가 분석을 수행하였다. 구체적으로, 전기영동되고 블롯팅된 재조합 HIV-1 gp120 단백질을 이용해서 면역블롯 분석을 수행하고, 투여 48시간 후에 pHIV-1Env-Fab 마우스로부터의 혈청을 탐침으로 이용하였다(도 6C). 블롯은 gp120 단백질의 분자량에 적절한 밴드를 나타내어, 이것이 기능적이며 gp120에 결합할 수 있음을 확인시켰다. 마찬가지로, ELISA에 의한 인간 Fab 정량을 수행하고, 플라스미드 투여 후 시간(즉 일수)의 함수로 나타내었다(도 6D). 결과는 생성된 Fab의 수준이 2-3 μ g/ml를 피크로 하였음을 나타낸다. 이들 결과는 HIV-1 Env 단백질을 특이적으로 인식하고 결합하는 능력뿐만 아니라 생성된 VRC01 기반 Fab의 VH 및 VL의 사슬의 정확한 폴리펩티드 조립을 나타내었다.

[0353] 도 6에 나타난 데이터의 통계 분석은 다음과 같다. 6이 하기와 같다. 도 6A에 요약된 데이터에 대하여, pHIV-1 Env-Fab 주사된 마우스로부터의 혈청에 대한 OD450nm값은 1 내지 10일의 측정 시점에 pVax1 주사된 마우스로부터의 혈청에 비해 통계적으로 상승하였다($p < 0.05$, 스튜던트 t 시험). 도 6B에 요약된 데이터에 대하여, rgp120 군으로부터의 OD450nm 값은 10 내지 14일 시점의 측정에서 PBS 대조군에 비해 유의미하게 상승하였다($p < 0.05$, 스튜던트 t 시험). 도 6D에 요약된 데이터에 대하여, pHIV-1 Env-Fab 주사된 마우스로부터의 OD450nm값은 2 내지 10일 시점의 측정에서 유의미하게 상승하였다($p < 0.05$, 스튜던트 t 시험).

[0354] **실시예 6**

[0355] **상이한 HIV-1 Env 단백질을 발현하는 세포에 대한 Fab/Ig의 결합: FACS 기반 분석**

[0356] pHIV-1Env-Fab가 투여된 마우스로부터의 혈청을 또한 293T 세포에 의해 일시적으로 발현된 상이한 HIV-Env 단백질에 대한 생성된 Fab의 결합을 평가하기 위해 이용하였다. 천연형 VRC01-mAb를 양성 대조군으로 이용하여 세포 표면 상에서 Env 단백질의 적절한 발현 및 검출을 확인하였다. 앞서 나타난 바와 같이, "미관련/연관되지 않은" Ig(Ig-E1M2)를 음성 대조군으로 이용하였다. 도 7A 및 7B에 예증된 바와 같이, pVax1(즉 Env 삽입물이 없는) 형질감염된 세포에 대해 상이한 Ig/Fab에 의해 본질적으로 배경 염색만 존재하였다. 그러나 정제된 VRC01 mAb 및 pHIV-1Env-Fab 투여된 마우스로부터의 혈청에 있어서 모두, 일차 HIV-1 단리체 pQ23Env17로부터의 Env를 발현하는 최적화된 C군 플라스미드(pOpt-Env-A)뿐만 아니라 공통 A군 Env 플라스미드(pCon-Env-A)를 발현하는 형질감

염된 세포의 유의미한 양성 염색이 존재하였다. 더욱이, pIg-E1M2 투여된 마우스로부터의 혈청은 배경 수준을 초과하는 임의의 HIV1 Env 형질감염된 세포의 염색을 나타내지 못했다. 이들 결과를 나타내는 FACS 분석이 도 7A에 제공된다. 상기 실험에 대해 FACS 분석으로부터의 데이터(즉 도 7A)를 나타내는 대표 그래프를 도 7B에 제공한다.

[0357] 도 7B에 나타난 데이터의 통계 분석은 다음과 같다. pCon-Env-A에 의해 생성된 외피 당단백질에 대한 천연 VRC01 항체 및 pHIV-1 Env-Fab 주사된 마우스로부터의 혈청 간의 특이적 결합은 유의한 차이가 없었다($p < 0.05$, 스튜던트 t 검정). 그러나 pOpt-Env-A에 의해 생성된 외피 당단백질에 대한 VRC01 항체의 결합이 pHIV-1 Env-Fab 주사된 마우스로부터의 혈청에 의한 결합보다 유의미하게 더 높았다($p < 0.05$, 스튜던트 t 시험).

[0358] 실시예 7

[0359] pHIV-1 Env Fab에 의해 생산된 Ig의 HIV 중화 활성

[0360] pHIV-1Env-Fab가 투여된 마우스로부터의 혈청을 일시적으로 형질감염된 293T 세포에서 발현되는 HIV-1 Env 단백질에 대한 HIV-Env Fab의 결합을 평가하기 위해 이용하였다. 혈청은 pHIV-1Env-Fab의 투여 6일 후에 마우스로부터 수득하였다. 구체적으로, 세포를 A군, B군 또는 C군 균주으로부터의 HIV-1 Env가 발현되는 플라스미드로 형질감염시켰다. A군, B군, 및 C군 균주는 92RW020, SF162, 및 ZM197이었다. 도 12에 나타난 바와 같이, pHIV-1Env-Fab가 투여된 마우스로부터의 혈청은 A군, B군, 및 C군 HIV-1 균주로부터의 HIV-1 Env에 결합하였고, 이에 따라 혈청이 여러 하위형의 HIV-1로부터의 HIV-1 Env와 교차반응하는 항체(즉, HIV-Env Fab)를 함유함을 나타내었다.

[0361] 이 연구에서 생산된 HIV-Env Fab의 잠재적인 HIV-1 중화 활성을 평가하기 위해, TZM-B1 표적 세포의 이용에 기반한 발광 기반 중화 분석을 수행하였다. TZM-B1 표적 세포를 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 실험 혈청 및 대조군의 부재 또는 존재 하에 4가지 상이한 가유행 HIV 바이러스 단리체로 감염시켰다.

[0362] 도 8은 HIV 가유행 바이러스에 대해 pHIV-1 Env Fab 주사된 마우스로부터의 혈청에 대한 중화 곡선을 도시한다. HIV-1 티어 1 바이러스 Q23Env(A군)뿐만 아니라 Ba126 및 SF162S(둘 다 B군)가 구체적으로 평가되었다. 또한, 혈청을 HIV-1 C군 티어 2 바이러스 ZM53M에 대해서도 평가하였다. 데이터는 HIV 감염의 중화/억제 백분율로 나타낸다. 그래프에서 평행선으로 그린 수평선은 분석에서의 50% 중화/억제 수준을 나타내었다. 양성 중화 대조군 mAb(데이터는 나타내지 않음)를 이 연구에서 이용하여 상기 분석 방법의 유용성 및 타당성을 확인하였다. 간략하게, 양성 대조군 중화 mAb는 모든 4가지 바이러스 가유행의 감염을 적어도 50% 억제할 수 있었다.

[0363] pHIV-1 Env Fab 투여된 마우스로부터의 혈청은 플라스미드 투여 후 경시적으로 HIV 중화 활성의 증가를 나타내었고, 중화 백분율은 Ba125, Q23Env17 및 SF162S에 있어서 2일째에 50%에 도달하였다. 또한 이들 3가지 바이러스에 대한 정체가 중화 백분율은 각각 약 62, 60 및 70%였다. ZM53M에 있어서, 50% 중화 역치는 3일까지 도달되지 않았고, 정체가 중화는 50%를 초과하지 않았다. 평가된 다른 3가지에 비해 이러한 덜 강력한 중화 프로파일은 이것이 덜 중화 가능한 티어 2 바이러스임을 반영하기 때문일 수 있다. 종합하면, 상기 연구에서 생성된 Fab는 다양한 HIV 단리체를 효과적으로 중화시킬 수 있었다. 도 8에 나타난 데이터의 통계 분석은 하기와 같다. 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 비-파라미터 분석에 기반하여, pHIV-1 Env-Fab 주사된 마우스로부터의 혈청에 의해 유도된 ZM53M C군 바이러스에 대한 HIV 중화 수준(도 8D)만이 평가된 다른 바이러스와 유의미하게 상이하였다(도 8A, 8B, 및 8C). 상기 차이는 최대로 달성 가능한 중화 수준뿐만 아니라 50% 중화를 달성하는데 필요한 시간(일수)에 있었다.

[0364] 실시예 3-7을 요약하면, pHIV-1 Env Fab 투여된 마우스에서 VRC01 Fab의 혈청 농도는 주사 후 12일째에 $2-3\mu\text{g/mL}$ 로 피크였다. 상기 범위는 현재 FDA에 의해 허가받은 여러 단클론성 항체에 필적하여, 본 발명자들의 항체 접근이 상기 소동물 모델에서 유의미하고 생물학적으로 관련된 수준의 항체를 생산함을 시사하였다. 특히, 우스 테키누맵(상표명: Stelara) 및 골리무맵(Simponi)에 있어서, 판 건선 및 관절염과 같은 자가면역 질환에 대한 이용에 대해 명시되는 두 항체는 각각 $0.31 \pm 0.33\mu\text{g/mL}$ 및 $1.8 \pm 1.1\mu\text{g/mL}$ 의 평균 \pm SD 혈청 농도를 갖는다. 또한, TNF 억제제 아달리무맵(Humira)은 약 $6\mu\text{g/mL}$ 의 평균 조(rough) 혈청 농도를 갖는다. 이에 관해, 실시예 4-8에 기재된 데이터는 대상체에 대해 항체를 암호화하는 DNA의 전달이 유의미하고 생물학적으로 관련된 수준의 항체가 대상체에 존재하도록 생체내 조립을 일으켰음을 나타내었다.

[0365] 이들 데이터는 또한 통상적 단백질 투여에 의해 생산된 Ig에 비해 pHIV-1Env Fab의 단회 EP 증강된 투여 후 생체내에서 Fab를 보다 신속히 생산하는 능력을 나타내었다(도 6A 및 6B). 또한, 어려운 백신 표적에 대해 기능적인 보호 Ig 유사 분자를 생성하는 능력이 나타났다. 현재까지 능동 백신접종 후 HIV-1 중화 항체의 유도는 매우

어려웠으며, 일차 감염 동안 전과 후 수년 까지도 중화 항체가 발생하지 않는다. 상기 DNA 플라스미드 접근으로, 중화 역가는 전달 후 1-2일 내에 관찰되었고, 피크 중화 Fab 혈청 농도($3.31 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$)는 투여 후 1주에 일어났다(도 6D). 상기 수준의 Ig는 현재 연구에서 감염으로부터 완전 보호를 제공하는 것으로 나타난 $8.3 \mu\text{g/mL}$ 농도와 비교적 유사하였다. 이들 데이터는 생물학적 활성 Ig 단편의 신속한 유도를 나타내었다.

[0366] 이들 데이터는 또한 HIV-1Env-Fab DNA 투여에 의해 야기된 HIV-1 일차 단리체에 대한 중화 항체 역가 및 반응을 나타내었다. 혈청을 클레이드 A, B 및 C로부터의 예를 나타내는 상이한 바이러스 티어(tier) 1, 및 2 바이러스 단리물의 패널에 대해 시험하였다. 결과는 이들 바이러스에 대한 강력한 중화 활성의 생성을 나타내었다(도 8).

[0367] 따라서 상기 DNA 플라스미드 기반 방법은 생체내에서 특이적이고 생물학적으로 활성이 있는 Fab 또는 Ig 분자를 생성하였고, 항체 생성을 위한 통상적 항원-기반 백신접종의 이용 필요성을 배제하였고, 시험관 내 제조된 Ig를 생성하고 정제할 필요성을 제거하였다.

[0368] 실시예 8

[0369] 인간 Ig 항체를 암호화하는 플라스미드의 구축

[0370] 상술된 바와 같이, 암호화 핵산의 대상체로의 투여 시 생체내 생성된 VRC01 항체, 즉 HIV-Env Fab로부터 Fab를 생성하였다. 이들 연구를 추가 확장하기 위해, VRC01 항체에서 유래된 IgG1 항체를 암호화하는 핵산 서열을 생성하였다. 도 13에서의 도식 내 나타난 바와 같이, 상기 핵산 서열은 퓨린 절단 부위 및 P2A 펩티드 서열을 암호화하는 핵산 서열에 의해 분리된 IgG 중쇄 및 경쇄를 암호화하였다. P2A 펩티드 서열은 프로테아제에 의한 절단의 효율을 증가시키며, 이에 따라 절단 후 별도의 폴리펩티드를 생성한다.

[0371] IgG 중쇄에는 가변 중쇄(VH), 불변 중쇄 1(CH1), 힌지, 불변 중쇄 2(CH2), 및 불변 중쇄 3(CH3) 영역이 포함되었다. IgG 경쇄에는 가변 경쇄(VL) 및 불변 경쇄(CL) 영역이 포함되었다. 상기 작제물을 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터의 제어 하에, 예를 들어 발현 벡터 pVAX1에 배치하였다. 이 작제물은 반응성 gp120(즉, VRC01 항체에 의해 인식된 항원)인 완전히 조립된 IgG 항체(도 14에 나타난 바와 같음)의 생산을 야기하였다. 이러한 완전 조립된 IgG를 본원에서 VRC01 IgG로 나타낸다. VRC01 IgG의 아미노산 서열(퓨린에 의한 절단 전)이 도 15에 나타나 있으며, 서열 번호: 5에 제시되어 있다.

[0372] 특히, VRC01 IgG의 아미노산 서열(퓨린에 의한 절단 전; 서열 번호: 15 및 도 15)은 하기 구조를 갖는다: 면역 글로불린 E1(IgE1) 신호 펩티드, 가변 중쇄 영역(VH), 불변 중쇄 영역 1(CH1), 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2(CH2), 불변 중쇄 영역 3(CH3), 퓨린 절단 부위, GSG 링커, P2A 펩티드, IgE1 신호 펩티드, 가변 경쇄 영역(VL), 및 불변 경쇄 영역(CL, 특히 카파). 구조의 각 부분의 서열(모두 상술되고 도 13에 나타난 순서로 서열 번호: 15 내에 포함됨)을 아래에 제공한다.

[0373] VRC-1 IgG의 IgE1 신호 펩티드 - (서열 번호: 8).

[0374] VRC01 IgG의 가변 중쇄 영역 - (서열 번호: 9).

[0375] VRC01 IgG의 불변 중쇄 영역 1(CH1) - (서열 번호: 10).

[0376] VRC01 IgG의 힌지 영역 - (서열 번호: 11).

[0377] VRC01 IgG의 불변 중쇄 영역 2(CH2) - (서열 번호: 12).

[0378] VRC01 IgG의 불변 중쇄 영역 3(CH3) - (서열 번호: 13).

[0379] VRC01 IgG의 퓨린 절단 부위 - (서열 번호: 14).

[0380] VRC01 IgG의 GSG 링커 및 P2A 펩티드 - (서열 번호: 15).

[0381] VRC01 IgG의 IgE1 신호 펩티드 - (서열 번호: 8).

[0382] VRC01 IgG의 가변 경쇄 영역(VL) - (서열 번호: 16).

[0383] VRC01 IgG의 불변 경쇄 영역(CL, 카파) - (서열 번호: 17).

[0384] 실시예 9

[0385] 두 플라스미드에 의해 암호화된 HIV-1 VRC01 IgG

[0386] 실시예 2-8에 상술된 바와 같이, Fab(각각의 사슬이 별도의 플라스미드에서 발현됨)를 VRC01 항체, 즉 HIV-Env

Fab로부터 생성하였고, IgG(단일 플라스미드에서 발현됨)를 VRC01 항체, 즉 VRC01 IgG로부터 생성하였다. 이들 연구를 추가 확장시키기 위해, IgG를 VRC01 항체로부터 생성하였고, 여기서 중쇄(즉, 가변 중쇄 영역(VH), 불변 중쇄 영역 1(CH1), 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2(CH2), 및 불변 중쇄 영역 3(CH3)) 및 경쇄(즉, 가변 경쇄 영역(VL) 및 불변 경쇄 영역(CL))는 별도의 작제물에 의해 암호화되었다(도 50 및 51). 상기 IgG를 본원에서 HIV-1 VRC01 IgG로 나타낸다.

[0387] 또한 각각의 작제물에는 일단 생체내 생성된 항체의 분비를 최적화하기 위한 리더 서열이 포함되어있다. 각각의 작제물을 pVAX1 벡터의 BamHI 및 XhoI 부위 내에 클로닝하고, 이에 따라 작제물을 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터의 제어 하에 배치하였다(도 50 및 51). 따라서 생체내에서 VRC01 IgG를 형성하거나 생성하기 위해, 플라스미드 혼합물, 즉 중쇄를 암호화하는 작제물을 함유하는 플라스미드 및 경쇄를 암호화하는 작제물을 함유하는 플라스미드를 대상체에 투여해야 한다.

[0388] 추가적으로, 각각의 작제물을 추가로 최적화하였다. 최적화에는 코작 서열(GCC ACC)의 부가 및 코돈 최적화가 포함되어있다. HIV-1 VRC01 IgG의 IgG1 중쇄를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 54 및 도 52에 나타낸다. 도 52에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 54는 서열 번호: 55 및 도 53에 명시된 아미노산 서열 (즉, HIV-1 VRC01 IgG의 IgG1 아미노산 서열)을 암호화한다.

[0389] HIV-1 VRC01 IgG의 IgG 경쇄를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 56 및 도 54에 나타낸다. 도 54에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 56은 서열 번호: 57 및 도 55에 명시된 아미노산 서열 (즉, HIV-1 VRC01 IgG의 IgG 경쇄 아미노산 서열)을 암호화한다.

[0390] 실시예 10

[0391] HIV-1 Env-PG9 Ig

[0392] VRC01 IgG에 부가하여, HIV-1 Env에 반응성인 IgG를 암호화하는 다른 작제물을 생성하였다. 상기 작제물은 HIV-1 Env-PG9로, 최적화되고 발현 벡터 내로 클로닝되었다(도 16A 및 16B). 최적화에는 코작 서열(예로, GCC ACC), 리더 서열, 및 코돈 최적화가 포함되어있다. HIV-1 Env-PG9 Ig를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터의 생성을 도 16C에 나타낸 바와 같이 제한 효소 소화에 의해 확인하였다. 도 16C에서, 레인 1은 소화되지 않은 발현 벡터이고, 레인 2는 BamHI 및 XhoI로 소화된 발현 벡터이고, 레인 M은 마커였다.

[0393] HIV-1 Env-PG9 Ig를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 63 및 도 61에 나타낸다. 도 61에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 63는 서열 번호: 2 및 도 18에 명시된 아미노산 서열, 즉, 퓨린에 의한 절단 전의 HIV-1 Env-PG9 Ig의 아미노산 서열을 암호화한다.

[0394] 상기 아미노산 서열에서, 신호 펩티드는 생체내 생성된 항체의 분비를 개선하기 위해 각각의 중쇄 및 경쇄에 펩티드 결합에 의해 연결된다. 추가적으로, 번역된 폴리펩티드의 중쇄 또는 경쇄를 함유하는 별도의 폴리펩티드로의 보다 효율적인 절단을 허용하기 위해, P2A 펩티드를 암호화하는 핵산 서열이 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산 서열 간에 배치된다.

[0395] 특히, HIV-1 Env-PG9 Ig의 아미노산 서열 (퓨린에 의한 절단 전; 서열 번호: 2 및 도 18)은 하기 구조를 갖는다: 인간 IgG 중쇄 신호 펩티드, 가변 중쇄 영역(VH), 불변 중쇄 영역 1(CH1), 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2(CH2), 불변 중쇄 영역 3(CH3), 퓨린 절단 부위, GSG 링커, P2A 펩티드, 인간 람다 경쇄 신호 펩티드, 가변 경쇄 영역(VL), 및 불변 경쇄 영역(CL, 특히 람다). 구조의 각 부분의 서열(모두 상술된 순서로 서열 번호: 2 내에 포함됨)을 아래에 제공한다.

[0396] HIV-1 Env-PG9 Ig의 인간 IgG 중쇄 신호 펩티드 - (서열 번호: 18).

[0397] HIV-1 Env-PG9 Ig의 가변 중쇄 영역 - (서열 번호: 19).

[0398] HIV-1 Env-PG9 Ig의 불변 중쇄 영역 1(CH1) - (서열 번호: 20).

[0399] HIV-1 Env-PG9 Ig의 힌지 영역 - (서열 번호: 21).

- [0400] HIV-1 Env-PG9 Ig의 불변 중쇄 영역 2(CH2) - (서열 번호: 22).
- [0401] HIV-1 Env-PG9 Ig의 불변 중쇄 영역 3(CH3) - (서열 번호: 23).
- [0402] HIV-1 Env-PG9 Ig의 퓨린 절단 부위 - (서열 번호: 24).
- [0403] HIV-1 Env-PG9 Ig의 GSG 링커 및 P2A 펩티드 - (서열 번호: 25).
- [0404] HIV-1 Env-PG9 Ig의 인간 램다 경쇄 신호 펩티드 - (서열 번호: 26).
- [0405] HIV-1 Env-PG9 Ig의 가변 경쇄 영역(VL) - (서열 번호: 27).
- [0406] HIV-1 Env-PG9 Ig의 불변 경쇄 영역(CL, 램다) - (서열 번호: 28).
- [0407] **실시예 11**
- [0408] **HIV-1 PG9 단일쇄 Fab(scFab)**
- [0409] 상술된 HIV-1 Env-PG9 Ig에 부가하여, 단일쇄 Fab(즉, 단일 전사체로 전사되고 단일 폴리펩티드로 번역되는 핵산 서열에 의해 암호화된 VH/CH1 및 VL/CL)를 PG9 항체(본원에서 HIV-1 PG9 scFab로 나타냄)에 기반하여 생성하였다. HIV-1 PG9 scFab를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 50 및 도 46에 나타낸다. 도 46에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 상기 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG)을 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA 또는 TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 50에 나타낸 핵산 서열은 최적화된 핵산 서열이다, 즉 코작 서열(GCC ACC), 코돈 최적화, 및 리더 서열을 포함하였다. 리더 서열은 작제물의 5' 말단, 즉 단일쇄 Fab 앞에 배치하였고, 이에 따라 링커 서열에 의해 암호화된 신호 펩티드는 단일쇄 Fab의 아미노 말단에 펩티드 결합에 의해 연결되었다. 서열 번호: 50에 나타낸 핵산 서열에는 또한 VH/CH1을 암호화하는 핵산 서열 및 VL/CL을 암호화하는 핵산 서열 간에 배치된 링커 서열이 포함되었다. 따라서 서열 번호: 50에 의해 암호화된 폴리펩티드에서, 링커 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열은 VH/CH1 및 VL/CL을 함께 유지하였다. 서열 번호: 50은 서열 번호: 51 및 도 47에 명시된 아미노산 서열, 즉 HIV-1 PG9 scFab의 아미노산 서열을 암호화하였다.
- [0410] **실시예 12**
- [0411] **HIV-1 Env-4E10 Ig**
- [0412] VRC01 IgG 및 HIV-1 Env-PG9 Ig에 부가하여, HIV-1 Env에 반응성인 IgG를 암호화하는 다른 작제물을 생성하였다. 상기 작제물은 HIV-1 Env-4E10로, 최적화되고 발현 벡터 내로 클로닝되었다(도 17A 및 17B). 최적화에는 코작 서열(예로, GCC ACC), 리더 서열, 및 코돈 최적화가 포함되었다. HIV-1 Env-4E10 Ig를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터의 생성을 도 17C에 나타낸 바와 같이 제한 효소 소화에 의해 확인하였다. 도 17C에서, 레인 1은 소화되지 않은 발현 벡터이고, 레인 2는 BamHI 및 XhoI로 소화된 발현 벡터이고, 레인 M은 마커였다.
- [0413] HIV-1 Env-4E10 Ig를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 62 및 도 60에 나타낸다. 도 60에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 62는 서열 번호: 1 및 도 19에 명시된 아미노산 서열, 즉, 퓨린에 의한 절단 전의 HIV-1 Env-4E10 Ig의 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0414] 상기 아미노산 서열에서, 신호 펩티드는 생체내 생성된 항체의 분비를 개선하기 위해 각각의 중쇄 및 경쇄에 펩티드 결합에 의해 연결된다. 추가적으로, 번역된 폴리펩티드의 중쇄 또는 경쇄를 함유하는 별도의 폴리펩티드로의 보다 효율적인 절단을 허용하기 위해, P2A 펩티드를 암호화하는 핵산 서열이 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산 서열 간에 배치된다.
- [0415] 특히, HIV-1 Env-4E10 Ig의 아미노산 서열 (퓨린에 의한 절단 전; 서열 번호: 1 및 도 19)은 하기 구조를 갖는다: 인간 IgG 중쇄 신호 펩티드, 가변 중쇄 영역(VH), 불변 중쇄 영역 1(CH1), 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2(CH2), 불변 중쇄 영역 3(CH3), 퓨린 절단 부위, GSG 링커, P2A 펩티드, 인간 카파 경쇄 신호 펩티드, 가변 경쇄 영역(VL), 및 불변 경쇄 영역(CL, 특히 카파). 구조의 각 부분의 서열(모두 상술된 순서로 서열 번호: 1 내에 포함됨)을 아래에 제공한다.
- [0416] HIV-1 Env-4E10 Ig의 인간 IgG 중쇄 신호 펩티드 - (서열 번호: 29).

- [0417] HIV-1 Env-4E10 Ig의 가변 중쇄 영역 - (서열 번호: 30).
- [0418] HIV-1 Env-4E10 Ig의 불변 중쇄 영역 1(CH1) - (서열 번호: 31).
- [0419] HIV-1 Env-4E10 Ig의 힌지 영역 - (서열 번호: 32).
- [0420] HIV-1 Env-4E10 Ig의 불변 중쇄 영역 2(CH2) - (서열 번호: 33).
- [0421] HIV-1 Env-4E10 Ig의 불변 중쇄 영역 3(CH3) - (서열 번호: 34).
- [0422] HIV-1 Env-4E10 Ig의 퓨린 절단 부위 - (서열 번호: 35).
- [0423] HIV-1 Env-4E10 Ig의 GSG 링커 및 P2A 펩티드 - (서열 번호: 36).
- [0424] HIV-1 Env-4E10 Ig의 인간 램다 경쇄 신호 펩티드 - (서열 번호: 37).
- [0425] HIV-1 Env-4E10 Ig의 가변 경쇄 영역(VL) - (서열 번호: 38).
- [0426] HIV-1 Env-4E10 Ig의 불변 경쇄 영역(CL, 램다) - (서열 번호: 39).
- [0427] **실시예 13**
- [0428] **HIV-1 4E10 ScFab**
- [0429] 상술된 HIV-1 Env-PG9 Ig에 부가하여, 단일쇄 Fab(즉, 단일 전사체로 전사되고 단일 폴리펩티드로 번역되는 핵산 서열에 의해 암호화된 VH/CH1 및 VL/CL)를 4E10 항체(본원에서 HIV-1 4E10 scFab로 나타냄)에 기반하여 생성하였다. HIV-1 4E10 scFab를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 52 및 도 48에 나타낸다. 도 48에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 상기 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG)을 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA 또는 TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 52에 나타난 핵산 서열은 최적화된 핵산 서열이다, 즉 코작 서열(GCC ACC), 코돈 최적화, 및 리더 서열을 포함하였다. 리더 서열은 작제물의 5' 말단, 즉 단일쇄 Fab 앞에 배치하였고, 이에 따라 링커 서열에 의해 암호화된 신호 펩티드는 단일쇄 Fab의 아미노 말단에 펩티드 결합에 의해 연결되었다. 서열 번호: 52에 나타난 핵산 서열에는 또한 VH/CH1을 암호화하는 핵산 서열 및 VL/CL을 암호화하는 핵산 서열 간에 배치된 링커 서열이 포함되었다. 따라서 서열 번호: 52에 의해 암호화된 폴리펩티드에서, 링커 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열은 VH/CH1 및 VL/CL을 함께 유지하였다. 서열 번호: 52은 서열 번호: 53 및 도 49에 명시된 아미노산 서열, 즉 HIV-1 4E10 scFab의 아미노산 서열을 암호화하였다.
- [0430] **실시예 14**
- [0431] **CHIKV-Env-Fab**
- [0432] 상술된 바와 같이, HIV-1 Env에 반응성인 Fab는 세포 또는 마우스로 HIV-1Env Fab의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열의 전달 시 생체내 조립되거나 생성되었다. 다른 항원에 반응성인 Fab가 세포 또는 대상체에 대한 암호화 핵산 서열의 전달 시 생체내 생성될 수 있는지를 결정하기 위해, 치쿤균야 바이러스(CHIKV)의 외피 단백질(Env)에 반응성인 항체의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL, 램다 유형)를 암호화하는 작제물을 생성하였다. 각각의 작제물에는 도 20A, 20B, 및 21에 나타난 바와 같은 리더 서열 및 코작 서열이 포함되었다. VH-CH1 및 VL-CL을 암호화하는 작제물을 발현 벡터 내로 클로닝하고, 이에 따라 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터의 제어 하에 배치하였다(도 21). VH-CH1 및 VL-CL을 암호화하는 작제물을 함유하는 발현 벡터는 각각 CHIKV-H 및 CHIV-L로 알려진다. 더불어, CHIKV-H 및 CHIKV-L 벡터의 혼합물은 pCHIKV-Env-Fab로 알려지며, 이는 생체내 CHIKV-Env-Fab를 생성하였다(즉, 세포 또는 대상체 내로의 도입 시). 다시 말하면, 두 벡터가 모두 아래에 보다 상세히 기재된 바와 같이 생체내에서 CHIKV-Env-Fab를 생성하기 위해 필요하였다.
- [0433] 작제물은 또한 발현을 위해 최적화되었다. 특히, 생체내에서 CHIKV-Env-Fab의 생성 시 CHIKV-Env-Fab의 분비 효율을 증가시키기 위해 각 작제물에 리더 서열을 포함시켰다. 각각의 작제물을 또한 코돈 최적화하고 코작 서열(GCC ACC)을 포함시켰다. CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1)를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 58 및 도 56에 나타낸다. 도 56에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 58는 서열 번호: 59 및 도 57에 명시된 아미노산 서열, 즉 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1)의 아미노산 서열을 암호화한다.

- [0434] CHIKV-Env-Fab의 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 60 및 도 58에 나타낸다. 도 58에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 60는 서열 번호: 61 및 도 59에 명시된 아미노산 서열, 즉 CHIKV-Env-Fab의 경쇄(VL-CL)의 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0435] 생체내 CHIKV-Env-Fab 생성의 경시적 역학을 측정하기 위해, 세포를 pVAX1, CHIKV-H, CHIKV-L, 또는 pCHIKV-Env-Fab로 형질감염시켰다. 형질감염 후, ELISA를 이용하여 경시적인 CHIKV-Env-Fab 생성 수준을 측정하였다. 도 22에 나타난 바와 같이, pVAX1, CHIKV-H, 또는 CHIKV-L로 형질감염된 세포는 CHIKV Env 항원에 반응성인 항체를 생산하지 않았다. 대조적으로, pCHIKV-Env-Fab로 형질감염된 세포는 CHIKV Env 항원에 반응성인 항체(즉, CHIKV-Env-Fab, CHIKV-Fab로도 알려져 있음)를 생산하였다. 따라서 이들 데이터는 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열의 전달이 CHIKV-Env 항원에 결합하거나 반응성인 Fab의 생성을 일으킴을 나타내었다.
- [0436] 추가적으로, CHIKV-Env-Fab를 CHIKV-Env 항원을 암호화하는 플라스미드인 pCHIKV-Env로 형질감염된 세포에서 수득된 용해액의 웨스턴 블롯에 이용하였다. 도 23에서 나타난 바와 같이, CHIKV-Env 항원이 CHIKV-Env-Fab를 통해 검출되어 상기 Fab가 항원에 결합함을 시사하였다.
- [0437] 생체내 CHIKV-Env-Fab의 생성 또는 조립을 추가 조사하기 위해, 마우스에 pCHIKV-Env-Fab(즉, 12.5 μ g CHIKV-H 및 12.5 μ g CHIKV-L)를 투여하였다. 추가적으로, 제2, 제3, 및 제4군의 마우스에 각각 25 μ g의 pVAX1, CHIKV-H, 및 CHIKV-L을 투여하여, 대조군으로 이용하였다. 특히 플라스미드를 채혈-전 표본의 수득 후 0일에 각 군의 마우스에 투여하였다. 1일, 2일, 3일, 5일, 7일 및 10일에 채혈하였다(도 24). 이들 혈액 상에서 ELISA 측정을 수행하여 CHIKV-Env 항원에 반응성인 항체 수준을 결정하였다. 도 25에 나타난 바와 같이, pCHIKV-Env-Fab가 투여된 마우스는 CHIKV-Env 항원에 반응성인 항체(즉, CHIKV-Env-Fab) 생성을 일으켰다. pVAX1, CHIKV-H 또는 CHIKV-L이 투여된 마우스는 CHIKV-Env 항원과 유의미하게 반응성을 갖는 항체를 생성하지 않았다. 따라서 이들 데이터는 CHIKV-Env-Fab의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열의 전달 시, 상기 Fab가 생체내(즉 마우스에서) 생성되었으며, 그 항원(즉, CHIKV-Env)에 반응성을 추가로 나타내었으며, 이에 따라 Fab가 생체내에서 정확히 조립됨을 나타내었다.
- [0438] CHIKV-Env-Fab가 CHIKV 감염에 대해 보호할 수 있는지를 측정하기 위해, C57BL/6 마우스(2-3주령; 약 20-25g 체중)에 0일에 pCHIKV-Env-Fab(50 μ g) 또는 pVAX1을 투여하였다. pCHIKV-Env-Fab의 투여 6시간 후, 각 마우스에 비강내 경로로 총 부피 25 μ l 중 7 log 10 PFU를 접종하였다. 다음 날마다 각 마우스에 대해 체중을 측정하고, 체중 손실이 30% 초과인 경우 마우스를 희생시켰다.
- [0439] 도 26에 나타난 바와 같이, pCHIKV-Env-Fab가 투여된 마우스의 약 75%가 연구 14일째에 CHIKV 감염에 생존한 반면, pVAX1이 투여된 마우스는 14일째에 모두 사망하였다. 추가적으로, pCHIKV-Env-Fab가 투여된 마우스는 pVAX1이 투여된 마우스에 비해 더 낮은 수준의 시토카인 TNF- α 및 IL-6에 연관되었다(도 27 및 28). TNF- α 및 IL-6 수준을 마우스에서 수득한 혈청에서 측정하였다. 이들 생존 마우스는 병리 징후, 체중 손실을 나타내지 않았고, 더 낮은 수준의 시토카인 TNF- α 및 IL-6을 가졌다. 따라서 이들 데이터는 pCHIKV-Env-Fab 투여가 마우스를 CHIKV 감염으로부터 보호하고 CHIKV 감염 시 생존을 촉진함을 나타내었다. 다시 말하면, 마우스에서 CHIKV-Env-Fab의 생체내 생성은 CHIKV 감염에 대해 보호하고 생존을 촉진하였다.
- [0440] **실시예 15**
- [0441] **항-Her-2 Fab**
- [0442] 상술된 바와 같이, HIV-1 Env 또는 CHIKV Env에 반응성인 Fab(즉, VH/CH1 및 VL/CL)가 세포 또는 마우스로 HIV-1Env Fab 또는 CHIKV Env-Fab의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열의 전달 시 생체내 조립되거나 생성되었다. 자가 항원(즉, Fab를 암호화하는 핵산 서열이 투여된 대상체에 내인성인 항원)에 반응성인 Fab가 세포 또는 마우스로의 암호화 핵산의 전달 시 생체내 생성될 수 있는지를 결정하기 위해, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(Her-2; Erb2로도 알려져 있음)에 반응성인 항체의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 암호화하는 작제물을 생성하였다. 각각의 작제물에는 도 28, 30 및 31에 나타난 바와 같이 항-Her-2 Fab의 VH-CH1 또는 VL-CL을 암호화하는 핵산 서열에 선행하여 리더 서열 및 코작 서열(GCC ACC)이 포함되었다. 따라서 이들 작제물은 리더 서열 및 코작 서열의 도입으로 인해 최적화되었고, 코돈 이용에 대해 추가로 최적화되었다.
- [0443] VH-CH1 및 VL-CL을 암호화하는 작제물을 pVAX1 발현 벡터 내로, 즉 BamHI 및 XhoI 제한 효소 부위 사이에 클로닝하고, 이에 따라 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터의 제어 하에 배치하였다. 특히, VH-CH1 및 VL-CL을 암

항화하는 작제물을 두 별도의 pVAX1 벡터 내로 클로닝하였고, 이에 따라 생체내에서 항-Her-2 Fab를 생성하기 위해서는 생성된 두 플라스미드가 필요하였다.

[0444] 항-Her-2 Fab의 VH-CH1을 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 40 및 도 32에 나타낸다. 도 32에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위 각각을 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 40은 서열 번호: 41에 나타난 아미노산 서열, 즉 항-Her-2 Fab의 VH-CH1의 아미노산 서열을 암호화한다(도 32 및 33).

[0445] 항-Her-2 Fab의 VL-CL을 암호화하는 핵산 서열을 서열 번호: 42 및 도 34에 나타낸다. 도 34에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 각각 핵산 서열을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA TAA) 코돈을 나타낸다. 서열 번호: 42는 서열 번호: 43에 나타난 아미노산 서열, 즉 항-Her-2 Fab의 VL-CL의 아미노산 서열을 암호화한다(도 34 및 35).

[0446] 항-Her-2 Fab의 VH-CH1 및 VL-CL을 암호화하는 플라스미드의 혼합물이 생체내에서 항-Her-2 Fab를 생성하는지를 결정하기 위해, 293T 세포를 항-Her-2 Fab 또는 pVAX1의 중쇄(VH-CH1) 및 경쇄(VL 및 CL)를 암호화하는 플라스미드 혼합물로 형질감염시켰다. 형질감염 후, 전체 IgG 농도를 도 36에 나타난 바와 같이 측정하였다. 36. 도 36에서, 오차 막대는 표준 편차를 나타내었다. 이들 데이터는 각각 항-Her-2 Fab의 VH-CH1 또는 VL-CL을 암호화하는 두 플라스미드의 도입 시 항-Her-2 Fab가 생체내 생성됨을 나타내었다.

[0447] **실시예 16**

[0448] **항-덴기 바이러스 인간 IgG**

[0449] 생체내에서 항-덴기 바이러스(DENV) 인간 IgG 항체를 생성하기 위해 단일 플라스미드 시스템을 생성하였다. 특히, 도 37의 모식도에 나타난 바와 같이 작제물을 생성하였다. 구체적으로, 리더 서열을 IgG 중쇄(즉, 가변 중쇄 영역(VH), 불변 중쇄 영역 1(CH1), 힌지 영역, 불변 중쇄 영역 2(CH2), 및 불변 중쇄 영역 3(CH3))를 암호화하는 핵산 서열의 상류에 배치하였다. 다시 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 서열을 IgG 중쇄를 암호화하는 핵산 서열의 하류에 배치하였다. IgG 경쇄(즉, 가변 경쇄 영역(VL) 및 불변 경쇄 영역(CL))를 암호화하는 핵산 서열을 프로테아제 절단 부위(즉, 퓨린 절단 부위)를 암호화하는 서열 뒤에 배치하였다. 상기 작제물에 의해 암호화된 신호 펩티드는 인지체 신호 펩티드였으므로, 이에 따라 발현 시 항체의 적절한 분비를 제공하였다. 추가적으로, 발현 시 단일 전사체가 단일 폴리펩티드로 번역되고, 이어서 프로테아제에 의해 항-DENV 인간 IgG의 중쇄 및 경쇄에 해당하는 폴리펩티드로 가공된다. 이어서 이들 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드는 기능적 항-DENV 인간 IgG로, 즉 그 인지체 항원에 결합하는 항체로 조립된다.

[0450] 상기 작제물을 발현 벡터 pVAX1(즉 BamHI 및 XhoI 부위) 내에 클로닝하고, 이에 따라 프로모터의 제어 하에 배치하였다. 항-덴기 바이러스 인간 IgG를 암호화하는 상기 작제물은 서열 번호: 44에 나타난 핵산 서열을 가지며(도 38), 발현을 위해 최적화되었다. 도 38에서, 밑줄 및 이중 밑줄은 작제물을 pVAX1 벡터 내로 클로닝하기 위해 이용된 BamHI(GGA TCC) 및 XhoI(CTC GAG) 제한 효소 부위를 나타내는 반면, 진한 글씨는 시작(ATG) 및 정지(TGA 또는 TAA) 코돈을 나타낸다. 최적화에는 코작 서열(GCC ACC)의 도입 및 코돈 최적화가 포함되었다. 서열 번호: 44는 서열 번호: 45 및 도 39에 명시된 아미노산 서열에 나타난 아미노산 서열, 즉 프로테아제에 의해 별도의 중쇄 및 경쇄의 두 별도의 폴리펩티드로의 절단 전 항-DENV 인간 IgG의 아미노산 서열을 암호화한다.

[0451] 항-덴기 바이러스 인간 IgG가 생체내(즉 마우스에서) 생성되는지를 결정하기 위해, 항-덴기 바이러스 인간 IgG를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 플라스미드를 마우스에 투여하였다. 플라스미드 투여 후, 마우스로부터 혈청을 수득하고 ELISA를 통해 분석하여 혈청이 4가지 덴기 바이러스 혈청형, 즉 DENV-1, DENV-2, DENV-3, 및 DENV-4로부터의 덴기 E 단백질에 반응성인 항체를 함유하는지를 결정하였다. 도 40에 나타난 바와 같이, 항-DENV 인간 IgG를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 플라스미드가 투여된 마우스로부터의 혈청은 혈청형 DENV-1, -2, -3, 및 -4로부터의 DENV E 단백질에 반응성이었다. 이소형 항체를 양성 대조군으로 이용하였다. 따라서 이들 데이터는 마우스 내로의 플라스미드 도입 시, 항-DENV 인간 IgG를 암호화하는 핵산 서열이 항-DENV 인간 IgG의 중쇄 및 경쇄를 함유하는 폴리펩티드를 산출하도록 가공되는 폴리펩티드로 전사되고 번역됨을 나타내었다. 이들 폴리펩티드는 항-DENV 인간 IgG로 조립되었고, 이에 따라 DENV E 단백질에 결합하거나 반응성인 기능적 항체를 제공하였다.

[0452] 단일 플라스미드의 투여에 의한 생체내 항-DENV 인간 IgG의 생성을 추가 조사하기 위해, 마우스에 항-DENV 인간 IgG를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 플라스미드를 주사를 통해 투여하였다. 구체적으로, 마우스에 50 μ g 또는 100 μ g의 플라스미드를 투여하였고, 각 군 당 마우스는 5마리씩이었다. 주사 후 3일 및 6일에, 마우스를 혈청

전환에 대해 조사하였다. 도 41에 나타난 바와 같이, 두 군의 마우스가 모두 항-DENV IgG 항체에 대해 혈청양성이었다. 특히 50 μ g의 플라스미드가 투여된 마우스는 약 110ng/mL의 인간 IgG를 가졌고, 100 μ g의 플라스미드가 투여된 마우스는 약 170ng/mL의 인간 IgG를 가졌다. 따라서 이들 데이터는 항-DENV 인간 IgG를 암호화하는 플라스미드의 투여 후 생체내 항-DENV 인간 IgG의 생성을 추가로 나타내었다. 이들 데이터는 또한 항-DENV 인간 IgG 항체 생산이 1주 이내에 일어나며, 이에 따라 항-DENV 인간 IgG 항체의 신속한 생산을 허용함을 나타내었다.

[0453] 실시예 17

[0454] PSMA

[0455] 인간 항-PSMA IgG1 항체는 항-PSMA 항체에 대한 문헌 조사에 의해 획득되었다. 실시예 2에 기재된 것과 유사하게도, 인간 항-PSMA IgG1을 도 63에 나타난 바와 같이 선형 배열로 제작하였다. 발현을 개선하기 위해 효율적인 IgE 리더 서열(서열 번호: 8)을 항-PSMA IgG1 유전자 서열 내에 혼입시켰다. 생성된 변형되고 증강된 항-PSMA IgG1 서열은 코돈- 및 RNA-최적화되었으며, 이어서 GenScript(Piscataway, NJ)에 의해 pVax1 발현 벡터 내로 클로닝되고 이들 작제물의 대규모 생산이 이어졌다. 항-PSMA 항체 유전자 서열 번호: 79를 BamHI 및 XhoI 제한 효소 부위 간에 삽입하였다. 서열 번호: 79는 서열 번호: 80에 명시된 아미노산 서열을 암호화한다.

[0456] 항-PSMA 항체를 단일 플라스미드 시스템에서 발현시켰다. 상기 생체내 발현은, 인간 PSMA에 결합되고 PSMA-발현 세포의 향상된 항체 유도 세포독성(ADCC) 사멸을 나타낸 탈푸코실화된 항체(즉, 푸코스 잔기가 결여된 항체)를 제공하였다.

[0457] 시험관내 발현.

[0458] 5 마이크로그램의 항-huPSMA 플라스미드를 293T 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 48일 후에 샘플을 수집하고 결합 분석을 수행하였다. 항체 역가 결과는 도 64에 나타난다. 도 64에서의 우측 패널은 염소 항-인간 IgG에 대한 인간 항-PSMA IgG 상청액의 결합을 비교한다. 항체 결합의 정량화는 도 65에 나타난다. 플롯팅된 막대 그래프는 항-PSMA 플라스미드(5 μ g)로 형질감염되고 37 °C 및 5% CO₂에서 밤새 항온처리된 293T 세포를 나타내며, 정량을 위해 사용된 최종 상청액을 형질감염 48시간 후에 수집하였다.

[0459] 항-PSMA IgG 정량 마우스 혈청 - Nu/J 마우스.

[0460] 0일에 5 Nu/J 마우스에게 인간 항-PSMA 항체 플라스미드를 투여하였다. 항-PSMA DNA 플라스미드를 CELLECTRA 전기천공 장치(Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting PA)를 사용하여 근육내로 전달하였다. 혈청은 상이한 시점에서 수집되었다 - 참고: 도 66에서의 시각표. 혈청을 PBST 및 1% FBS에서 1:100으로 희석하였다. IgG의 농도가 도 66의 그래프에 나타나 있다. 약 1-5 μ g/mL의 검출가능한 인간 IgG1를 면역결핍 마우스의 혈청에서 획득하였다.

[0461] IgG 결합 활성은 하기와 같이 확인되었다: 1 마이크로그램의 재조합 단백질을 로딩하고 SDS-PAGE를 수행한 다음, 블롯을 도 67에 나타난 바와 같은 다양한 공급원으로부터의 혈청과 함께 항온처리하였다(상업적 공급원, 주사된 마우스, 및 조직 배양). 면역블롯은 항체의 특이성을 나타낸다. 생성된 항-huPSMA IgG1의 특이성을 설명하는 추가 결합 연구. LNCaP 세포에 대한 항-PSMA 혈청(7일부)의 결합을 유세포분석에 의해 조사하였다. 강한 반응성이 PSMA-양성 LNCaP 세포에서 관찰되었다. 시험된 혈청을 분석을 위해 1:4로 희석하였다. 도 68을 참고한다.

[0462] 항-PSMA IgG 정량 - 마우스 혈청 - C57BL/6(B6.Cg-Foxn1nu/J) 마우스

[0463] 또한, 5마리의 C57BL/6 누드(B6.Cg-Foxn1nu/J) 마우스를 100 μ g의 항-PSMA DNA 플라스미드로 근육내로 면역화한 다음, 전기천공하였다. 마우스 혈청을 도 83에 나타난 시점에 안구 뒤 출혈에 의해 수집하였다. 각 시점에서의 IgG의 농도가 또한 도 83에 나타나 있다. 생체내 항-PSMA 항체를 발현시키고 도 84에 나타난 바와 같이 재조합 인간 PSMA에 결합시켰으며; 항-PSMA 항체를 도시된 ELISA 결과에서 1:50으로 희석하였다. 1 내지 1.5 μ g/mL의 검출가능한 인간 IgG1이 생산되었다.

[0464] 항-PSMA IgG 정량 - 마우스 혈청 - 면역 적격 마우스

[0465] 5마리의 C57BL/6 마우스를 100 μ g의 항-PSMA DNA 플라스미드로 근육내로 면역화한 다음, 전기천공하였다. 마우스 혈청을 도 85 및 도 86에 나타난 시점에 안구 뒤 출혈에 의해 수집하였다. 면역 적격 마우스에서의 생체내 항-PSMA 항체는 0.5 내지 0.9 μ g/mL의 인간 IgG에서 검출되었다. 특히, 도 85는 각 마우스에 대한 항-PSMA 항체의 IgG 정량을 나타내는 반면, 도 86은 항-PSMA 항체의 그룹화된 IgG 정량을 나타낸다.

- [0466] 항-인간 PSMA IgG1 ADCC 활성의 측정.
- [0467] 항-인간 PSMA IgG1 ADCC 활성을 측정하였다. 효과기 세포를 면역화된 마우스로부터의 혈청의 존재 또는 부존재 하에 LnCap 세포에 대한 세포독성에 대해 시험하였다. 도 69, 도 87, 및 도 88 상의 그래프를 참고한다. LnCap 세포에 대한 PSMA 혈청의 생물학적 활성은 상업적인 PSMA 항체보다 훨씬 더 높은 ADCC 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 항-PSMA 항체의 탈푸코실화가 탈푸코실화되지 않은 상업적 PSMA 항체와 비교하여 ADCC 촉발을 증가시켰음을 뒷받침하였다.
- [0468] 도 95A-95E는 또한 최적화된 PSMA-dMAb 플라스미드가 *시험관내*에서 높은 수준의 IgG 생산을 유도한다는 것을 보여준다. 도 95A는 본원에서 PSMA-dMAb로 지칭된 항-PSMA 단일클론 항체를 암호화하는 최적화된 항-PSMA-IgG 플라스미드의 설계를 나타낸다. 도 95B는 정량 ELISA를 나타내고, 도 95C는 pVax1-또는 PSMA-dMAb-형질감염된 293T 세포로부터 48시간에 수집된 상청액의 1:50 희석의 결합 ELISA를 나타낸다. 도 95D는 pVax1 또는 PSMA-dMAb-형질감염된 293T 세포로부터의 48시간 상청액의 적정 결합 ELISA를 나타낸다. 도 95E는 PSMA-dMAb-형질감염된 293T 세포로부터의 상청액의 1:50 희석액으로 프로빙된 재조합 PSMA(rPSMA) 또는 무관한 재조합 HIV-Env(rHIV-Env) 단백질의 웨스턴 블롯 분석이 293T 세포에서 생산된 PSMA-dMAb-IgG의 특이적 결합을 나타낸다는 것을 보여준다.
- [0469] 도 96A-96C는 또한 PSMA-dMAb 플라스미드가 마우스에서 높은 수준의 IgG 생산을 유도한다는 것을 나타낸다. 도 96A는 100ug PSMA-dMAb 플라스미드의 단일 주사를 근육내로 접종한 후 EP를 접종한 C57BL/6 누드(B6.Cg-Foxn1nu/J) 마우스로부터 수집된 혈청 상에서 수행된 정량 ELISA를 나타낸다. 1.2 ug/ml의 피크 IgG 농도를 C57BL/6 누드에 대해 14일에 수득하였다. 도 96B는 재조합 인간 PSMA에 대해 시험된 마우스로부터 수집된 혈청의 적정 결합 ELISA를 나타낸다. 도 96C는 PSMA-dMAb-접종된 마우스로부터의 혈청의 1:50 희석액으로 프로빙된 재조합 PSMA(rPSMA) 또는 무관한, 재조합 HIV-Env(rHIV-Env) 단백질의 웨스턴 블롯 분석이 마우스에서 생산된 PSMA-dMAb IgG의 특이적 결합을 나타낸다는 것을 보여준다.
- [0470] 도 97A-97B는 누드 마우스에서 생산된 PSMA-dMAb IgG가 PSMA 발현 세포주에 결합한다는 것을 나타낸다. 도 97A는 공 pVax1 벡터 또는 PSMA-dMAb 플라스미드가 접종된 마우스로부터의 14일 혈청의 1:50 희석액으로 염색된 PSMA를 발현하는 LNCaP 및 TRAMP-C2 세포주의 유세포분석을 나타낸다. 도 97B는 LnCap 및 TRAMP-C2 세포 염색의 평균 형광 지수(MFI)의 정량을 나타낸다.
- [0471] 도 98은 C57BL/6 누드 마우스에서 생산된 PSMA-dMAb가 종양 조직 내의 PSMA를 염색한다는 것을 나타낸다. PSMA-dMAb 접종된 마우스로부터의 혈청(14일 혈청)을 이용한 인간 포르말린-고정된 파라핀 포매된(FFPE) 조직 절편 내의 방광 및 신장의 면역염색은 각 종양 조직 전반에 균일하게 분포된 PSMA 염색의 강한 수준을 나타낸다. 간접적 면역형광 분석을 사용하여 항체 발현을 확인하였다.
- [0472] 도 99A-99C는 PSMA-dMAb가 LNCaP 세포 상에서 ADCC를 매개한다는 것을 나타낸다. 도 99A는 PSMA-dMAb의 ADCC 활성이 ADCC 리포터 분석을 사용하여 조사되었음을 보여준다. 이 분석에서 이용된 효과기 세포는 FcγRIIIa 수용체, V158(높은 친화도) 변이체 및 반딧불 루시페라아제의 발현을 유도하는 NFAT 반응 요소를 안정적으로 발현하는 조작된 Jurkat 세포였다. 항체 생물학적 활성은 NFAT 경로 활성화의 결과로서 생산되는 루시페라아제를 통해 측정한다. 표적 LNCaP 세포를 조작된 Jurkat 효과기 세포 및 14일 샘플로부터의 PSMA-dMAb 면역화된 마우스 혈청의 다양한 희석액과 함께 6시간 동안 항온처리한 다음, 루시페라아제 활성을 정량하였다. 도 99B는 항체가 없는 음성 대조군과 비교하여 PSMA-dMAb 면역화된 마우스 혈청에 의해 유도된 ADCC의 유도 배수를 나타낸다. 이 데이터는 ADCC 활성이 항체가 없는 음성 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었음을 입증함으로써($P < 0.05$), PSMA-dMAb의 기능성 프로파일을 강조한다. 도 99C는 LNCaP 세포의 세포 사멸에 대한 PSMA-dMAb 혈청의 효과를 분석하기 위한 유세포분석을 나타낸다. 초기 세포사멸사(히스토그램에서 Q2 및 Q3 분획) 및 후기 세포사멸사 및 괴사(히스토그램에서 Q2 분획)의 통계학적으로 유의한 증가가 상이한 혈청 농도로 pVax1 대조군 혈청 처리된 세포와 비교하여 PSMA-dMAb 혈청으로 처리된 LNCaP 세포에서 관찰되었다. PSMA-dMAb 항체와 조합된 PMBC의 부가는 아넥신 V/PI 염색 LnCap 세포에 의해 평가될 때 세포 사멸의 유의미한 유도를 야기하였다.
- [0473] 실시예 18
- [0474] 치쿤균야 SNAPi
- [0475] CHIKV 외피(Env) 단백질을 표적으로 하는 Fab 단편(CHIKV-Fab) 또는 전장 항체(CHIKV-IgG) 중 하나를 암호화하는 최적화된 DNA 플라스미드를 설계하여 비교하였다. 마우스로 둘 중 하나의 SNAPi 작제물의 근육내 전달이 CHIKV의 초기 및 후기 노출에서 방어 효능을 야기할 뿐만 아니라 이의 암호화된 항체의 빠른 생산을

초래하였다. CHIKV-IgG 접종 마우스의 혈청은 또한 생체외(ex vivo)에서 다수의 임상적 CHIKV 단리물을 증화할 수 있었다. 주목할 것은, CHIKV-IgG로의 단일 접종은, 기존의 항원-유도 DNA 플라스미드보다, CHIKV에 후기 노출에서의 높은 방어 수치를 나타냈을 뿐만 아니라 조기 바이러스 노출에서 유의미하게 보다 나은 방어를 입증하였다는 것이다.

- [0476] 물질 및 방법
- [0477] 세포
- [0478] 인간 배아 신장(HEK) 293T 세포 및 배로 세포를 10% 소태아 혈청(FBS), 1ml당 페니실린 100IU, 1ml당 스트렙토마이신 100ug 및 2mM L-글루타민으로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco-Invitrogen)에 유지시켰다.
- [0479] CHIKV-Fab 및 CHIKV-IgG의 작제.
- [0480] 항-CHIKV Env 항체 발현 플라스미드를 작제하기 위해, 상기 항체의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 분절을, 여러 변형을 갖는 합성 올리고뉴클레오타이드의 사용에 의해, 생성하였다. Fab 단편 또는 전체길이 항체를 복제하기 위해, 중쇄 및 경쇄, 중쇄 및 경쇄 사이에 삽입된 퓨린 절단부위 및 P2A 자기공정 펩티드 부위를 함유하는 단일 개방형 해독틀을 조립하였다. 이것은 단일 개방형 해독틀에서 전체길이 항체를 발현하기 위해 편입되었다. 양쪽 플라스미드에서, 발현을 증강하기 위해 선두 서열을 각 유전자에 편입시켰다. 상기 수득된 서열을 코돈과 RNA 최적화로 변형 및 증강시킨 후, pVax1 발현 벡터로 복제하였고, 상기 수득된 작제물을 본 연구를 위해 대량으로 생산하였다(GenScript, NJ). 정제된 플라스미드 DNA를 추후 물에 마우스에 투여하기 위해 물에 제형화하였다. 빈 대조군 pVax1 발현 벡터를 음성대조군으로 사용하였다. 구체적으로, 본 연구에 사용된 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH)(예컨대, Fab) 또는 전체 면역글로불린 (Ig)용 DNA를 확립된 항-Env 특이적 CHIKV 중화 인간 단클론 항체/혼성세포에서 생성하였다 (NCBI 데이터베이스로부터의 서열을 기반으로 함).
- [0481] 웨스턴 블롯 분석법에 의한 CHIKV Fab 또는 CHIKV-IgG에서의 항-CHIKV Env 항체 의 발현의 측정.
- [0482] TurboFectin 8.0 세포감염 시약(Origene)을 사용하여 발현 분석을 위해 상기 인간 293T 세포주를 활용하였다. 이와 같은 세포를 35 mm 배양 접시에 24시간 동안 50~70% 세포군집(confluence)(총 배지 부피 2mL에서 1 웰당 $1-3 \times 10^5$ 개 세포)에서 시딩하였다. 24시간 후, pVax1 대조군 벡터 10 μ g, CHIKV-Fab(VH 5 μ g 및 VL DNA 5 μ g) 또는 CHIKV-IgG(100g)으로 세포를 감염시켰다. 세포감염 48시간 후, 상청액을 채취하여 코팅 항원으로 CHIKV-Env 재조합 단백질을 사용하여 ELISA로 항-CHIKV 항체를 평가하였다. pVax1 시료의 상청액을 음성대조군으로 사용하였다.
- [0483] 웨스턴 블롯 분석법을 수행하여 CHIKV-Fab 또는 CHIKV-IgG로의 세포 감염에 의해 생산된 항체의 특이적 결합을 확인하였다. CHIKV 외피 단백질의 공급원을 생성하기 위해, 293T 세포를 CHIKV-Env를 발현하는 DNA 플라스미드 10 μ g로 세포감염시켰다. 세포감염 2일 후, 세포를 용해하고 12% SDS-PAGE 겔 상에 전기 이동시켰다. 상기 겔을 iBlot2(Life Technologies)를 사용하여 나이트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 시료를 폴리아크릴아미드 겔 (12% NuPAGE Novex, Invitrogen) 상에서 분리하고, PDF 막(Invitrogen)에 이동시켰다. 상용 완충용액(Odyssey Blocking Buffer, LiCor Biosciences)을 사용하여 막을 차단하고, 4℃에서 마우스에서 기른 특이적 1차 항체 및 β -액틴(Santa Cruz)으로 밤새 배양하였다. 검출을 위해 IRDye800 및 IRD700 염소 항-토끼 또는 항-마우스 2차 항체를 사용하였다(LiCor Biosciences).
- [0484] 바이러스-특이적 결합 분석: 면역형광 분석
- [0485] 챔버 슬라이드(Nalgene Nunc, Naperville, Ill.)를 보관 배양물의 배로 세포(1x10)로 시딩하였다. 세포의 세포군집이 대략 80% 될 때까지 배양한 후, 도감염다중(m.o.i.) 1에서 CHIKV로 2시간 동안 세포를 감염시켰다. 2시간 동안 37℃에서 흡착한 후, 상기 바이러스 접종원을 흡입한 후, 세포 시트를 Iscove-10% FBS 배지로 3회 세정하였다. 감염 24시간 후, 상기 세포를 PBS로 2회 세척하고, 실온에서 20분 동안 차가운 메탄올로 고정한 후, 공기중에 건조되도록 방치하였다. 항체 결합을 CHIKV-Fab 투여 마우스에서 얻은 면역 혈청(1:100 희석)을 90분 동안 37℃에서 습식 챔버에서 첨가하여 검출하였다. PBS로 3회 세척한 후, 상기 세포를 60분 동안 37℃에서 FITC-접합 염소 항-인간 IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.,)로 배양하였다. 실온에서 20분 동안 4', 6-디아미디노-2-페닐린돌(DAPI)로 추가적인 핵 염색을 수행하였다. 각 배양 단계 후 1회 PBS 세척을 수행하였다. 추후 DABCO를 사용하여 시료를 유리 슬라이드에 탑재하고, 공초점 현미경(LSM710; Carl Zeiss) 하에서 관찰하였다. Zen 소프트웨어(Carl Zeiss)를 사용하여 수득된 이미지를 분석하였다. 추가로, Further, CHIK-IgG 면역 혈청의

면역 반응성을 CHIKV-Env 바이러스 감염 배로 세포로 위형화(위형)된 HIV-1 GFP에서 검사하여 유동세포 계수법으로 결합 활성을 검사하였다.

[0486] ELISA에 의한 항체 정량화 분석.

[0487] 항체 작제물의 발현 속도론 및 이의 표적 항원인 CHIKV-Env에 결합하는 능력을 측정하기 위해, CHIKV-Fab, CHIKV-IgG 또는 pVax1이 투여된 마우스의 혈청으로 ELISA 분석을 수행하였다. 플라스미드-주사 마우스에서 다양한 시점에 혈청 시료를 채취하였다. 채취한 혈청 시료의 총 인간 Fab를 정량화하기 위해, 96웰 고결합 폴리스티렌 플레이트(Corning)를 염소 항-인간 IgG-Fab 단편 항체(Bethyl Laboratories) 1 μ g/웰로 밤새 4℃에 코팅하였다. 상기 항체 작제물의 표적 항원(CHIKV Env 단백질) 결합 능력을 측정하기 위해, ELISA 플레이트를 제조한 CHIKV Env 단백질로 밤새 4℃에서 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 PBS-T(PBS, 0.05% Tween 20)로 세척하고, 실온에서 1시간 동안 PBS-T 중 3% BSA로 차단하였다. 또 한 번 세척 후, 시료를 PBS-T 중 1% FBS에서 1:100으로 희석하고, 상기 플레이트에 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 세척하고, HRP-접합 염소 항-인간 카파 경쇄(Bethyl Laboratories)를 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 그리고 나서, 플레이트를 Biotek EL312e Bio-Kinetics 판독기를 사용하여 450nm으로 판독하였다. SIGMAFAST OPD (Sigma-Aldrich)로 시료를 검출하였다. 정량화를 위해, 정제된 인간 IgG/카파 (Bethyl Laboratories)를 사용하여 표준 곡선을 생성하였다. 모든 혈청 시료를 이중으로 검사하였다.

[0488] CHIKV-Env 위형 생산 및 FACS 분석.

[0489] pNL4-3env-GFP 5 μ g 및 플라스미드-암호화 CHIKV 바이러스 외피 10 μ g를 사용하여, CHIKV-Env GFP (38) 위형을 생산하였다. 위형화된 VSV를 생산하였다. 슈도바이러스(Pseudovirion)를 4℃에서 1.5시간 동안 20% 수크로스 쿠션(cushion)을 통해 Sorvall Lynx 400 초고속 원심분리기(Thermo Scientific)에서 28,000 rpm에서의 초원심 분리 농축에 의해 농축하였다. 펠렛을 4℃에서 HBSS에서 밤새 재현탁시켰다. p24 ELISA 분석 후, 렌티바이러스 가성비리온을 정상화시켜서 동등한 수의 바이러스 입자를 함유하게 했다. 감염 24시간 전, 2.5×10^4 의 세포를 48-웰 플레이트에 시딩하였다. 세포를 감염 18시간 후 탈착시키고, PBS 중 1% PFA에서 10분 동안 고정시키고, 0.1% (w/v) 사포닌 세제 용액을 투과시켰다. CHIKV 감염 세포를 pCHIKV-IgG 투여 마우스의 혈청 및 Alexa 594-접합 염소 항-인간 IgG 제2 항체(Life Technologies)로 배양하였다. 감염을 유동세포 계수법(Becton-Dickinson)으로 평가하고, FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0490] 마우스에 IgG 투여 및 CHIKV 유발 연구.

[0491] Fab 및 전장 IgG의 생성, 정량화 및 기능의 특징화를 위해 B6.Cg-Foxnlnu/J(The Jackson Laboratory) 마우스를 사용하였다. 대퇴사두근을 통해 마우스에 pVax1 DNA(100 μ g), CHIKV-Fab DNA(VH 50 μ g 및 VL 50 μ g) 또는 CHIKV-IgG(100 μ g)의 총 부피 50 μ l를 주사하였다. DNA 플라스미드의 투여 직후, 최적화된 EP-매개 전달을 수행하였다(CELLECTRA® Inovio Pharmaceuticals, Inc.). EP 전달을 위한 펄스 매개변수는 1초 간격으로 52 밀리세컨드의 길이로, 0.5 Amp 고정전류의 3펄스였다.

[0492] CHIKV 유발 연구를 위해, 이전에 기술된 바와 같이, BALB/c 마우스에 CHIKV-Fab 또는 CHIKV-IgG 또는 빈 대조군 pVax1 플라스미드(100 μ g) 총 부피 100 μ l를 근육내로 주사한 직후, Opt-EP 매개 전달을 수행하였다. DNA 전달 2일 후, 총 1×10^7 PFU (25 μ l)의 CHIKV-De1-03(JN578247)(41)을 각 뒷발의 배근층의 피하경로를 통해 마우스에 유발하였다. 매일 0 내지 14 dpi의 디지털 측정계를 사용하여 족 부종(높이 X 너비)을 측정하였다. 유발 후 3주의 관찰 기간 동안 매일 생존여부 및 감염 징후(즉, 체중 감량 및 무기력 상태)에 대해 마우스를 모니터링하였다. 체질량을 30% 초과하여 잃은 동물은 마취시켜, 사이토킨 정량화 및 기타 면역 분석을 위해 혈청 시료를 채취하였다. 유발 7 내지 14일 후, 꼬리 출혈 부위 및 바이러스 혈증에서 혈액 시료를 채취하고, 플라크 분석(PFU/ml)에 의해 분석하였다. 2개의 독립적인 실험을 수행하였다.

[0493] 면역 사이토킨 분석.

[0494] CHIKV-Fab 또는 CHIKV-Ig 주사 및 바이러스성 면역반응이 유도된 마우스(유발 10일 후)에서 혈청을 채취하였다. ELISA 키트를 사용하여 제조업체의 사용설명서(R&D Systems)에 따라, TNF- α , IL-1 β , IP-10 및 IL-6 혈청 사이토킨 수치를 측정하였다.

[0495] CHIKV 중화 검정

[0496] CHIKV-Fab 또는 CHIKV-IgG 투여 마우스의 혈청 중 바이러스 중화 항체 역가 역가를 측정하였다. 간략하게, 배로

세포(American Type Culture Collection)를 96-웰 플레이트(Nunc)에 1웰당 15,000개 세포를 플레이팅하였다. 열-불활성 마우스 혈청의 연속 2배 희석물을 96-웰 플레이트에서 3중으로 제조하였고, CHIKV 바이러스 단리물 현탁액의 100 TCID₅₀을 각 웰에 첨가하였다. 37℃에서 1시간 배양한 후, 시료를 배로 세포 단일층에 첨가하여 3일 동안 배양하였다. 추후 배로 세포 단일층을 0.05% 결정 바이올렛, 20% 메탄올(Sigma-Aldrich)로 고정 및 염색하였다. 중화 역가를 상기 배로 세포 단일층이 전혀 손상되지 않고, 여전히 세포변성효과의 100% 억제력을 제공하는 최고 혈청 희석물의 역수로 발견되는 마지막 희석물의 역수를 취함으로써 측정하였다. GraphPad Prism 5 소프트웨어 패키지(GraphPad Software)로 그래프 및 통계를 생성하였다. S자 모양의 용량-반응(가변 기울기)으로 비선형 회귀 적합을 사용하여 IC₅₀을 결정하였다.

[0497] 통계학적 분석

[0498] 스튜던트 t-검증 또는 비매개변수의 Spearman 상관관계 검증을 사용하여, Graph Pad Prism 소프트웨어(Prism Inc.)로 통계학적 분석을 수행하였다. 대조군 및 실험군의 변수들 사이의 상관관계를 Spearman 순위 상관관계 검증을 사용하여, 통계학적으로 평가하였다. 모든 검증의 경우, 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주하였다.

[0499] 결과

[0500] CHIKV 단클론 항체의 작제물 및 작용성

[0501] CHIKV-Fab 및 전장 IgG 작제물을 발현 증가를 위해 최적화하였다. PubMed 이용가능한 서열(ascension number)로부터 생성된 CHIKV-Env에 특이적인 신규한 완전 인간 mAb를 합성하였다. 도 70A는 최적화된 항-CHIKV-Fab 및 CHIKV-IgG 플라스미드의 설계를 도시한다. 이후, CHIKV-Fab의 경우, VH 및 VL 유전자를 개별적으로 pVax1 플라스미드 벡터 내로 클로닝하였다.

[0502] 시험관내에서 생산된 CHIKV-Fab 및 IgG의 발현 및 기능을 조사하기 위해, 인간 293T 세포를 CHIKV-Fab 또는 CHIKV-IgG의 동량의 중쇄 및 경쇄 플라스미드 모두로 형질감염시키고, 감염된 세포로부터의 상청액을 형질감염 48시간 후에 수집하였다. 도 70B에서 표지된 바와 같이, CHIKV-Fab 또는 CHIKV-IgG 플라스미드로 감염된 세포들만이, 재조합 CHIKV 외피 단백질을 사용하고 CHIKV-Fab 또는 단일 전장 IgG의 2가지 플라스미드 설계가 적절히 조합된 기능적 CHIKV 항체를 시험관내에서 생성할 수 있음을 보여주는 결합 ELISA로 측정된 바와 같이, 측정가능한 수치의 항-CHIKV 항체를 생산하였다.

[0503] EP-매개 전달 후 CHIKV-IgG 의 증진된 생체내 발현 속도론 및 정량화

[0504] 단일클론 항체 전달을 위한 이러한 신규 DNA 전달 접근법을 규명하기 위해, 본 발명자들은 그 다음으로 생체내에서 기능성 CHIKV 항체를 생산하는 CHIKV-IgG의 능력의 효과를 시험하였고, 본 발명자들은 상기 기재된 전장 IgG 작제물을 사용하여 중요 연구를 수행하였다. 도 70C에 표시된 바와 같이, 근육내(IM) 주사로 B6.Cg-Foxnltm/J 마우스에 IgG 플라스미드 또는 pVax1 벡터를 투여한 직후, EP를 투여하였다. 비교용 CHIKV-IgG뿐만 아니라, 재조합 CHIKV-Env 단백질의 단일 투여 역시 마우스의 면역화를 실현하였다. 상기 실험 중엔 다양한 시점에 모든 마우스의 혈청을 채취하고, ELISA에 의해 표적 항원의 CHIKV 외피 단백질 결합을 측정하였다. CHIKV-IgG를 투여한 마우스는 CHIKV 외피 단백질과 결합할 수 있고, 투여 1-3일 후 유발된 항체를 검출가능한 수치로 생산하였고, 이때 재조합 CHIKV-Env 접종 마우스는 투여 8일 경에 나타났고(도 70D), 이는 기존의 단백질 투여보다 IgG 전달의 빠른 생성을 표지한다. 더욱이, 마우스에 EP와 함께 CHIKV-IgG의 단일 투여는 혈청에서 검출가능한 인간 CHIKV-Abs의 빠른 생성을 야기하였다. CHIKV-Abs의 혈청 수치는 5일에 600-800ng/mL를 획득하였고, 14일에 1300-1600ng/mL의 최고치에 도달하였고, 이후 35일까지 800ng/mL를 초과하는 수치를 유지하였다(도 70E). 생체내에서 생산된 CHIKV-IgG의 발현을 조사하기 위해, 접종 마우스에서 생산된 항-CHIKV 항체의 결합 특이성을 재조합 CHIKV 단백질을 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인한 결과, CHIKV-IgG의 IgG-플라스미드 설계가 적절히 절단되고 조합된 기능성 CHIKV-IgG 항체로서 생체내에서 생성할 수 있음을 보여주었다(도 70F). 이들 실험은 DNA 전달 CHIKV-단클론 항체가 시험관내에서 안정적일뿐만 아니라 동물에서 여러날 시간 경과에도 안정적이라는 증거를 제공한다.

[0505] CHIKV-감염 세포의 결합 특이성 및 면역조직염색(Immunohistochemistry)의 특징화

[0506] 본 발명자들은 예비 연구를 확대하고, 그 다음 신규한 DNA 전달 항-CHIKV 단일클론 항체의 치료 가능성을 규명하기 위해 감염을 사용하였다. CHIKV-abs는 특이적으로 CHIKV-Env에 결합하고, 기타 단백질에는 결합하지 않는다. CHIKV 감염 세포를 사용하여, ELISA, FACS 분석 및 면역조직염색을 결합함으로써, CHIKV-Abs의 특이성 및

표적 결합 특성을 평가하였다. CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Fab 항체를 주사한 마우스에서 14일 후 채취한 혈청의 검사된 연속 희석물들은 검출된 항체가 이의 표적 항원, 즉 CHIKV-Env 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고, 재조합 HIV-1 외피 단백질에는 결합할 수 없음을 입증하였다(도 71A). *생체내*에서 생산된 항-CHIKV-IgG 항체의 결합 특이성을 추가로 분석하기 위해, 마우스의 혈청을 미리 CHIKV 바이러스로 감염시킨 고정된 배로 세포로 배양하였다. 면역 형광 영상은 CHIKV 외피 단백질을 발현하는 세포 상에 결합된 항-CHIKV-IgG의 존재를 뚜렷하게 나타내나, 작제물 pVax1 단일 마우스의 마우스 혈청에서는 아니었다(도 71B). 또한, 감염된 세포에 대하여 *생체내*에서 생산된 항체를 FACS에 의해 분석하였다(도 71C). CHIKV-IgG 투여 마우스의 실험용 혈청 시료는 CHIKV-Env 표적 항원에 결합하였다.

[0507] CHIKV-IgG 주사 마우스 유래의 혈청은 임상적 CHIKV 단리물에 대한 넓은 중화 활성을 입증하였다

[0508] CHIKV-Ig 투여 마우스에서 채취한 혈청의 잠재적 항-CHIKV 활성을 평가하기 위해, 여러 CHIKV 단리물, 구체적으로, CHIKV 균주 Ross, LR2006-OPY1, IND-63WB1, Ross, PC08, Bianchi 및 DRDE-06에 대한 중화 활성을 측정하였다. IC₅₀ 값(적어도 50% 억제율을 야기하는 최고 혈청 희석물)을 각각의 바이러스 단리물에 대해 측정하였다(도 72A-F). CHIKV-IgG 주사 마우스의 혈청은 검사대상인 6개 바이러스 단리물 모두를 효과적으로 중화하였고, 이것은 단일 DNA 암호화 CHIKV-IgG 주사가 마우스 내 인간 항-CHIKV Ig의 중화 역가를 생산할 수 있음을 예증한다. 상기 결과는 CHIKV-IgG의 투여로 생성된 항체가 *생체내* 전달 후 관련된 생물학적 활성을 보였음을 나타내었다.

[0509] CHIKV-IgG이 높은 수치의 바이러스-특이적 항체 활성에 기여하고, CHIKV 유발에서 마우스를 보호하였다

[0510] 현재의 CHIKV 백신의 한계는 아마도 불충분한 면역원성으로 인해 지속적인 감염을 제거할 수 없다는 것이다 (45). 또한, 전통적인 백신접종은 유도기(lag period)가 필요하며 생산적인 면역 반응을 형성한다. 많은 연구들은 감염의 결과를 조절하는 핵심 인자로서 바이러스에 대한 초기 면역의 발달에 초점을 맞추었다(5, 20). 상기 CHIKV-IgG 작제물이 CHIKV에 초기 노출로부터 방어를 제공할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 여러 그룹의 마우스에 0일째에 CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Fab 플라스미드를 주사하고, 이어서 2일째에 바이러스로 유발하였다. 제3 그룹의 마우스는 빈 pVax1 플라스미드를 주사받아 음성대조군 역할을 하였다. 20일 동안 생존율 및 체중 변화를 기록하였다. pVax1 플라스미드가 주사된 마우스는 바이러스 유발 1주일 내에 모두 죽었다(도 73A). 면역반응이 유도된 마우스에서, CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Fab이 투여된 마우스에서 유발 후 20일 동안의 관찰 기간 동안 100% 생존율을 관찰하였다. 이것은 CHIKV 작제물 두 개 모두 전달 후 초기에 CHIKV에 대해 방어 면역을 부여할 수 있음을 나타낸다(도 73B).

[0511] 이후, CHIKV-IgG 및 CHIKV-Fab가 지속적인 방어 면역(방어 면역)을 생산하는지 여부를 후속 평가하였다. 여러 그룹의 마우스에서 CHIKV-IgG, CHIKV-Fab 또는 pVax1 플라스미드의 단일 주사 30일 후, CHIKV 바이러스로 면역 반응을 유도하였다. 그리고 나서, 마우스를 20일의 기간에 걸쳐 생존율을 모니터링하였다. 유발 후 관찰 기간 중에, CHIKV-Fab를 주사한 마우스는 50% 생존율을 나타낸 반면, CHIKV-IgG를 주사한 마우스에서 90% 생존율이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 SNAPi 전략 작제물 둘 모두가 체내에서 지속적인 방어 면역을 제공할 수 있으나, CHIKV-IgG에 의해 전달된 방어가 CHIKV-Fab 주사에 의한 것보다 좀 더 지속적이고 오래 갈 수 있음을 시사하였다(p=0.0075) (도 73C).

[0512] CHIKV와 같은 모기 유래 바이러스는 인간에게서 중증 뇌염을 유발시킬 수 있다 (7). 다양한 그룹으로부터의 이전 연구는 CHIKV를 이용한 마우스의 비강내, 피하 및 발바닥 감염과 같은 상이한 방식의 바이러스 투여가 감염 6-9일 이내에 높은 사망률을 야기한다는 것을 보여주었다(13, 14). 뿐만 아니라, CHIKV는 다양한 정도의 발병으로 마우스를 감염시킨 후 6-9일 내 높은 사망률을 야기한다. 바이러스 감염에 대한 CHIKV-항체 치료의 효능을 비강내 및 피하 바이러스 유발과 비교하기 위해 실험을 수행하였다. 각각의 pVax1 및 CHIKV-IgG에서의 20마리의 마우스를 단일 면역화시키고, 각 그룹 내의 마우스의 절반에게 CHIKV(25 μ l의 PBS)의 비강내 투여를 투여하고 마우스의 나머지에 2일에 CHIKV를 갖는 피하 주사를 투여하고, 체중 감소, 뒷다리 약화 및 혼수를 결정함으로써 CHIKV-IgG의 보호 효능을 측정하였다. 둘 모두를 하기와 같이 면역화하였다: 피하로 (도 73D) ($p < 0.0024$) 또는 비강내로 (도 73E) ($p < 0.0073$) (대조군 마우스와 비교하여 CHIKV 감염으로부터 유의한 보호를 제공함). 피하 유발을 받은 마우스는 비강 유발에 비해 평균 체중 감량에서 지연을 나타내었다. 상기 데이터를 모두 감안하면, 상기 결과들은 DNA 전달 CHIKV-IgG는 점막뿐 아니라 기존(피하) CHIKV 유발에 대해 보호할 수 있는 광범위하게 반응성을 갖는 중화 항체 반응을 생성하였다.

[0513] 바이러스 유발 시 즉각적이고 지속적인 CHIKV 특이적 IgG 의 평가

[0514] CHIKV-Fab 작제물과 동등하게 빠르고, 그러나 더 지속적인 방어 면역 반응을 *생체내*에서 생성하였음을 입증한

후, CHIKV-IgG에 의해 생성된 방어 효능을 전장 CHIKV 외피 단백질을 발현하는 기존 DNA 백신 플라스미드인 CHIKV-Env 플라스미드와 비교하였다 (17). 중요하게도, 기존 백신 전략이 표적 항원을 인식하고 반응하기 위해 숙주 면역체계에 의존하는 반면, SNAPi 작제물은 숙주 면역 반응과 독립적인 방어 면역을 제공한다. 이러한 차이를 고려할 때, SNAPi 작제물은 CHIKV에 대한 초기 노출로부터 보호성의 체액성 면역의 보다 즉각적인 공급원을 제공할 수 있다.

[0515] 따라서, 여러 그룹의 마우스에 CHIKV-IgG, CHIKV-Env 또는 pVax1의 단일 투여를 부여한 후, 플라스미드 면역 후 2일째에 CHIKV로 유발하였다(도 74A). CHIKV-Env 또는 pVax1이 투여된 마우스는 바이러스 유발 후 6일 내에 모두 죽은 반면, CHIKV-IgG로 면역화된 마우스에서는 100% 생존율을 관찰하였다(도 74B). 이것은 기존의 항원-생성 DNA 백신인 CHIKV-Env보다 CHIKV-IgG이 투여 후 훨씬 더 일찍 방어 면역을 부여하였음을 시사하였다.

[0516] CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env에 의해 생성된 항-CHIKV 반응의 기간을 추후에 평가하였다. CHIKV-Env에 의한 강력한 면역 반응의 유도를 보장하기 위해 상이한 면역화 요법을 활용하였다. 따라서, 35일째에 바이러스 면역반응 유발 전, 마우스에 0일째에 CHIKV-IgG의 단일 면역화, 또는 (0일, 14일 및 28일째에) CHIKV-Env의 다중 면역화 중 하나를 부여하였다. 제3 그룹의 마우스는 0일째에 단일 pVax1 예방주사를 맞았고, 35일째에 바이러스 유발하였다(도 74A, 그룹 II). CHIKV-Env를 이용한 다중-부스터 면역화 요법을 받은 마우스에 대해 100% 생존이 기록되었고(도 74C), 이는 앞서 동일한 DNA 백신의 단일 주사로 면역화된 마우스의 생존율과 현저히 대조적이며(도 74B), 이와 같은 발견은 항원 노출 후 전개되는 데 대략 2주가 걸리고 방어 면역을 생성하기 위해 종종 여러 차례의 항원 노출을 요구하는 적응성 면역 반응의 속도론과 일치한다.

[0517] 더욱이, 20일 관찰 기간 동안 CHIKV-IgG 접종된 마우스에서 90% 생존이 관찰되었고($p=0.0005$)(도 74C), 상기도면은 43일까지 CHIKV-IgG 면역화된 마우스에서 <80% 생존을 나타낸다. 그러나, 플라스미드/백신 투여 후 초기에 그리고 후기에 마우스 혈청에서 검출되는 인간 IgG의 상이한 수치들이 상기 유발 결과에 어떤 영향을 미칠 수 있는지 평가하였다. 항-CHIKV Env 특이적 인간 IgG는 CHIKV-IgG의 단일 주사 48시간 내에 검출가능하였고, 피크 수치는 주사 후 14일 경에 측정되었다(~1400ng/mL). 중요하게도, 인간 IgG는 제2일에 최초로 측정된 값보다 높은 수치로 주사 후 45일경에 여전히 검출가능하였다. 이와 같이 감소된 방어는 항-CHIKV IgG의 측정된 혈청 수치에 상응된다(도 74D). 방어 항체의 수치 감소는 항체의 정상적인 청소율(clearance) 때문일 수 있는데, 이것은 CHIKV-IgG의 수치가 재투여되지 않은 경우 확대된 기간 후 방어 미만의 수치로 약해질 수 있음을 시사한다. 요약하면, 이와 같은 발견은 CHIKV-IgG의 단일 주사이 다중 부스터 예방주사를 요구하는 기존 백신-유도 면역 반응과 질적인 측면 및 지속성에서 유사한 방어 반응을 생성할 수 있음을 시사한다.

[0518] CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env 면역화 후 지속적 및 전신성 항-CHIKV-Env 항체의 유도.

[0519] CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env 방어 반응이 CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env로 면역화된 마우스에서 모두 나타났다는 점을 감안하여, 상기 항체 수치를 평가하기 위해 추가의 보강적 연구를 수행하였다. 제0일에 BALB/c 마우스에 CHIKV-IgG DNA를 예방접종하거나, 또는 0, 14 및 21일에 CHIKV-Env DNA를 접종하였다. 도 74E는 CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Env로 예방접종된 마우스의 지정된 시점에서의 항-CHIKV IgG의 수치를 나타낸다. 중요한 차이점은, CHIKV-IgG-접종 마우스에서 항-CHIKV 인간 IgG를 측정하였고, CHIKV-Env-접종 마우스에서 항-CHIKV 마우스 IgG를 측정하였다는 것이다. 상기 결과들은 CHIKV-IgG-접종 마우스에서 인간 IgG의 초기 검출 및 빠른 증가를 보여준다. CHIKV-Env에 의해 유발된 마우스 IgG의 역가는 예방접종 2주 내에 유사한 피크 수치에 도달하지만, 더 느린 수치의 항체 생산을 주목할만하게 나타낸다.

[0520] 감염의 조절을 야기하는 CHIKV 바이러스 부하 및 사이토킨 수치 감소

[0521] 이전 연구는 CHIKV 바이러스 부하 및 전-염증성 사이토카인의 패널을 포함하여, CHIKV-관련 질환 중증도의 다수의 분자 상관관계를 확인하였다. 따라서, 바이러스 유발 후 초기에 그리고 후기에, CHIKV-IgG가 이와 같은 연관-질병 마커를 억제하는 능력을 평가하였다. CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Env 중 하나를 예방접종한 마우스의 혈청은 pVax1 대조군 동물과 비교하여 현저히 감소된 바이러스 부하를 보여주었다(각각 $p=0.0244$ 및 0.0221)(도 75A). 주목할만하게, CHIKV-IgG-접종 마우스는 CHIKV-Env 마우스와 비교할 만한 바이러스 부하 감소 수치를 나타내었다. 바이러스 유발 후 5일째에 CHIKV-IgG-접종 마우스 및 CHIKV-Env 접종 마우스에서 선택된 염증성 사이토킨(TNF- α 및 IL-6) 또한 측정하였다. pVax1-접종 동물과 비교할 때, CHIKV-IgG 및 CHIKV-Env는 양쪽 사이토킨 모두 초기 및 후기 시점에 유사한 수치까지 현저하게 감소시켰다(75B-C). CHIKV 바이러스, TNF- α , 및 IL-6의 혈청 수준이 질환 중증도와 상관관계가 있는 것으로 나타났기 때문에, 이러한 발견은 CHIKV-IgG를 이용한 단일 면역화가 전통적인 DNA 백신과 대등한 수준으로 CHIKV-관련된 병리학의 내구성 있는 수준의 보호를 제공할 수 있음을 시사한다.

- [0522] CTL이 바이러스 감염된 세포를 제거하는데 중요할 수 있으므로, 추가 분석은 백신-유도된 T-세포 반응의 평가를 수행하였고, 이는 총 T-세포 반응의 유의한 백분율로 구성되었음을 나타내며, 본 발명자들은 CHIKV-Env 면역화된 마우스에서 IFN- γ 수준을 시험하였고, 이는 CHIKV 펩티드 자극 후 IFN- γ 반응의 상대적으로 높은 백그라운드 수준을 나타내었으며 IFN-생산 세포는 모든 면역화된 마우스에서 검출되었다. 도 75D는 사전에 CHIKV-IgG, CHIKV-Env, 또는 둘 모두를 접종한 마우스에서의 T-세포 반응의 척도였다. 상기 결과는 CHIKV-Env가 강한 T 세포 반응을 유발하는 반면, CHIKV-IgG는 그렇지 않다는 것을 나타내는 것으로 보인다. 이 대안적인 다중모드 신규 접근법은 강력하고, 즉각적이며, 지속적인 전신 체액성 및 세포성 면역을 유발하였다.
- [0523] 이와 같은 CHIKV-Fab 및 CHIKV-IgG 연구에서, 전장 IgG의 빠른 생산은 투여 후 처음 48시간 내지 72시간 내에 주목되었다. 생산의 속도론 및 수치는 초기에 상기 항체의 Fab 및 IgG 형태에서 유사하며, 이것은 감염성 질병 예방에 중요한 요인이다. 항체 양상의 두 가지 형태 모두 예방접종 후 2일째에 치명적인 CHIKV 유발로부터 마우스를 방어하였다. 그러나, 보호의 차이는 마우스에게 백신 전달 후 더 늦은 시점(면역화 후 30일)에 투여되었을 때 분명하였다: CHIKV-IgG로 면역화된 마우스의 90%가 생존한 반면, CHIKV-Fab 면역화된 마우스에서는 50% 생존이 기록되었다. 따라서, 두 가지 항체 작제물 모두 전달 후 동일한 항원 특이성 및 빠른 발현을 보이지만, 전장 IgG가 Fab 작제물보다 더 긴 반감기를 입증하였고, 이것은 방어 면역을 지속시키는 데 필수적인 요소임이 입증되었다.
- [0524] CHIKV-Env로 불리는, CHIKV 감염에 대한 DNA 기반 백신은 이전에 생성되었다. 문헌[미국 특허 공개공보 제 2011/0104198호]를 참조한다. 마우스에 CHIKV-IgG 또는 CHIKV-Env 중 하나의 단일 용량을 주사하고, 2일 후 바이러스로 유발하는 경우, CHIKV-IgG 주사 그룹의 모든 마우스가 생존하였는데, 이것은 감염 후 마우스가 생존하지 못한 CHIKV-Env 그룹과 완전히 대조적이었다. 그러나 완전 예방접종 요법(3주에 걸쳐 3회 접종) 후, CHIKV-ENV에서 완전한 방어가 관찰되었다. 주목할만하게, 유사한 방어 수치가 CHIKV-IgG의 단일 용량을 투여한 마우스에서 나타났으나, 이와 같은 방어는 더 확장된 기간에 걸쳐 75% 생존율로 약화되었다. 이러한 발견은 각 플랫폼의 이점을 입증하며, 조합 접근법이 즉각적이고 지속적인 보호에 필요할 수 있음을 제안한다. DNA-기반의 백신은, 항-백터 면역을 방해하거나 생성하지 않기 때문에, 조합 접근법을 위한 이상적인 플랫폼을 제공한다. CHIKV 및 다른 병원균에 대한 신속하고 지속적인 면역을 제공하기 위한 수단으로서 SNAPi 플라스미드 및 전통적인 DNA 백신의 연속적인 또는 공동-전달은 현재 본 발명자의 실험실에서 활발히 연구되고 있는 분야이다.
- [0525] **실시예 19**
- [0526] **DNA 플라스미드-매개된 항체 유전자 전달을 사용한 DENV에 대한 교차반응성 중화 항체의 순환계 내로의 전달**
- [0527] Fc γ R 결합을 폐지하는 Fc 영역 돌연변이를 갖는, 항-DENV 인간 IgG1 nAb를 암호화하는 DNA 플라스미드의 근육 내 전달은 마우스를 바이러스-단독 DENV 감염 및 항체-항상된 치사 감염 모두로부터 보호한다.
- [0528] 항-DENV 항체 DV87.1 (DENV1-3을 중화할 능력이 있는 인간 IgG1 mAb)의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 고도로 최적화된 DNA 플라스미드를 설계 및 작제하였다. 2개의 최적화된 플라스미드를 구성하였다: DV87.1의 중쇄 및 경쇄에 대해 암호화된 pDVSF-3 WT 및 DV87.1의 Fc 영역-변형된 형식에 대해 암호화된 pDVSF-3 LALA(CH2 영역 중 2개의 루신-알라닌(LALA) 돌연변이에 의해 폐기된 Fc γ R 결합). 이것은 항체-의존성 감염증가를 제거하기 위해 수행되었다. 작제물 중 중쇄 및 경쇄 유전자는 퓨린 절단부위 및 P2A 자기공정 펩티드에 의해 분리하였다. 각각의 이식 유전자는 유전적으로 변형된 pVax1 포유류 발현 벡터로 최적화, 합성 및 서브클론되었다(도 76a)
- [0529] 플라스미드로 인간 배아 신장 (HEK) 293T 세포를 감염시켰고, 상기 상청액 중 분비된 항체 수치를 48시간 후 효소-결합 면역흡착법(ELISA)에 의해 정량화하였다(도 76b). pDVSF-3 WT 및 pDVSF-3 LALA 모두 인간 IgG 600ng/mL를 초래하였고, 이것은 플라스미드가 인간 IgG를 발현할 수 있음을, 그리고 LALA 변이가 시험관에서 항체 발현 수치에 어떤 영향도 미치지 않았음을 확인시켜준다. 적합한 항체 조립체를 확인하기 위해, 감염된 HEK293T 세포의 상청액에서 DVSF-3 및 DVSF-3 LALA 항체를 채취하고, 웨스턴 블롯 분석을 위해 SDS-PAGE 겔에 의해 분리하였다(도 76c). 상기 중쇄 및 경쇄 단백질은 예상 분자량이 측정되었는데, 이것은 적절한 단백질 절단 및 항체 조립체를 시사한다.
- [0530] 상기 항체의 생물학적 활성을 평가하기 위해, 우선 항체-함유 상청액이 재조합 DENV1-3 E 단백질에 결합할 수 있는지를 측정하는 결합 ELISA 분석을 수행하였다. DVSF-3 WT 또는 DVSF-3 LALA 항체 중 하나를 분비하는 HEK293T 세포의 상청액은 DENV1-3 E 단백질을 인지할 수 있었던 반면, DENV4는 예상대로 인지되지 못했다(도 79). 추가적으로, DVSF-3 WT- 및 DVSF-3 LALA-함유 상청액은 DENV1-3으로 감염된 벡로 세포를 염색할 수 있었던 반면, DENV4에 감염된 벡로 세포는 상기 상청액으로 염색되지 않았다(도 76d). 각 작제물은 DENV1-3의 시험

관내 중화를 나타내었으나(테이타 명시하지 않음), DVSF-3 WT은 Fc γ R-수반 인간 K562 세포의 DENV 감염을 증강시킨 반면, DVSF-3 LALA는 시험관내에서 이와 같은 ADE 활성이 없었다(도 79b).

[0531] 생체내 항체 생산 속도론을 조사하기 위해, 누드 마우스에서 DNA 플라스미드-암호화된 인간 IgG 발현(면역-적응 숙주에서의 항체 발현을 모형화함)의 기간을 측정하였다. 상기 마우스에 또 다른 인간 IgG1 항-DENV 항체(DVSF-1 WT)를 암호화하는 DNA 플라스미드 100 ug을 근육내로 주사한 직후, EP를 주사하였다. 상기 혈청 중 인간 IgG 농도는 주사 후 5일 내에 검출가능하였고, 주사 후 2주에 피크 수치 ~1000ng/mL을 측정하였다(도 2a, 좌측 패널). 인간 IgG 발현 기간은 적어도 19주간 지속되었고(도 77a, 우측 패널), 이는 DNA 플라스미드로 달성될 수 있는 지속적인 발현 수준을 나타낸다. 마우스 DENV 유발 모형이 129/Sv 배경의 마우스를 사용한다는 점을 감안할 때, 이와 같은 배경의 군주에서 혈청에서 검출가능한 수치의 DVSF-3 WT 또는 LALA의 생산을 측정하기 위해 항체를 암호화하는 DNA 플라스미드 작제물을 연구하였다. pDVSF-3 WT 또는 pDVSF-3 LALA를 주사받은 129/Sv 마우스의 혈청은 비교할만한 인간 IgG 수치를 나타내었고(도 77b), DENV1-3에 감염된 벼로 세포를 염색하였다(도 77c). 부가적으로, WT 및 LALA-함유 혈청 모두 DENV1-3을 중화할 수 있었다(도 77d).

[0532] DNA 플라스미드-암호화된 항-DENV 중화 mAb를 발현하는 마우스가 DENV 투여로부터 보호되는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 유형 I 및 유형 II 인터페론(IFN) 수용체가 결여되고, DENV 감염시, 인간 질환의 많은 측면을 반복하는 AG129 마우스 모델을 이용하였다. 중요하게도, 이와 같은 마우스는 또한 감염을 증가시키는 낮은 용량의 혈청형-특이성 및 교차 반응성 항체로, ADE를 나타내었다. 이와 같은 연구들을 위해, 마우스는 마우스-맞춤 DENV2 균주 S221로 감염시켰고, 이것은 (감염 4~6일 후) 아-중화량의 항-DENV mAb 2H2의 존재 하에, 치명적인 것에 가까운 용량으로 AG129 마우스에서 항체-증강 중증 질병 및 급성 치사(lethality)를 유발한다.

[0533] pDVSF-3 LALA를 발현하는 AG129 마우스가 바이러스-단독 감염 및 항체-의존 감염 증강(ADE)으로부터 방어될 수 있는지 여부를 결정하기 위해, AG129 마우스에 pDVSF-3 WT 또는 pDVSF-3 LALA의 단일 근육내 주사를 부여한 직후, EP를 주사하였다. 음성대조군은 pVax1 빈 벡터의 단일 근육내 주사를 부여받은 후, EP를 주사받았다. 5일 후, 상기 마우스에서 외인성 항-DENV mAb 2H2의 존재 하에(ADE) 또는 부재 하에(바이러스-단독 감염), 치사량에 가까운 용량(1×10^9 GE)의 DENV2 S221로 유발하였다. 상기 pDVSF-3 WT, pDVSF-3 LALA 및 pVax1 집단의 마우스는, 유발 하루 전에, 각각 평균 인간 IgG 농도 750ng/mL, 1139ng/mL, 및 검출불가능 수치를 나타내었다(보충 도면 2; pDVSF-3 WT 및 pDVSF-3 LALA를 비교할 때, $p \leq 0.0930$). 바이러스-단독 감염 조건 하에서, pDVSF-3 WT-처리 마우스는, DENV와 DVSF-3 WT 항체에 의해 형성되는 면역 복합체가 감염 증가¹⁴를 야기해야 하기에, ADE 및 급성 치사를 경험할 것으로 기대되었다. 반면, pVax1- 및 pDVSF-3 LALA-처리 마우스는 중증 질병으로 방어될 것으로 기대되었다. 사실상, pDVSF-3 LALA-처리된 마우스 6마리 중 5마리가, 그리고 pVax1 마우스 5마리 모두 중증 질병에서 방어되었다; 모든 pDVSF-3 WT-처리 마우스는 5일째에 질병에 굴복하였고(도 78a; pDVSF-3 LALA 및 pDVSF-3 WT을 비교할 때, $p \leq 0.0084$), 이것은 바이러스-단독 감염에 대한 pDVSF-3 LALA의 방어 능력을 입증하였다. ADE 조건 하에서, pDVSF-3 WT- 및 pVax1-처리 마우스 모두 감염 증강으로 인한 급성 치사를 경험할 것으로 기대되는 반면, pDVSF-3 LALA-처리 마우스는 중증 질병으로부터 방어되어야 한다. pDVSF-3 LALA를 주사받은 마우스 5마리 모두 ADE 조건 하에서 생존한 반면, pDVSF-3 WT 또는 pVax1 빈 벡터를 주사받은 마우스는 모두 4~5일 내에 급성의 항체-증강 질병에 굴복하였다(도 78b; pDVSF-3 LALA 및 pDVSF-3 WT를 비교할 때, $p \leq 0.0072$). 종합하면, 이들 데이터는 pDVSF-3 LALA의 주사가 바이러스-단독 및 ADE 병태 모두에서 중증 질환을 예방한다는 것을 보여주며, 이는 이 플랫폼으로부터 기능성 항체를 정확하게 처리하고 발현하는 근육의 개념을 뒷받침한다.

[0534] 변형된 인간 항-DENV1-3 중화 항체를 암호화하는 DNA 플라스미드의 단일 근육내 주사는 바이러스-단독 및 항체-증강 DENV 질병으로부터 마우스를 방어할 수 있었다. SNAPi에 의해 발현된 중화 항-DENV mAb에 의해 전달되는 방어는 속도가 빠르고, pDVSF-3 LALA 투여 후 일주일 내에 면역반응이 유도된 마우스에서 완전한 생존율을 나타내었다. 추가로, 플라스미드-암호화된 항체 전달은 전달 후 5일 내에 방어 효과를 제공하는데, 이것은 백신으로 유도되는 방어보다 유의미하게 훨씬 더 빠른 것이었다.

[0535] 보호성 Fc 영역-변형된 LALA 항체를 암호화하는 DNA 플라스미드의 능력은 DENV 백신접종 또는 자연 감염시 ADE-예방 항체 변이체를 생산하는 본 발명자들의 면역 체계의 능력 때문에 신규하다.

[0536] 다가 DENV 백신

[0537] DENV 혈청형이 중화¹⁵를 벗어나는 것으로 나타났다는 것을 고려할 때, 본 발명자들의 전략은 예방을 위해 DENV 바이러스 상의 다수의 에피토프를 표적화하는 항체 콕테일을 설계하는 것이다. 129/Sv 마우스에 한쪽 다리에

pDVSF-3 WT(항-DENV1-3)를 다른 다리에 pDVSF-1 WT (항-DENV1-4)을 주사하였다. 두 가지 플라스미드를 주사한 마우스는 단일 플라스미드를 주사받은 마우스와 비교하여, 7일째에 유의미하게 더 높은 혈청 인간 항체 수치를 나타내었다(도 81; pDVSF-1 WT 및 pDVSF-1+3을 비교할 때, $p = 0.0088$; pDVSF-3 WT 및 pDVSF-1+3을 비교할 때, $p = 0.0240$). 더욱이 두 가지 플라스미드를 주사한 마우스의 혈청은 4가지 DENV 혈청형 모두로 감염된 벼로 세포를 염색하였다(데이터가 명시되지 않음).

[0538] 실시예 20

[0539] 항-PSMA 항체를 이용한 종양 공격

[0540] DNA 플라스미드로부터 발현된 실시예 17의 항-PSMA 항체를 종양 공격 연구에서 조사하였다. 구체적으로, C57BL/6 마우스의 3개의 그룹에게 마우스당 1×10^6 TRAMP-C2 세포를 피하로 접종하였다. 각 그룹에 10마리의 마우스가 있었다. 종양 이식 후 5일에, 대조군을 100 μ g의 pVax1 플라스미드로 면역화시키고, 하나의 실험군을 100 μ g의 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화시켰다. 두 번째 실험군을 종양 이식 후 7일에 100 μ g의 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화시켰다. 도 89는 각 그룹에 대한 종양 이식 및 면역화의 각각의 시각표를 예시하는 개요도를 나타낸다. 종양을 매주 도 89에 표시된 시점에 측정하였다.

[0541] pVax1-면역화된 그룹의 모든 마우스는 종양을 발생시켰다(10/10, 100%; 도 90). 항-PSMA, 5일-면역화된 그룹 내의 마우스의 절반은 종양을 발생시켰다(5/10, 50%; 도 91). 항-PSMA, 7일-면역화된 그룹 내의 마우스의 약 1/3은 종양을 발생시켰다(3/10, 30%; 도 92).

[0542] 추가 분석을 수행하여 마우스의 각 그룹의 평균 종양 부피를 결정하였다. 이 분석은 pVax1 플라스미드로 면역화된 그룹과 비교하여 항-PSMA DNA 플라스미드로 면역화된 두 그룹에서 종양 크기의 감소를 입증하였다. 도 93을 참고한다. 도 93 및 도 94. 도 93은 상기 3개의 그룹으로부터의 마우스 및 이들 각각의 종양의 이미지를 나타낸다. pVax1-면역화된 그룹 및 항-PSMA, 7일-면역화된 그룹 사이에 통계학적으로 상이한 종양 크기가 관찰되었다($p=0.0184$, 도 94).

[0543] 이러한 결과는 항-PSMA 항체를 발현한 DNA 플라스미드의 투여가 종양 부피를 감소시켰다는 것을 나타내었다. 공 DNA 플라스미드 pVax1이 수혜자 마우스에서 종양 부피를 감소시키지 않았으므로, 이러한 관찰은 항-PSMA 항체를 발현하는 DNA 플라스미드에 의존적이었다. 요약하면, 탈푸코실화되고 증가된 ADCC 활성을 나타낸 항-PSMA 항체를 암호화하는 DNA의 전달은 이 항체의 발현을 야기하였고, 이 DNA를 받는 마우스에서 종양 부피를 감소시켰다.

[0544] 도 100a-100d는 또한 PSMA-dMAb가 TRAMP-C2 종양 공격 마우스 모델에서 항종양 면역을 유도한다는 것을 보여준다. 도 100a는 C57BL/6 마우스 내로 종양 투여 및 pVax1 또는 PSMA-dMAb 플라스미드 투여의 개요를 보여준다. 마우스는 그들의 우측 옆구리에 피하로 1×10^6 TRAMP-C2 세포를 받은 다음, 1주 후 마우스의 근육내로 접종된 100 μ g의 플라스미드를 받은 다음, EP를 받았다. 도 100b는 종양 투여 후 10주까지 캘리퍼스로 매주 측정된 종양 부피를 나타낸다. PSMA-dMAb 플라스미드로 접종된 마우스는 지연된 종양 성장을 나타내었다. 도 100c는 종양 투여 후 50일에 pVax1 및 PSMA-dMAb 그룹으로부터 종양을 갖는 대표적인 마우스를 나타낸다. 도 100d는 PSMA-dMAb 투여 전 항-NK1.1 IgG의 단일 주사를 이용한 NK 세포의 고갈이 종양 살상에 대한 PSMA-dMAb의 보호 효과를 폐지하였음을 보여준다.

[0545] 앞서 상세한 설명 및 이에 따른 실시예들은 단순히 예시적인 것으로, 첨부된 청구항 및 이의 등가물에 의해서만 정의되는, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 받아들여져서는 안 된다는 점이 이해될 것이다.

[0546] 본원에 개시된 구현예에 다양한 변경 및 수정은 당해기술의 숙련자에게는 명백해보일 것이다. 이와 같은 변경 및 수정은, 비제한적으로 화학구조식, 치환체, 유도체, 중간물질, 합성, 조성물, 제형, 또는 본 발명의 사용 방법등과 관련된 것이 포함되는데, 본원의 원칙 및 범위에서 벗어나지 않게 이루어질 수 있다.

[0547] 조항 1. 대상체에서 합성 항체를 생성하는 방법으로, 상기 방법이 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 재조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 발현되어 상기 합성 항체를 생성하는, 방법.

[0548] 조항 2. 조항 1에 있어서, 상기 항체가 중쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편 및, 경쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.

[0549] 조항 3. 조항 2에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편이 제1 핵산 서열에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 폴리펩티드, 또는 이의 단편이 제2 핵산 서열에 의해 암호화되는, 방법.

- [0550] 조항 4. 조항 3에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 상기 제1 핵산 서열 및 상기 제2 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0551] 조항 5. 조항 4에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 단일 전사물로서 상기 대상체에서 상기 제1 핵산 서열 및 상기 제2 핵산 서열을 발현하기 위한 프로모터를 추가로 포함하는, 방법.
- [0552] 조항 6. 조항 5에 있어서, 상기 프로모터가 거대세포바이러스(CMV) 프로모터인, 방법.
- [0553] 조항 7. 조항 5에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 제3 핵산 서열을 추가로 포함하되, 제3 핵산 서열이 상기 제1 핵산 서열 및 상기 제2 핵산 서열 사이에 위치하는, 방법.
- [0554] 조항 8. 조항 7에 있어서, 상기 대상체의 프로테아제가 프로테아제 절단 부위를 인식하고 절단하는, 방법.
- [0555] 조항 9. 조항 8에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 발현되어 항체 폴리펩티드 서열을 생성하되, 상기 항체 폴리펩티드 서열이 상기 중쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편, 상기 프로테아제 절단 부위, 및 상기 경쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편을 포함하되, 상기 대상체에 의해 생산된 프로테아제가 상기 항체 폴리펩티드 서열의 프로테아제 절단 부위를 인식하고 절단함으로써, 절단된 중쇄 폴리펩티드 및 절단된 경쇄 폴리펩티드를 생성하고, 상기 합성 항체가 상기 절단된 중쇄 폴리펩티드 및 상기 절단된 경쇄 폴리펩티드에 의해 생성되는, 방법.
- [0556] 조항 10. 조항 4에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 제1 전사물로서 제1 핵산 서열을 발현하기 위한 제1 프로모터 및 제2 전사물로서 제2 핵산 서열을 발현하기 위한 제2 프로모터를 포함하되, 제1 전사물이 제1 폴리펩티드로 번역되고 제2 전사물이 제2 폴리펩티드로 번역되고, 상기 합성 항체가 상기 제1 및 제2 폴리펩티드에 의해 생성되는, 방법.
- [0557] 조항 11. 조항 10에 있어서, 상기 제1 프로모터 및 상기 제2 프로모터가 동일한 것인 방법.
- [0558] 조항 12. 조항 11에 있어서, 상기 프로모터가 거대세포바이러스(CMV) 프로모터인, 방법.
- [0559] 조항 13. 조항 2에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드가 가변 중쇄 영역 및 고정 중쇄 영역 1을 포함하는, 방법.
- [0560] 조항 14. 조항 2에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드가 가변 중쇄영역, 불변 중쇄영역 1, 경첩영역, 불변 중쇄영역 2 및 불변 중쇄영역 3을 포함하는, 방법.
- [0561] 조항 15. 조항 2에 있어서, 상기 경쇄 폴리펩티드가 가변 경쇄영역 및 불변 경쇄영역을 포함하는, 방법.
- [0562] 조항 16. 조항 1에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 Kozak 서열을 추가로 포함하는, 방법.
- [0563] 조항 17. 조항 1에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 면역글로불린 (Ig) 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 방법.
- [0564] 조항 18. 조항 17에 있어서, 상기 Ig 신호 펩티드가 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함하는, 방법.
- [0565] 조항 19. 조항 1에 있어서, 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 1, 2, 5, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 및 80의 아미노산 서열 중 적어도 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 방법.
- [0566] 조항 20. 조항 1에 있어서, 재조합 핵산 서열은 서열 번호: 3, 4, 6, 7, 40, 42, 44, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 63 및 79 중 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 방법.
- [0567] 조항 21. 한 대상체에서 합성 항체를 생성하는 방법으로, 상기 방법이 중쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 제1 재조합 핵산 서열, 및 경쇄 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 제2 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 제1 재조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 발현되어 제1 폴리펩티드를 생성하고 상기 제2 재조합 핵산이 상기 대상체에서 발현되어 제2 폴리펩티드를 생성하고, 상기 합성 항체가 상기 제1 및 제2 폴리펩티드에 의해 생성되는, 방법.
- [0568] 조항 22. 조항 21에 있어서, 상기 제1 재조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 상기 제1 폴리펩티드를 발현하기 위한 제1 프로모터를 추가로 포함하고, 상기 제2 재조합 핵산 서열이 상기 대상체에서 상기 제2 폴리펩티드를 발현하기 위한 제2 프로모터를 추가로 포함하는, 방법.
- [0569] 조항 23. 조항 22에 있어서, 상기 제1 프로모터 및 제2 프로모터가 동일한 것인 방법.
- [0570] 조항 24. 조항 23에 있어서, 상기 프로모터가 거대세포바이러스(CMV) 프로모터인, 방법.
- [0571] 조항 25. 조항 21에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드가 가변 중쇄 영역 및 고정 중쇄 영역 1을 포함하는, 방법.

- [0572] 조항 26. 조항 21에 있어서, 상기 중쇄 폴리펩티드가 가변 중쇄영역, 불변 중쇄영역 1, 경첩영역, 불변 중쇄영역 2 및 불변 중쇄영역 3을 포함하는, 방법.
- [0573] 조항 27. 조항 21에 있어서, 상기 경쇄 폴리펩티드가 가변 경쇄영역 및 불변 경쇄영역을 포함하는, 방법.
- [0574] 조항 28. 조항 21에 있어서, 상기 제1 재조합 핵산 서열 및 상기 제2 재조합 핵산 서열이 Kozak 서열을 추가로 포함하는, 방법.
- [0575] 조항 29. 조항 21에 있어서, 상기 제1 재조합 핵산 서열 및 상기 제2 재조합 핵산 서열이 면역글로불린 (Ig) 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 방법.
- [0576] 조항 30. 조항 29에 있어서, 상기 Ig 신호 펩티드가 IgE 또는 IgG 신호 펩티드를 포함하는, 방법.
- [0577] 조항 31. 한 대상체에서 질병을 예방 또는 치료하는 방법으로, 상기 방법이 조항 1 또는 21의 방법에 따라 대상체에서 합성 항체를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0578] 조항 32. 조항 31에 있어서, 상기 합성 항체가 외래 항원에 특이적인, 방법.
- [0579] 조항 33. 조항 32에 있어서, 상기 외래 항원이 바이러스에서 유도된 것인 방법.
- [0580] 조항 34. 조항 33에 있어서, 상기 바이러스가 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 치쿤균야 바이러스(CHIKV) 또는 뎅기 바이러스인, 방법.
- [0581] 조항 35. 조항 34에 있어서, 상기 바이러스가 HIV인, 방법.
- [0582] 조항 36. 조항 35에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 1, 2, 5, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55 및 57의 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0583] 조항 37. 조항 35에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 3, 4, 6, 7, 50, 52, 55, 56, 62, 63 및 63의 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0584] 조항 38. 조항 34에 있어서, 상기 바이러스가 CHIKV인, 방법.
- [0585] 조항 39. 조항 38에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 59 및 61의 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0586] 조항 40. 조항 38에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 58 및 60의 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0587] 조항 41. 조항 34에 있어서, 상기 바이러스가 뎅기 바이러스인, 방법.
- [0588] 조항 42. 조항 41에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 45, 70, 74 또는 78의 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0589] 조항 43. 조항 41에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 44, 69, 73, 또는 77의 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0590] 조항 44. 조항 31에 있어서, 상기 합성 항체가 자기-항원에 특이적인, 방법.
- [0591] 조항 45. 조항 44에 있어서, 상기 자기-항원이 Her2인, 방법.
- [0592] 조항 46. 조항 45에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 41 및 43의 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0593] 조항 47. 조항 45에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 40 및 42의 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0594] 조항 48. 조항 44에 있어서, 상기 자기-항원이 PSMA인, 방법.
- [0595] 조항 49. 조항 48에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 80의 적어도 하나의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [0596] 조항 50. 조항 48에 있어서, 상기 재조합 핵산 서열이 서열 번호: 79의 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는, 방법.

- [0597] 조항 51. 제2항에 있어서, 류신에서 알라닌으로의 2개의 돌연변이가 Fc 영역의 CH2 영역에 도입되는 방법.
- [0598] 조항 52. 제2항에 있어서, 생체내에서 생산된 항체가 탈푸코실화된 방법.
- [0599] 조항 53. 조항 1 내지 조항 52의 방법들 중 하나에 의해 생산된 생성물.
- [0600] 조항 54. 조항 53에 있어서, 상기 생성물이 기능성 항체를 발현할 수 있는 단일 DNA 플라스미드인 것인 생성물.
- [0601] 조항 55. 조항 53에 있어서, 상기 생성물이, 체내에서 조합되어 기능성 항체를 형성하는 기능성 항체의 성분들을 발현할 수 있는 2 이상의 별개의 DNA 플라스미드로 이루어진 것인 생성물.
- [0602] 조항 56. 병원체에 의한 감염에서 대상체를 치료하는 방법으로, 상기 병원체에 특이적인 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0603] 조항 57. 조항 56에 있어서, 상기 병원체의 항원을 투여하여 상기 대상체에서 면역 반응을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0604] 조항 58. ADCC를 유도하는 암 마커를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 투여하는 것을 포함하는, 대상체를 암으로부터 치료하는 방법.
- [0605] 조항 59. 서열 번호: 79에 제시된 핵산 서열의 전장에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자.
- [0606] 조항 60. 서열 번호: 79에 개시된 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자.
- [0607] 조항 61. 서열 번호: 80에 제시된 아미노산 서열의 전장에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자.
- [0608] 조항 62. 서열 번호: 80에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 합성 항체를 암호화하는 핵산 분자.
- [0609] 조항 63. 조항 59 내지 62 중 어느 한 조항에 있어서, 상기 핵산 분자가 발현 벡터를 포함하는, 핵산 분자.
- [0610] 조항 64. 조항 59 내지 62 중 어느 한 조항의 핵산 분자를 포함하는 것인 조성물.
- [0611] 조항 65. 조항 64에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

도면

도면1

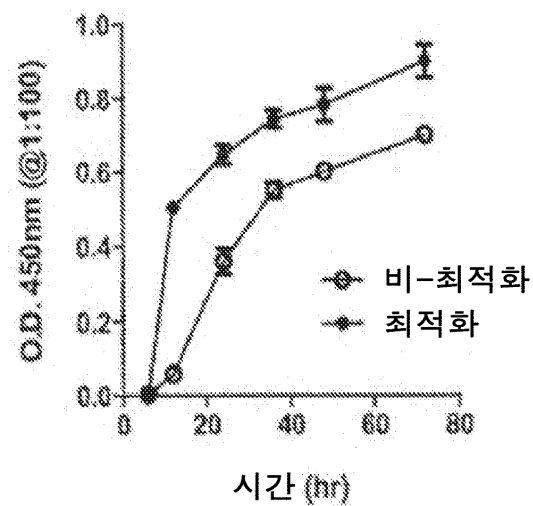
IgG 중쇄를 암호화하는 최적화된 헤산 서열

GGATCCGCCACCATGGAAACCGACACTCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCGGCTCAACAGGCGACGGC
 GCTCAGGTCCAGCTGGTCCAGTCTGGAGCTGTGATCAAGACCCCTGGCAGCTCCGTCAAAATTTCTTGCAGAGCAAGTG
 GCTACAACTTCCGGACTATAGCATCCACTGGGTGGGTGATCTCTGATAAGGATTTGAGTGGATCGGCTGGATCAA
 GCCACTGTGGGGCGCTGTGTCTACGCAAGCAGCTGCAGGGGCGCTCTCCATGACACGACAGCTGTCTCAGGACCC
 AGACGATCCCGATTGGGGGTGGCTACATGGAGTTCACTGGACTGACTCCCGCAGACACCCCGCAATATTTTTCGTG
 CGGAGAGGCTCTCGGACTACCTGGGATTTCCATGGCAGTATGGTGTGAGGGAACCTGGTCTGGTCTCTAGTG
 CATCAACCAAGGGCCCAAGGTGTTTCTCTGGCCCCATCAAGCAAAAGTACATCAGGAGGAACCTGCAGCTCTGGGAT
 GTCTGGTGAAGGATTAATCTCCCGAGCTGTGACCTGTGACCTCAGCTGGAACTCCGGAGCACTGACCTCCGGAGTGACACAT
 TCCCGCTGTCTGCAGTCTCTGGGCTGTACTCTGTAGTTCACTGGTTCACAGTGCCTAGCTCTCTCTGGGCACCCAGA
 CATATATCTGCAACGTCAATCATAGCCCAAGTAACTAAAGTGGACAAAGAAAGTGCGAACCCAAATCATGTACCCCT
 ATGACGTGCTGATTATGCTTGGATTAATCTCGAG (서열 번호:6)

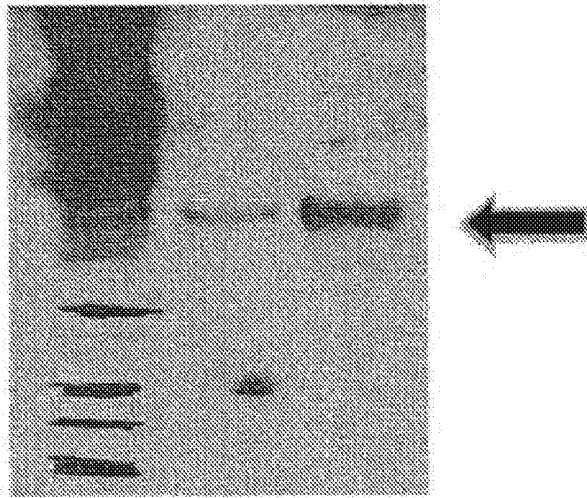
도면2

lgG 경채를 암호화하는 최적화된 핵산 서열
GGATCCGCCACCATGGAGACTGATACACTGCTGTGGTGTCTGTGTGGTGCCTGGCTCAACCGGCGACGGG
GCTCAGGTCCAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCATCCTGTCTACTGAGCCAGGAGACCGCAACACTGTTCTGCA
AGGCCTCCAGGGCGGAACGCTATGACATGGTACAGAAACGGAGAGGACAGGTGCCCGACTGCTGATCTATGACA
CTTCAAGGCGAGCAAGCGAGTGCCTGATCGATTGTGGCAGCGGCTCTGGACAGACTTCTTCTGACTATTAAATAA
GCTGGACAGAGAGGATTTCGCTGTGTAATTTGCCAGCAGTTTGAATTTCTTGGACTGGGCAGCGAGCTGGAAGTGCAC
AGGACCGTCGCCCTCCAAAGTGTGTCTATTTTCCCTTACCGATGAGCAGCTGAAATCCGGGACAGCTCTGTGGTCT
GTCTGTGAACAATTTCTACCCCGCGAAGAAAGGTGCAAGTGGAAAGTCGAAACGCCCTGCAGAGTGGCAATTCAC
AGGAGAGCGTGACCGAACAGGACTCCAAAGGATTCTACATATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCCTGTCTAAAGCTGATT
CGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCCAAGTCACTCATCAGGGCCCTGTCTAGTCTGTGACCAAGAGCTTTAACCCGAGG
GGAGTGTACCCATATGACGCTCCCGATTACGCCCTGAATAACCTCGAG (서열 번호:7)

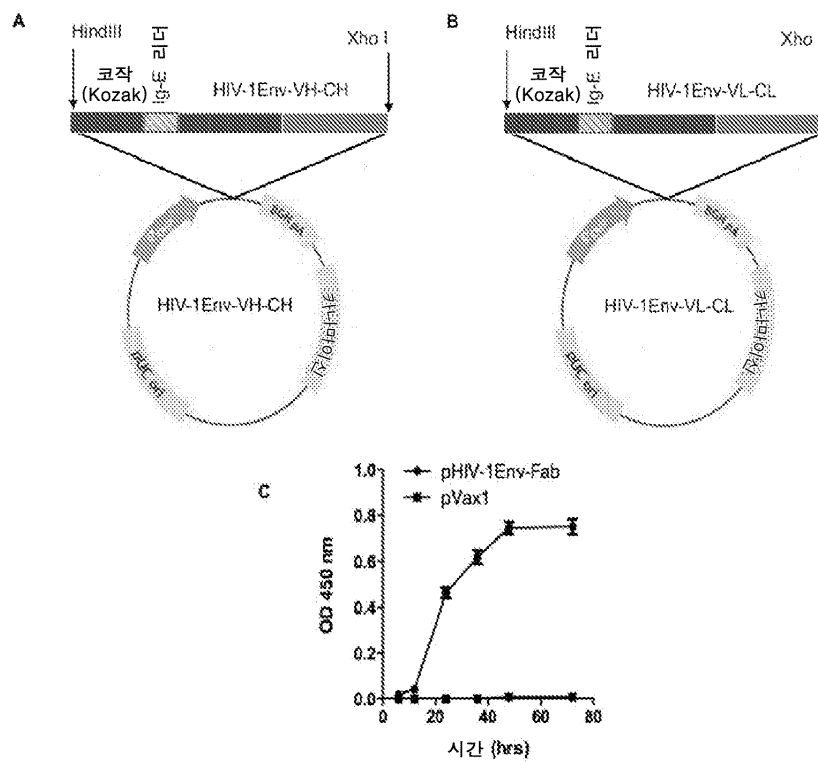
도면3



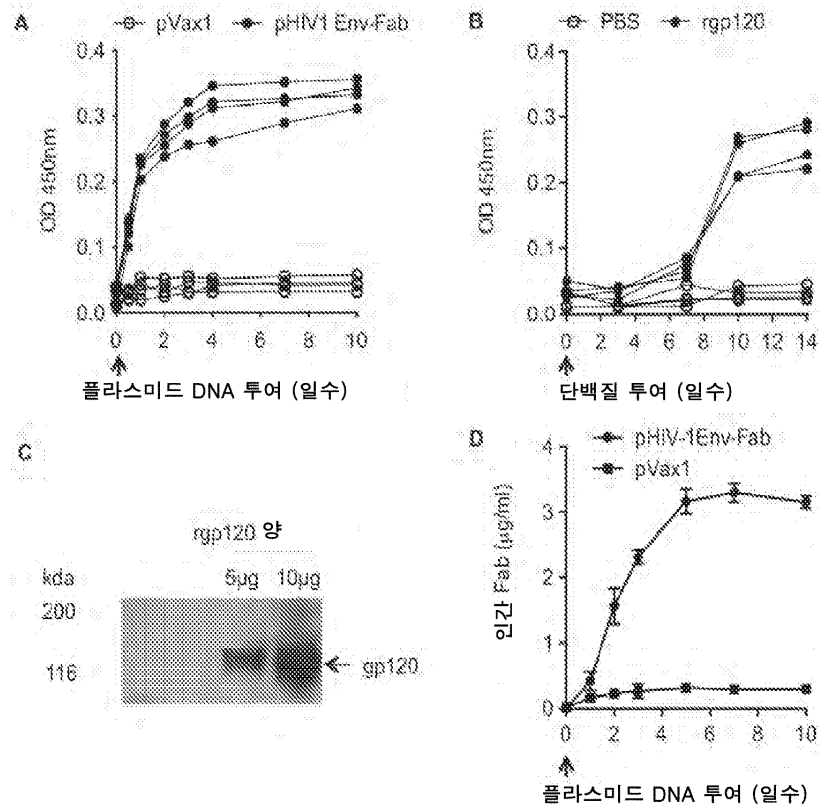
도면4



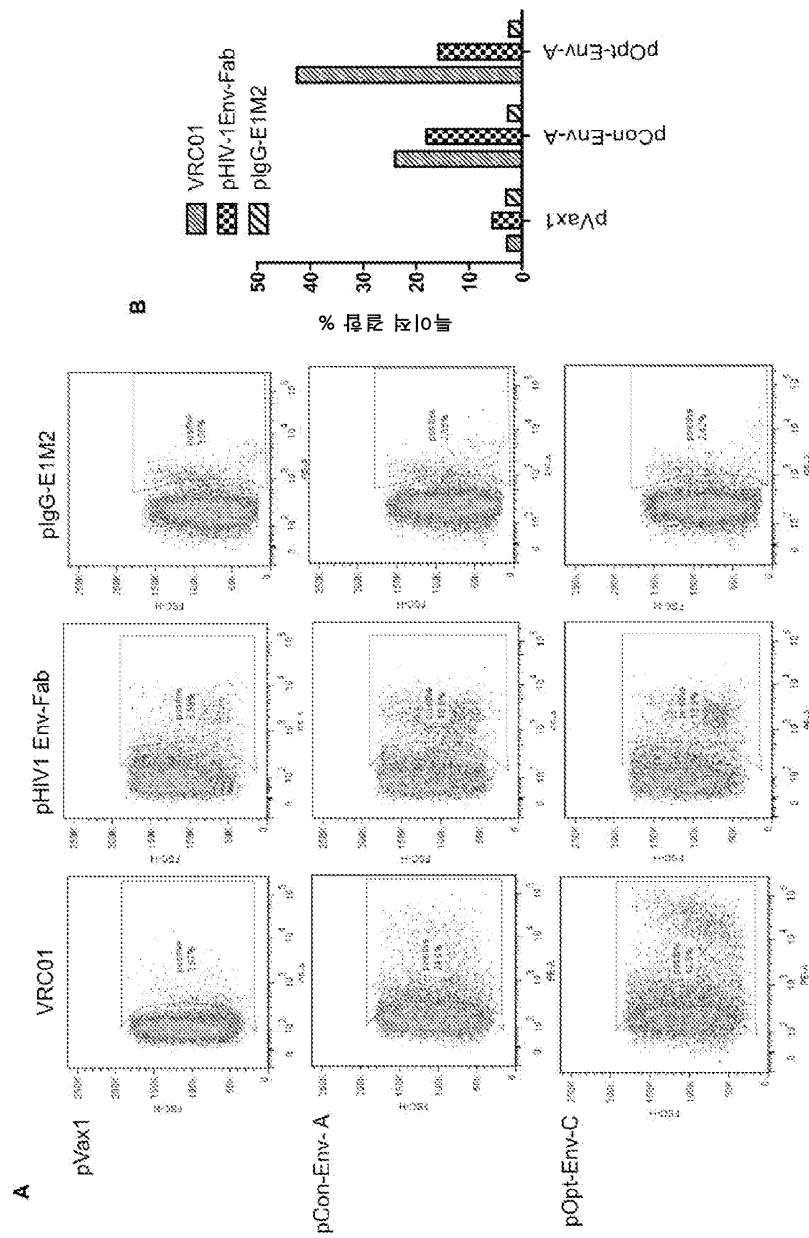
도면5



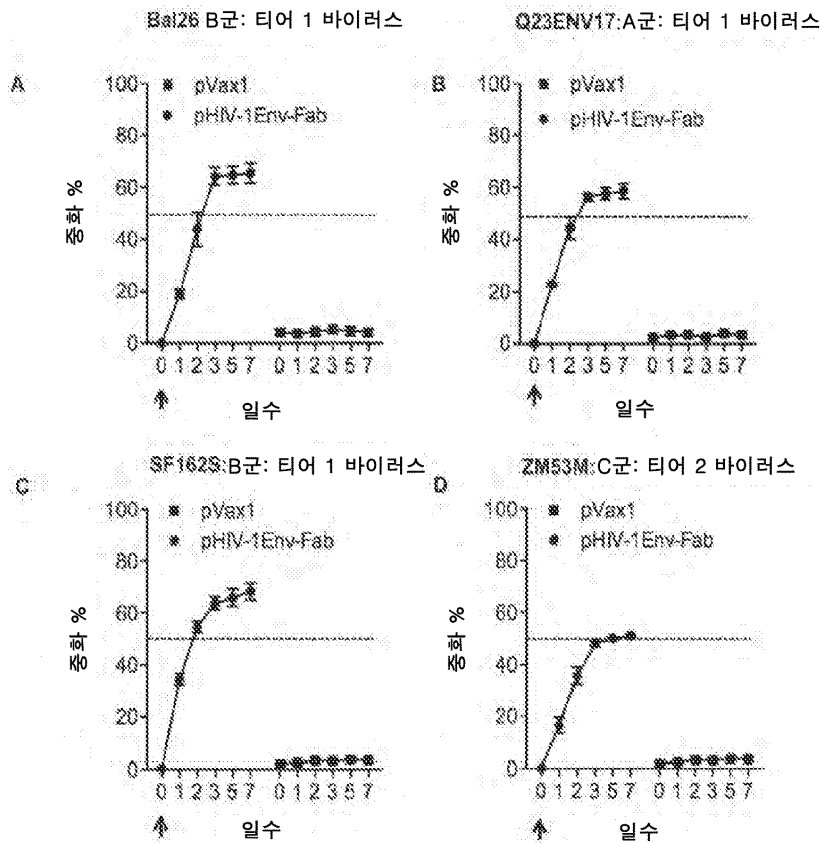
도면6



도면7



도면8



도면9

HIV-1 Env Fab의 중쇄 (VH-CH1)를 암호화하는 핵산 서열

AAGCTTGGCCGCCACCATGGAGACTGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG
GTGCCAGGGTCAACCGGAGATGGGGCTCAGGTCCAGCTGGTCCAGAGCGGCGGACA
GATGAAGAAACCCGGCGAGAGCATGAGGATCTCCTGCAGAGCATCTGGATACGAGT
TCATCGACTGTACCCTGAACTGGATTAGGCTGGCTCCTGGAAAGAGACCAGAGTGG
ATGGGGTGGCTGAAACCACGAGGGGGAGCAGTGAATTACGCCCGGGCCCTGCAGGG
ACGAGTGACCATGACCAGGGACGTGTACAGCGATACCGCCTTCCTGGAGCTGCGGT
CCCTGACAGTGGACGATACTGCTGTCTACTTCTGCACACGCGGAAAGAACTGTGACT
ATAATTGGGATTTTGAACACTGGGGCCGGGGAACACCCGTGATCGTCAGCTCCCCCA
GTACTAAGGGACCTTCAGTGTTCCTCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAG
GGACAGCCGCTCTGGGATGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTGACCGTCA
GTTGGAACCTCAGGGGCTCTGACTTCTGGCGTGCACACCTTTCCTGCAGTCCTGCAGT
CAAGCGGGCTGTACAGTCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCA
CTCAGACCTATATTTGTAACGTGAATCATAAGCCATCCAATACAAAAGTGGACAAA
AAAGCCGAACCCAAATCCTGTTACCCTTATGATGTGCCCGACTACGCCTGACTCGAG

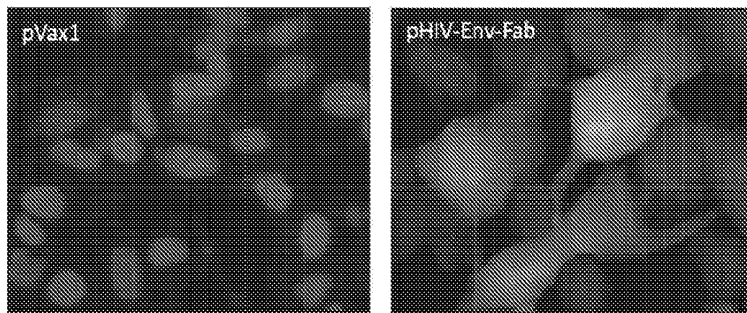
(서열 번호:3)

도면10

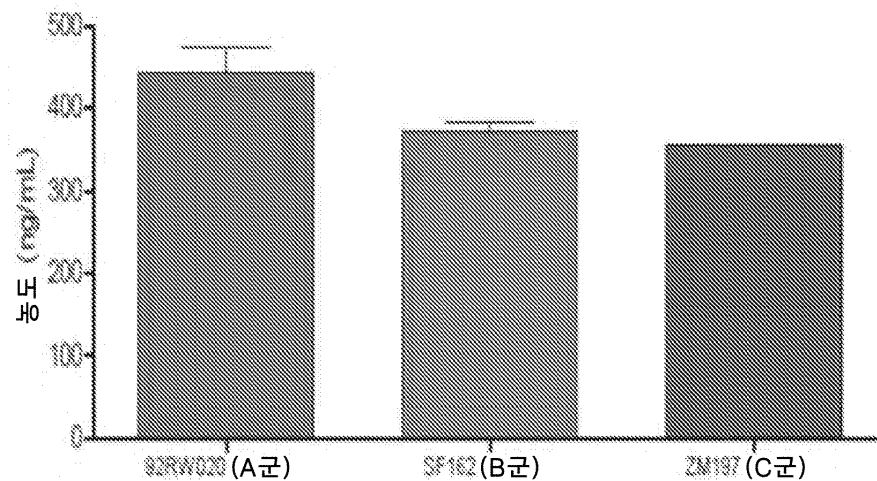
HIV-1 Env Fab의 경쇄 (VL-CL)

AAGCTTGCCGCCACCATTGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG
GTGCCAGGAAGTACCGGGGATGGGGCTCAGGTCCAGATTGTGCTGACTCAGTCCCCT
GGGACCCTGTCTCTGAGTCCAGGCGAGACAGCTATCATTTTCATGCCGAAGTAGCCAG
TACGGCAGCCTGGCTTGGTATCAGCAGCGACAGGACAGGCACCACGACTGGTCAT
CTACTCAGGCAGCACAAGGGCCGCTGGCATCCCCGACAGGTTCTCCGGCAGCAGGT
GGGGGCCTGATTACAACCTGACTATCTCTAATCTGGAGAGTGGGGACTTTGGCGTGT
ACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCTTCGGCCAGGGAACCTAAGGTGCAGGTGGACATC
AAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGATGAGCAGCTG
AAGTCAGGCACCGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCCGGGAAGCC
AAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCTCTGCAGAGTGGAAATTCACAGGAGAGCGT
GACCGAACAGGACTCCAAGGATTCTACATATAGTCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA
GTAAAGCAGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAAGTCACACATCAGGGC
CTGAGGAGCCCCGTGACTAAAAGTTTCAACCGAGGAGAGTGCTACCCTTATGATGTG
CCCGACTACGCCTAACTCGAG (서열 번호:4)

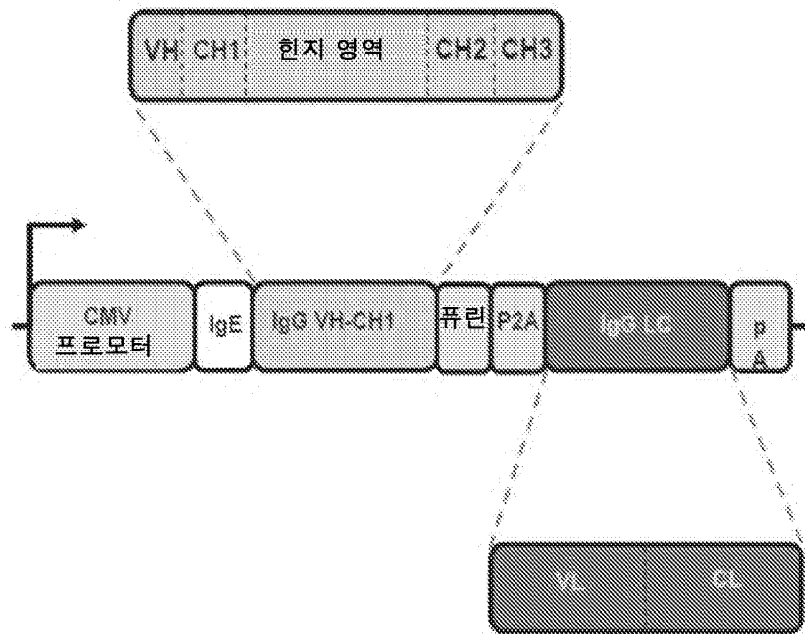
도면11



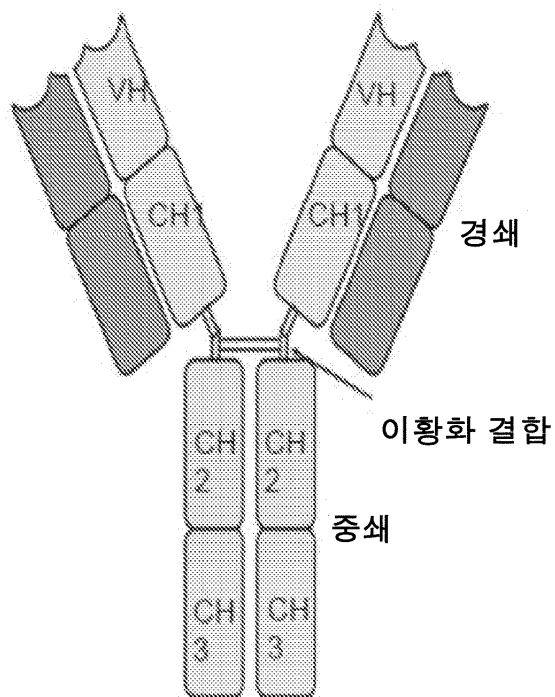
도면12



도면13



도면14

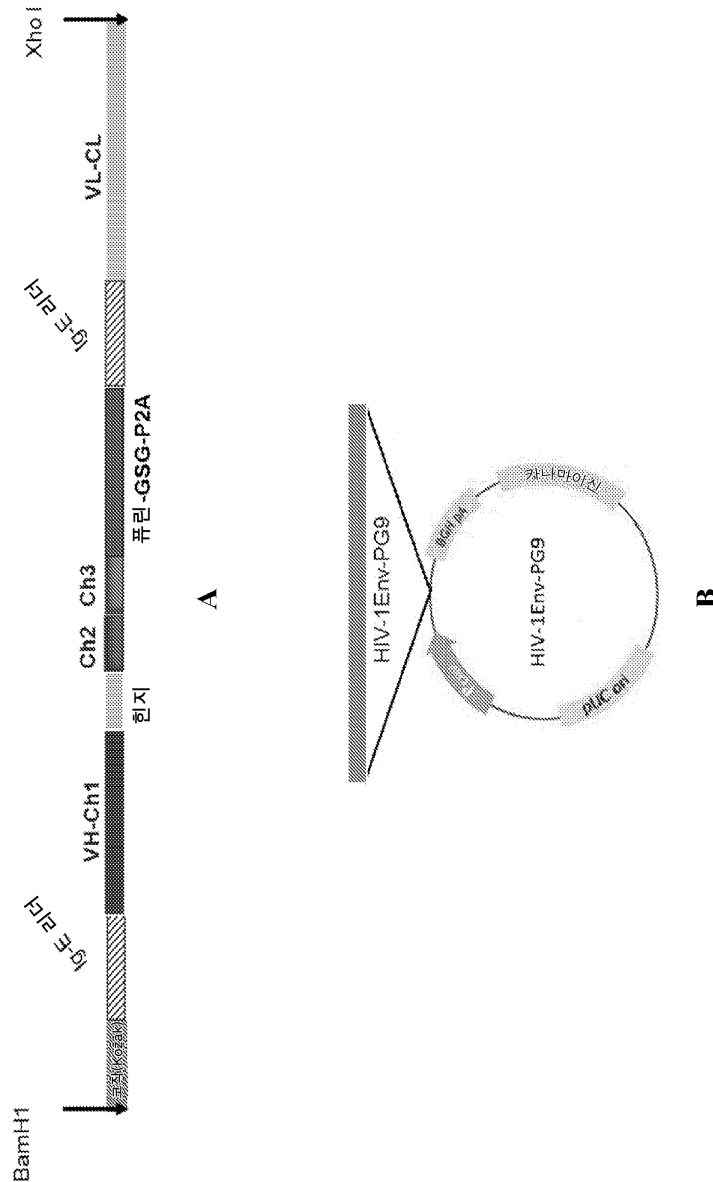


도면15

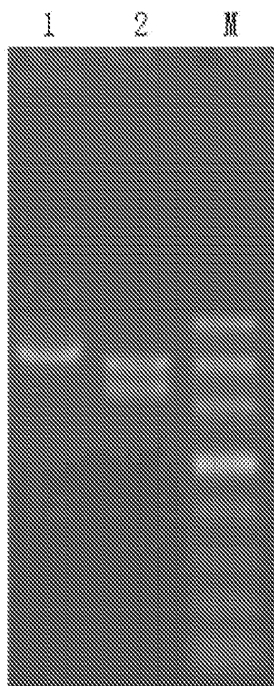
VRC01 IgG

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLA
 PGKRPEWMGWLKPRGGA VNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCT
 RGKNC DYNWDFEHWGRGTPVIVSSPSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KKAEPKSCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSEIVLTQ
 SPGTLSPGETAHSRSTSYGSLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGP
 DYNLTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH
 KKYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (서열 번호:5)

도면16ab



도면16c

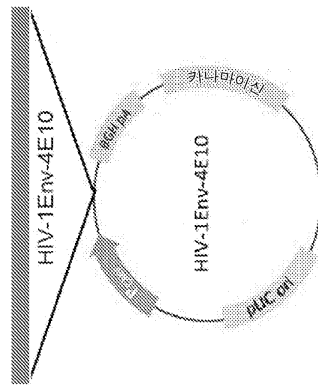


C

도면17ab

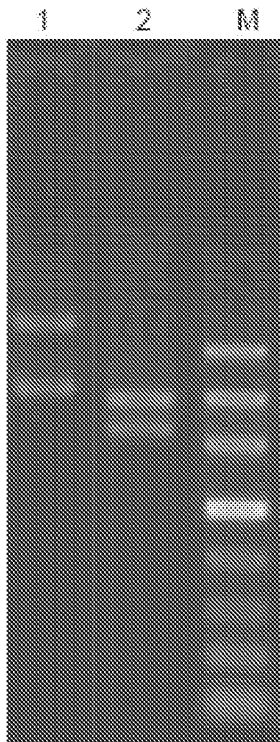


A



B

도면17c



C

도면18

HIV-1 Env-PG9 Ig의 아미노산 서열 (프로테아제 절단 전)

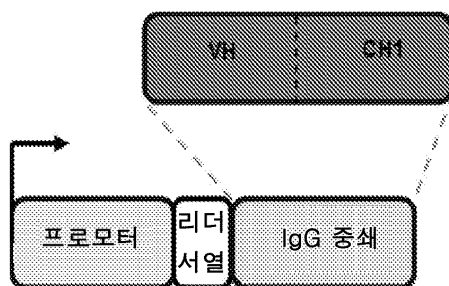
```
MDWTWRILFLVAAATGTHAEFLSWVFLVAFRLRGVQCQRLVESGGGVVQPGSSRLRLSC
AASGFDFSRQGMHWVRQAPQGGLWVAFIKYDGSEKYHADSVWGRLSISRDNKDTL
YLQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFYDGYNYHYMDVWGKGTTVT
VSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMAWTPFLFLLTCCPGGSNSQSALTQPASVSGSPGQSITSCNGTSNDVGGYE
SVSWYQQHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEGDYYCKS
LTSTRRRVFGTGTCLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW
KADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS (서열 번호:2)
```

도면19

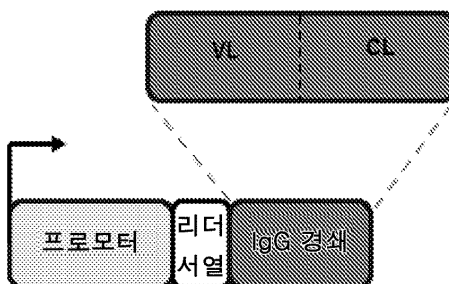
HIV-1 Env-4E10 Ig의 아미노산 서열 (프로테아제 절단 전)

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVR
QAPGRGLEWMGGVIPLLTITNYAPRFQGRITITADRSTSTAYLELNSLRPEDTAVYYCAR
EGTTGWGWLKGPIGAFAHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVLQTQVFISLLWISGAYGEIVL
TQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVADRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGGQSLSTFGQGTKVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE (서열 번호:1)

도면20

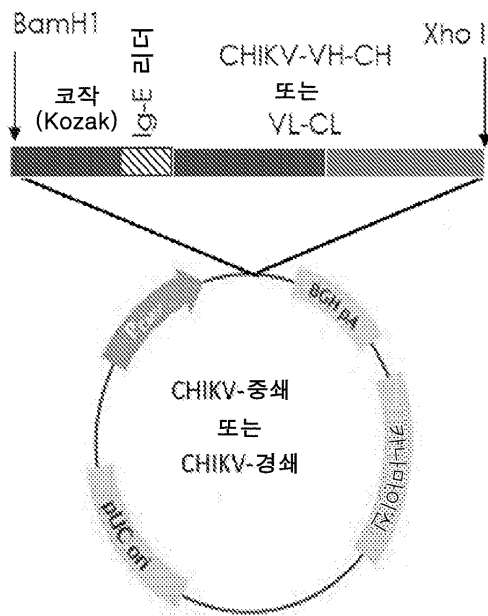


A

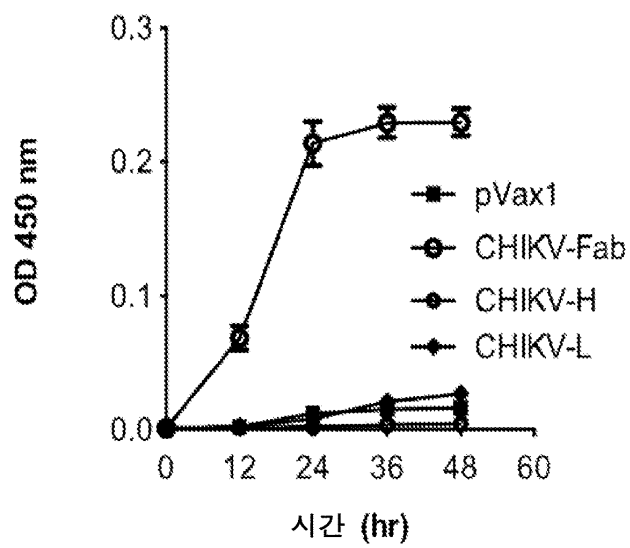


B

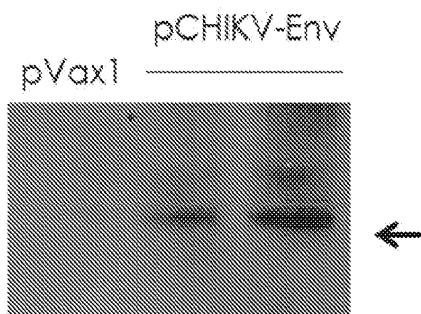
도면21



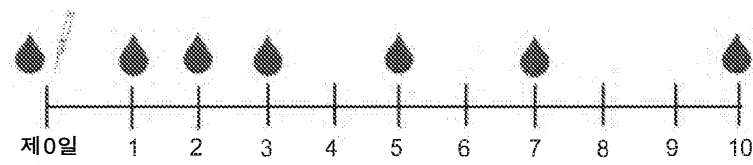
도면22



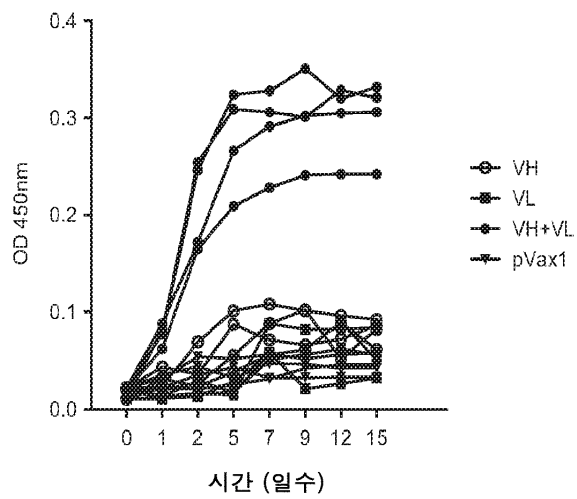
도면23



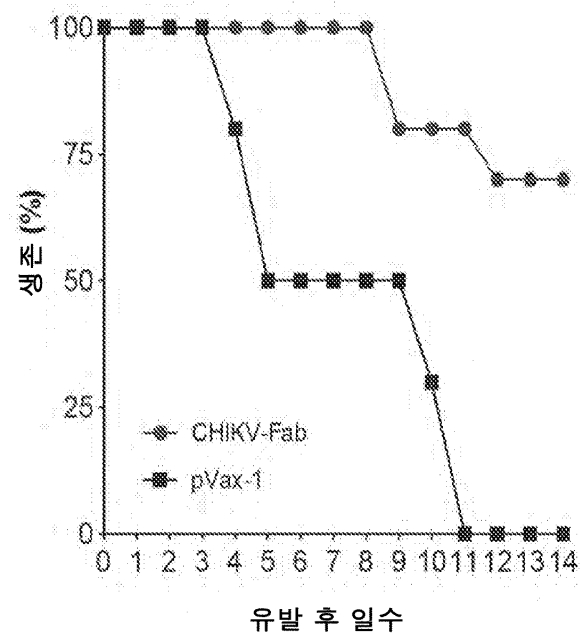
도면24



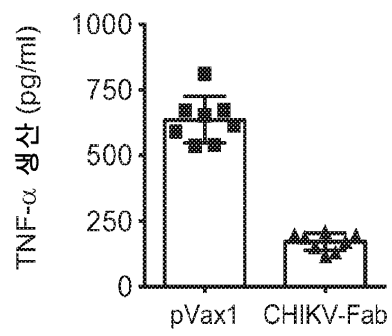
도면25



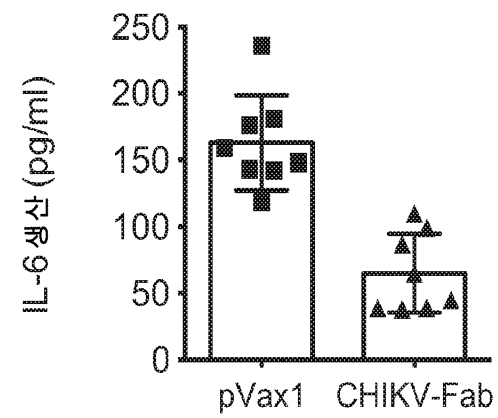
도면26



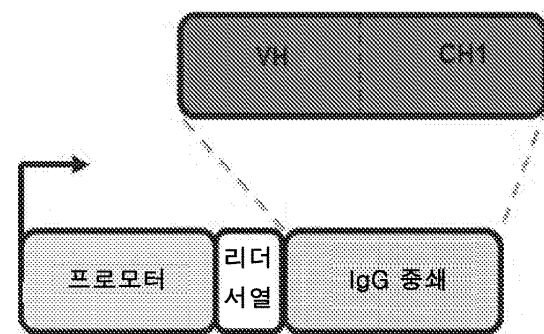
도면27



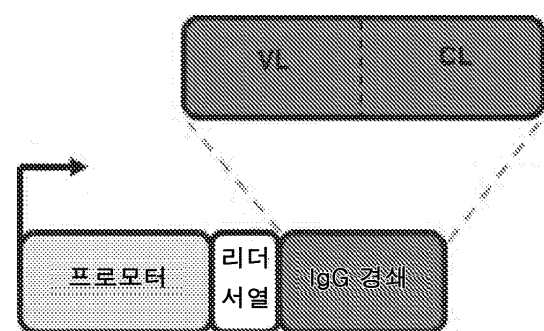
도면28



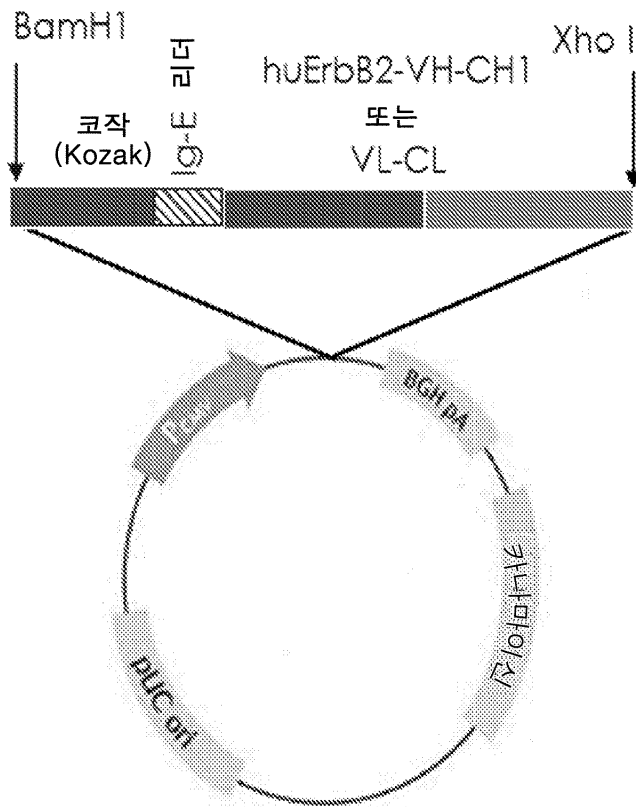
도면29



도면30



도면31



도면32

항-Her-2 Fab의 VH-CH1을 암호화하는 핵산 서열

GGATCCGCCACCA**TGG**ACTGGACATGGATTCTGTGTTCTGGTCGCCCGCCTACAAGAGTGCAATCCGAAGTGCAGCTGG
TCGAGAGTGGAGGGGACTGGTGCAGCCCGGGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACCTTTACAGA
CTACACCATGGATTGGGTGAGACAGGCACCTGGCAAGGACTGGAGTGGTGGCTGATGTCAACCCAAATAGTGGGGG
CTCAATCTACAACAGAGGTTCAAGGGCAGGTTCAACCTGAGCGTGGACAGGTCCAAAAACAATCTGTATCTGCAGAT
GAATTCTCTGCGGGCTGAAGATACCGCAGTCTACTATTGCGCCCGCAATCTGGGCCCCAAGCTTCTACTTTGACTATTGG
GGCAGGGCACACTGGTGACTGTCACTCCGCTTCTACAAAGGACCAAGCGTGTCCCACTGGCACCCCTCTAGTAAAT
CCACCTCTGGAGGGACAGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTATTTCCCGCAGCTGTGACTGTCAAGCTGGAACTC
CGGAGCACTGACTAGCGGAGTGCACACCTTTCCAGCCGCTCTGCAGTCAAGCGGCCCTGACTCCCTGTCTCTGTGGTC
ACAGTGCCTAGTTCAAGCCCTGGGAACTCAGACCTATATTGTAATGTGAACCATAAACCAAGCAATACAAAGGTGGAC
AAGAGGTGGAAACCAAAATCCTGCT**GTATAACTCGAG** (서열 번호 :40)

도면33

항-Her-2 Fab의 VH-CH1의 아미노산 서열
 MDWTWILFLVAAATRVHSEVQLVESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYN
 QRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYDYWGQGTLLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 (서열 번호 :41)

도면34

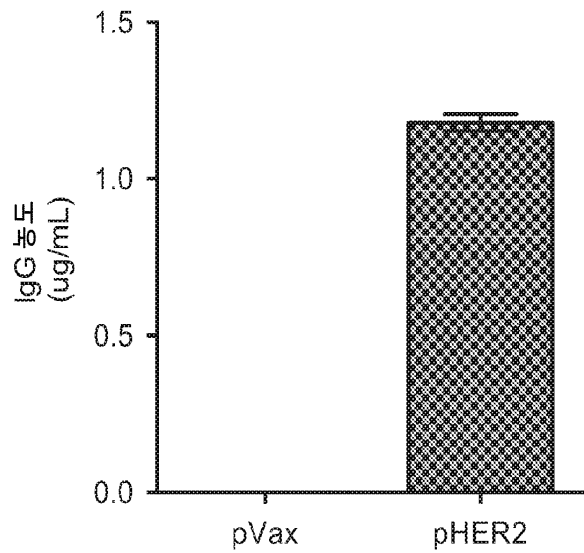
항-Her-2 Fab의 VL-CL을 암호화하는 핵산 서열
 GGATCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATTCTGTTCTGGTCGCCGCCGCTACCCGCGTGCATTCCGATATTCAGATGA
 CTCAGAGCCCCCTCCTCACTGTGAGCCAGCGTGGGCGACCGAGTCACCATGCATGCAAAGCTTCTCAGGATGTGAGTAT
 TGGGGTTCGCATGGTACCAGCAGAAAGCCAGGCAAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTATACAGG
 AGTGCCCCAGCAGATTCAGTGGCTCAGGAAGCGGGACTGACTTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTC
 GCTACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGAACAAAAGTGAGATCAAGCGGACCG
 TGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAGAGCGGAACAGCAAGCGTGGTCTGTCTGCT
 GAACAAATTTCTACCCCTCGCGAGGCCAAAAGTGCAGTGGAAAGGTCGATAACGCTCTGCAGTCCGGGAAATCTCAGGAGAG
 TGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAAAA
 GCACAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGTCAAATCCCGTCAACCAAGTCCTTCAATAGAGGCGAATG
 CTGATAACTCGAG (서열 번호:42)

도면35

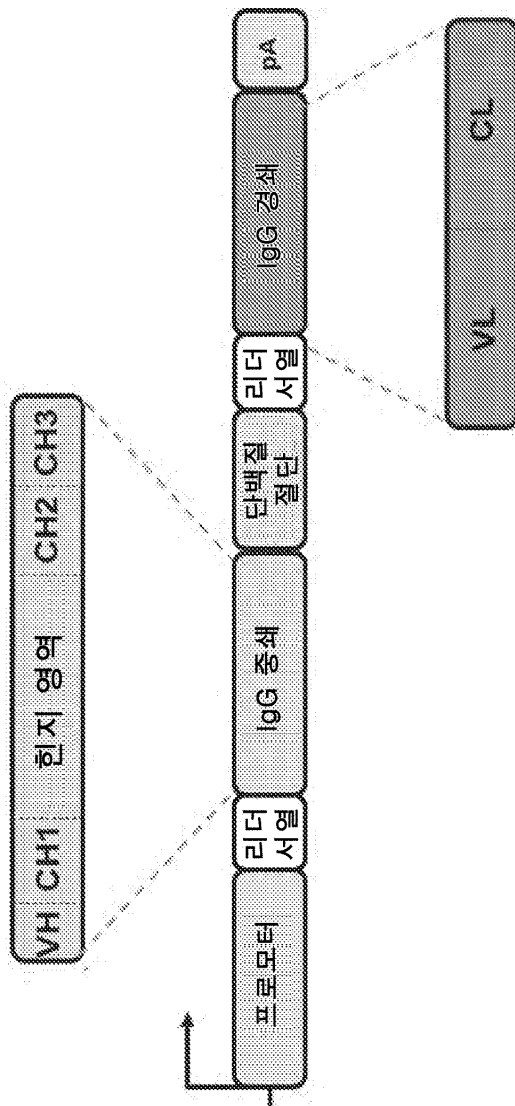
항-Her-2 Fab의 VL-CL의 아미노산 서열

MDWTWILFLVAAATRVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHIQLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호:43)

도면36



도면37



도면38

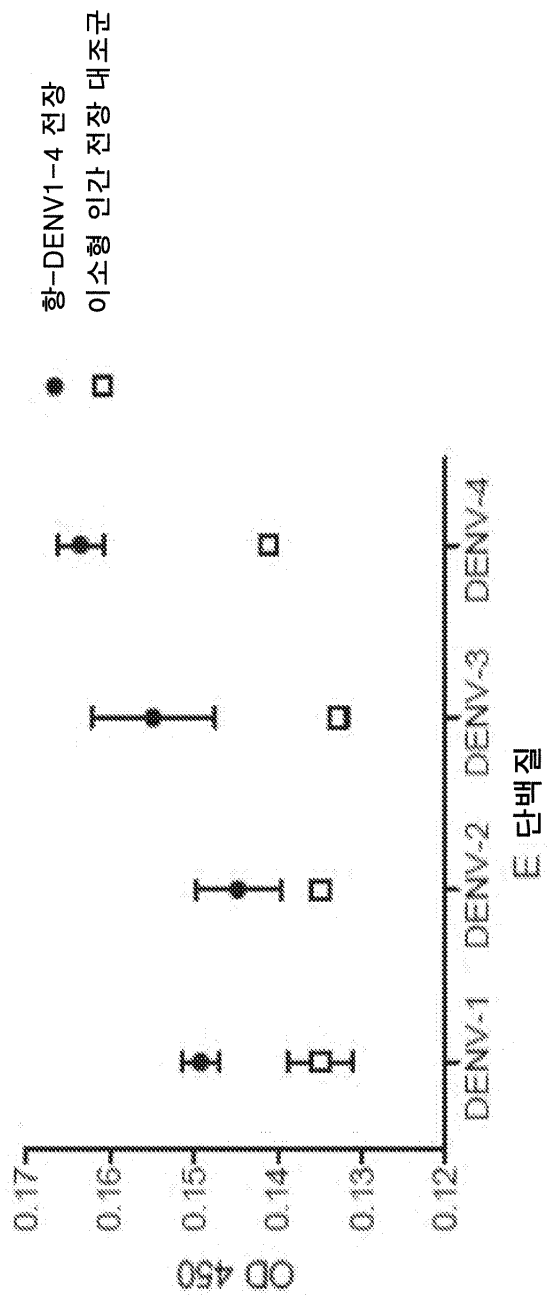
항-DENY 인간 IgG를 암호화하는 핵산 서열

GGATCCGCCACCAATGGACTGGACTTGGAGGATCTGTTTCTGGTCGCCCGCTACTGGGACTCAGCTCAGGCACATC
TGTTCCGAATCTGGAGGAGGAGTGGTCCAGCTTGGCGATCGCTTGGCAGCTGTCTGGCAGCTAGTACGCTTCAACTTCAG
CACAAACGCAATGCACTGGCTGGCGACAGGCACAGGCAAGGACTGGAGTGGCTGCTGTGATCTCATACGACGGAA
GCCATAAGTACTATGCAGATTCTGTGAAAGCCGGTTCCACTTCCAGGGACAATTCTAAGAACACCCCTGTATCTGCA
GATGAATAGCTTGGCGACGCGATACCGCAGTGTACTATTGGCAACTTGGCTGCTGCTGACCTGGCCAGTGAACGCG
CGAATACTTTCACCATTTGGGACAGGCGAGTCTGGTCTCAGTGAGCTCCGCAAGTACTAAGGACCATCAGTGTTCCTCA
CTGGCACCTCTAGTAAATCTACTAGTGGGGGACCGCTGCTGCTGCGAATGGGAGTCTGGTGAAGGACTATTTTCCGAGCTG
TCACCGTGAGCTGGAATTCGGAGCCCTGACAAGCGGCTCCACACTTTCCCGCTGCTGCTGCAAGCGGACTGTGTA
CTCCCTGCTCTGTGGTCACTGTGCTAGTTCAGGCTGGGCACTCAGACCTATATCTGCAATGTGAACACCAAGCCCT
CTAACACCAAGTCGACAAAGAAAGTGAACCTAAGAGCTGTGATAAACAACATACCTTGGCCACCTTGTCCAGCACCAAG
AGTGTCTGGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCTAAAGACACACTGATGATTAGCCGGACACCTGAAG
TCACTTGGTGTGCTGTGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTAAATTGGTACGTGGATGGCTCGAGGTGCA
TAACGCCAAGACCAAAACCCGGGAGGAACAGTACAATAGCACATATAGAGTCTGTCCCTGCTGACTGTGTGCTGATCA
GGATTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAACAAAGGCTTGCCTGCACCAATCAGAAAAACCATTAG
CAAGGCTAAAGGCCAGCCTAAGGAACCAAGGTGTACACACTGCCTCCAAAGTCGCGACGAGTGAACCAAGAAATCAGGT
CTCCCTGACATGCTGTGAAGGCTTCTATCCATCAGATATCGCCGTGGAGTGGAAAGCAACGGCAGGCCGAA
CAATTACAAGACCAACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGCAGTTTCTTCTGTATTTCTAAGCTGACCGTGGACAAGT
AGATGGCAGCAGGGGAATGCTTTTCAATGTAGCGTGTACACGAGGCCCTGCACAAACCAATTAACACACAGAAGTCCCTG
TCTCTGAGTCCCGGAAAGAGGGGCCGCAACGGAGATCAGGAGCGGAGCTACTAATTCAGCCTGCTGAAACAGGCA
GGGATGTGGAGAAACCCCGGACCTATGGCTTGGACCCCACTGTCTCTTCTGCTGACATGCTGTCCTCCGGGGCA
GCAATTCAGAGTGTCTGACACAGCCACCATCAGTGGCGGAGCACAGGACAGAGGTGACCATCTCCTGACACAG
GCAGCAGCAACATTGGCCCGGTACGACGTGCATTGGTATCAGCAGCTGCCCGCACCGCTCTAAGCTGCTGA
TCTTGGCAACCAATAACCCGCCATCTGGGTGCCCGATCTCCGGCTTAAAGTGGGACTTACGCCAGCCTGCTGCTG
TATTACCGCTGCAGGCCGAGGACGAAGTGAATTAATTCAGAGACTACGACTCAAGCCTGACCGGAGTCTGCTGTC
GGAGGAGAACCAAGCTGACAGTCTGGGACAGCTAAAGCCGCTCCAAAGCTGACACTGTCTTCTTCCATCTCTGAG
GAACTGCAGGCAACCAAGGCCACCTGTGTGCTGATTTCCGACTTCAACCCGGGCGAGTCACTGTGGCTTGGAA
GCAGATAGTTCACCTGTCAAAGCCGGAGTGGAGACTACACACCATCAAGCAGAGCAATAACAATACGACGCCAG
CTCCTATCTGTCTGACCCCTGAGCAGTGAAGTCTCAAAATCTTCTTGGCAGGCTCACTACGAAAGGAGCACT
GTGGAGAAAACCTGTCGCACCAACCGAATGTAGTTGATAAATCTGAG (서열 번호:44)

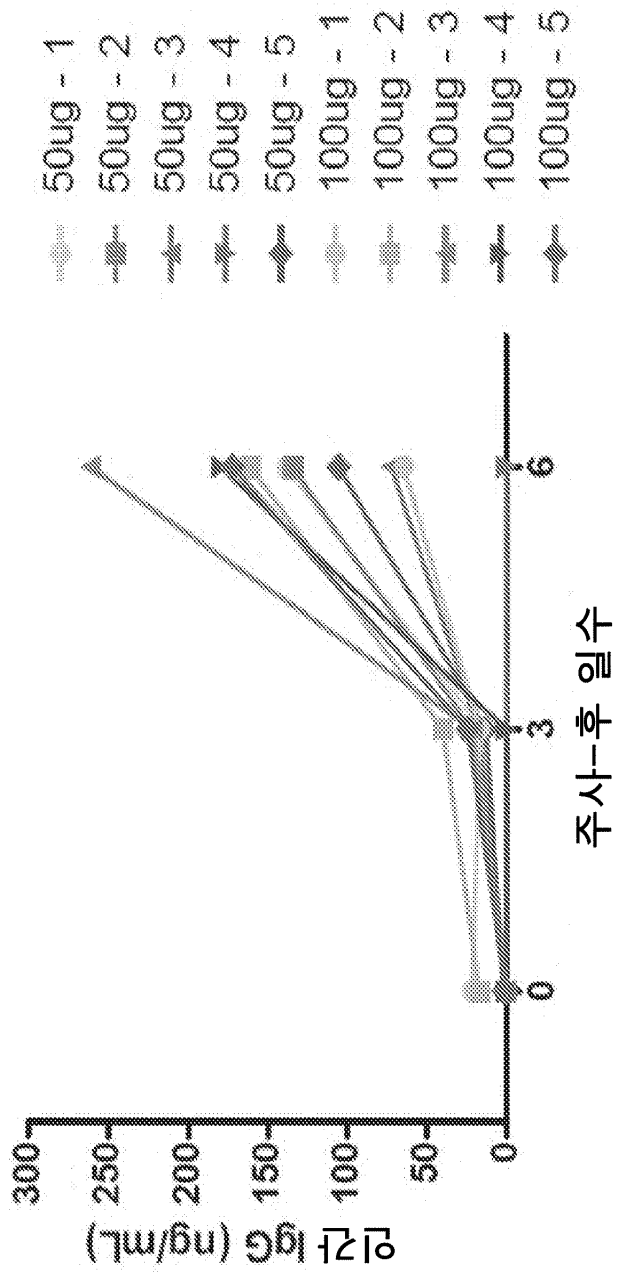
도면39

항-DENY 인자 IgG를 암호화하는 아미노산 서열 (중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 구별하는 프로테아제 절단 지)
MDWTWRILFLVAAAIGTHAQAIHLVESGGGVVQPGRSRLSCAASAFNFSTNAMHHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSHKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAADTAVYYCATVGVLTWPNVNAEYHHHWQGSLSVSVSSASTKGPSVFPPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNIHYTQKSLSPGKRRKRRSGSGATNF
SLKQAGDVEENPGPMAWTPFLFLITCPTGGSNSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQQLPGIAPK
LLICGNNRPSGVPDFRSGSKGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLTGTVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL
QANKATLVCLISDEFPYPAVTVAWKADSSPYKAGVETTTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHIKSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS (서열 번호:45)

도면40



도면41



도면42

IgG 중쇄
 METDTLLWVLLWVPSTGDGAQVQLVQSGAVIKTPGSSVKISCRASGYNFRDYSIHVRLIPDKGFIEWIGWIKPLWGAV
 SYARQLQGRVSMTRQLSQDPPDWGVAYMEFSGLTPADTAETFCYRRGSCDYCGDFPWQYWCQGTVVVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGFAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPS
 NTKVDKKVEPKSCYPYDVPDYA (서열 번호:46)

도면43

IgG 경쇄
 METDTLLWVLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGILSLSPGETATLFCASQGGNAMTWYQKRRGQVPRLLIYDTSRRASG
 VPDRFVGSNGTHDFFLTINKLDREDFAVYYCQPEFFGLGSELEVHRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECYPYDVPDYA
 (서열 번호:47)

도면44

HIV-1 Env Fab의 중쇄(VH-CH1)의 아미노산 서열
 METDTLLWVLLWVPGSTGCGAQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGG
 AVNYARPLQGRVTMTKRDVYSDTAFLERSLTVDDTAVYFCTRGKNCNWDDEHWGRTPIVSSPSTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVIDKKA
 EPKSCYPYDVPDYA (서열 번호:48)

도면45

HIV-1 Env Fab의 경쇄(VL-CL)의 아미노산 서열
 METDTLLWVLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGTLSPGETAISCRISQYGLAWYQORPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPD
 RFGSRWGPDYNTISNLESGDFGVYCCQYEFPGQTKVQVQDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLSKADYKEIKHVIYACEVTHIQGLRSPVTKSFNRGECYPYDVPDYA
 (서열 번호:49)

도면46

HIV-1 PG9 Fab를 암호화하는 핵산 서열

GGATCCGCACCATGGCAAGACCCCTGTGCACTCGCTGTGCTGATGGCAACCTTGGCCGGGACCTGGCATACAGAGC
GCCCTACCCAGCCGCAAGCGCTCTCCGGCTCAGCGGCATGCACTACTATTGTCACCGGACTAGCAACAGCAGC
GTGGAGGCTATGAGATGTCTAGCTTCCAGCAGCATCCCGAAAGCAACAAAGTGATGTCATCTACGATGTCACT
AAAAGGCCAACTGGGGTCTCAATAGGTTCTCAGGGAGTAATCTGGGAATACAGCATCTCTGACCAATCTCCGGACTG
GGCGCAGAGATGAAGGCGACTACTATGCAAAAAGCTGACCTCAACCCAGACGGCGAGTCTTTGGGACAGGCACCA
CTGACAGTCTACAGTGTGCTGCCCTCGTCTTCAATTTTCCACCTCAGATGAGCAGTGAAATCTGGCATCTGGCAT
CTGTGGTCTGCCCTGTAACAACTCTATCCACGAGAGGCCAAGGTGCACTGGAAAGTGGATAACGCATTCGACTCCG
GCAATAGTACAGGAAGAGTGTAGCAGGATATCCAAAGACAGTACTATAGCTGTCTCCACTACGACTGCTGTCCA
AGGCTGACTACGAAACATAAAGGTGTATGCTGTGAAGTGACTACCCAGGACACAGGTCACTACTAAGTCTT
TTAACAGGGAGAGTGGCGGGGGAGGATCTGGAGCGCGGCTCTGGAGGGGAGGCTCAGGGGGCGGAGGAAG
CGGCGAGGAGGTCCGAGAGGAGGCTCAGAGACTGTGTGAAAGCGGGGAGGATGGTGCAGCCTGGTGCTCT
CACTGAGACTGTCACTGCGCTGCCAGTGTGATTTTTCACGACAGGAATGCAATGGGTAGGCACGGCACCCGGACA
GGCCTTGGAAATGGTGCTTCAATTAAGTACCGACGGAAGTACCAATGCCAGTCACTGTGGGAAGGCTGAG
CATCTCAAGGACAACTCAAAAGGACACCTGTACTTCGATGAATAGCTGAGATGGGAAGATACCGGTACTTATT
CTGGTCGAGAGGCGGAGGGCCAGATACCGGAACGGGTCAATTACTATGATTTCTACGCGGTACTACAATTA
CCATATATAGGATGTGGGCAAGGAAGTACAGTCACTGGACTCCGAACTAAGGAGCTTCCGIGTCTTCT
CTGGTCCCGATTTCCAAGATACATCCGGAGAACAGCCGCTCTGGGATGCTGTGTCAGGACTATTTTCCGAGGCCG
TGACTGTCTCTGGAAACGCGGGCTGTGACAAACGGGGTGACACCTTCTCTGCCGTGTGTCAGTCCAGTGGGCTGTA
CAGCTGTCTGATGTGCTCACTGTGCCAGCTCAAGTCTGGGACCCAGACATCATTTGTAAATGTGAACCATAAACC
TCAACACCAAAAGTGGACAGAAAGTGGAACCTAAAGCTGATAACTTCGAG(서열 번호:50)

도면47

HIV-1 PG9 Fab를 암호화하는 아미노산 서열
 MAPLCTLLLLMATLAGALAQSAITQPASVSGSPGQSITSCNGTSDVGGYESVYQQIHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSN
 RFGSKSGNTASLTISGLGADEGDYCKSLTSTRRVFGTGTCLTLVLYAAPSVFIPTSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGECGGGGGGGGS
 GGGSGGGGGGGGGGSGGSGRQLVESGGGVVQPGSSRLSCAASGFDSESRQGMHWVRQAPQGLEWVAFIKYDGSEKYYH
 ADSVWGRLLSIRDNSKDITLYIQMNSLRVEDATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFYDGYNYHYMDVWGKGTTTIVYSSAS
 TKGPSVFEPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV
 NHIKPSNTKVDDKKVEPKS (서열 번호:51)

도면48

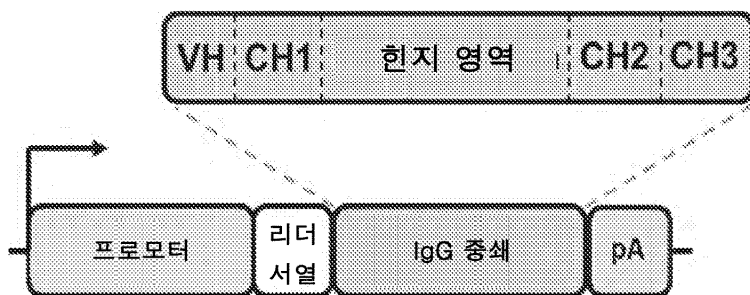
HIV-1 4E10 Fab를 암호화하는 유전자 서열

GGATCCGCCACCATGGCAAGACCTCTGTGCACCTGTCTGTCTGCTGATGGCTACTCTGGCCGGGGCTCTGGCTGAGATTG
TCCTTCAACCAAGTCCCTGGCACTCAGTACTGTCTCCCGCGGAGCGCAACTCTGTCTCTACGAGCAAGCAAGCTCCG
CGGGAACAACAAGTCGCATGGTACAGCAGCAGCCAGGACAGGCACTCCAGGCTCTGATCTACGGAGCAAGCTCCC
GGCCTACGGGAGTCTGATAGATTCTCCGGAAGCGGCTCCGGAGCGGATTTCACTTGACCATCTCCAGGCTGGAAAC
TGAGGATTTGGCGTGATTTACTTGACAGTACGGCAGGCTGTCACTTTCCGCGCAGGGAATAAAGTCTGAATA
TGAAACCGTTGGCGCCACAACAGCGCTTATTTTCCCTAGGGATGAACAGCTGAATAATCCGGGACTGCTTCCGTGGTC
TGCTTGTGAATAACTTATCTCAAGAGAGCAAGAGTGACATGGAAAGTGGACAAACGCCCTGCAGAGCGAAACTCA
CAGGAATCTGTGACAGACAGGACTCAAGGATACGACATACGACTGTCTCACTTCACTGACCTGTCCAAAGCTGAC
TATGAAAGCAATAAAGTCTACGCACTGTGAGGTGACCCACCAAGCACTGAGTCTCCCGTCACTAAGTCTTCAATAGA
GGCAGGTCTGGGGGGGGGAGTGGCGAGGGAAAGTGGGCGGAGGAGTGGCGGCGGCGGCGGAGTGGGCGGCG
GCGGCTCAGGGGGCGCGCTCCCAAGTCTCCAGCTGTCTCCAGCGGAGCGGAGTCAAGAGACCAGGCTCTTTCAGTCA
CTGGTAGTCAAGGCAAGCGAGGAGTCTTTAGCACTTACGCCCTGTCTAGGCTGGCGGAGGCCCTCAGGCC
TGGATGTA TGGGCGCGTGATCCCTCTGCTCACTTACTAATCTATGCCCTAGA TTTGAGCGCCGATACCCATCAC
AGCTGACAGATCCACATCCACAGCTTACCTGGAGCTGAACAGTCTGAGGCCGAGGACACTGCAGTCTACTACTGTGC
ACGAGAAGACCACTATCGATGGGGTGGCTGGGAGAGCCATCCGGCTTTTGACATTTGGGCGGAGGAGCACTGGT
GACTGTGAGCTCTCCAGCACTAAGAGGCCCAAGTCTTCCCTTGGCCCCAAGTTCACAAAGTACATCAGGGGCGCAC
GCCCACTGGGGGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCGTGACAGTCAAGTGGAAACAGCGGCGCTCTGACCAAGT
GGGTGGACACTTCCAGGCTGCGAGATTCAGGGCTGACTCTCTGCTCTCAGTGGTGAAGTGTGCTTCCCTCAGCA
GCTGGGGACTCAGACTTACATTTGTATGTGAACCAATAAACCCCTCAAA TACTAAAGTGGACAAA AAGTGGAAACCA
GAGCTGTAATCTCGAG (서열 번호:52)

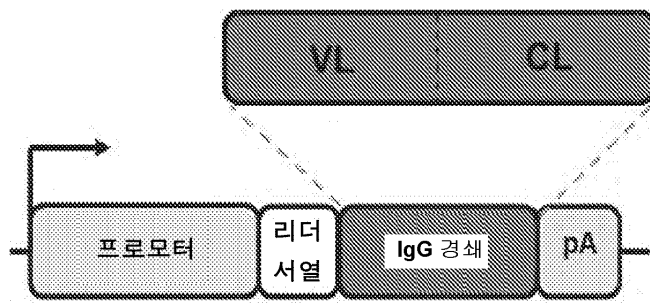
도면49

HIV-1 4E10 Fab를 암호화하는 아미노산 서열
 MARPLCTLLLLMATLAGALAEIVLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQORPGQAPRLLIYGASSRPSGVADR
 FSGSGSDFTLTISRLEPEFAVYYCQYGGSLTFGGGTKVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSISLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGECGGGGGGGGGG
 GSGGGGGGGGGGGGQVQLVQSGAEVKKRPGSSVTVSCKASGGSESTYALSWVRQAPGRGLEWNGGVIPLLTTINYP
 RFGGRTITADRSSTAYLELNSLRPEDTAVYCARAGTTGGWGLGKPIGAFAHWGGGTLVTVSSASTKGPSVPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVLQSSGLYSLSVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEP
 KS (서열 번호:53)

도면50



도면51



도면52

HIV-1 VRC01 IgG1 중쇄 (VH/CH1/원지/CH2/CH3)를 암호화하는 핵산 서열
GGATCCGCCACCAATGGGATTGGACATGGATTCTGTCTCTGGTCGCCGCCGCAACTAGAGTGCATTCACAGGTGCAGCTGG
TGCAGTCAAGCGGCGAGATGAAGAAACCGGCGAGAGTATGCGAATCTCATGCCGGCTAGCGGTACGAATTCATCG
ACTGTACCCCTGAACCTGGATTAGACTGGCACCTGGGAAGAGGCCAGAGTGGATGGCTGAAACCTAGAGCGCGGG
GCAGTGAATTACGCCAGACCACTGCAGGGCAGGGTCACTATGACCCCGACGCGTATTCCTGATACCGCATTCCTCTGGAG
CTGCGAAGTCTGACAGTCGACGATACCTGCGGTACTTCTGCACACGGGGCAAGAACTGTGACTATAATTGGGATTTTG
AACACTGGGGCAGGGGACACCTGTCTATTGTGAGCTCCCAAGTACTAAGGGACCCCTCAGTGTTCCTCCCTGGCCCTTC
TAGTAAAGTACCTCAGGAGGCACAGCCGCTCTGGGATGCCGTGGTGAAGGATTAATTCCTGAGCCAGTCAACCTGTGAG
TTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAAGCGGGTCCATACTTTCCAGCTGTCTGCAGTCAAGCGGGCTGACTCCCTGTCC
TCTGTGGTCACAGTGCCCACTCAAGCTTGGGAACACAGACTTATCTGTAAACGTCAATCACAAAGCTAGCAATACTA
AAGTGGACAAGAAAGCCGAGCCTAAGAGCTGGGAACCAAGTCTGTGATAAACCATACATGCCCTCCCTGTCCAG
CTCCTGAACCTGCTGGGCGGCCCATCCGTGTTCTTCCACCCAAAGCCCAAGACACCCCTGATGATTAGCAGGACTCC
TGAGGTCACTGCTGGTGGTCTGGACGTGTCTCCAGGAGACCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTAGCTGGATGGGCTCGA
AGTGCAATAATGCCAAGACAAACCCCGGAGGACAGTACAACTCTACCTATAGAGTCGTGAGTCTCCTGACAGTGCT
GCACAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTAAAGTGCAAGTGTCTAAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAAC
AATTTCGAAGCAAAAGGCCAGCCAAAGGGAACCCAGGTGTACACTCTGCCCTCCATCCCGCGACGAGCTGACTAAGAA
CCAGGTCTCTGTGACCTGTCTGGTGAAGGATTTCTATCCAAAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAAATGGCCAGCCC
GAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTCTTCTGTATTCAAAGCTGACCCGTGGATA
AAAGCCGCTGGCAGCAGGGGAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCAATCATTCACACCCAGAAAT
CTCTGAGTCTGTCACTGGCAAGTGAATAA

도면53

HIV-1 VRC01 IgG1 중쇄 (VH/CH1/CH2/CH3)의 아미노산 서열
MDWTWLELVAAATRVHSQQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFDCTLNWIRLAPGKRPEWNGWLKPRGGAVNYA
RPLQGRVTMTRDVYSDTAFLRLSLTVDDTAVYFCTRGKNCYNWDFEHWGRGTPVIVSSPTKGPSVPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCF
PKSCDKTHITCPGPCPAPELLGGPSVLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVTLHODWLNKEYKKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호:55)

도면54

HIV-1 VRC01 IgG 경쇄 (VL/CL)를 암호화하는 핵산 서열
GGATCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATTCTGTTCTCTGGTGGCAGCCGCTACCAGAGTCCATTCCGAAATTTGTGCTGA
 CCCAGTCTCCCGGAACACTGTCTCTGAGTCTCTGGCGAGACAGCCATCATTTCTGTAGGACTTCTCAGTACGGGAGTCT
 GGCAATGGTATCAGCAGCGACACAGGACAGGCTCTCGACTGGTCACTACTCAGGAAGCACTCGGCAGCCGGCATTTCC
 CGACCGATTCTCCGGGTCTCGGTGGGACCTGATTACAACCTGACCATCTCAAACTGGAAAGCGGGAGACTTTGGCGTG
 TACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCTTTGGCAGGGAACCAAGGTCCAGGTGGACATCAAACGCACAGTCGCTGCACCA
 AGCGTGTTCATCTTTCCACCCTCAGATGAACAGTGAAGTCCGGCACCGCTCTGTGGTGGCTGCTGAACAATTCTA
 CCCCCGGGAGGCAAGGTTCAGTGGAAAGTGACAACGCCCTGCAGTCTGGCAATAGTAGGAGTCAGTGACTGAAC
 AGGACAGCAAGGATTCCACCTATTCTCTGTCTCTACTCTGACCCCTGAGCAAAAGTATTACGAGAAAGCACAAAGTGTA
 TGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGACTGCGGTCAACCGTCAACCAAGAGCTTCAATCGCGGAGAGTGTGATAACTCGA
 T(서열 번호:56)

도면55

HIV-1 VRC01 IgG 경쇄 (VL/CL)의 아미노산 서열
MDWTWILFLVAAATRVHSEIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGSIAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRW
GPDYNLTISNLESGDFGVYYCQQYEFHGGGKTKVQVDIKRTVAAPSVFIHPPSDEQLKSGTASVVCLLNINNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (서열 번호:57)

도면56

CHIKV-Env-Fab의 중쇄 (VH-CH1)를 암호화하는 핵산 서열
GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGAGGATTCTGTTTCTGGTCGCCCGCCTACTGGAACTCAGCTCAGGTGCAGC
 TGGTGCAGTCAGGGTCCGAAC¹TGAAGAAACCAGGGGCATCTGTGAAGGTCAAGTTGCAAAAGCCTCAGGCTACACCCCTGA
 CACGGTATGCCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGACAGGACTGGAGTGGATGGCTGGATCAACACTTACACACG
 GAAATCCAACTTATGTGAGGGTTCAACCGGCCGATTCTGGACACTTCCGCTCTACCGCCTTCTGAC
 ATTACAAGTCTGAAGGCAGAGGACACTGCCGTGTACTTTCGCTAGGGAAGGCGGAGCAAGAGGCTTTGATTATTGG
 GGCCAGGGAACCTGGTGACAGTCAGCTCCGCCAGCACAAAGGACCCCTCCGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAA
 AGTACATCAGGGGCACTGCCCTCTGGGATGTCGGTCAAGATTA²CTCCGAACTGACCGGCTGGAAGT
 CCGGAGCTCTGACCGAGGGGTGCATACATTTCCCGAGTCCCTGACAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGCTCTGTGGT
 CACAGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGGACACAGACTTATCTGTAA³TGTGAACCATAGCCAAAGCAACACCAAAAGTGGAA
 CAAAAAGTGAACCTAAGAGCTGCTGATTA⁴CTCCGAG (서열 번호:58)

도면57

CHIKV-Env-Fab의 중쇄 (VH-CH1)의 아미노산 서열
MDWTWRILELVAAATGTHAQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLTRYAMTWVRQAPQGLEWMGWINTYTGNPT
YVQGFTGRFVFSLDTSVSTAFHLHITSLKAEDTAVYFCAREGGARGEDYWGQGLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTKVDKKVEPKSC
(서열 번호:59)

도면58

CHIKV-Env-Fab의 경쇄 (VL-CL)를 암호화하는 핵산 서열
GGATCCGCCACCATGGCATGGACCCCACTGTTCTCTGCTGACTTGTTGTCTCTGGCGGGAGCAATTTCACAGAGCG
TCTGACCCAGCCCCCTTCTGTGTCCGGAGCACACAGGACAGCGAGTCACAAATCTCTTGCACTGGAAAGCTCCTCTAACAT
TGGGCCAGCCACGACGTGCATTGGTACCAGCAGCTGCCAGGACCGCTCCACACTGCTGATCTATGTGAAGCTCTAAT
AGCCTAGTGGCTCCAGATAGATTTCAGGGAGCAAGTCGGCACCTCTGCTAGTCTGGCAATTACAGGACTGCAG
GCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGCCAGAGTTACGACTCAAACTGTCAAGCAGCGCAGTGTTCGGAGGAGGAAC
AAGCTGACCGTCTGGGACAGCCCAAGCCGCTCTCTGTGACCCCTGTTCCCTAGTTCAGAGGAACTGCAGGCCA
ACAAAGCTACTCTGGTGTGCTGATCTCCGACTTCTACCTGGAGCAGTACCCTGCGCATGGAAAGCCGATAGCTCCCC
AGTGAAAGCTGGGGTCGAGACCACTCCCAAGCAAGCAGTCCCAACAAGTACGACCTCTAGTTATCTGTCACT
GACACCTGAACAGTGGAGAGCCACAAATCCTATTCTTGCCAAAGTGACTCATGAGGGCAGTACCGTGGAAAGACAGT
CGCCCCAACTGAGTGTCTCTGATAAATCGAG (서열 번호:60)

도면59

CHIKV-Env-Fab의 경쇄 (VL-CL)의 아미노산 서열
MAWTPLEFLLTCCPGGSNSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGASHDVHWYQQLPGTAPTLIIYVNSNRPSGVPDR
FSGSKSGTSAASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSNLSGSAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY
PGAVTVAWKADSSPVKAGVETITPSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHIKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
(서열 번호:61)

도면60

HIV-1 Env-4E10 Ig를 암호화하는 핵산 서열

GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGAGGATTCTGTTTCTGGTCGCCCGCTACAGGAACCTCAGCCCCAGGTGCAG
CTGGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTGAAGCGACACGACAGCTCCGTCACCTGTGTCCTGCAAAAGCATCTGGCGGATCATTC
AGCACCTACGCCCTAGCTGGGTGAGACAGCTCTCGACGAGGACTGGAATGGATGGGAGCGCTCATCCCACTGCTG
ACAAATTAACTACGCCCCCGATTTCAGGGCAGGATCACCAATTACAGCAGACCGCTCCACTTCTACCGCTATCTGG
AGCTGAATAGCTTGAGACAGAAATACCGAGTGTACTATGCGCCGGGAGGTAACCAAGATGGGATGGCTG
GGAAAGCCCATCGGGGCTTTCGCACACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACAGTGTAGTGCAGCACAAGGGCCCC
TCCGTTTCCCTTGGCTCCTTCAAGCAAAAGTACTTCAAGAGGGACCGCCGCTCTGGGATGCTGGTGAAGGACTACT
TCCCTGAGCCAGTCAACGTGCTCTGGAACCTTGGCGCTCTGACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCAGTCCCTGCAGTC
CTCTGGGCTGACTCTCTGAGTTCAGTGGTCACTGTGCTAGCTCCTCTCTGGCACACAGACTTATATTCGCAACGTGA
ATCACAAAGCCCTCCAATACCAAGTGCACAAAGAAAGTGAACCTTAAGTCTGTGTATAAAACCCATACATGCCCACTT
GTCCAGCACCTGAGCTGCTGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCAAGACACACTGATGATTAGCCG
GACACCTGAAGTGACTTGTGTGGTCTGGACGTCAAGCACGAGGACCCCGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCAGGGAGAACAGTCAACTCTATAGGGTCGTGAGTGTCTCTGAC
CGTGTGCACACGAGTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAGTGTCCAATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGA
GAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGCCAGCCACGCGAACCCAGGTGTACACTCTGCCCTCCAGCAGGACGAGCTGAC
CAAGAACCCAGGTGAGTCTGACATGCTCTGGTCAAGGCTTCTATCCAAGCGATATCGCGTGGAGTGGGAATCCAATGG
ACAGCCCGAAAAACAATTACAAGACTACCCCTGCTGGCTGGACAGTGAATCTTCTGTATTTCCAAAGCTGACC
GTGGACAAATCTCGCTGGCAGCAGGGGAACGCTTTAGCTGCTCTCGTGTATGACAGAGGCCCTTGCACAATCATCACAC
CAGAAGTCTCTGAGTCTCTACCAAGCAAGCGGGACGCAAAAGGAGAACGGGTCCGGCTACTAACTTCAGCCTG
CTGAAACAGGCAGGGGATGTGAGGAAAAATCTTGGCCCAATGGTCTCTGCAGACCCAGGTGTTATCTCACTGCTGTGT
GGATTAGCGGGGCTTATGGCGAAATCTGTCTGACTCAGAGCCCCGGAAACCCAGTCTCTGAGTCTGGGAGGCGGCTA
CACTGAGCTCTCGAGCATCACAGAGCTGGGAACAATAAGCTGGCATGGTACCAGCAGAGGCTGGCCAGGCTCCAA
GACTGTGATCTATGGCGCAAGTTCAGGGCTAGCGAGTGGCAGCCGCTTCTCCGGATCTGGGATGGCACCGATTT
TACTCTGACCAATTAGCAGGCTGGAGCAGAGACTTCGCTGTGTACTATTGCGCAGCAGTACGCGCCAGTCACTGAGCAC
TTTGGACAGGGGACTAAGGTGCAAAAAGAACCTGGCAGCCCAAGTGTCTTATTTTCCACCTCAGACGAGCAG
CTGAAGAGTGAACACAGCTCACTGTGTGTCTGTGAAACAATTTTACCCCAAGGAGGGCCAAAGGTCCAGTGGAAAGTG
GATAACGCTCTGCAGAGCGCAATTCCAGGAGTCTGTGACAGAACAGACAGTAAAGGATTCAACTTATAGCCTGAGC
TCCACACTGACTCTGTGTCAAAAGCAGATTACGAGAAAGCAAAAGTGTATGCTGTGCAAGTCAACCCATCAAGGGAATGTCT
AGTCTGTGACAAAAGTCTTTTAAACAGAGGGGAGTATTAACCTCGAG (서열 번호:62)

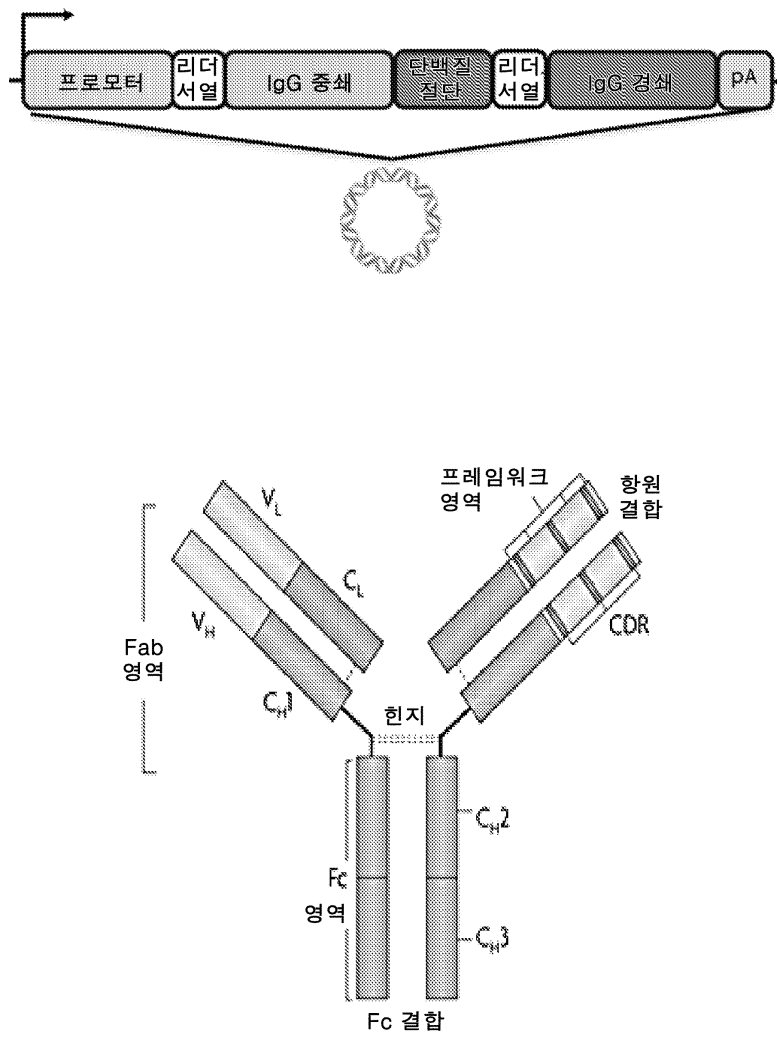
도면61

HIV-1 Env-PG9 Ig를 암호화하는 핵산 서열
 GGATCCGCCACCATGGACTGGACTTGGAGGATCTGTTTCTGGTGGCCGCCCAACTGGAATCAGCTGAATTTGGAC
 TGTCAATGGGCTTTCTGGTGGCTTTCTGCGAGGGGTCCAGTCCAGAGGCTAGGTGGAGTCCGGAGGAGGTGGTCCCA
 GCCAGGAGCTCCTGGACTGAGTTGTGCGGCTTCAGGGTTTCGACTTTCAGAGGCTATGCATGGTGGTGGCAG
 GCACAGGACAGGAGCTGAGTGGTGGCTTTTCATCAAGTACGACGGAAGTGAATAATCATGCCGATTCAGTGTGG
 GGGCGGTGTCAATTAGCCGCGACAACTCCAAAGTACCTGTACTGCAAGTGAATTTCTAGAGGTTCGAGACACA
 GCTACTTATTTCTGGTGGGAAAGAGCGGACCTGTATACAAACGGGTATAATTTCTATGACTTTTACGATGGCT
 ACTAATACACTATAATGACGTTGGGCAAGGAAACACAGTACAGTGTCTAGTGCATCAACTAAGGCCCAA
 GCGTGTTCCTGGCCCTTCAAGCAAGTCCACTTCTGGAGGACCGCAGCATGGGATGTCTGGTGAAGGATTAATTT
 CCTGAGCCAGTCAACCGTGGAGTTCAGGCGCCCTGACTAGCGGAGTCCATACCTTTCTGCTGTGCTGCAGTCC
 TCTGGGCTGTACAGCTGAGTTCAGTGTGCACAGTCCCAAGCTCTCTCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTA
 ATCACAAGCCTAGCAATACTAAGTTCGACAAAGAGTGGAAACCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCTGCCACCTT
 GTCCAGCACTGAGCTGTGGAGGGCTTCCGTGTTCTGTTCCACCAGCCAAAGCAACCCCTGATGATTAGCCG
 GACACCAGAAGTCACTTGGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTTGATGG
 CGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACAAACACGGGAGGAACACTCACTCCACATATCGCGTCTGTCTGTCTGAC
 TGTGCTGACCCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGC/AAAGTGTCCAATAAGGCACTGCCAGCCCCCATCGA
 GAAAACCAATTTCAAGGCCAAAGGCCAGCCACGAGACCCAGGTGTACACATGCCCTCCAAGTAGGACGAGCTGAC
 TAAGAACAGGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCCTCTGATATCGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGA
 CAGCTGAAACAAATTACAAGACTACCCCTGTTGGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATAGCAAGCTGACCG
 TGGACAAATCCAGATGGCAGCAGGGGAACGCTTTAGTTGCTCAGTGTGCACGAGGCACGTGCACAAATCAATTACACCC
 AGAAAGCCTGTCTCTCTGGCAAGAGGGGAAGAAAGGAGAAAGTGGGTAGGCGCAACAACTTCAGCCTG
 CTGAAGCAGGCGGGAGATGTGGAGGAAATCTCTGGGCCAATGGCTTGGACCCCTGTCTCTGTCTGTGACATGCT
 GTCTGGCGGAAGCAACTCCAGTCTGCATGCACAGCCAGCAAGTGTGTCAAGGAGCCAGGACAGAGCATCACC
 TTTCTGTAAACGGCAAGCAATGACGTGGGGGTACGAGTCCGTGCTTTGTGATCAGCATCTCTGGAAAGGCCCC
 AAAAGTCGTGATCTACGATGTACGAAACGCCCTCTGGGTGAGTAACCGATTACAGTGAATCAAGAGCGGGAATAC
 CGCTTCTTGACAAATAGTGGCTGCAGGACAGGAGGAGGAGATTAATTTGCAATCATTGACAAGCAGCTCGGG
 CCGAGTCTTCGGAACCGGGACAAAGCTGACTGTGTGGTCCAGCCCAAGCTGCACCTAGCTGACCTGTCTTCCACCC
 AGTTCAGAGGAACCTGCAGGCTAATAAGGCAACACTGGTGTGCTGTCTCCGACTTCTACCTGGCGCTGTCACTGTGG
 CCTGGAAGGCTGTAGTCTCCCAAGTCAAGCAGGAGTGGAAACAACACTCCCTCCCAAGCAGTCTAACACAAGTACG
 CCGCTTCTAGTTATCTGTCACTGACTCCGAGCAGTGGAAAGGCCCAAAATCCTATTTCTTGCCAGGTGACCCCATGAGGG
 CTCCACTGTGCGAAAGACCGTGGCCCTACAGAGTGTCTTGATATCTCGAG (서열 번호:63)

도면62

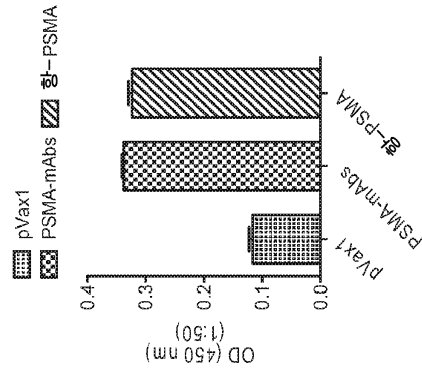
VRC01 IgG를 암호화하는 핵산 서열
GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGATTCTTCTGTCGCCGCCCACTAGAGTGCATTACAGGTGACAGCTGG
TGCAGTCAAGCGCGGACAGATGAAGAAACCCGGGAGAGATATGCGAATCTATGCGGGGTACGGGTACGAATTCATCG
ACTGACCTGAACCTGATTAGACTGCACTCTGGGAAGAGCCAGAGTGAATGGGATGGCTGAACCTAGAGCGGGG
GCAGTGAATTACGCCAGACCACTGCAGGGCAGGTCACATGACCCGGACGCTGATTTCTGTATACCGCATTTCTGGAG
CTGCAAGTCTGACAGTCACTGCTGATCTCTGACACACGGGCAAGAACCTGTGACTATAATTTGGGATTTTG
AACACTGGGGCAGGGGACACCTGTCTATTGTGAGCTCCCAAGTACTAAGGACCCCTAGTGTTTCCCTGGCCCTTC
TAGTAAAGTACCTCAGGAGCACAGCCCTCTGGGATGCTGGTGAAGGATTAATTTCCCTGAGCCAGTCACTGGAG
TTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAAGCGGGTCCATACTTTTCCAGCTGTGCTCAGTCAAGCGGCTGTACTCCCTGTCC
TCTGTGTCACAGTGGCCAGTTCAAGCTGGGAACACAGACTTAATCTGTAAAGTCAATCACAGCCTAGCAATACTA
AAGTGACAAAGAACCCGAGCTAAGAGCTGCAACCAAGTCTCTGTGATAAAACCCATACATGCCCTCCCTGTCCAG
CTCTGAATGCTGGCGGCCCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAAGCCAAAGACACCTGTATGATAGCAGGACTCC
TGAGTCACTGCTGTGTCGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGTCAAGTTTAACTGTGACGTGGATGGCTCGA
AGTGCAATAATGCCAAGACAAACCCGGGAGAACAGTCAACTTACCTATAGAGTCTGTGAGTGTCTCTGACAGTGTCT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGATATAAGTGCAAGTCTAATAAGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAAAC
AATTTCAAAGGCAAAAGGCCAGCCAAAGGAAACCCAGGTGACACTCTGCTCCATCCCGGACGAGCTGACTAAGAA
CCAGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGATTTCTATCCAAAGCATATCGCGTGGAGTGGAAATCCAAATGGCCAGCCC
GAGAACATTAACAGACCACACCCCTGTCTGGACAGGATGGCTCTCTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATA
AAAGCCGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTTAGCTGCTCGTGTATGACGAAAGCTCTGCAACATATTACACCCAGAAAT
CTCTGAGTCTGTCACTGGCAAGAGGGGACGAAACGGAGAAAGCGGACGCTACAACTTCAGCCTGCTGAAA
CAGCAGGCGACGTGGAGGAAATCTGGGCCAATGGATTGGACTTGGATTCTGTCTGGTGGCAGCCGCTACCCAGA
GTCCATTCGAAATTTGTCTGACCCAGTCTCCGGAAACACTGTCTGAGTCTGGGAGACAGCCATCATTTCTGTGA
GGACTTCTCAGTACGGGAGTCTGGCATGGTATCAGCAGGACCCAGGACAGGCTCTCGACTGGTCACTACTCAGGAA
GCATCGGGCAGCCGGCATTTCCGACCGATTTCCGGGTCTGGTGGGACCTGATTTCAACCTGACCATCTCAATCT
GGAAAGCGGAGACTTTGGCGTGTACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCTTTGGCAGGAAACCAAGTCCAGGTGGACAT
CAACGCACAGTCTGCACCAAGCGTGTTCACTTTCCACCTCAGATGAACAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCTGTG
GTGTCCCTGTGAACAAATTTCTACCCCGGAGGCAAGGTCCAGTGAAGAGTGGCAACACCCCTGCACTGTGGCAAT
AGTCAGGAGTCACTGAAACAGGACAGCAAGGATTCACCTATTCTGTCTCTACTGTGACCTGAGCAAAAGCTG
ATTACGAGAAAGCAAAAGTGTATGCATGTGAGGTCAACCAGGAGTGGGGTCACTCCGTCAACCAAGAGCTTCAATC
GCGGAGAGTGTGATAACTCGAG (서열 번호:64)

도면63



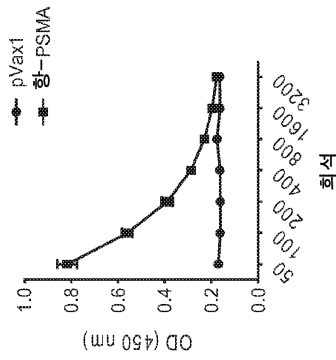
도면64

하기와의 huPSMA 단백질의 결합



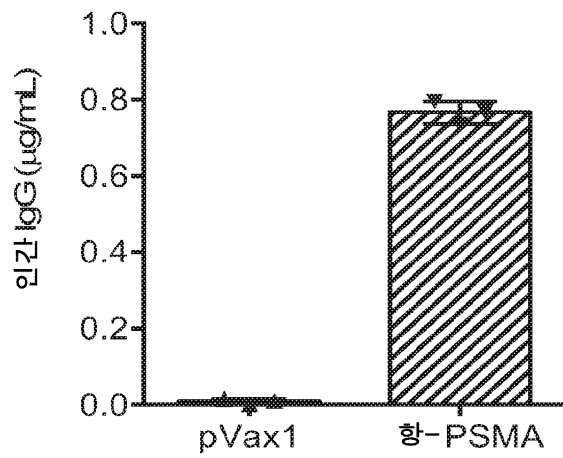
제조한 인간 PSMA	0.25 µg
항-huPSMA-IgG	1:100
상청액	
염소 항-인간 IgG	1:10,000

항-huPSMA 발현
(시험관내 293T 형질감염된 세포)

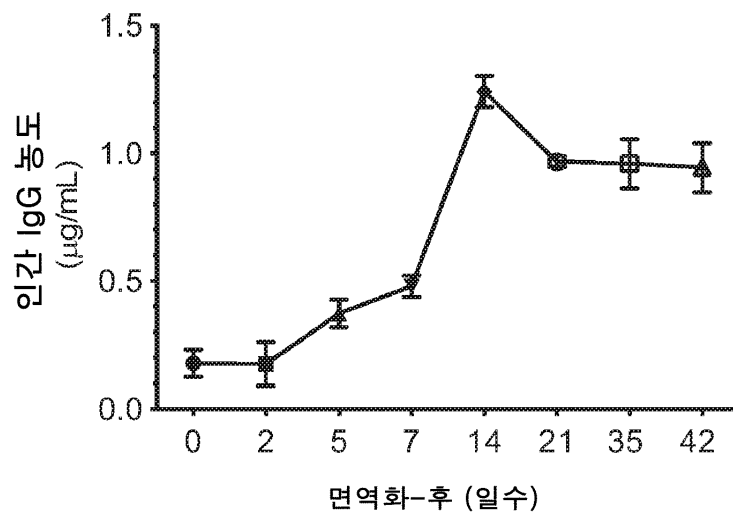


5µg의 플라스미드
293T 세포
결합을 위한 형질감염 후
수집된 48 샘플

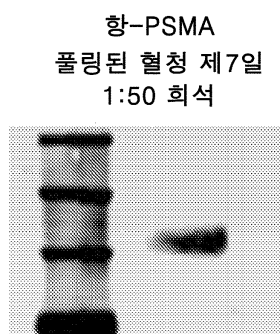
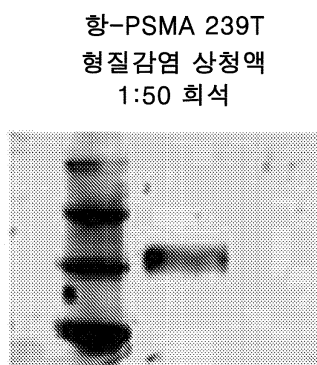
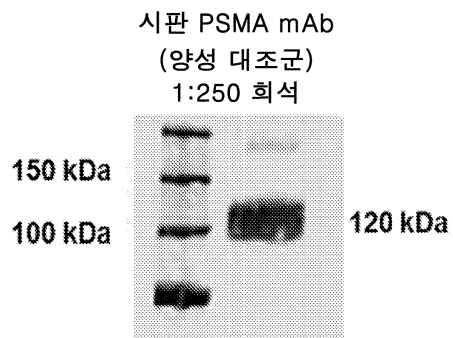
도면65



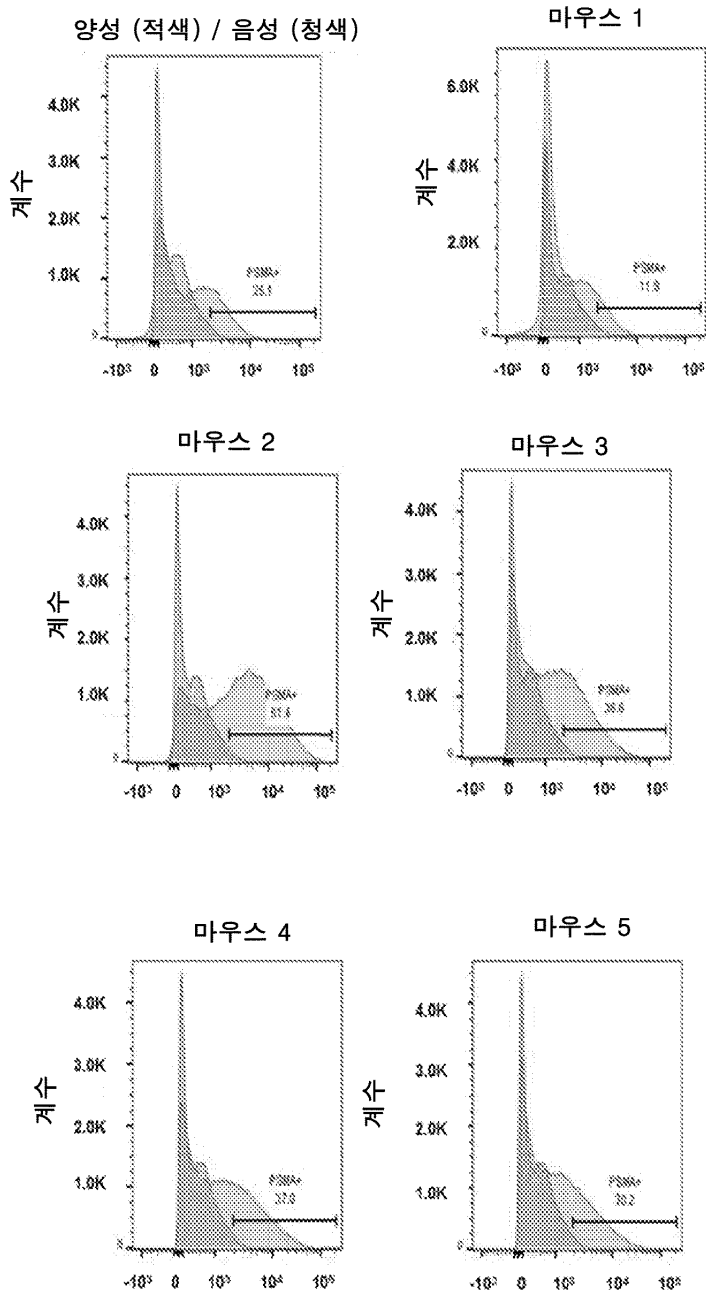
도면66



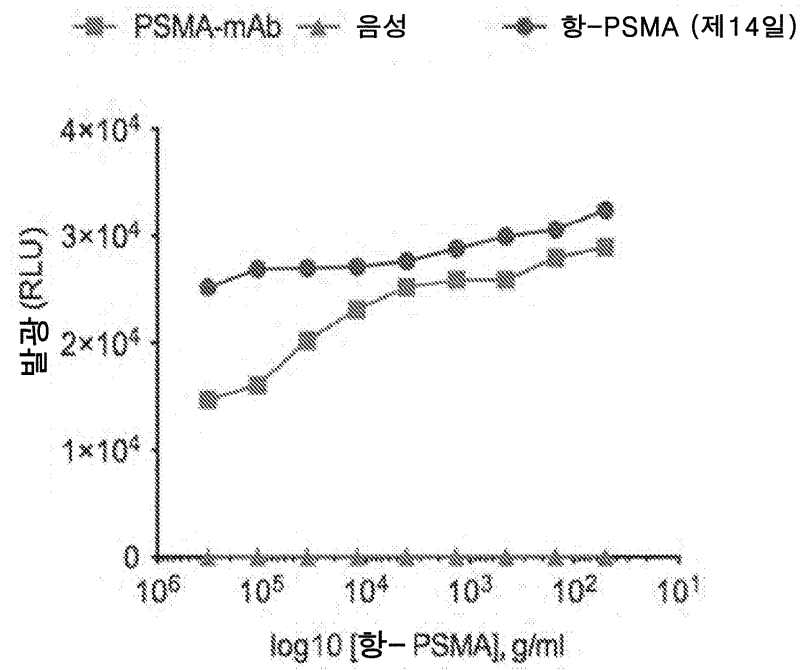
도면67



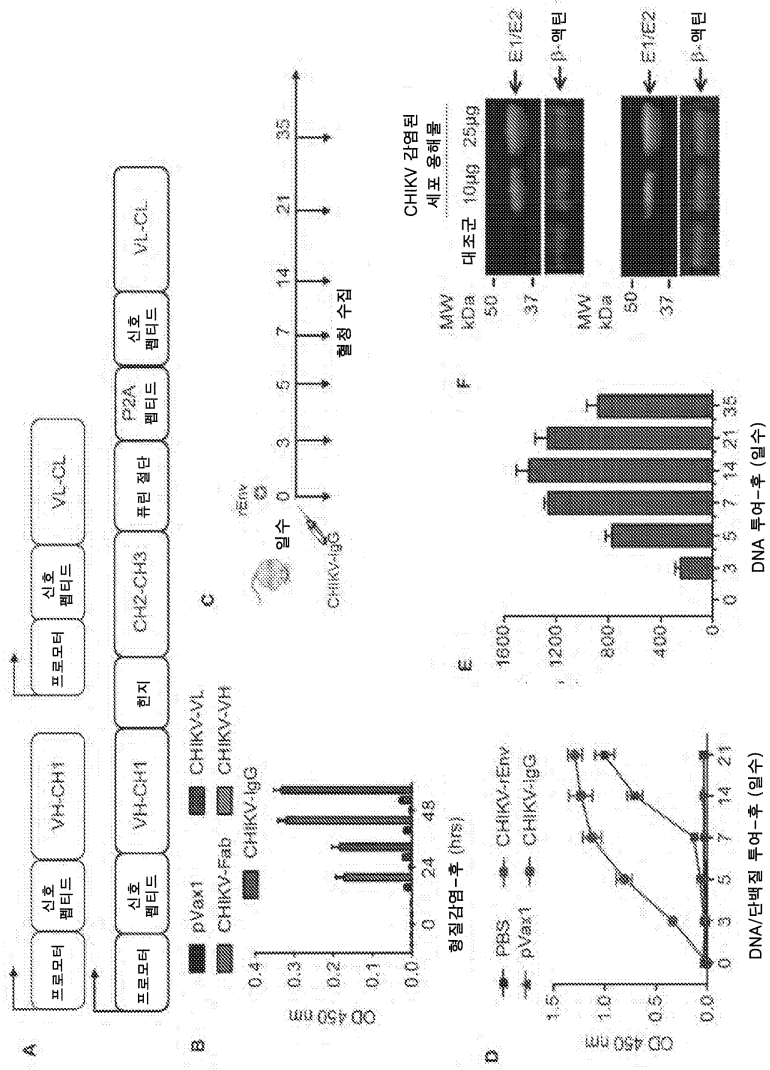
도면68



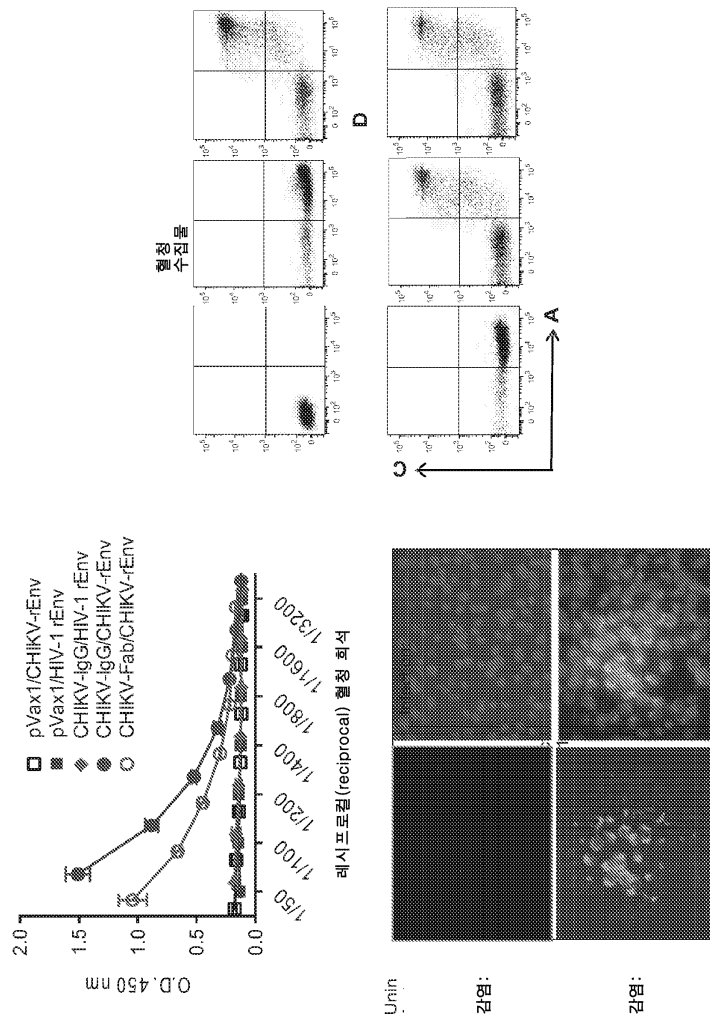
도면69



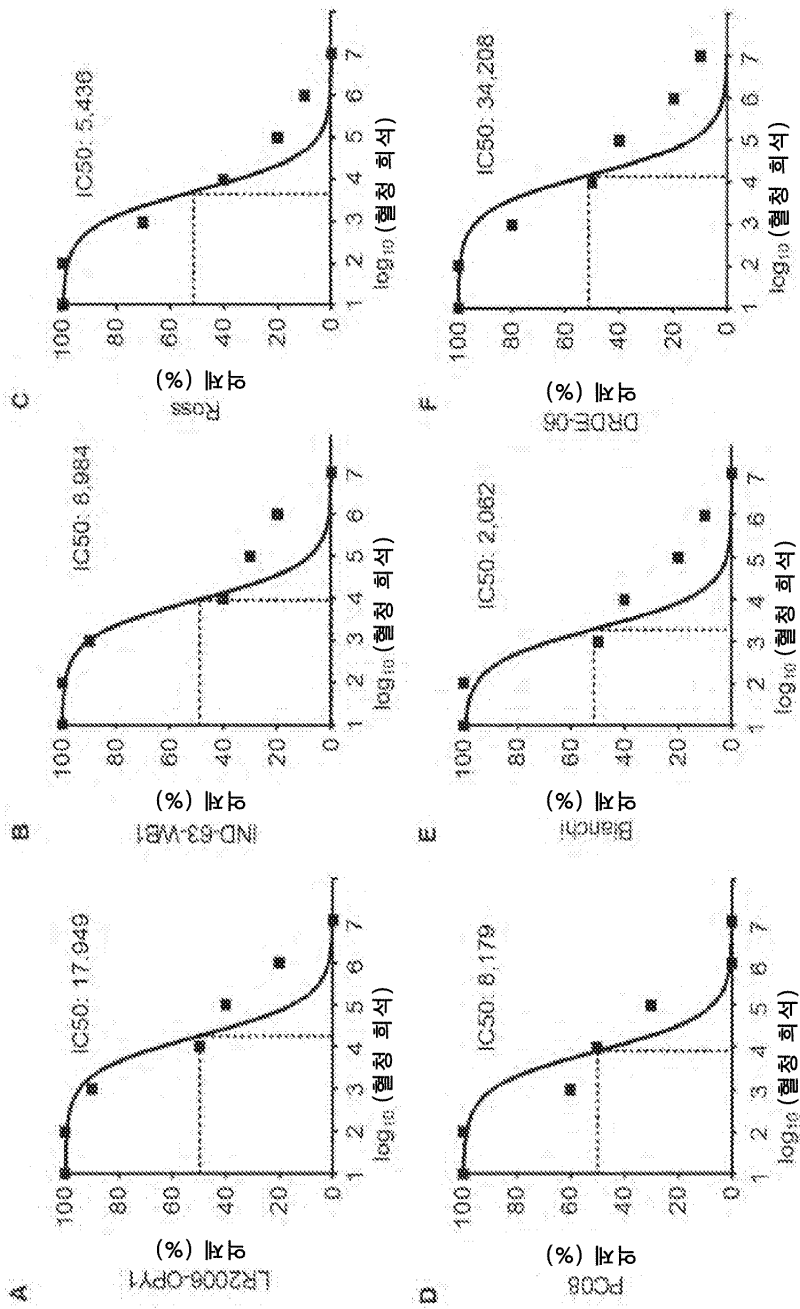
도면70



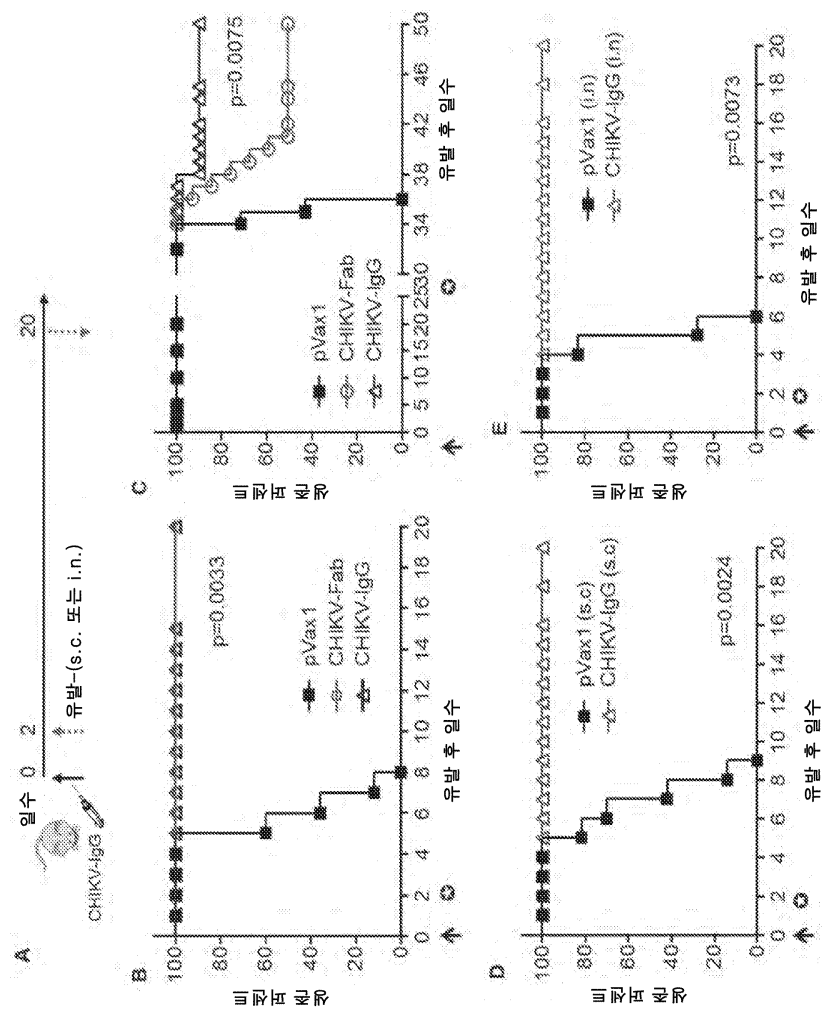
도면71



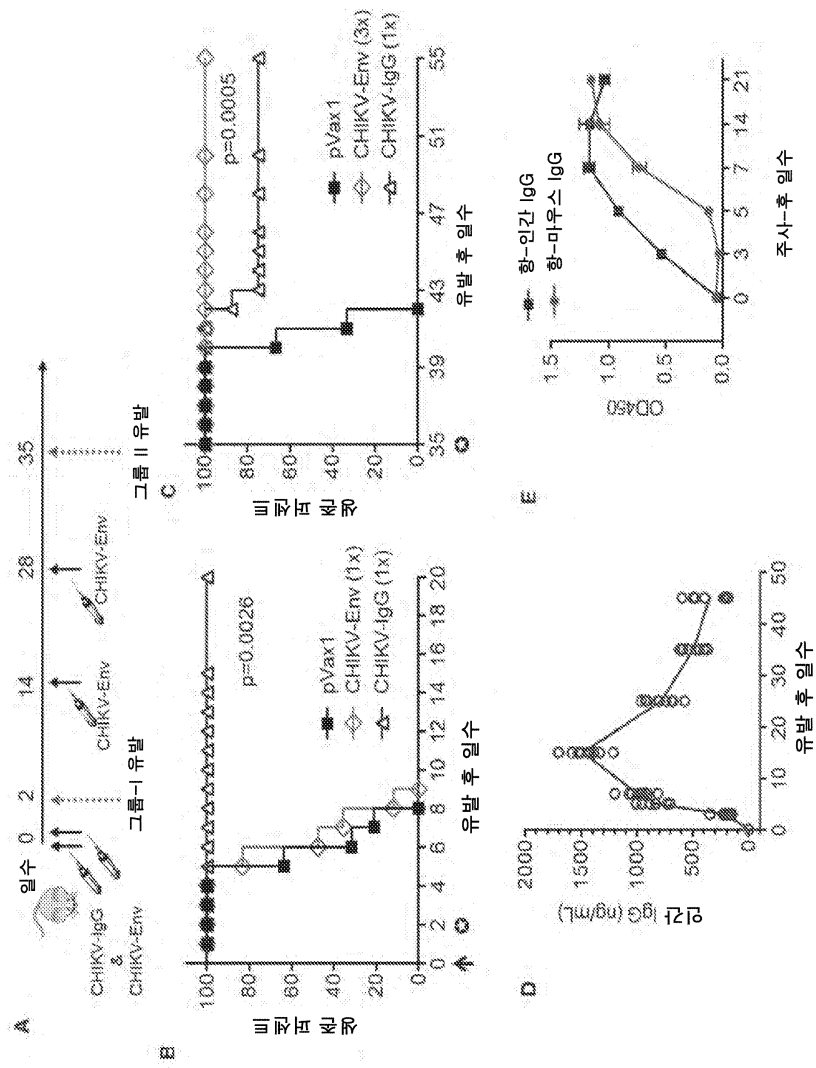
도면72



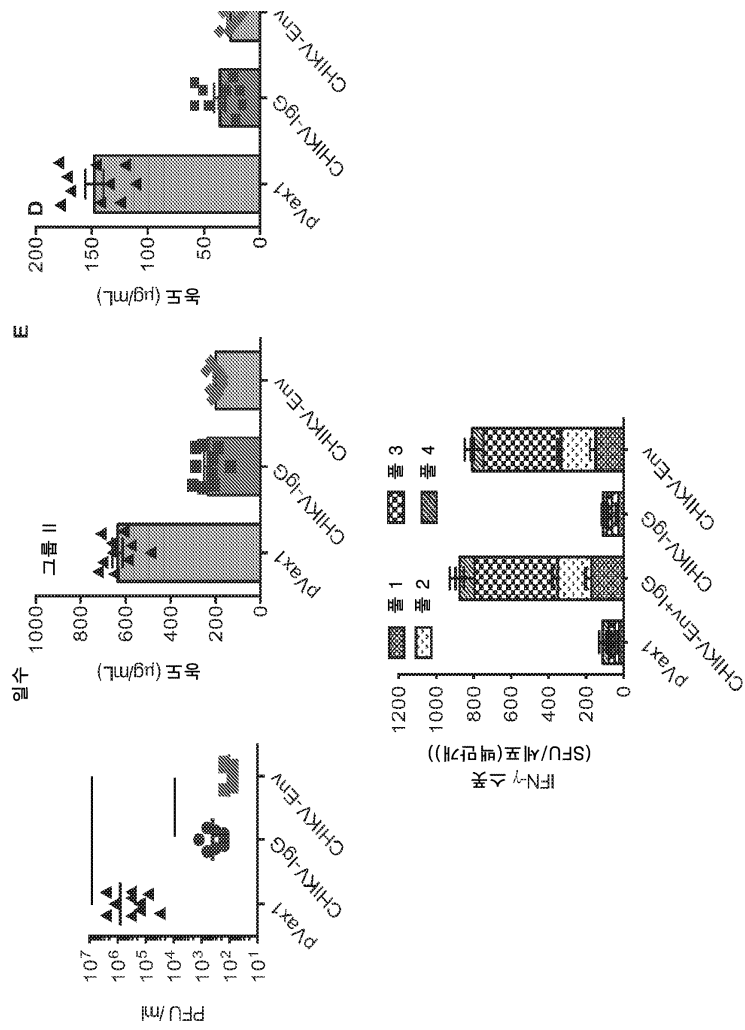
도면73



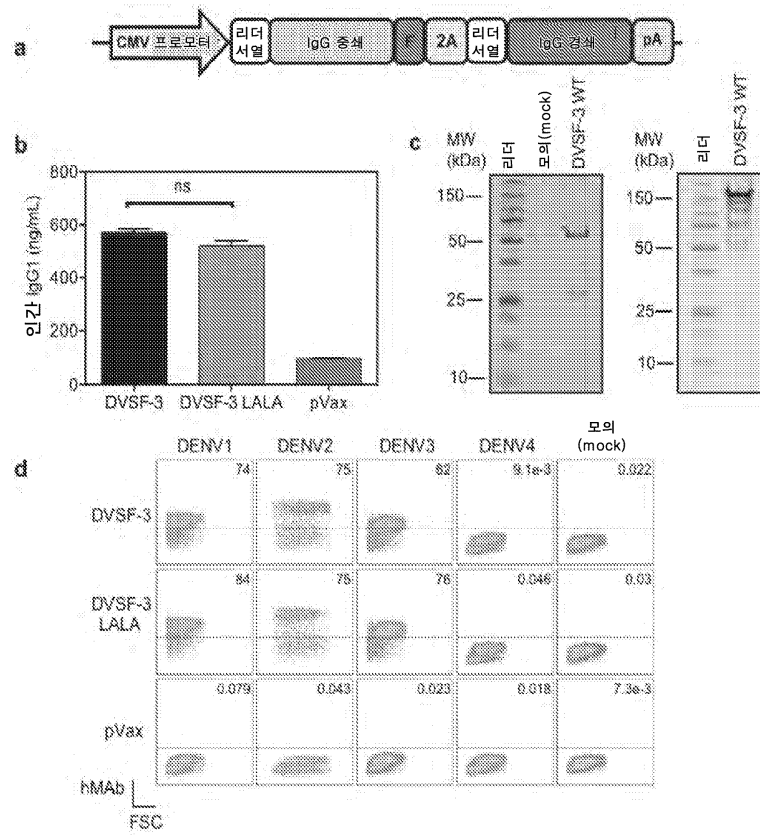
도면74



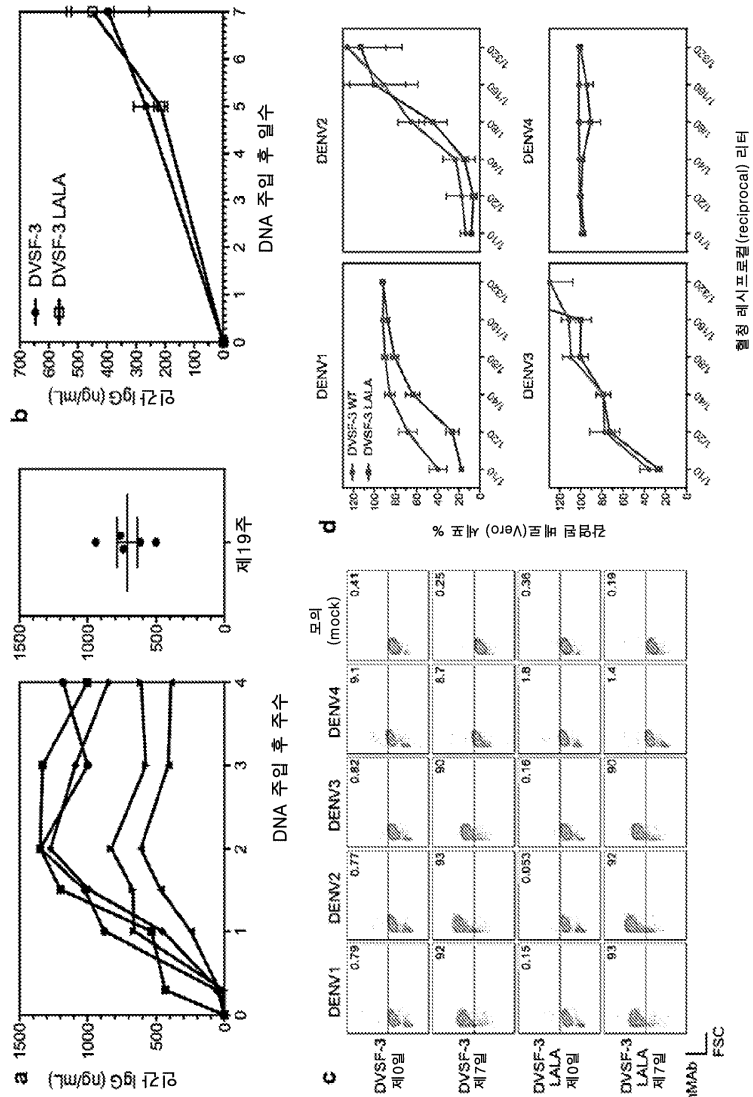
도면75



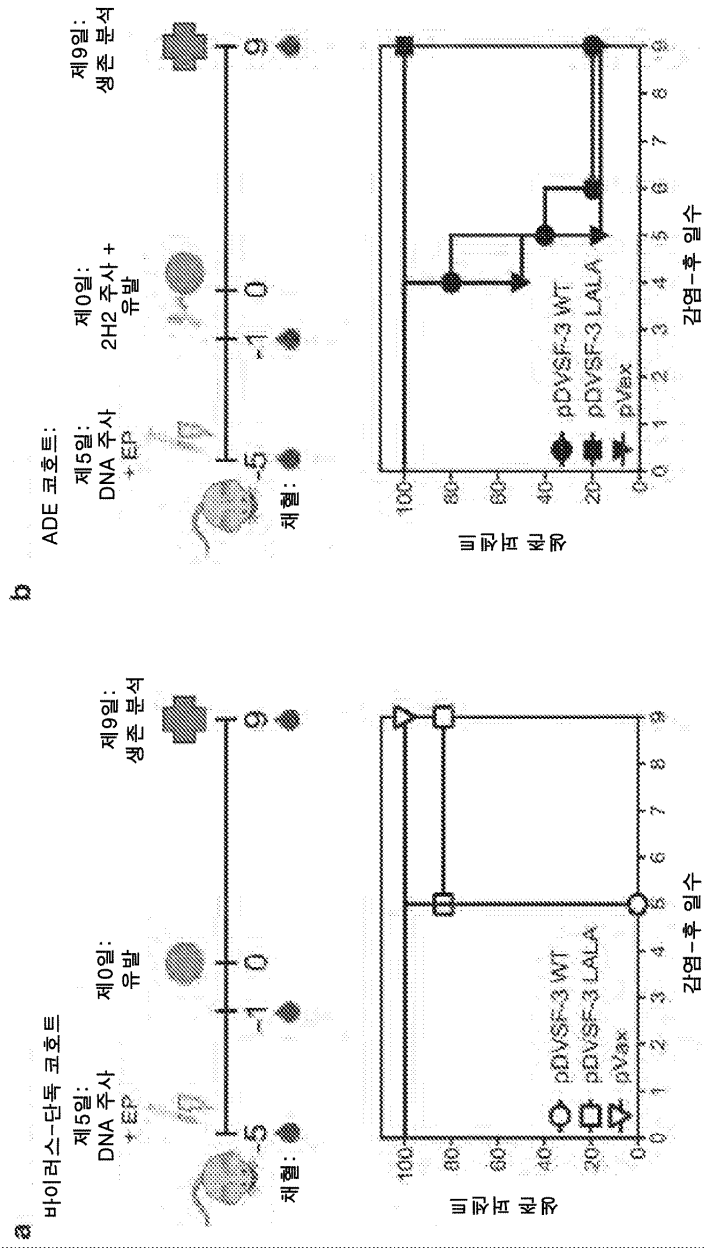
도면76



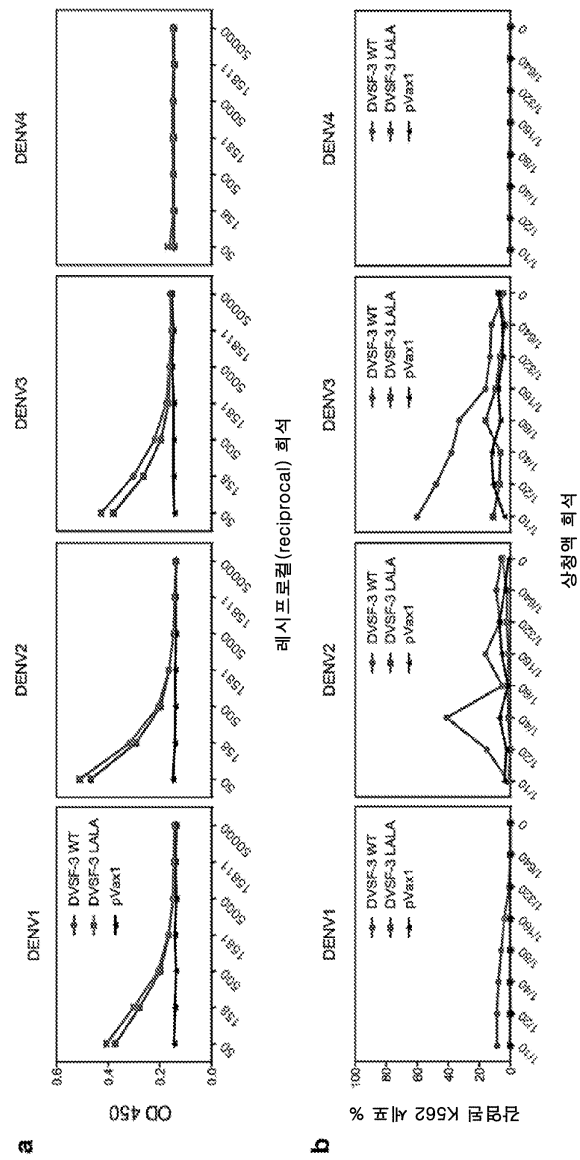
도면77



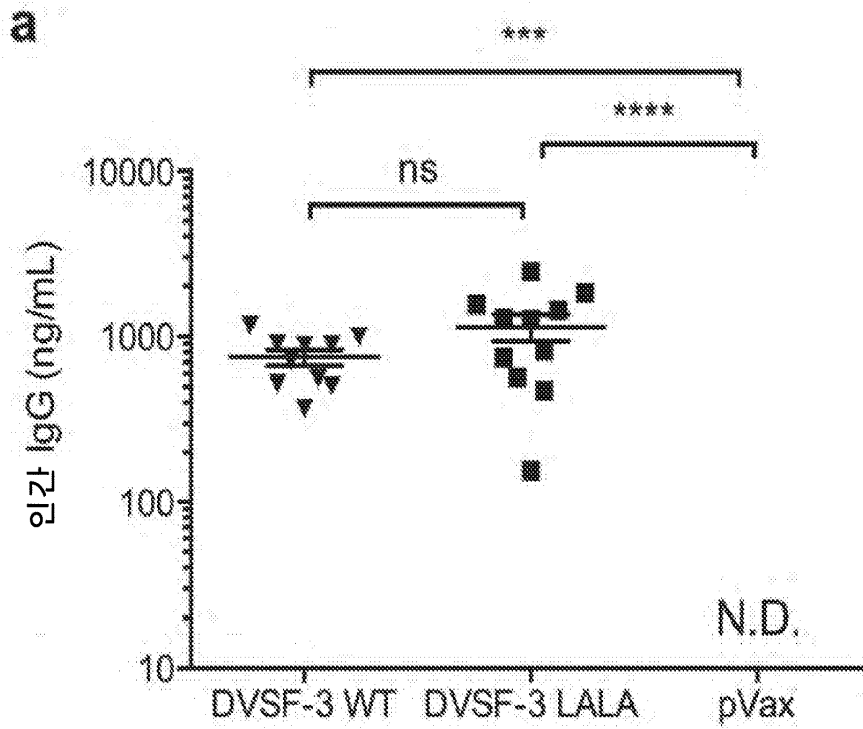
도면78



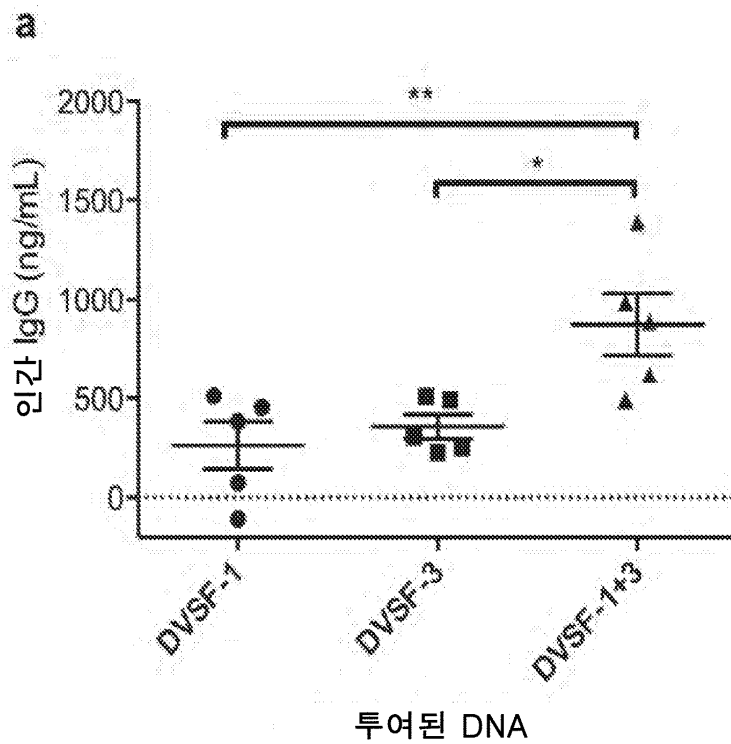
도면79



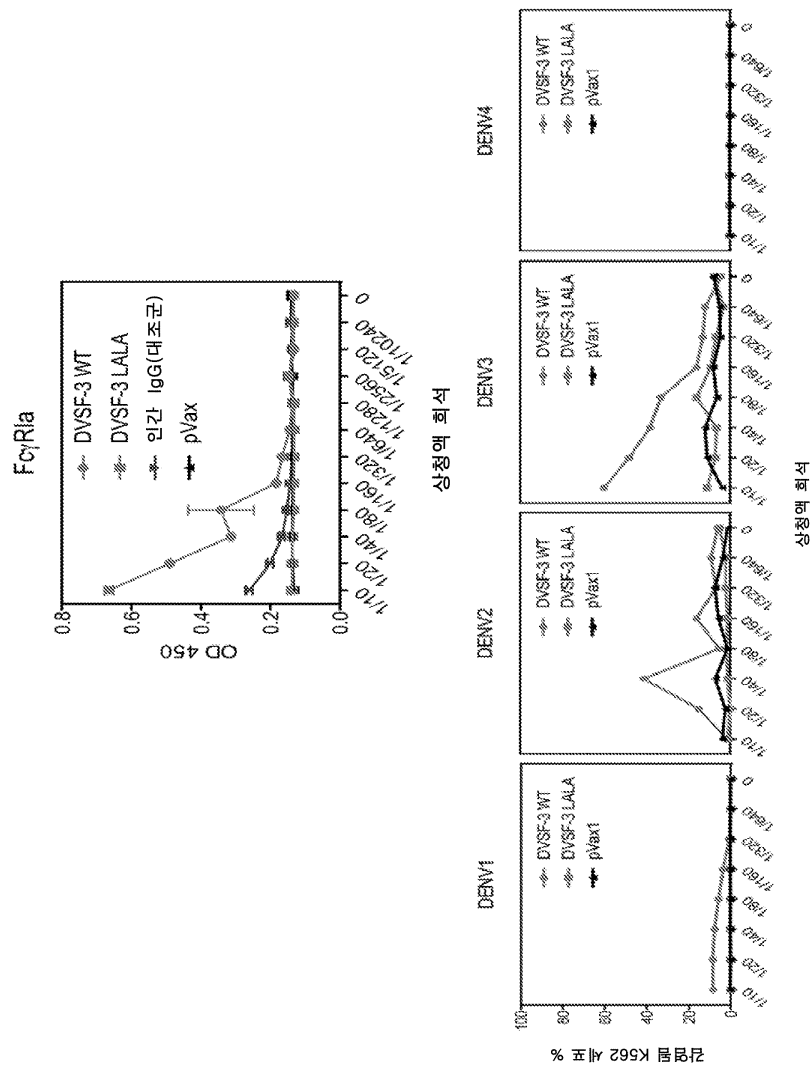
도면80



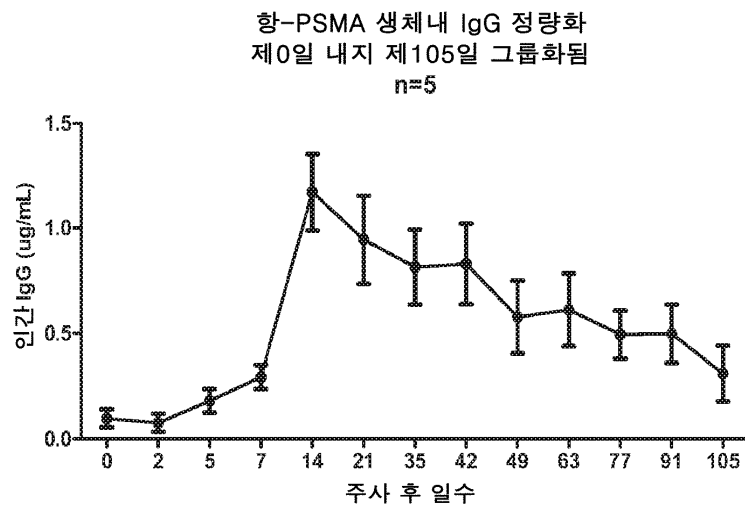
도면81



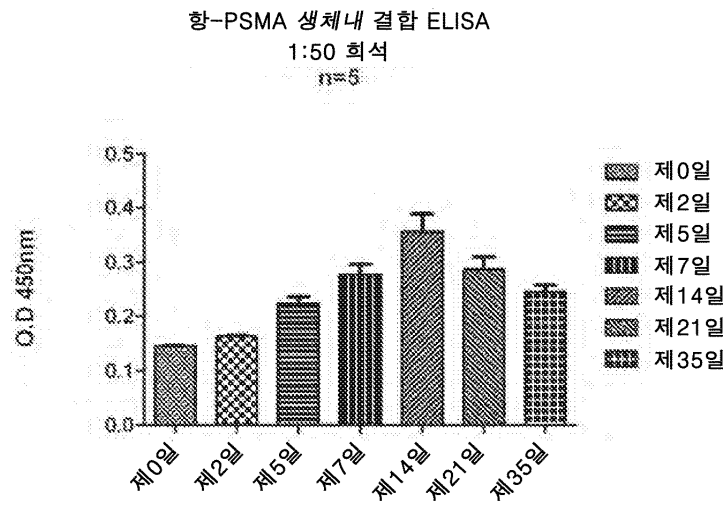
도면82



도면83

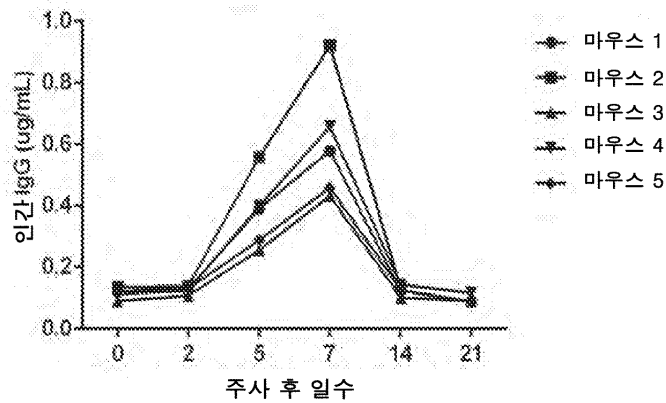


도면84



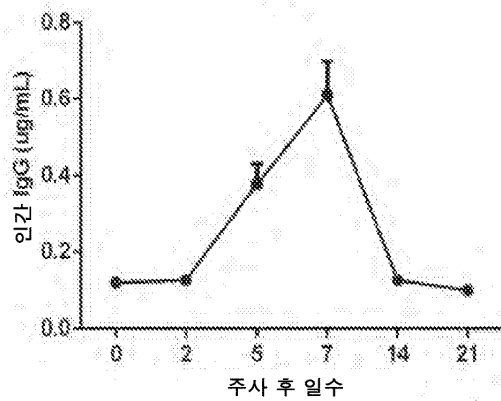
도면85

C57BL/6 마우스 내 항-PSMA 생체내 IgG 정량화
제0일 내지 제21일

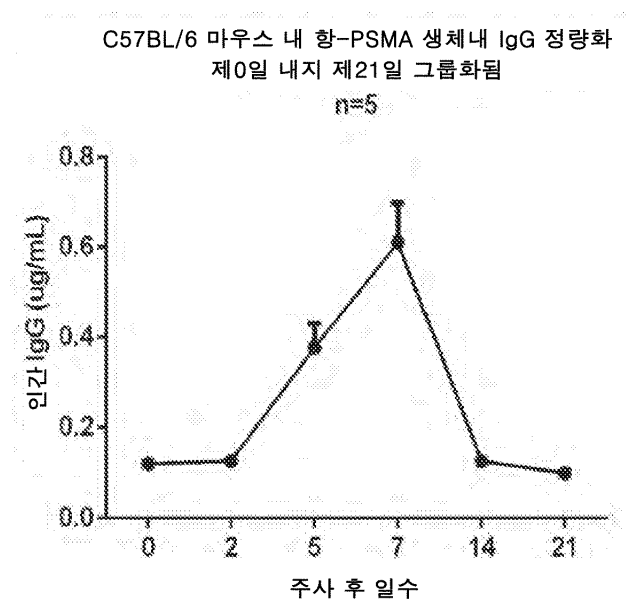


도면86

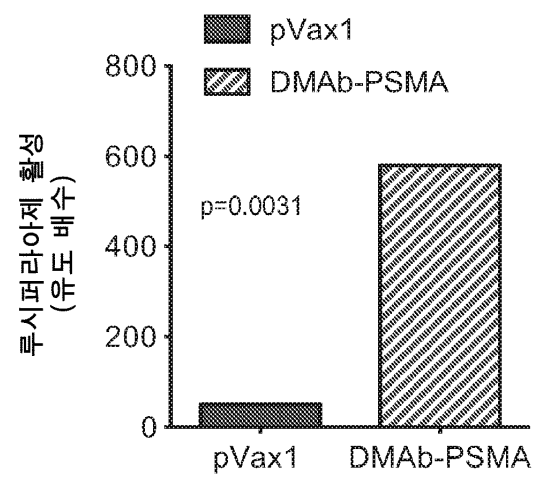
C57BL/6 마우스 내 항-PSMA 생체내 IgG 정량화
제0일 내지 제21일 그룹화됨
n=5



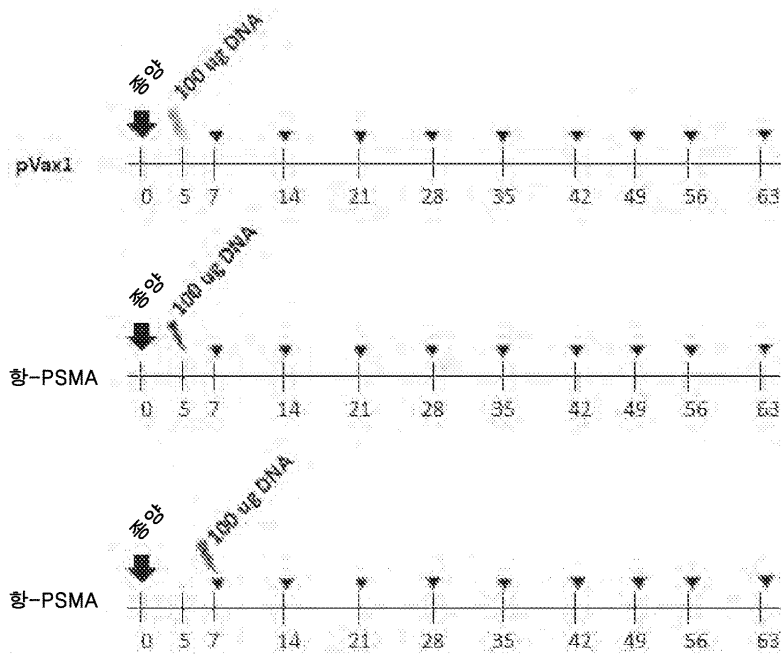
도면87



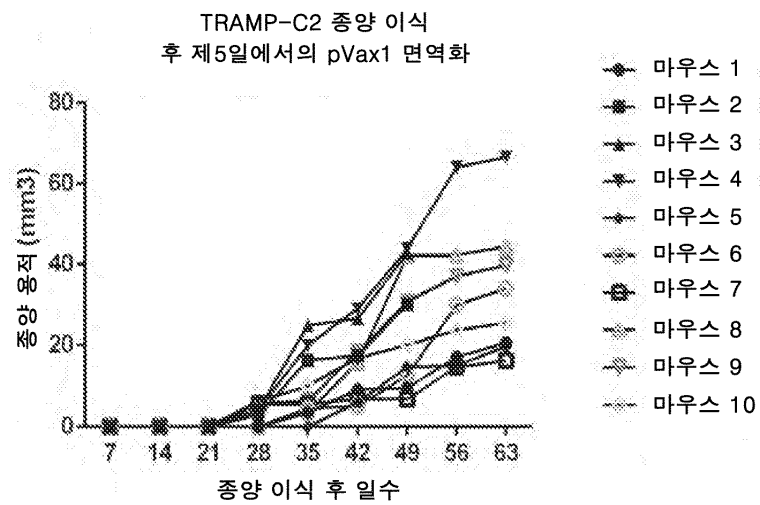
도면88



도면89

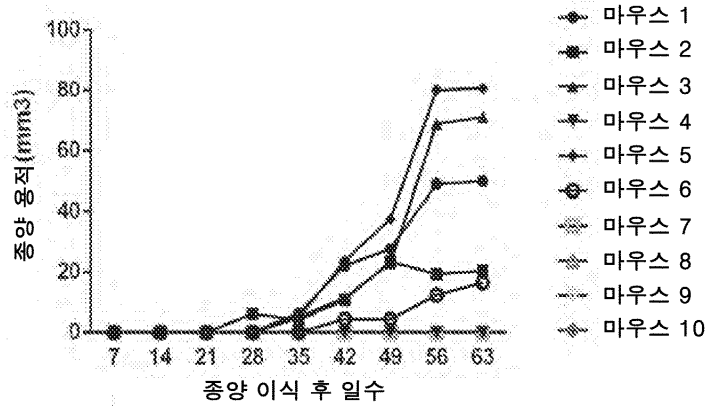


도면90



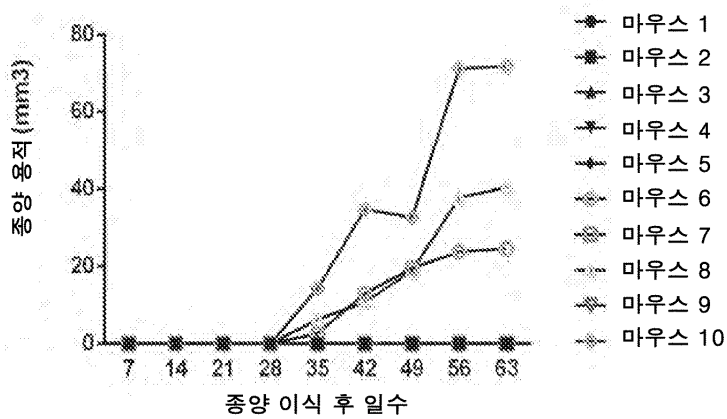
도면91

TRAMP-C2 종양 이식
후 제5일에서의 항-PSMA 면역화

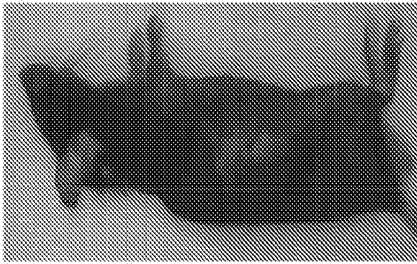


도면92

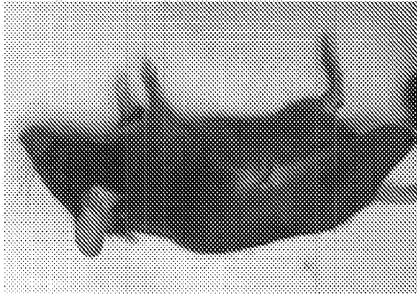
TRAMP-C2 종양 이식
후 제7일에서의 항-PSMA 면역화



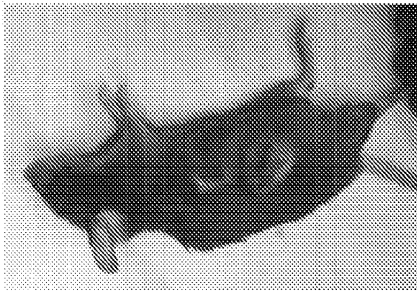
도면93



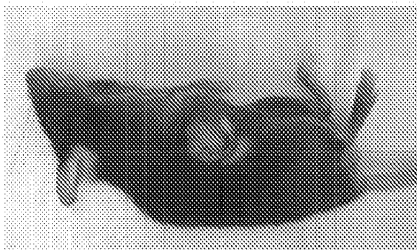
항-42323A (제7일)



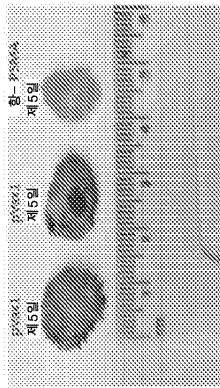
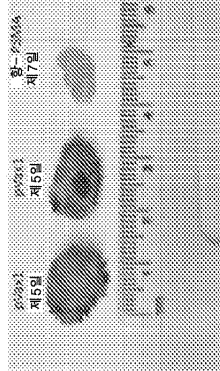
항-42323A (제5일)



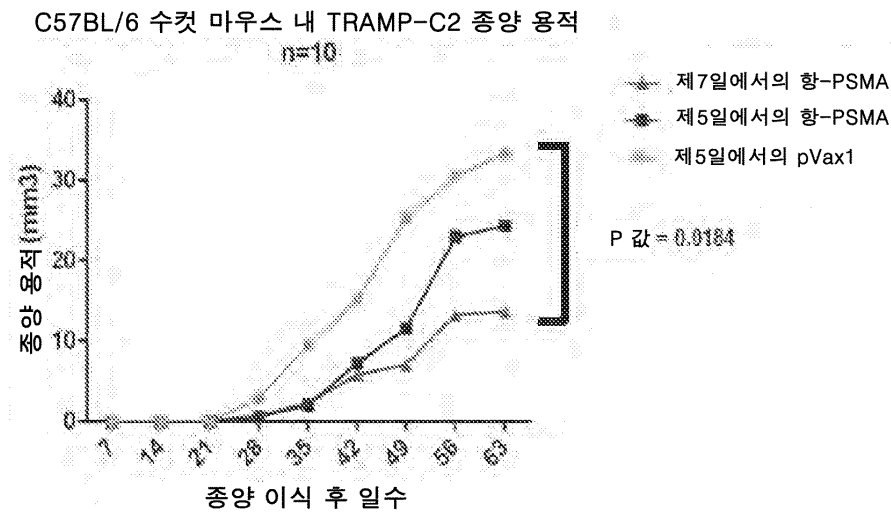
항-42323A (제5일)



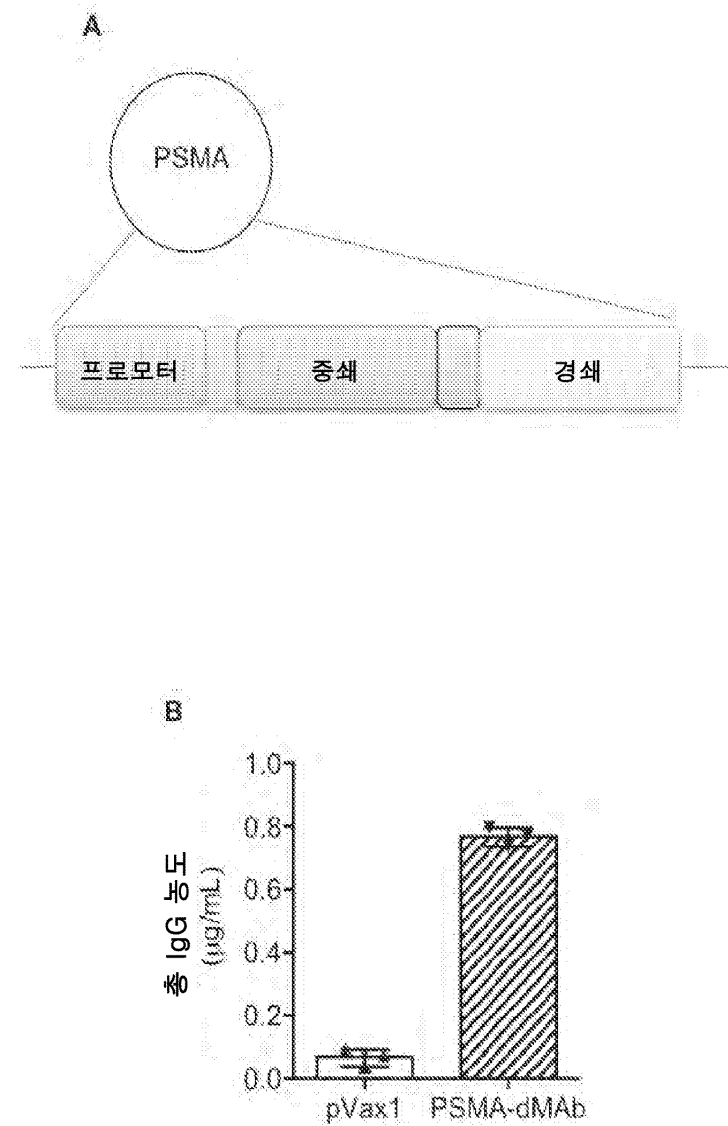
항-42323A (제5일)



도면94

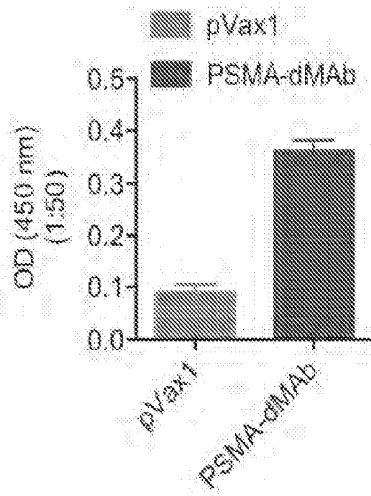


도면95ab

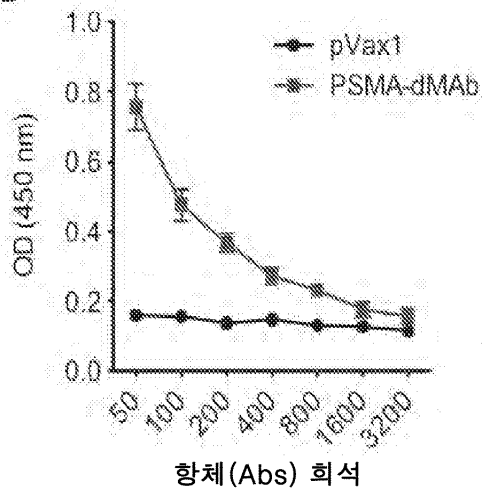


도면95cd

C

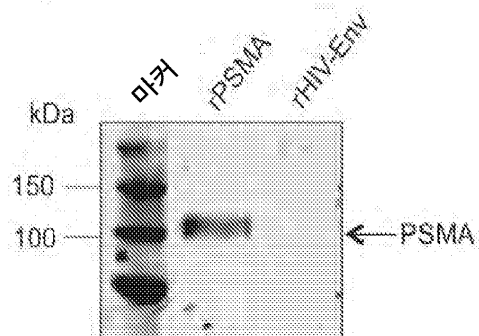


D

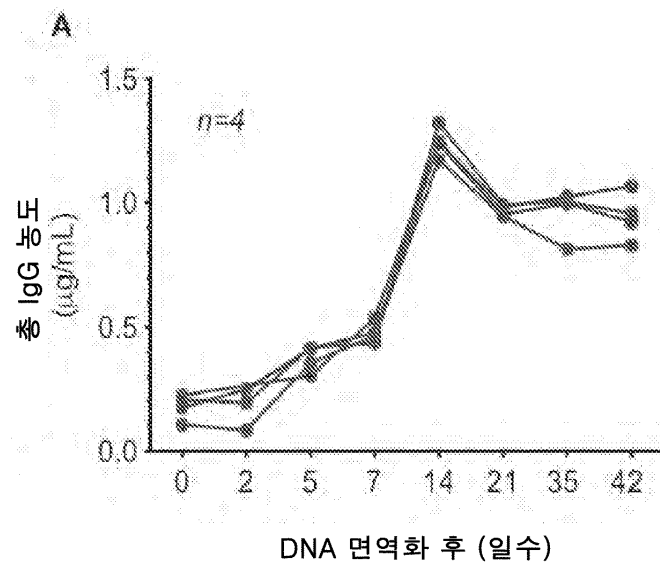


도면95e

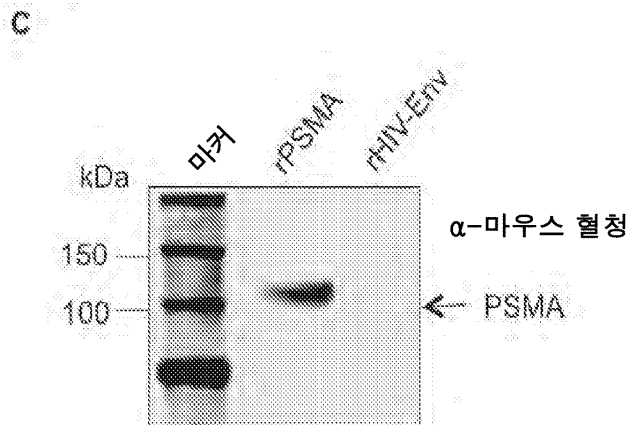
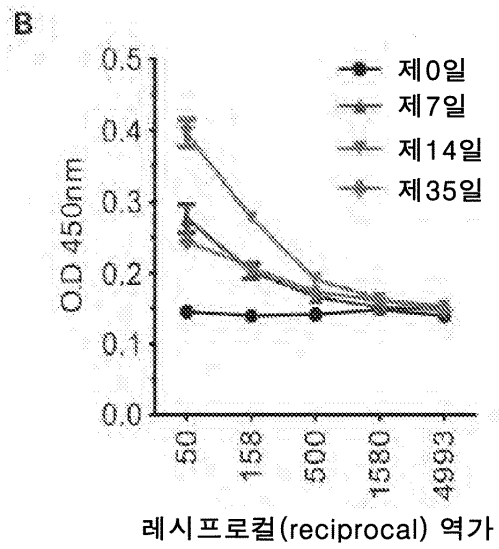
E



도면96a

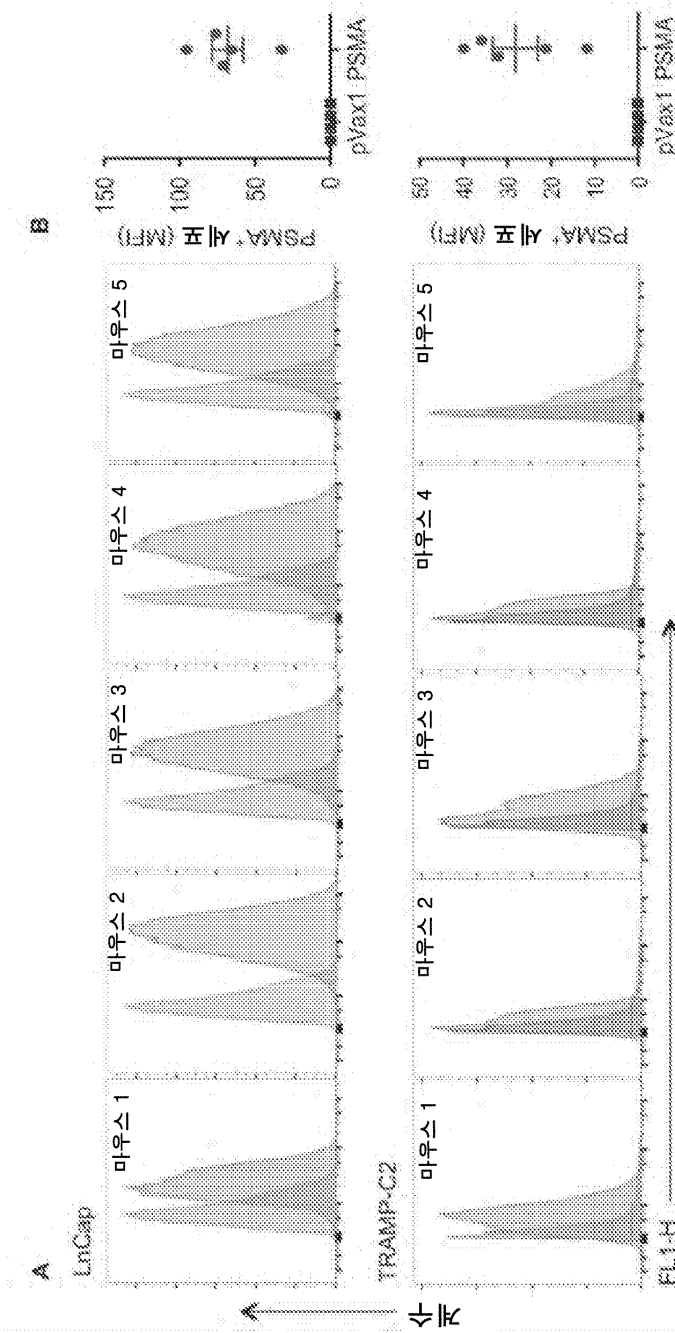


도면96bc



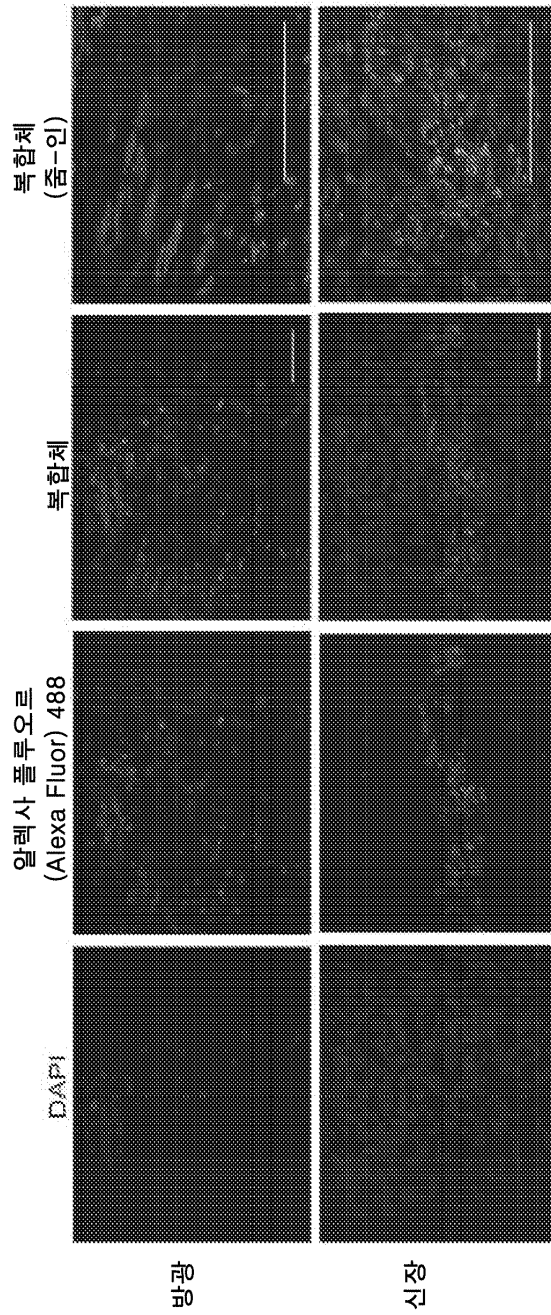
도면97a

도 3



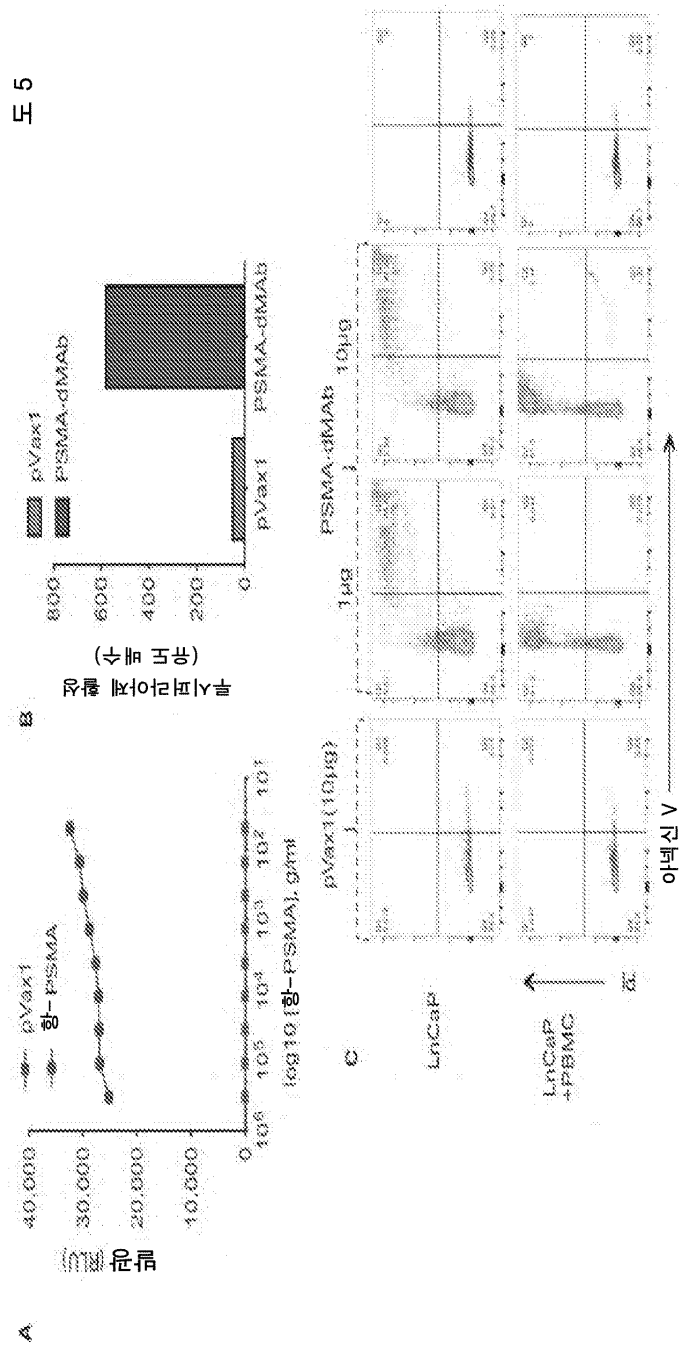
도면98

도 4

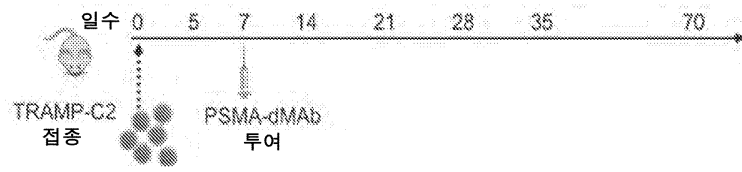


도면99

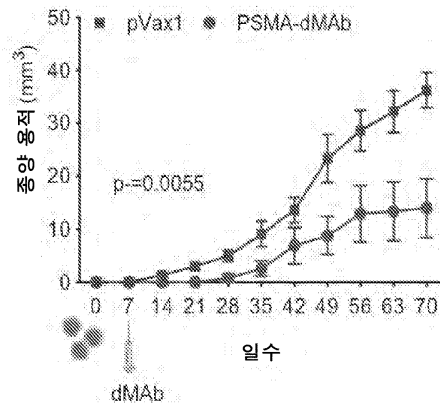
도 5



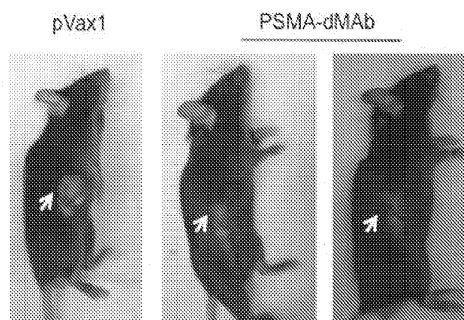
도면100abc



A

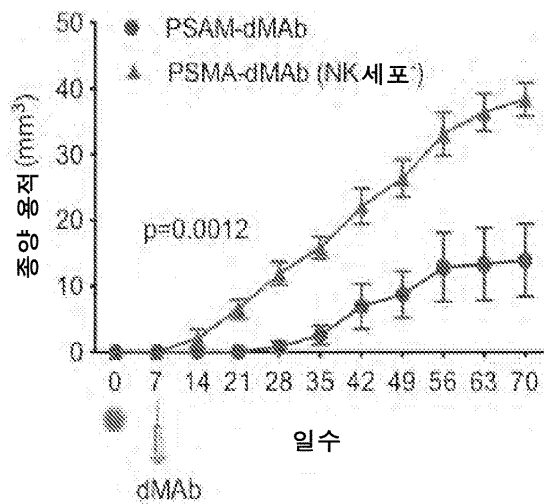


B



C

도면100d



D

서열 목록

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

INOVIO PHARMACEUTICALS, INC.

WEINER, David

MUTHUMANI, Karupiah

WALTERS, Jewell

SARDESAI, Niranjana

<120> DNA ANTIBODY CONSTRUCTS AND METHOD OF USING SAME

<130> 206108-0033-20-WO.604930_UPVG0053WO3

<150> US 62/086,157

<151> 2014-12-01

<150> US 62/213,166

<151> 2015-09-02

<160> 80

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 1

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe

35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Leu Leu Thr Ile Thr Asn Tyr Ala

65 70 75 80

Pro Arg Phe Gln Gly Arg Ile Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser

85 90 95

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

340 345 350
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 385 390 395 400
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 405 410 415
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 435 440 445
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 450 455 460
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys
 465 470 475 480
 Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
 485 490 495
 Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val
 500 505 510
 Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val
 515 520 525
 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Gln Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 530 535 540
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Lys Leu Ala
 545 550 555 560
 Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly
 565 570 575
 Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Val Ala Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 580 585 590

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
595 600 605
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Gln Ser Leu Ser Thr Phe
610 615 620
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
625 630 635 640
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
645 650 655
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
660 665 670
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
675 680 685
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
690 695 700
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
705 710 715 720
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
725 730 735
Gly Glu

<210> 2

<211> 768

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 2

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Thr His Ala Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Phe Leu
20 25 30
Arg Gly Val Gln Cys Gln Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
35 40 45

Gln Pro Gly Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp
50 55 60

Phe Ser Arg Gln Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
65 70 75 80

Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr His
85 90 95

Ala Asp Ser Val Trp Gly Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
100 105 110

Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Phe Cys Val Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly
130 135 140

Tyr Asn Tyr Tyr Asp Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met
145 150 155 160

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
165 170 175

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
195 200 205

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
210 215 220

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
225 230 235 240

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
245 250 255

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
260 265 270

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser

500 505 510

Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu

515 520 525

Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu Leu Thr

530 535 540

Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala

545 550 555 560
 Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly
 565 570 575
 Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 580 585 590
 His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg

 595 600 605
 Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr
 610 615 620
 Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr
 625 630 635 640
 Tyr Cys Lys Ser Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly
 645 650 655
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr
 660 665 670

Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu
 675 680 685
 Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp
 690 695 700
 Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro
 705 710 715 720
 Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu
 725 730 735
 Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr

 740 745 750
 His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 755 760 765

<210> 3

<211> 792

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the Heavy Chain (VH-CH1) of HIV-1

Env Fab

<400> 3

aagcttgccg ccaccatgga gactgataca ctgctgctgt ggggtgctgct gctgtgggtg 60
ccagggtcaa ccggagatgg ggctcaggtc cagctgggtcc agagcggcgg acagatgaag 120

aaaccggcg agagcatgag gatctcctgc agagcatctg gatacagatt catcgactgt 180
acctgaact ggattaggct ggctcctgga aagagaccag agtggatggg gtggctgaaa 240
ccacgagggg gagcagtga ttacgcccgg ccctgcagg gacgagtac catgaccagg 300
gacgtgtaca gcgataccgc ctctctggag ctgcgggtccc tgacagtga cgatactgct 360
gtctacttct gcacacgcgg aaagaactgt gactataatt gggattttga aactggggc 420
cggggaacac ccgtgatcgt cagctcccc agtactaagg gaccttcagt gtttcactg 480
gccccctcta gtaaatccac ctctggaggg acagccgctc tgggatgcct ggtgaaagat 540

tatttccccg aacctgtgac cgtcagttgg aactcagggg ctctgacttc tggcgtgcac 600
acctttctg cagtcctgca gtcaagcggg ctgtacagtc tgtcctctgt ggtcactgtg 660
cctagttaa gctggggcgc tcagacctat atttgtaacg tgaatcataa gccatccaat 720
acaaaagtgg acaaaaaagc cgaacccaaa tctgttacc cttatgatgt gcccgactac 780
gcctgactcg ag 792

<210> 4

<211> 756

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain (VL-CL) of HIV-1 Env Fab

<400> 4

aagcttgccg ccaccatgga aaccgataca ctgctgctgt ggggtgctgct gctgtgggtg 60
ccaggaagta ccggggatgg ggctcaggtc cagattgtgc tgactcagtc ccctgggacc 120
ctgtctctga gtccaggcga gacagctatc atttcatgcc gaactagcca gtacggcagc 180
ctggcttggg atcagcagcg accaggacag gcaccacgac tggatcatcta ctacggcagc 240
acaagggcgg ctggcatccc cgacaggttc tccggcagca ggtggggggc tgattacaac 300
ctgactatct ctaatctgga gagtgggggac tttggcgtgt actattgcca gcagtatgag 360
ttcttcggcc agggaaactaa ggtgcagggtg gacatcaaaa gaaccgtggc agcccatcc 420

gtcttcattt ttcccccttc tgatgagcag ctgaagtcag gcaccgccag cgtgggtctgt 480
ctgctgaaca atttctaccc ccgggaagcc aaggtgcagt ggaaagtgga caacgctctg 540

cagagtggaa attcacagga gagcgtgacc gaacaggact ccaaggattc tacatatagt 600
ctgagcagca ccctgaccct gagtaaagca gattacgaga agcacaaagt gtatgcctgt 660
gaagtcacac atcagggcct gaggagcccc gtgactaaaa gtttcaaccg aggagagtgc 720
tacccttatg atgtgcccgga ctacgcctaa ctcgag 756

<210> 5

<211> 731

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VRC01 IgG

<400> 5

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro

20 25 30

Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile

35 40 45

Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu

50 55 60

Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg

65 70 75 80

Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr

85 90 95

Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His

115 120 125

Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Pro Ser Thr Lys Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

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

420 425 430
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg
 465 470 475 480
 Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp
 485 490 495

 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu
 500 505 510
 Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
 515 520 525
 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys
 530 535 540
 Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
 545 550 555 560
 Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly

 565 570 575
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu
 580 585 590
 Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
 595 600 605
 Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys
 610 615 620
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 625 630 635 640

 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 645 650 655
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 660 665 670
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

675 680 685
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

690 695 700
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser

705 710 715 720
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

725 730
<210> 6
<211> 819
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Optimized Nucleic Acid Sequence Encoding IgG Heavy Chain
<400> 6

ggatccgcc ccatggaac cgacactctg ctgctgtggg tgctgtctgt gtgggtgccc 60
ggctcaacag gcgacggcgc tcaggtccag ctggtccagt ctggagctgt gatcaagacc 120
cctggcagct ccgtcaaaat ttcttcgaga gcaagtggct acaacttccg ggactatagc 180

atccactggg tgcggctgat tctgataag ggatttgagt ggatcggctg gatcaagcca 240
ctgtggggcg ctgtgtccta cgcaaggcag ctgcaggggc gcgtctccat gacacgacag 300
ctgtctcagg acccagacga tcccattgg ggggtggcct acatggagtt cagtggactg 360
actccgcgag acaccgccga atatttttgc gtgcggagag gctcctgcga ctactgtggg 420
gatttcccat ggcagtattg gtgtcaggga actgtggctg tggctcttag tgcataacc 480
aagggcccca gcgtgtttcc tctggcccca tcaagcaaaa gtacatcagg aggaactgca 540
gctctgggat gtctggtgaa ggattactic ccgcagcctg tgaccgtcag ctggaactcc 600

ggagcactga cctccggagt gcacacattt cccgtgtcc tgcagtcctc tgggctgtac 660
tctctgagtt cagtggcac agtgcctagc tctctctgg gcaccagac atatatctgc 720
aacgtcaatc ataagccaag taatactaaa gtggacaaga aagtcgaacc caaatcatgt 780
taccctatg acgtgctga ttatgcttga taactcgag 819

<210> 7
<211> 753
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Optimized Nucleic Acid Sequence Encoding IgG Light Chain

<400> 7

ggatccgcc ccatggagac tgataactg ctgctgtggg tgctgctgct gtgggtgcct 60

ggctcaaccg gcgacggggc tcaggtccag attgtgtga cccagagccc tggcatcctg 120

tcactgagcc caggagagac cgcaacactg ttctgcaagg cctcccaggg cgggaacgct 180

atgacatggt accagaaacg gagaggacag gtgccccgac tgctgatcta tgacacttca 240

aggcgagcaa gcggagtgcc tgatcgattt gtcggcagcg gctctgggac agacttcttt 300

ctgactatta ataagctgga cagagaggat ttctgtgtgt actattgcca gcagtttgaa 360

ttctttggac tgggcagcga gctggaagtg cacaggaccg tcgccgtcc aagtgtgttc 420

atttttccc ctacgatga gcagctgaaa tccgggacag cctctgtggt ctgtctgctg 480

aacaatttct acccccgcga agcaaagggt cagtggaaag tcgacaacgc cctgcagagt 540

ggcaattcac aggagagcgt gaccgaacag gactccaagg attctacata tagtctgagc 600

tccactctga cctgtctaa agctgattac gagaagcaca aagtgtatgc atgcgaagtc 660

actcatcagg gcctgtctag tctgtgacc aagagcttta accgagggga gtgttaccca 720

tatgacgtcc ccgattacgc ctgataactc gag 753

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgE1 Signal Peptide of VRC-1 IgG

<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable Heavy Region of VRC01 IgG

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys
20 25 30

Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe
65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly

100 105 110

Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Pro Ser Thr Lys Gly

115 120 125

<210> 10

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy region 1 (CH1) of VRC01 IgG

<400> 10

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

1 5 10 15

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

20 25 30

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

35 40 45

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

50 55 60

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

65 70 75 80

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys

85 90 95

Ser Cys

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge Region of VRC01 IgG

<400> 11

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy Region 2 (CH2) of VRC01 IgG

<400> 12

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy Region 3 (CH3) of VRC01 IgG

<400> 13

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin Cleavage Site of VRC01 IgG

<400> 14

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

1 5

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG Linker and P2A Peptide of VRC01 IgG

<400> 15

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 16

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable Light Region (VL) of VRC01 IgG

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala

20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser

35 40 45

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg

50 55 60

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp

65 70 75 80

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr

85 90 95

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg

100

<210> 17

<

211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Light Region (CL, kappa) of VRC01 IgG

<400> 17

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro

85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG Heavy Chain Signal Peptide of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 18

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 19

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable Heavy Region of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 19

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

1 5 10 15

Gln Cys Gln Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly

20 25 30

Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg

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

100 105 110
Cys Val Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr
115 120 125
Tyr Asp Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp
130 135 140
Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
145 150

<210> 20
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Constant Heavy region 1 (CH1) of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 20
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge Region of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 21

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy Region 2 (CH2) of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 22

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

100 105 110

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy Region 3 (CH3) of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 23

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin Cleavage Site of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 24

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

1 5

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG Linker and P2A Peptide of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 25

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Lamba Light Chain Signal Peptide of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 26

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu Leu Thr Cys Cys Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Asn Ser

20

<210> 27

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable Light Region (VL) of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val

35 40 45

Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Leu Thr Ser Thr

85 90 95

Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Light Region (CL, lambda) of HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG Heavy Chain Signal Peptide of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 29

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 30

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable Heavy Region of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 30

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

Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Ile Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Glu Gly Thr Thr Gly Trp Gly Trp Leu Gly Lys Pro Ile Gly
100 105 110

Ala Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy region 1 (CH1) of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 31

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

1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge Region of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 32

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy Region 2 (CH2) of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 33

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

 85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

 100 105 110

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Heavy Region 3 (CH3) of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 34

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin Cleavage Site of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 35

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

1 5

<210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GSG Linker and P2A Peptide of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 36
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human Kappa Light Chain Signal Peptide of HIV-1 Env-4E10 Ig
 <400> 37

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Tyr Gly
 20

<210> 38
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Variable Light Region (VL) of HIV-1 Env-4E10 Ig
 <400> 38

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

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

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Constant Light Region (CL, kappa) of HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 39
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
1 5 10 15
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
35 40 45
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

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

<210> 40
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the VH-CH1 of anti-Her-2 Fab

<400> 40

ggatcgcgcca ccatggactg gacatggatt ctgtttctgg tcgccgccgc tacaagagtg 60
cattccgaag tgcagctggg cgagagtggg gggggactgg tgcagcccgg cggatctctg 120
cgactgagtt gcgccgttc aggccttcacc ttacagact acaccatgga ttgggtgaga 180
caggcacctg gcaagggact ggagtgggtg gctgatgtca acccaaatag tgggggtca 240
atctacaacc agaggttcaa gggcagggtc accctgagcg tggacaggtc caaaaact 300
ctgtatctgc agatgaattc tctgcgggct gaagataccg cagtctacta ttgcgccgc 360
aatctgggcc caagcttcta ctttgactat tgggggcagg gcacactggt gactgtcagc 420

tccgcttcta caaagggacc aagcgtgttc cactggcac cctctagtaa atccacctct 480
ggagggacag cagccctggg ctgtctgggtg aaagactatt tcccagagcc tgtgactgtc 540
agctggaact ccgagcact gactagcgga gtgcacacct ttccagccgt cctgcagtca 600
agcggcctgt actccctgtc ctctgtgggtc acagtgccta gttcaagcct gggaactcag 660
acctatattt gtaatgtgaa ccataacca agcaatacaa aggtggacaa gaaggtggaa 720
ccaaaatcct gctgataact cgag 744

<210> 41

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the VH-CH1 of anti-Her-2 Fab

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr

35 40 45

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln

65 70 75 80

Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr
85 90 95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

195 200 205
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

<210> 42

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the VL-CL of anti-Her-2 Fab

<400> 42

ggatccgcc ccatggattg gacttggatt ctgttcttgg tcgccgccgc tacccgcgtg 60

cattccgata ttcagatgac tcagagcccc tctcactgt cagccagcgt gggcgaccga 120

gtcaccatca catgcaaagc ttctcaggat gtgagtattg gggtcgcatg gtaccagcag 180

aagccaggca aagcacccaa gctgctgata tattccgcct cttacaggta tacaggagtg 240

cccagcagat tcagtggctc aggaagcggg actgacttta ctctgacat cagctccctg 300

cagcctgagg atttcgctac ctactattgc cagcagtact atatctaccc atatacttt 360

ggccaggga caaaagtga gatcaagcg accgtggccg ctcctccgt ctcatTTTT 420
ccccctctg acgaacagct gaagagcga acagcaagcg tggctgtct gctgaacaat 480

ttctaccctc gcgaggccaa agtgcaagg aaggtcgata acgtctgca gtccgggaat 540
tctcaggaga gtgtgactga acaggactca aaagatagca cctattccct gtctagtaca 600
ctgactctga gcaaggcaga ctacgaaaag cacaagtgt atgctgtga ggtcacccac 660
caggggctgt caagtcctgt caccaagtcc ttcaatagag gcgaatgtg ataactcgag 720
720

<210> 43

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the VL-CL of anti-Her-2 Fab

<400> 43

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

20 25 30

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser

35 40 45

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

50 55 60

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

85 90 95

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr

100 105 110

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 44

<211> 2241

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding anti-DENV Human IgG

<400> 44

ggatccgcc ccatggactg gacttggagg attctgtttc tggtcgccgc cgctactggg 60
 actcacgctc aggcacatct ggtcgaatct ggaggaggag tggtcagacc tggccgatec 120
 ctgcgactgt cttagcgagc tagcgccctc aacttcagca caaacgcaat gcactgggtg 180
 cgacaggcac caggcaaggg actggagtgg gtcgctgtga tctcatagca cggaagccat 240

aagtactatg cagattctgt gaaaggccgg ttcaccattt ccagggacaa ttctaagaac 300
 accctgtatc tgcagatgaa tagcctgcgc gcagccgata ccgcagtgtg ctattgcgca 360
 actgtcggcg tgctgacctg gccagtgaac gccgaatact ttcaccattg gggacagggc 420
 agtctgggtc cagtgcgctc cgcaagtact aagggacat cagtgttccc actggcaccc 480
 tctagtaaat ctactagtgg cgggaccgct gcactgggat gtctggtgaa ggactatttc 540
 cccgagcctg tcaccgtgag ctggaattcc ggagccctga caagcggcgt ccacactttt 600
 cccgctgtgc tgcagtcaag cggactgtac tcctgtcct ctgtggtcac tgtgcctagt 660

tcaagcctgg gcactcagac ctatatctgc aatgtgaacc acaagccctc taacacaaaa 720
 gtcgacaaga aagtgaacc taagagctgt gataaaacac atacttgccc accttgtcca 780
 gcaccagagc tgctgggagg accaagcgtg ttctgtttc cacccaagcc taaagacaca 840

ctgatgatta gccggacacc tgaagtcact tgcgtggctcg tggacgtgtc ccacaggagac 900
 cccgaagtca agtttaattg gtacgtggat ggcgtcgagg tgcataacgc caagacacaaa 960
 cccccggagg aacagtacaa tagcacatat agagtcgtgt ccgtcctgac tgtgctgcat 1020
 caggattggc tgaatgggaa ggagtataag tgcaaagtgt ctaacaaggc tctgcctgca 1080

ccaatcgaga aaaccattag caaggctaaa ggccagccta gggaaccaca ggtgtacaca 1140
 ctgcctccaa gtcgacga gctgaccaag aatcaggtct ccctgacatg tctggtgaaa 1200
 ggcttctatc catcagatat cgccgtggag tgggaaagca acgggcagcc cgaacaacat 1260
 tacaagacca cccccctgt gctggactct gatggcagtt tctttctgta ttctaagctg 1320
 accgtggaca aaagtagatg gcagcagggg aatgtctttt catgtagcgt gatgcacgag 1380
 gccctgcaca accattacac acagaagtcc ctgtctctga gtcccggaaa gaggggccgc 1440
 aaacggagat caggggagcgg agctactaat ttcagcctgc tgaaacaggc aggggatgtg 1500

gaggaaaacc ccggacctat ggcttggacc ccactgttcc tgtttctgct gacatgctgt 1560
 cccgggggca gcaattctca gagtgtcctg acacagccac catcagttag cggagcacca 1620
 ggacagaggg tgaccatctc ctgcacaggc agcagcagca acattggcgc cgggtacgac 1680
 gtgcattggt atcagcagct gcccggcacc gctcctaagc tgctgatctg tggcaacaat 1740
 aaccgccc atgggggtgcc cgatcgattc tccggctcta aaagtgggac ttcagccagc 1800
 ctggctatta cggcctgca ggccgaggac gaagctgatt actattgcca gagctacgac 1860
 tcaagcctga ccggagtctg gttcggagga ggaaccaagc tgacagtcct gggacagcct 1920

aaagccgctc caagcgtgac actgtttcct ccatacctctg aggaactgca ggcaacaag 1980
 gccaccctgg tgtgcctgat ttccgacttc taccggggg cagtcactgt ggcttggag 2040
 gcagatagtt cacctgtcaa agccggagtg gagactacca caccatcaaa gcagagcaat 2100
 aacaaatacg cagccagctc ctatctgtcc ctgaccctg agcagtggaa gtctcacaaa 2160
 tcctattctt gccaggtcac tcacgaagga agcactgtgg agaaaactgt cgcaccaacc 2220
 gaatgtagtt gataactcga g 2241

<210> 45
 <211> 739
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of anti-DENV Human IgG

<400> 45

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

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

 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Gly Val Leu Thr Trp Pro Val Asn Ala Glu
 115 120 125

 Tyr Phe His His Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Ser 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 Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

 485 490 495
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu
 500 505 510

Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln
 515 520 525
 Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys
 530 535 540
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr
 545 550 555 560

 Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Cys Gly Asn Asn
 565 570 575
 Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Thr Gly Val Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro

 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 675 680 685
 Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 690 695 700

 Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
 705 710 715 720
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 725 730 735
 Glu Cys Ser

<210> 46

<211> 265

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG Heavy Chain

<400> 46

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Asn Phe Arg Asp Tyr Ser Ile His Trp Val Arg Leu Ile Pro

50 55 60

Asp Lys Gly Phe Glu Trp Ile Gly Trp Ile Lys Pro Leu Trp Gly Ala

65 70 75 80

Val Ser Tyr Ala Arg Gln Leu Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Arg Gln

85 90 95

Leu Ser Gln Asp Pro Asp Asp Pro Asp Trp Gly Val Ala Tyr Met Glu

100 105 110

Phe Ser Gly Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Val Arg

115 120 125

Arg Gly Ser Cys Asp Tyr Cys Gly Asp Phe Pro Trp Gln Tyr Trp Cys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

180 185 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

195 200 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

210 215 220

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

225 230 235 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

245 250 255

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

260 265

<210> 47

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG Light Chain

<400> 47

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Val Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser

20 25 30

Pro Gly Ile Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Thr Leu Phe Cys

35 40 45

Lys Ala Ser Gln Gly Gly Asn Ala Met Thr Trp Tyr Gln Lys Arg Arg

50 55 60

Gly Gln Val Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Arg Arg Ala Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Val Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe

85 90 95

Leu Thr Ile Asn Lys Leu Asp Arg Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Phe Glu Phe Phe Gly Leu Gly Ser Glu Leu Glu Val His Arg

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro

225 230 235 240

Asp Tyr Ala

<210> 48

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the Heavy Chain (VH-CH1) of HIV-1 Env Fab

<400> 48

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly

 20 25 30

Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser

 35 40 45

Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro

 50 55 60

Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala

 65 70 75 80

Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp

 85 90 95

Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp

100 105 110
 Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn
 115 120 125
 Trp Asp Phe Glu His Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser
 130 135 140
 Pro Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 165 170 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 180 185 190
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

245 250 255

<210> 49

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the Light Chain (VL-CL) of HIV-1 Env Fab

<400> 49

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Val Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
 20 25 30
 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys

35 40 45
 Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
 50 55 60
 Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly
 65 70 75 80
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

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

 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Tyr Pro Tyr Asp Val
 225 230 235 240
 Pro Asp Tyr Ala

<210> 50

<211> 1536

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding HIV-1 PG9 Fab

<400> 50

ggatccgcc ccatggcaag acccctgtgc accctgtgc tgctgatggc aaccctggcc 60
ggagccctgg cacagagcgc cctgaccag cccgcaagcg tctccggctc accaggccag 120
agcatcacta ttagttgcaa cgggactagc aacgacgtgg gaggtatga gagtgtcagc 180
tggtaccagc agcatcccgc aaaagcacca aaagtgggtca tctacgatgt cagtaaaagg 240
ccaagtgggg tctcaaatag gttctcaggg agtaaatctg ggaatacagc atctctgacc 300
atctccggac tgggcgcaga agatgaaggc gactactatt gcaaaagcct gacctcaacc 360

agacggcgag tctttgggac aggcaccaag ctgacagtcc tgacagtgc tgccccctcc 420
gtcttcattt ttccaccttc agatgagcag ctgaaatctg gcactgcac tgtgggtctgc 480
ctgtgaaca acttctatcc acgagaggcc aaggtgcagt ggaaagtgga taacgcactg 540
cagtccggca atagtcagga aagcgtgact gagcaggatt ccaaggacag tacctatagc 600
ctgtccagta cactgacct gtccaaggct gactacgaaa aacataaggt gtatgcatgt 660
gaagtgactc accagggact gaggtcacca gtcactaagt cttttaacag gggagagtgc 720
ggcgggggag gatctggagg cggcggctct ggaggggggag gctcaggggg cggaggaagc 780

ggcggaggag ggtccggagg aggaggcagt cagagactgg tcgaaagcgg gggaggagtg 840
gtgcagcctg ggtcctcact gagactgtca tgcgtgccca gtggctttga tttttcacga 900
cagggaatgc attgggtcag gcaggcaccc ggacagggcc tggaatgggt cgccttcatt 960
aagtacgacg gaagcgagaa gtacatgcc gactcagtgt ggggaaggct gagcatctca 1020
agggacaact caaaggacac cctgtacctg cagatgaata gcctgagagt ggaagatacc 1080
gtactattat tctgcgtgcg agaggccgga ggccagatt accggaacgg gtacaattac 1140
tatgatttct acgacggcta ctacaattac cattatatgg atgtctgggg caaaggaact 1200

acagtaccg tgagctccgc aagtactaag ggaccttccg tgtttcctct ggctccagt 1260
tccaaaagta catccggagg aacagccgct ctgggatgtc tggtaagga ctattttccc 1320
gagcccgta ctgtctcctg gaacagcggg gctctgacaa gcggggtgca cacctttcct 1380
gccgtgctgc agtcagtggt gctgtacagt ctgtctagtg tcgtcactgt gccaaagctca 1440
agtctgggga ccagacata catttgtaat gtgaaccata aacctcaaa caccaaagtg 1500
gacaagaaag tggaacctaa aagctgataa ctcgag 1536

<210> 51

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of HIV-1 PG9 Fab

<400> 51

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Asn Asp

35 40 45

Val Gly Gly Tyr Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Val Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gly Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser

100 105 110

Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr

115 120 125

Val Leu Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Val Glu Ser
 260 265 270

 Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 275 280 285
 Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Gln Gly Met His Trp Val Arg Gln
 290 295 300
 Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Lys Tyr Asp Gly
 305 310 315 320
 Ser Glu Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Trp Gly Arg Leu Ser Ile Ser
 325 330 335
 Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

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

 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 435 440 445
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 450 455 460
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 465 470 475 480
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

485	490	495
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
500		
<210> 52		
<211> 1503		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding HIV-1 4E10 Fab		
<400> 52		
ggatccgcca ccatggcaag acctctgtgc actctgtgc tgctgatggc tactctggcc	60	
ggggctctgg ctgagattgt cctgaccag tccctggca ctgagtcact gtccccggc	120	
gagcgcgcaa ctctgtcctg cagagcaagc cagtccgtcg ggaacaaca gctggcatgg	180	
taccagcagc gcccaggaca ggcacccagg ctgctgatct acggagcaag ctccccgcct	240	
agcggagtcg ctgatatatt ctccggaagc ggctccggga ccgatttcac tctgaccatc	300	
tccaggctgg aacctgagga ttttccgtg tattactgtc agcagtacgg gcagagcctg	360	
tcaactttcg gccagggaac taaagtcgaa aagagaaccg tggccgcacc aagcgtcttt	420	
atttttcccc ctgagatga acagctgaaa tccgggactg cttccgtggt ctgcctgctg	480	
aataacttct atccaagaga ggcaaagggt cagtggaaag tggacaacgc cctgcagagc	540	
ggaaactcac aggaatctgt gacagagcag gactccaagg atagcacata cagtctgtcc	600	
tcaactctga cctgtccaa agctgactat gagaagcata aagtctacgc atgtgaggtg	660	
accaccagg gactgaggtc ccccgtaact aagtccttca atagaggcga gtgcgggggc	720	
gggggcagtg gcggaggggg aagtgggggc ggaggagtg gcggcggcgg gagtggcggc	780	
ggcggctcag ggggcggcgg ctcccaggtc cagctggtcc agagcggagc cgaggtaag	840	
agaccaggct cttcagtcac cgtgagctgc aaagccagcg gaggtcctt tagcacttac	900	
gccctgtcat ggggtcggca ggccccaggc cgaggcctgg agtggatggg cggcgtgac	960	
cccctgctga ccattactaa ctatgccct agatttggag gccggatcac catcacagct	1020	
gacagatcca catccacagc ttacctggag ctgaacagtc tgaggcccga ggacactgca	1080	
gtctactact gtgcacgaga aggcaccact ggatgggggt ggctggggaa gcccacggg	1140	
gcttttgcac attggggcgg agggacactg gtgactgtga gctctgccag cactaaagg	1200	
cccagtgtct tccctctggc cccaagttcc aagagtacat cagggggcac cgccgcactg	1260	
gggtgtctgg tgaaggatta cttccagag cccgtgacag tcagttggaa cagcggcgt	1320	
ctgaccagtg ggggtgcacac tttccagcc gtgctgcaga gttcagggt gtactccctg	1380	

tcctcagtggtgactgtgccctcaagcagctctggggactcagacttacattgtaatgtg1440

aaccataaacctcaaatactaaagtggacaaaaaagtggaaccaaagagctgataactc1500

gag1503

<210> 53

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of HIV-1 4E10 Fab

<400> 53

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala

1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Gln Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Gly Asn Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Val Ala

65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

100 105 110

Gly Gln Ser Leu Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Lys Arg

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 260 265 270
 Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala
 275 280 285
 Ser Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala
 290 295 300
 Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Ile Thr Asn Tyr Ala Pro Arg Phe Gly Gly Arg Ile Thr Ile Thr Ala
 325 330 335
 Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Thr Thr Gly Trp
 355 360 365
 Gly Trp Leu Gly Lys Pro Ile Gly Ala Phe Ala His Trp Gly Gly Gly
 370 375 380
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 385 390 395 400
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 405 410 415
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 420 425 430

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
435 440 445

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
450 455 460

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
465 470 475 480

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
485 490

<210> 54

<211> 1446

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the HIV-1 VRC01 IgG1 Heavy Chain
(VH/CH1/Hinge/CH2/CH3)

<400> 54

ggatccgcc ccatggattg gacatggatt ctgttcctgg tcgccgccgc aactagagtg 60

cattcacagg tgcagctggt gcagtcaggc gggcagatga agaaaccgg cgagagtatg 120

cgaatctcat gccgggctag cgggtacgaa ttcacgact gtacctgaa ctggattaga 180

ctggcacctg ggaagaggcc agagtggatg ggatggctga aacctagagg cggggcagtg 240

aattacgcc gaccactgca gggcagggtc actatgacc gcgacgtgta ttctgatacc 300

gcattcctgg agctgcgaag tctgacagtc gacgatactg ccgtgtactt ctgcacacgg 360

ggcaagaact gtgactataa ttgggatttt gaacactggg gcagggggac acctgtcatt 420

gtgagctccc caagtactaa gggaccctca gtgtttcccc tggccccttc tagtaaaagt 480

acctcaggag gcacagccgc tctgggatgc ctggtgaagg attacttccc tgagccagtc 540

acctgtagtt ggaactcagg cgccctgaca agcggggtcc atacttttcc agctgtgctg 600

cagtcaagcg ggctgtactc cctgtcctct gtggtcacag tgcccagttc aagcctggga 660

acacagactt atatctgtaa cgtcaatcac aagcctagca atactaaagt ggacaagaaa 720

gccgagccta agagctgcga accaaagtcc tgtgataaaa ccatacatg ccttcctgt 780

ccagctcctg aactgtctggg cggcccatcc gtgttcctgt ttccaccaa gcccaaagac 840

acctgatga ttagcaggac tctgaggtc acctgcgtgg tcgtggacgt gtcccacgag 900

gacccgaag tcaagtttaa ctggtacgtg gatggcgtcg aagtgcataa tgccaagaca 960

aaaccccgagg aggaacagta caactctacc tatagagtcg tgagtgtcct gacagtgtg 1020
caccaggact ggctgaacgg gaaggagtat aagtgcaaag tgtctaataa ggccctgcc 1080
gtcccatcg agaaaacaat ttccaaggca aaaggccagc caagggaacc ccaggtgtac 1140
actctgcctc catcccgca cgagctgact aagaaccagg tctctctgac ctgtctggtg 1200
aaaggattct atccaagcga tatcgccgtg gagggggaat ccaatggcca gcccgagaac 1260
aattacaaga ccacaccccc tgtgtctggac agcgatggct ccttctttct gtattcaaag 1320

ctgaccgtgg ataaaagccg ctggcagcag gggaacgtct ttagctgctc cgtgatgcac 1380
gaagctctgc acaatcatta caccagaag tctctgagtc tgtcacctgg caagtataa 1440
ctcgag 1446

<210> 55

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the HIV-1 VRC01 IgG1 Heavy Chain
(VH/CH1/CH2/CH3)

<400> 55

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro
20 25 30

Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile
35 40 45

Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu
50 55 60

Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg
65 70 75 80

Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr

85 90 95
Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110
Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His

115 120 125

Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Pro Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys

 225 230 235 240
 Ser Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 290 295 300

 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

370 375 380
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445

 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 <210> 56
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the HIV-1 VRC01 IgG Light Chain
 (VL/CL)
 <400> 56

 ggatcgcgcca ccatggattg gacttggatt ctgttctctgg tggcagccgc taccagagtc 60
 cattccgaaa ttgtgctgac ccagttctccc ggaacactgt ctctgagtcc tggcgagaca 120

 gccatcattt ccgtaggac ttctcagtac gggagtctgg catggtatca gcagcgacca 180
 ggacaggctc ctgactggt catctactca ggaagcactc gggcagccgg cattcccgac 240
 cgattctccg ggtctcgggtg gggacctgat tacaacctga ccattctcaa tctggaaagc 300
 ggagactttg gcgtgtacta ttgccagcag tatgagttct ttgggcaggg aaccaaggtc 360
 caggtggaca tcaaacgcac agtcgctgca ccaagcgtgt tcattctttcc accctcagat 420
 gaacagctga agtccggcac cgctctgtg gtgtgcctgc tgaacaattt ctacccccgg 480
 gaggcaaagg tccagtggaa agtggacaac gcctgcagt ctggcaatag tcaggagtca 540

 gtgactgaac aggacagcaa ggattccacc tattctctgt cctctactct gacctgagc 600
 aaagctgatt acgagaagca caaagtgtat gcatgtgagg tcaccacca gggactgcgg 660
 tcaccctgca ccaagagctt caatcgcgga gagtgttgat aactcgag 708

<210> 57

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the HIV-1 VRC01 IgG Light Chain (VL/CL)

<400> 57

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser

20 25 30

Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser

35 40 45

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile

50 55 60

Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

65 70 75 80

Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser

85 90 95

Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser

115 120 125

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

130 135 140

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

145 150 155 160

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser

165 170 175

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr

180 185 190

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys

195 200 205

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn

210

215

220

Arg Gly Glu Cys

225

<210> 58

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the Heavy Chain (VH-CH1) of the
CHIKV-Env-Fab

<400> 58

ggatcgcgcc ccatggattg gacatggagg attctgtttc tggtcgccgc cgctactgga 60
actcacgctc aggtgcagct ggtgcagtca ggtccgaac tgaagaaacc aggggcatct 120
gtgaaggtea gttgcaaagc ctcaggctac accctgacac ggtatgccat gacttgggtg 180
cgccaggctc ctggacaggg actggagtgg atgggctgga tcaacactta caccggaaat 240
ccaacttatg tgcaggggtt caccggccga ttcgtgtttt ctctggacac ttccgtctct 300

accgcctttc tgcacattac aagtctgaag gcagaggaca ctgccgtgta cttctgcgct 360
agggaaggcg gagcaagagg ctttgattat tggggccagg gaaccctggt gacagtcagc 420
tccgccagca caaagggacc ctccgtgttc cactggctc cctctagtaa aagtacatca 480
gggggcactg ccgtcttggg atgtctggtc aaagattact tccccgaacc tgtgaccgtc 540
agctggaact ccggagctct gaccagcggg gtgcatacat ttccgcagt cctgcagtca 600
agcggactgt actccctgtc ctctgtggtc acagtgccta gttcaagcct ggggacacag 660
acttatatct gtaatgtgaa ccataagcca agcaacacca aagtggacaa aaaagtggaa 720

cctaagagct gctgataact cgag 744

<210> 59

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the Heavy Chain (VH-CH1) of the
CHIKV-Env-Fab

<400> 59

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1	5	10	15												
Thr	His	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys
	20		25		30										
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu
	35		40		45										
Thr	Arg	Tyr	Ala	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50		55		60										
Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Val
	65		70		75										
Gln	Gly	Phe	Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser
	85		90		95										
Thr	Ala	Phe	Leu	His	Ile	Thr	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
	100		105		110										
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Gly	Ala	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
	115		120		125										
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
	130		135		140										
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	145		150		155										
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	165		170		175										
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
	180		185		190										
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
	195		200		205										
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	210		215		220										
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	225		230		235										
<210>	60														
<211>	738														

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding the Light Chain (VL-CL) of the
CHIKV-Env-Fab

<400> 60

```

ggatccgcca ccatggcatg gacccactg ttctgttcc tgtgacttg ttgtcctggc      60
gggagcaatt cacagagcgt cctgaccag ccccttctg tgtccggagc accaggacag      120
cgagtcacaa tctcttgac tggagctcc tctaacttg gggccagcca cgactgcat      180
tggtaccagc agctgccagg gaccgtccc aactgctga tctatgtgaa ctctaatagg      240
cctagtggcg tccagatag atttcaggg agcaagtcg gcacctctgc tagtctggca      300

attacaggac tgcaggctga ggacgaagca gattactatt gccagagtta cgactcaaac      360
ctgtcaggca gcgcagtgtt cggaggagga actaagctga ccgtcctggg acagcccaaa      420
gccgtcctt ctgtgacct gtttcccct agttcagagg aactgcaggc caacaaggct      480
actctggtgt gtctgatctc cgacttctac cctggagcag tgaccgtcgc atggaaggcc      540
gatagctccc cagtgaagc tggggtcgag accacaactc ccagcaagca gtccaacaac      600
aagtagcgag cctctagtta tctgtcactg acacctgaac agtggagag ccacaaatcc      660
tattcttgcc aagtgaacta tgagggcagt accgtggaaa agacagtcgc cccaactgag      720

tgttcctgat aactcgag      738

```

<210> 61

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of the Light Chain (VL-CL) of the
CHIKV-Env-Fab

<400> 61

```

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu Thr Cys Cys Pro Gly
  1             5             10             15
Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly
          20             25             30

Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn
          35             40             45
Ile Gly Ala Ser His Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr

```

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

100 105 110
Tyr Asp Ser Asn Leu Ser Gly Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
130 135 140
Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160
Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
165 170 175

Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
180 185 190
Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
195 200 205
Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
210 215 220
Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 62
<211> 2238
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding HIV-1 Env-4E10 Ig

<400> 62

ggatccgcc ccatggattg gacatggagg attctgtttc tggtcgccgc cgctacagga 60
actcagccc aggtgcagct ggtgcagtca ggagccgaag tgaagcgacc aggcagctcc 120
gtcactgtgt cctgcaaagc atctggcgga tcattcagca cctacgcct gagctgggtg 180

agacaggctc ctggacgagg actggaatgg atgggaggcg tcatccact gctgacaatt	240
actaactacg cccccgatt tcagggcagg atcaccatta cagcagaccg ctccacttct	300
accgcctatc tggagctgaa tagcctgaga ccagaagata ccgcagtgtg ctattgcgcc	360
cgggagggaa ccacaggatg gggatggctg ggaaagccca tcggggcttt cgcacactgg	420
ggccagggaa ccttggtcac agtgtctagt gccagcaca agggccctc cgtgtttccc	480
ctggctcctt caagcaaaag tacttcagga gggaccgccg ctctgggatg tctggtgaag	540
gactacttcc ctgagccagt caccgtgtcc tggaaactctg gcgctctgac ctccggagtg	600
catacatctt ccgcagtctt gcagtcctct gggtgtact ctctgagtgc agtgggtcact	660
gtgcctagct cctctctggg cacacagact tatatctgca acgtgaatca caagccctcc	720
aataccaaag tcgacaagaa agtggaaact aagtcttgtg ataaaacca tacatgcca	780
ccttgtccag cactgagct gctgggcgga ccttccgtgt tctgtttcc acccaagcca	840
aaagacacac tgatgattag cggacacct gaagtgactt gtgtggctgt ggacgtcagc	900
cacgaggacc ccgaagtga gttcaactgg tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgcc	960
aagaccaaac ccaggaggga acagtacaac tctacttata gggtcgtgag tgtcctgacc	1020
gtgtgcacc aggactggct gaacgggaag gagtataagt gcaaagtgtc caataaggcc	1080
ctgccagctc ccatcgagaa aacaatttct aaggttaaag gccagccacg cgaacccag	1140
gtgtacactc tgcctccag caggacgag ctgaccaaga accaggtgag tctgacatgt	1200
ctggtcaaag gcttctatcc aagcgatatc gccgtggagt gggaatcaa tggacagccc	1260
gaaaacaatt acaagactac cccccctgtg ctggacagtg atggatcatt ctttctgtat	1320
tccaagctga ccgtggacaa atctcgctgg cagcagggga acgtctttag ctgctccgtg	1380
atgcacgagg cctgcacaa tcattacaca cagaagtctc tgagtctgtc accaggcaag	1440
cggggacgca aaaggagaag cgggtccggc gctactaact tcagcctgct gaaacaggca	1500
ggggatgtgg aggaaaatcc tggccaatg gtctgcaga cccaggtgtt tatctactg	1560
ctgctgtgga ttagcggggc ttatggcgaa atcgtgtgta ctcagagccc cggaaccag	1620
tctctgagtc ctggggagcg cgctacactg agctgtcgag catcacagag cgtggggaac	1680
aataagctgg catggtacca gcagaggcct ggccaggctc caagactgct gatctatggc	1740
gcaagtacac ggcttagcgg agtggcagac cgcttctccg gatctgggag tggcaccgat	1800
tttactctga ccattagcag gctggagcca gaagacttcg ctgtgtacta ttgccagcag	1860
tacggccagt cactgagcac atttggacag gggactaagg tcgaaaaaag aaccgtggca	1920
gccccaaagt tcttcatttt tccacctca gacgagcagc tgaagagtgg aacagcctca	1980

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttctacccc agggaggcca aggtccagt gaaagtggat 2040

aacgctctgc agagcggcaa ttcccaggag tctgtgacag aacaggacag taaggattca 2100

acttatagcc tgagctccac actgactctg tccaaagcag attacgagaa gcacaaagtg 2160

tatgcctgcg aagtcaccca tcagggactg tctagtcttg tgacaaagtc ttttaacaga 2220

ggggagtgat aactcgag 2238

<210> 63

<211> 2328

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding HIV-1 Env-PG9 Ig

<400> 63

ggatccgcca ccatggactg gacttggagg attctgtttc tggtcgccgc cgcaactgga 60

actcacgtg aatttggact gtcattgggtc tttctggtgg cctttctgcg aggggtccag 120

tgccagaggc tggtaggagtc cggaggagga gtggtccagc caggcagctc cctgcgactg 180

agtttgtgcc cttcagggtt cgacttttct agacagggca tgcactgggt gcggcaggca 240

ccaggacagg gactggagtg ggtggctttc atcaagtacg acggaagtga aaaatatcat 300

gccgattcag tgtgggggcg gctgtcaatt agccgcgaca actccaagga taccctgtac 360

ctgcagatga attctctgag ggtcgaggac acagctactt atttctgctg gaggggaagca 420

ggcggacctg attacagaaa cgggtataat tactatgact ttacgatgg ctactataac 480

taccactata tggacgtgtg gggcaaggga accacagtca cagtgtctag tgcattcaact 540

aaaggcccaa gcgtgtttcc cctgcccct tcaagcaagt ccacttctgg aggaaccgca 600

gcactgggat gtctggtgaa ggattacttc cctgagccag tcaccgtgag ttggaactca 660

ggcgccctga ctacgggagt ccataccttt cctgctgtgc tgcagtcctc tgggctgtac 720

agcctgagtt cagtgggtcac agtgccaagc tcctctctgg gcaccagac atatatctgc 780

aacgtgaatc acaagcctag caatactaag gtcgacaaaa gagtgggaacc aaagagctgt 840

gataaaactc atacctgccc accttgtcca gcacctgagc tgctgggagg gccttcctgt 900

ttctgtttc caccgaagcc aaaagacacc ctgatgatta gccggacacc agaagtcact 960

tgctgggtcg tggacgtgag ccacaggagc cccgaagtca agtttaactg gtacgtggat 1020

ggcgtcgagg tgcataatgc taagacaaaa ccacgggagg aacagtacaa ctccacatat 1080

cgcgtcgtgt ctgtcctgac tgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa ggagtataag 1140

tgcaaagtgt ccaataaggc actgccagcc cccatcgaga aaaccatttc taaggccaaa 1200

ggccagccac gagaacccca ggtgtacaca ctgcctccaa gtagggacga gctgactaag	1260
aaccaggtct ctctgacctg tctgggtgaaa ggctttctatc cctctgatat cgctgtggag	1320
tgaggaaagta atggacagcc tgaaaacaat tacaagacta cccccctgt gctggacagc	1380
gatggcagct tcttctgtg tagcaagctg accgtggaca aatccagatg gcagcagggg	1440
aacgtcttta gttgctcagt gatgcacgag gcactgcaca atcattacac ccagaaaagc	1500
ctgtccctgt ctctggcaa gaggggaaga aaaaggagaa gtgggtcagg cgcaacaaac	1560
ttcagcctgc tgaagcaggc cggagatgtg gagggaaaatc ctgggccaat ggcttggacc	1620
ccccgttcc tgtttctgt gacatgctgt cctggcggaa gcaactccca gtctgcactg	1680
acacagccag caagtgtgtc agggagccca ggacagagca tcaccatttc ctgtaacggc	1740
acaagcaatg acgtcggggg ctacgagtcc gtgtcttggg atcagcagca tcctggaaag	1800
gccccaaaag tcgtgatcta cgatgtcagc aaacgcccct ctggggtgag taaccgattc	1860
agtggatcaa agagcgggaa taccgcttct ctgacaatta gtggcctgca ggcagaggac	1920
gaaggagatt actattgcaa atcactgaca agcactcggc gccgagtctt cggaaccggg	1980
acaaagctga ctgtgtctgg ccagcccaaa gctgcaccta gcgtgacctt gtttcacccc	2040
agttcagagg aactgcaggc taataaggca acactggtgt gtctgatctc cgacttctac	2100
cctggcgtg tcaactgtgc ctggaaggct gatagctccc cagtcaaagc aggagtggaa	2160
acaactacc cctccaagca gtctaacaac aagtacgccg cttctagtta tctgtcactg	2220
actcccagc agtgggaagc ccacaaatcc tattcttgcc aggtgacca tgagggtccc	2280
actgtcgaaa agaccgtggc ccctacagag tgttcttgat aactcgag	2328
<210> 64	
<211> 2217	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleic Acid Sequence Encoding VRC01 IgG	
<400> 64	
ggatccgcca ccatggattg gacatggatt ctgttcttgg tcgccgccgc aactagagtg	60
cattcacagg tgcagctggt gcagtcaggc gggcagatga agaaacccgg cgagagtatg	120
cgaatctcat gccgggctag cgggtiacgaa ttcactgact gtaccctgaa ctggattaga	180
ctggcacctg ggaagaggcc agagtggatg ggatggctga aacctagagg cggggcagtg	240
aattacgcca gaccactgca gggcagggtc actatgacct gcgacgtgta ttctgatacc	300
gcattcctgg agctgcgaag tctgacagtc gacgatactg ccgtgtactt ctgcacacgg	360

ggcaagaact gtgactataa ttgggatttt gaacactggg gcagggggac acctgtcatt	420
gtgagctccc caagtactaa gggaccctca gtgtttcccc tggcccttc tagtaaaagt	480
acctcaggag gcacagccgc tctgggatgc ctggtgaagg attacttccc tgagccagtc	540
acctgtgatt ggaactcagg cgccctgaca agcgggggcc atacttttcc agctgtgctg	600
cagtcaagcg ggctgtactc cctgtcctct gtggtcacag tgcccagttc aagcctggga	660
acacagactt atatctgtaa cgtcaatcac aagcctagca atactaaagt ggacaagaaa	720
gccgagccta agagctgcga accaaagtcc tgtgataaaa ccatacatg cctccctgt	780
ccagtcctg aactgtctgg cgcccctcc gtgttctgt ttccaccaa gcccaaagac	840
acctgatga ttagcaggac tcctgaggtc acctgcgtgg tcgtggacgt gtcccacgag	900
gaccccgaag tcaagtttaa ctggtacgtg gatggcgtcg aagtgcataa tgccaagaca	960
aaacccggg aggaacagta caactctacc tatagatcg tgagtgtcct gacagtgtg	1020
caccaggact ggctgaacgg gaaggagtat aagtgc aaag tgtctaataa ggccctgcc	1080
gtcccctcg agaaaacaat ttccaaggca aaaggccagc caagggaacc ccaggtgtac	1140
actctgcctc catcccgcga cgagctgact aagaaccagg tctctctgac ctgtctggtg	1200
aaaggattct atccaagcga tatcgccgtg gattgggaat ccaatggcca gcccgagaac	1260
aattacaaga ccacaccccc tgtgtctggac agcgatggct ccttctttct gtattcaaag	1320
ctgaccgtgg ataaaagccg ctggcagcag gggaacgtct ttagctgtc ctgatgcac	1380
gaagctctgc acaatcatta caccagaag tctctgagtc tgtcacctgg caagaggga	1440
cgaaaacgga gaagcggcag cggagctaca aacttcagcc tgcctgaaaca ggcagccgac	1500
gtggaggaaa atcctgggcc aatggattgg acttgattc tgttctgtg ggcagccgct	1560
accagagtc attcgaaat tgtgtctgacc cagtctcccg gaacactgtc tctgagtcct	1620
ggcgagacag ccatcatttc ctgtaggact tctcagtcag ggagtctggc atggtatcag	1680
cagcgaccag gacaggctcc tcgactggtc atctactcag gaagcactcg ggcagccggc	1740
attcccgaac gattctccgg gtctcgggtg ggacctgatt acaacctgac catctcaaat	1800
ctggaaagcg gagactttgg cgtgtactat tgccagcagt atgagttctt tgggcaggga	1860
accaaggtcc aggtggacat caaacgcaca gtcgtgcac caagcgtgtt catctttcca	1920
ccctcagatg aacagctgaa gtcgggcacc gcctctgtgg tgtgcctgct gaacaatttc	1980
tacccccggg aggcaaaggt ccagtggaaa gtggacaacg ccttcagtc tggcaatagt	2040
caggagtcag tgactgaaca ggacagcaag gattccacct attctctgtc ctctactctg	2100
acctgagca aagctgatta cgagaagcac aaagtgtatg catgtgaggt caccaccag	2160

ggactgcggt caccgcgtcac caagagcttc aatcgcgagg agtgttgata actcgag 2217

<210> 65

<211> 2223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHIKV snapi nucleic acid sequence

<400> 65

ggatccgcc ccatggactg gacttggatt ctgtttcttg tgcgccgcgc taccgagtg 60

cattcacagg tgcagctgca gcagcctggg gccgctctgg tgaagccagg agctagcgca 120

atgatgtcct gcaaagcctc tggctacact ttacctcct attggatcac ctgggtgaag 180

cagcgacctg gacagggact ggagtggatc ggcgacatct acccaggcac cgggagaaca 240

atctacaagg aaaaattcaa gacaaaagcc aactgactg tggacaccag ctctctaca 300

gcttttatgc agctgaacag cctgacttcc gaggatagcg ccgtgtacta ttgcgcaaga 360

ggatacggct ctcttacta tgccctggac tattgggggc agggaactag cgtcacctg 420

agttcagcat ctaccaaggg accaagcgtg ttccactgg cacctagctc caaatccact 480

tctggcgggg ccgccgtctt gggatgtctg gtgaaggatt acttccctga gccagtcaca 540

gtgagttgga actcaggggc tctgaccagc ggagtccaca catttctgc agtgctgcag 600

tctagtggac tgiactcct gtcaagcgtg gtcactgtcc catctctag tctgggcacc 660

cagacatata tctgcaacgt gaatcacaag ccatccaata ccaaagtcga taagaaagt 720

gagcccaagt ctgtgacaa aactcatacc tgccctccct gtccagcacc tgaactgctg 780

ggaggcccaa gcgtgttctt gtttccacc aagcctaaag acaccctgat gattagcagg 840

acaccagagg tcaattgcgt ggtcgtggac gtgagccacg aagacccga ggtcaagttc 900

aactggtacg tggatggcgt cgaagtgcac aatgccaaga caaaacccg ggaggaacag 960

tacaactcaa cctatcgggt cgtgagcgtc ctgacagtgc tgcaccagga ctggctgaac 1020

ggaaaggagt acaagtcaa agtgtctaata aaggccctgc cagctcccat cgaaaaaacc 1080

attagcaagg ctaaaggcca gccaaagag cccaggtgt acacactgcc tccatcaagg 1140

gacgaactga caaagaacca ggtcagcctg acttgtcttg tgaaaggctt ctatccagc 1200

gatatcgagc tggaatggga gtccaatggg cagcctgaga acaattacaa gaccacacc 1260

cctgtgctgg acagcgatgg gtccttcttt ctgtattcca agctgacagt ggataaatct 1320

cggtggcagc agggaaacgt ctttagttgc tcagtgatgc acgaagcct gcacaatcat 1380

tacactcaga agagcctgtc cctgtctccc ggaaagaggg gccgcaaagc gagaagtggc 1440

tcaggggcaa ccaacttctc tctgctgaaa caggccggcg atgtggagga aaatcctggg 1500
ccaatggact ggacatggat tctgttctcg gtggcagccg ctacaagggt ccattccgac 1560

attgtgctga ctcagctccc tgcaagtctg gccgtgtctc agggacagcg agcaaccatc 1620
agttgtaagg ctagccagtc cgtcgactac gatggggaca gttacgtgaa ctggtatcag 1680
cagaagcctg gacagtcctc aaaactgctg atctatgatg ctagtaatct ggagtcaggc 1740
attccgcac gattctctgg aagtggctca gggacagact tcaccctgaa cattaccct 1800
gtcgaggaag aggacgtggc tacctactat tgccaggaaa gcaatgagga cccccgact 1860
ttcgggggag gcaccaagct ggagatcaaa cgaactgtcg cagccccag cgtgttcac 1920
ttccaccct cagacgaaca gctgaagagc ggaaccgat ccgtgggtgtg cctgctgaac 1980

aacttctacc cccgcgaggc caaggtccag tggaaagtgg ataacgtctc gcagtcaggc 2040
aatagccagg aatccgtgac tgagcaggat tctaaggaca gtacctatc actgtcaagc 2100
acactgactc tgagcaaagc agactacgaa aagcataaag tgtatgcctg cgaagtcacc 2160
caccaggggc tgaggtctcc agtcactaag tctttcaaca gaggggaatg ctgataactc 2220
gag 2223

<210> 66

<211> 733

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHIKV-snapi amino acid sequence

<400> 66

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro

20 25 30

Gly Ala Ser Ala Met Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

35 40 45

Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Lys Glu

65 70 75 80

Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr

85 90 95
 Ala Phe Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

340 345 350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

355 360 365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

370 375 380
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

385 390 395 400
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

405 410 415
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

450 455 460

Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr

465 470 475 480

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly

485 490 495

Pro Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg

500 505 510
Val His Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val

515 520 525

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

530 535 540

Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

545 550 555 560

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly

565 570 575

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

580 585 590

Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 595 600 605
 Glu Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 610 615 620
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 625 630 635 640
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

645 650 655
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 660 665 670
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 675 680 685
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 690 695 700
 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 705 710 715 720

Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 725 730

<210> 67

<211> 2241

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-1 WT nucleic acid sequence

<400> 67

ggatcgcgcca ccatggactg gacttggagg attctgtttc tggtcgccgc cgctactggg 60
 actcacgctc aggcacatct ggtcgaatct ggaggaggag tggtcagacc tggccgatcc 120
 ctgcgactgt cttgcgcagc tagcgccttc aacttcagca caaacgcaat gcactgggtg 180
 cgacaggcac caggcaaggg actggagtgg gtcgctgtga tctcatacga cggaagccat 240

aagtactatg cagattctgt gaaaggccgg ttcaccattt ccagggacaa ttctaagaac 300
 accctgtatc tgcagatgaa tagcctgcgc gcagccgata ccgcagtgtg ctattgcgca 360
 actgtcggcg tgctgacctg gccagtgaac gccgaatact ttcaccattg gggacagggc 420
 agtctggtct cagttagctc cgcaagtact aagggacat cagtgttccc actggcaccc 480

tctagtaa	at ctactag	tgg cg	ggaccg	ct g	cactgg	gat g	tctgg	tga	ggactat	ttc	540	
cccgag	cctg	tcaccg	ttag	ctgga	attcc	ggagc	cctga	caagc	ggcgt	ccacact	ttt	600
cccgtg	tgc	cagtca	ag	cgga	ctgtac	tccctg	tcc	ctgtg	gtcac	tgtgc	ctagt	660
tcaagc	ctgg	gcactc	agac	ctatat	ctgc	aatgt	gaacc	acaag	ccctc	taacac	caaaa	720
gtcgac	aaga	aagtgg	aacc	taagag	ctgt	gataaa	acac	atact	tgccc	acctt	gtcca	780
gcaccag	agc	tgtctg	ggagg	accaag	cgtg	ttcctg	tttc	cacca	agcc	taaag	acaca	840
ctgatg	atta	gccgg	acacc	tgaag	tca	tgcgt	ggtcg	tggac	gtgc	ccacg	aggac	900
cccga	gtca	agttta	atgtg	gtacgt	ggat	ggcgt	cagg	tgcata	acgc	caagac	caaaa	960
ccccgg	gagg	aacagt	ataca	tagcac	atat	agagt	ctgtg	ccgtc	ctgac	tgtgc	tgc	1020
caggat	tggc	tgaatg	ggaa	ggagt	ataag	tgcaa	agtgt	ctaaca	aggc	tctgc	ctgca	1080
ccaatc	gaga	aaaccat	tag	caagg	ctaaa	ggccag	ccta	ggga	accaca	ggtgt	acaca	1140
ctgcct	ccaa	gtcgcg	acga	gctga	ccaag	aatcag	gtct	ccctg	acatg	tctgg	tga	1200
ggctt	ctatc	catcag	atat	cgccg	tggag	tggga	aagca	acggg	cagcc	cgaaa	acaat	1260
tacaag	acca	cacccct	gt	gctgg	actct	gatgg	cagtt	tcttt	ctgta	ttcta	agctg	1320
accgtg	gaca	aaagtag	atg	gcagc	agggg	aatgt	ctttt	catgl	agcgt	gatgc	acag	1380
gccctg	caca	accatt	acac	acaga	agtcc	ctgtc	ctga	gtccc	gaaa	gaggg	gccgc	1440
aaacg	gagat	caggg	agcgg	agctac	tactaat	ttcac	ctgc	tga	aacaggc	agggg	atgtg	1500
gaggaaa	acc	ccggac	ctat	ggctt	ggacc	ccactg	tcc	tgttt	ctgct	gacat	gctgt	1560
ccccggg	gca	attct	ca	gagt	gtcctg	acacag	ccac	catcag	ttag	cggag	cacca	1620
ggacag	aggg	tgacc	atctc	ctgcac	aggc	agcag	cagca	acatt	ggcgc	cgggt	acgac	1680
gtgcatt	ggt	atcag	cagct	gccc	ggcacc	gtcct	taagc	tgtg	atctg	tggca	aacaat	1740
aaccg	cccat	ctggg	gtgcc	cgatc	gattc	tccg	gtcta	aaagt	gggac	ttcag	ccagc	1800
ctggc	tatta	ccggc	ctga	ggccg	aggac	gaagc	tgatt	actat	tcca	gagct	acgac	1860
tcaagc	ctga	ccggag	tgt	gttcg	gagga	ggaac	caagc	tgacag	tcct	gggac	agcct	1920
aaagc	cgctc	caagc	gtgac	actgt	ttcct	ccatc	ctctg	agga	actgca	ggcaa	acaag	1980
gccacc	ctgg	tgtgc	ctgat	ttccg	acttc	taccc	gggg	cagtc	actgt	ggctt	ggaag	2040
gcagat	agtt	cacct	gtcaa	agccg	gagtg	gagac	tacca	caccat	caaa	gcagag	caat	2100
aacaa	atag	cagcc	agctc	ctatc	tgtcc	ctgac	ccctg	agcag	tggaa	gtctc	acaaa	2160
tcctat	tctt	gccag	gtcac	tcacg	aagga	agcact	gtgg	agaaa	actgt	cgcac	caacc	2220
gaatg	tagtt	gataa	ctga	g								2241

<210> 68

<211> 739

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-1 WT amino acid sequence

<400> 68

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala Gln Ala His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asn Phe

35 40 45

Ser Thr Asn Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Gly Val Leu Thr Trp Pro Val Asn Ala Glu

115 120 125

Tyr Phe His His Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Ser 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 Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 485 490 495
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu
 500 505 510
 Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln
 515 520 525
 Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys
 530 535 540
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr
 545 550 555 560
 Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Cys Gly Asn Asn
 565 570 575
 Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Thr Gly Val Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 675 680 685
 Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 690 695 700
 Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys

705 710 715 720
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 725 730 735
 Glu Cys Ser

<210> 69

<211> 2241

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-1 LALA nucleic acid sequence

<400> 69

ggatcgcgcca ccatggactg gacttggagg attctgtttc tggtcgccgc cgctactggg 60

actcacgctc aggcacatct ggtcgaatct ggaggaggag tggtcagcc tggccgatcc 120

ctgcgactgt cttgcgcagc tagcgccttc aacttcagca caaacgcaat gcactgggtg 180

cgacaggcac caggcaaggg actggagtgg gtcgctgtga tctcatacga cggaagccat 240

aagtactatg cagattctgt gaaaggccgg ttcaccattt ccagggacaa ttctaagaac 300

acctgtatc tgcagatgaa tagcctgcgc gcagccgata ccgcagtgtg ctattgcgca 360

actgtcggcg tgctgacctg gccagtgaac gccgaatact ttcaccattg gggacagggc 420

agtctggtct cagttagctc cgcaagtact aagggacat cagtgttccc actggcaccc 480

tctagtaaat ctactagtgg cgggaccgct gcactgggat gtctggtgaa ggactatttc 540

cccagcctg tcaccgtgag ctggaattcc ggagccctga caagcggcgt ccacactttt 600

cccgtgtgc tgcagtcaag cggactgtac tccctgtcct ctgtggtcac tgtgcctagt 660

tcaagcctgg gcactcagac ctatatctgc aatgtgaacc acaagccctc taacacacaa 720

gtcgacaaga aagtgaacc taagagctgt gataaaacac atacttgccc acctgtcca 780

gcaccagagg cagctggagg accaagcgtg ttctgtttc cacccaagcc taaagacaca 840

ctgatgatta gccggacacc tgaagtcact tgcgtggtcg tggacgtgtc ccacaggac 900

cccgaagtca agtttaattg gtacgtggat ggcgtcgagg tgcataacgc caagacacaa 960

ccccgggagg aacagtacaa tagcacatat agagtctgtt ccgtcctgac tgtgctgcat 1020

caggattggc tgaatgggaa ggagtataag tgcaaagtgt ctaacaaggc tctgcctgca 1080

ccaatcgaga aaaccattag caaggctaaa ggccagccta gggaaccaca ggtgtacaca 1140

ctgcctccaa gtcgcgacga gctgaccaag aatcaggtct ccctgacatg tctggtgaaa 1200

ggcttctatc catcagatat cgccgtggag tgggaaagca acgggcagcc cgaaaacaat 1260

tacaagacca caccacctgt gctggactct gatggcagtt tctttctgta ttctaagctg	1320
accgtggaca aaagtagatg gcagcagggg aatgtctttt catgtagcgt gatgcacgag	1380
gacctgcaca accattacac acagaagtcc ctgtctctga gtcccgaaa gaggggccgc	1440
aaacggagat caggagcgg agctactaat ttcagcctgc tgaacaggc aggggatgtg	1500
gaggaaaacc ccggacctat ggcttggacc ccaactgttc tgtttctgct gacatgctgt	1560
ccccggggca gcaattctca gagtgtcctg acacagccac catcagttag cggagcacca	1620
ggacagaggg tgaccatctc ctgcacaggc agcagcagca acattggcgc cgggtacgac	1680
gtgcattggt atcagcagct gcccggcacc gctcctaagc tgctgactgt tggcaacaat	1740
aaccgccccat ctgggggtgcc cgatcgattc tccggctcta aaagtgggac ttcagccagc	1800
ctggctatta ccggcctgca ggccgaggac gaagctgatt actattgcca gagctacgac	1860
tcaagcctga ccggagtctg gttcggagga ggaaccaagc tgacagtcct gggacagcct	1920
aaagccgctc caagcgtgac actgtttcct ccatcctctg aggaactgca ggcaacaag	1980
gccaccctgg tgtgcctgat ttccgacttc taccggggg cagtactgt ggcttgaag	2040
gcagatagtt cacctgtcaa agccggagtg gagactacca caccatcaa gcagagcaat	2100
aacaatacg cagccagctc ctatctgtcc ctgaccctg agcagtggaa gtctcaciaa	2160
tcctattctt gccaggtcac tcacgaagga agcactgtgg agaaaactgt cgcaccaacc	2220
gaatgtagtt gataactcga g	2241
<210> 70	
<211> 739	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DVSF-1 LALA amino acid sequence	
<400> 70	
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
Thr His Ala Gln Ala His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln	
20 25 30	
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asn Phe	
35 40 45	
Ser Thr Asn Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	

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

 Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Gly Val Leu Thr Trp Pro Val Asn Ala Glu
 115 120 125
 Tyr Phe His His Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Ser 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 Ala Ala 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 Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

465 470 475 480

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

485 490 495

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu

500 505 510

Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln

515 520 525

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

530 535 540

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr

545 550 555 560

Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Cys Gly Asn Asn

565 570 575
 Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Thr Gly Val Val Phe

610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 675 680 685

Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 690 695 700
 Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
 705 710 715 720
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 725 730 735
 Glu Cys Ser

<210> 71
 <211> 2241
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DVSF-2 WT nucleic acid sequence

<400> 71
 ggatccgcc ccatggactg gacatggaga atcctgttcc tggtcgccgc cgcaaccggg 60
 acacacgccg aagtgcagct ggtggaatct ggagggggat gggcgcagcc aggagggtcc 120
 ctgcgactgt ctgccccgc tagtggttc actttttcca gatacgacat gcactgggtc 180

aggcaggtga ccggaagg cctggaatgg gtgagcgcaa tcaccacagc cggagacaca	240
tactatcccc attctgtgaa gggccggttc accattagtc gggagaacgc caaaagctcc	300
ctgtatctgc agatgaacaa tctgagagct ggcgacaccg cactgtacta ttgcgctagg	360
ggcccccta cagattgctc tagtggacga tgtctgggag tcggagtggg actggacca	420
tgggggcagg gaacactggt cactgtgtca agcgctcca caaaggacc ctctgtgttc	480
cctctggctc catcctctaa aagtacttca ggaggaaaccg cagcactggg atgtctgtg	540
aaggattact tcccagagcc cgtcaccgtg agctggaact ccggagctct gactagcggc	600
gtccatacct ttctgcagt gctgcagagt tcaggcctgt acagcctgag ctccgtggc	660
accgtgcat ctagttcact ggggacccag acatatatct gcaacgtgaa tcacaagcca	720
tctaatacaa aagtcgacaa gaaagtggaa cccaagagtt gtgataaac tcatacctgc	780
ccaccatgtc ctgcaccaga gctgctggga ggaccatccg tgttcctgtt tcctccaaag	840
cccaaagaca cactgatgat tagcaggaca cccaagtca cttgcgtggt cgtggacgtg	900
agccacgagg accccgaagt caagtttaac tggtagctgg atggcgtcga ggtgcataat	960
gccaagacca aaccccgga ggaacagtac aacagtacct atagagtcgt gtcagtcctg	1020
acagtctgc accaggactg gctgaacggg aaagagtata agtgcaaagt gtccaataag	1080
gcactgccc cccctatcga gaaaaccatt tctaaggcca aaggacagcc ccgagaacct	1140
caggtgtaca cactgcccc tagccgcgac gagctgacaa agaaccaggt ctccctgact	1200
tgtctggtga aagggttcta tccttcagat atcgccgtgg agtgggaaag caatggacag	1260
ccagaaaaca attacaagac taccacacc gtgctggact ctgatggcag tttctttctg	1320
tatagcaagc tgaccgtgga caaatccgc tggcagcagg ggaacgtctt tagctgctcc	1380
gtgatgcatg aggccctgca caatcattac actcagaagt ctctgagtct gtcacctgga	1440
aagaggggac gaaaacgaag aagcggctcc ggagcaacca acttcagcct gctgaaacag	1500
gccggggatg tggaggaaaa tccaggaccc atggcatgga ctctctgtt cctgtttctg	1560
ctgacctgct gtccaggcgg gagcaacagc tcctacgagg tgaccagcc tccatctgtc	1620
agtgtgtcac ccggccagac cgcttcaatc acatgtagcg gggacaagct gggaaagaaa	1680
tacacaagtt ggtatcagca gaaaccagga cagtcacccc tgctggtcat ctaccaggat	1740
actaagcgc ctagcgcat tccagaacgg ttcagcggct ccaactctgg gaatacagct	1800
actctgacca tctccggcac ccaggccatg gacgaggctg attactattg ccaggcatgg	1860
gattctacaa ctacgtcat ttccggaggc gggaccaagc tgacagtgt ggggcagccc	1920
aaagctgcac ctagcgtcac cctgtttccc ctttctagtg aggaactgca ggctaataag	1980
gcaacactgg tgtgtctgat ttccgacttc taccaggag cagtcactgt ggcatggaag	2040

gctgattcaa gccccgtcaa agccggagtg gaaaccacaa ctctttcaaa gcagagcaac 2100

aacaagtacg ccgcttcctc ttatctgtcc ctgactcccg agcagtggaa gtctcacaaa 2160

agttattcat gccaggtgac ccatgagggc tccactgtcg aaaagaccgt ggcccctaca 2220

gagtgttctt gataactcga g 2241

<210> 72

<211> 739

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-2 WT amino acid sequence

<400> 72

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Arg Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Val Thr Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Ser Ser

85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Leu Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Pro Thr Asp Cys Ser Ser Gly Arg Cys Leu

115 120 125

Gly Val Gly Val Gly Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

165	170	175
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
180	185	190
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
195	200	205
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
210	215	220
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
225	230	235
		240
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
245	250	255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
260	265	270
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
275	280	285
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
290	295	300
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
305	310	315
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
325	330	335
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
340	345	350
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
355	360	365
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
370	375	380
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
385	390	395
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
405	410	415
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		

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

 450 455 460
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg
 465 470 475 480
 Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 485 490 495
 Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Leu Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 515 520 525

 Glu Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
 530 535 540
 Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys Lys Tyr Thr Ser Trp
 545 550 555 560
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp
 565 570 575
 Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 580 585 590
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu

 595 600 605
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Thr Thr His Val Ile Phe
 610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670

Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
675 680 685
Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
690 695 700
Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
705 710 715 720
Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
725 730 735
Glu Cys Ser

<210> 73

<211> 2241

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-2 LALA nucleic acid sequence

<400> 73

ggatcgcgca ccatggactg gacatggaga atcctgttcc tggtcgccgc cgctactggg 60
actcacgccg aagtgcagct ggtcgagagt ggagggggat gggcgcagcc cggcggcagc 120
ctgaggctgt ctgccccgc tagtggcttc actttttcta gatacgacat gcactgggtc 180
cggcaggtga ccgggaaggg actggaatgg gtgagcgcca tcaccacagc aggggacaca 240
tactatcccg attctgtgaa gggcaggttc accattagta gggagaacgc aaaaagctcc 300

ctgtatctgc agatgaacaa tctgagagcc ggcgacaccg ctctgtacta ttgcgccagg 360
ggccctccca cagattgtc tagtggacgc tgtctgggag tcggagtggg actggaccca 420
tggggacagg ggacactggt caccgtgagc agcgcctcca ctaagggacc aagcgtgttc 480
cctctggcac catcctctaa aagtacttca gggggcaccg cagccctggg atgtctggtg 540
aaggattact tccagagcc cgtcacagt agctggaact ccggggccct gacttccgga 600
gtccacacct ttctgtctg gctgcagagt tcaggcctgt actctctgag ctccgtggtc 660
acagtccat ctagttcact gggaaccag acatatact gcaacgtgaa tcacaagcca 720

agtaatacta aagtcgacaa gaaagtggaa cccaagtctt gtgataaac tcatacctgc 780
ccacctgtc ctgcaccaga ggctgcagga gggccatccg tgttctgtt tcctccaaag 840
cccaaagaca cctgatgat tagccggaca cccaagtca cttgcgtggt cgtggacgtg 900
tcccacgagg accccgaagt caagttaac tggtagtgg atggcgtcga ggtgcataat 960

gccaagacaa aaccagga ggaacagtac aacagtacct atagagtcgt gtcagtcctg 1020
 acagtgtgc accaggactg gctgaacgga aaggagtata agtgcaaagt gtctaataag 1080
 gctctgccc cactatcga gaaaaccatt agcaaggcca aagggcagcc ccgagaacct 1140

caggtgtaca cactgcccc ttcccgcgac gagctgacaa agaaccaggt ctctctgact 1200
 tgtctggtga aaggattcta tcttcagat atcgccgtgg agtgggaaag caatgggcag 1260
 ccagaaaaca attacaagac taccacacc gtgctggact ctgatggcag tttctttctg 1320
 tatagcaagc tgaccgtgga caaatccgc tggcagcagg gaaacgtctt tagctgtccc 1380
 gtgatgcatg aggcctgca caatcattac acccagaagt ctctgagtct gtcacctggg 1440
 aagcgaggac gaaaaaggag aagcggctcc ggagctacaa acttctccct gctgaaacag 1500
 gcaggagatg tggaggaaaa tccagggccc atggcctgga ctctctgtt cctgtttctg 1560

ctgacctgct gtccaggcgg aagcaacagc tctacagg tgaccagcc tccaagcgtg 1620
 agcgtgagcc caggccagac cgcttcaatc acatgtagcg gagacaagct ggggaagaaa 1680
 tacactagtt ggtatcagca gaaaccaggg cagtcacccc tgctggtcat ctaccaggat 1740
 accaagcgc ctagcgcat tccagaacga ttcagcggct ccaactctgg aaatacagcc 1800
 actctgacca tcagcggcac ccaggcaatg gacgagccg attactattg ccaggcttgg 1860
 gattccacaa ctacgtcat tttcgggggc ggaaccaagc tgacagtgt gggacagccc 1920
 aaagccgctc ctccgtcac cctgtttccc cttctagtg aggaactgca ggccaataag 1980

gccaccctgg tgtcctgat tagcgacttc taccggag ctgtcactgt ggcattggaag 2040
 gccattcaa gcccgtcaa agcaggggtg gaaaccacaa ctcttcaaa gcagagcaac 2100
 aacaagtacg cagcctctc ttatctgtcc ctgaccctg agcagtggaa gtctcataaa 2160
 agttattcat gtcaggtcac ccatgagggc agcacagtgg aaaaaaccgt ggcaccaaca 2220
 gaatgtagct gataactcga g 2241

<210> 74

<211> 739

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-2 LALA amino acid sequence

<400> 74

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln

20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Arg Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Val Thr Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp

 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Ser Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Pro Thr Asp Cys Ser Ser Gly Arg Cys Leu
 115 120 125
 Gly Val Gly Val Gly Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

 210 215 220
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260 265 270
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325 330 335
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 355 360 365
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 370 375 380
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 385 390 395 400
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 405 410 415
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 420 425 430
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 435 440 445
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 450 455 460
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg
 465 470 475 480
 Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 485 490 495
 Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Leu Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 515 520 525

Glu Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala

530 535 540

Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys Lys Tyr Thr Ser Trp

545 550 555 560

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp

565 570 575

Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser

580 585 590

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu

595 600 605

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Thr Thr His Val Ile Phe

610 615 620

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

625 630 635 640

Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys

645 650 655

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr

660 665 670

Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr

675 680 685

Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr

690 695 700

Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys

705 710 715 720

Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr

725 730 735

Glu Cys Ser

<210> 75

<211> 2229

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-3 WT nucleic acid sequence

<400> 75

ggatccgcc ccatggactg gacatggaga atcctgttcc tggtcgccgc cgcaaccggg	60
acacacgccg aagtgcagct ggtggaatca gggggagggc tggtcagcc tgaagaagt	120
ctgaggctgt catgcgccgc tagcggcttc acctttgacg attacgccat gttctgggtg	180
aggcaggctc caggcaaggg actggaatgg atcagcggca tttcctggaa ctctgcaact	240
atcgggtatg ccgactccgt gaaaggacgg ttaccattt caagagaca cgccaagaaa	300
agcctggatc tgcagatgaa ttccctgcgg ccgacgata ccgctctgta ctattgcga	360
aagggaggac ctagaggcct gcagctgctg agctcctggg tggactactg gggacagggc	420
actctggtca ccgtgtctag tgcttcaca aaggacatt ctgtgttccc actggcaccc	480
tcaagcaat caacaagcgg aggaactgca gcactgggat gtctggtgaa ggattatttc	540
cccagacctg tcaccgtgag ttggaactca ggagcactga cttccggagt ccacacattt	600
ccagcagtgc tgcagtcctc tggactgtac agcctgagtt cagtggtcac agtcctagc	660
tcctctctgg gcacacagac ttatatctgc aacgtgaatc acaagcctag caatactaaa	720
gtcgacaaga aagtgaacc aaagtcctgt gataaaacc atacatgcc accctgtcca	780
gcaccagagc tgctgggggg accaagcgtg ttctgtttc cacccaagcc caaagacaca	840
ctgatgattt ctcgacccc tgaagtcaca tgtgtggtcg tggacgtgag ccacaggac	900
cccgaagtca agttcaactg gtacgtggat ggcgtcgagg tgcataatgc taagacaaa	960
ccccgagagg aacagtacaa cagcacttat cgggtcgtgt ccgtcctgac cgtgctgcac	1020
caggactggc tgaacgggaa ggagtataag tgcaaagtgt ccaataaggc cctgcctgct	1080
ccaatcgaga aaacaatttc taaggcaaaa ggacagcctc gcgaaccaca ggtgtacact	1140
ctgcctccat cccgagacga gctgaccaag aaccaggtct ctctgacatg tctggtgaaa	1200
ggcttctatc caagtgatat cgctgtggag tgggaaagca atgggcagcc cgaaaacaat	1260
tacaagacca caccctgtgt gctggacagc gatggctcct tctttctgta ttctaagctg	1320
accgtggata aaagtagatg gcagcagggg aacgtctttt cctgctctgt gatgcatgag	1380
gccctgcaca atcattacac acagaagagi ctgtcactga gcccagggaa gcgaggacgg	1440
aaacggagat ccgggtctgg agcaaccaac ttctccctgc tgaacaggc aggcgacgtg	1500
gaggaaaatc caggacctat ggtcctgcag acccaggtgt ttatctctct gctgctgtgg	1560
attagtggcg cctacgggga tatccagatg acacagtccc ccagttcact gagtgcctca	1620
gtcggcgaca gggtagactat cacctgtcgc gctagccagg atattaggcg ctacctgaac	1680
tggatatcagc agcgaccagg acgagtgcct cagctgtgta tctacactac ctccacctg	1740

cagtctggag tccaagtag gttcagcggc tccgggtctg tgacagactt tacactgact 1800
 attagctccc tgcagcccga agatttcggc acttactatt gccagcagag ttattcacca 1860

ccccacacat ttggacaggg cactaagctg gaaatcaaaa ctgtcgctgc accctcagtg 1920
 ttcatTTTTt ctccatctga cgagcagctg aagtcaggca cgcagcagct cgtgtgtctg 1980
 ctgaacaatt tctaccctcg cgaggctaag gtccagtggg aagtgataa cgcactgcag 2040
 tctgggaata gtcaggagtc agtgacagaa caggacagca aggattccac ttattctctg 2100
 tctagtaccc tgacactgag caaagccgac tacgagaagc acaaagtcta tgcttgcgaa 2160
 gtgacccatc aggggctgag aagtcctgtg acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 2220
 taactcgag 2229

<210> 76
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DVSF-3 WT amino acid sequence
 <400> 76

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Asp Asp Tyr Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Ala Thr Ile Gly Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys
 85 90 95
 Ser Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Pro Arg Gly Leu Gln Leu Leu Ser Ser
 115 120 125

Trp Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 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 Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
465 470 475 480

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
485 490 495

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser
500 505 510

Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln
515 520 525

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
530 535 540

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
545 550 555 560

Arg Pro Gly Arg Val Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Thr Leu
565 570 575

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp
580 585 590

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr
595 600 605

Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
610 615 620

Lys Leu Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

625 630 635 640
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 645 650 655
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 660 665 670
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 675 680 685
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 690 695 700

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
705 710 715 720
Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 725 730 735

<210> 77

<211> 2229

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DVSF-3 LALA nucleic acid sequence

<400> 77

ggatcgcgcca ccatggactg gacttggaga atcctgtttc tggtcgccgc cgcaactgga 60

accacgccc aggtgcagct ggtcgaatca gggggaggcc tggtcagcc tgggagaagt 120

ctgcggctgt catgcgccgc tagcggcttc acctttgacg attacgcaat gtcttgggtg 180

aggcaggcac caggcaaggg actggaatgg atcagcggca tttcctggaa ctctgctacc 240

atcggatatg cagacagcgt gaaaggaggg ttacaattt ctagagacaa cgccaagaaa 300

agtctggatc tgcagatgaa ttcactgcgc cccgacgata ccgccctgta ctattgcgct 360

aagggcggac ccaggggcct gcagctgctg agtccttggg tggactactg ggggcagggc 420

actctggtca ccgtgtctag tgctccaca aaggcccta gcgtgttccc actggctccc 480

tcaagcaat caacaagcg gggcactgca gccctgggat gtctggtgaa ggattatttc 540

cccgagcctg tcaccgtgag ttggaactca ggggctctga ctagcggcgt ccacaccttt 600

cccgagcctg tgcagtcctc tggcctgtac agcctgagtt cagtggtcac tgcctctagc 660

tcctctctgg gaacacagac ttatatctgc aacgtgaatc acaagccttc caatacaaaa 720

gtcgacaaga aagtggaaac aaagtcttgi gataaaaccc atacatgccc tcctgtcca 780

gcaccagagg ctgcaggagg gccaaagctg ttcctgtttc cacccaagcc caaagacaca	840
ctgatgatta gccggacccc tgaagtcaca tgcgtggctg tggacgtgag ccacgaggac	900
cccgaagtca agtttaactg gtacgtggat ggcgtcgagg tgcataatgc taagacaaa	960
ccccgagagg aacagtacaa cagtacttat agggctcgtgt cagtccctgac cgtgctgcac	1020
caggactggc tgaacgggaa ggagtataag tgcaaagtgt ccaataaggc actgcctgcc	1080
ccaatcgaga aaactatttc taaggctaaa ggccagccta gagaaccaca ggtgtacacc	1140
ctgcctccaa gccgggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacatg tctggtgaaa	1200
ggattctatc catccgatat cgcagtggag tgggaatcta atgggcagcc cgaatacaat	1260
tacaagacca cccccctgt gctggacagc gatggcagct tcttcctgta tagcaagctg	1320
accgtggata aatcccgtg gcagcagggg aacgtctttt cctgctctgt gatgcatgag	1380
gccctgcaca atcattacac acagaagagt ctgtcactga gcccaggaaa gcgaggagg	1440
aaaaggagat ccgatctgg ggctactaac ttctccctgc tgaagcaggc aggcgacgtg	1500
gaggaaaatc ccggacctat ggtcctgcag acacaggtgt ttatcagcct gctgctgtgg	1560
atttcggcg cttacggaga tatccagatg actcagtcce ccagttcact gagtgcacaa	1620
gtcggcgacc gggtagactat cactgtcgc gcctctcagg atattcggcg ctacctgaat	1680
tggatcagc agcgaccagg acgagtgcct cagctgctga tctacactac ctccacactg	1740
cagctcggcg tcccaagtag gttcagcggc tccggatctg tgactgactt tacactgact	1800
attagctccc tgcagcccga ggatttcggc acctactatt gccagcagag ttattcacca	1860
ccccacacat ttgggcaggg cactaagctg gaaatcaaaa ccgtcgccgc tcccagcgtg	1920
ttcatctttc ctccaagtga cgagcagctg aagtcaggaa cagccagcgt ggtgtgcctg	1980
ctgaacaatt tctacctag agaagccaag gtccagtgga aagtgataa cgctctgcag	2040
tctgggaata gtcaggagtc agtgacagaa caggacagca aggattccac ttattctctg	2100
tctagtaccc tgacactgag caaagcagac tacgagaagc ataaagtgtg tgcctgcgaa	2160
gtcaccacc agggtctgag gtcaccagtc acaaaatcct ttaacagagg cgaatgctga	2220
taactcgag	2229
<210> 78	
<211> 735	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DSVF-3 LALA amino acid sequence	
<400> 78	

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Asp Asp Tyr Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Ala Thr Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys
85 90 95
Ser Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Leu
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Pro Arg Gly Leu Gln Leu Leu Ser Ser
115 120 125
Trp Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 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	Ala	Ala	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	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser
465				470				475				480			
Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val
485				490				495							

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser
500 505 510

Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln
515 520 525

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
530 535 540

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
545 550 555 560

Arg Pro Gly Arg Val Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Thr Leu
565 570 575

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp
580 585 590

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr
595 600 605

Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
610 615 620

Lys Leu Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
625 630 635 640

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
645 650 655

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
660 665 670

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
675 680 685

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
690 695 700

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
705 710 715 720

Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
725 730 735

<210> 79

<211> 2217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PSMA nucleic acid sequence

<400> 79

ggatccgcca ccatggattg gacatggagg attctgtttc tggtcgccgc cgccacagga	60
acccacgccg aagtgcagct ggtgcagtca ggagccgagg tgaagaaacc aggcgaaagt	120
ctgaaaatct catgcaaagg aagtgggtac tcattcacta gcaactggat tggatgggtg	180
cggcagatgc caggcaaggg actggagtgg atgggaatca tctaccccg ggactccgat	240
acacgtata gtccttcatt tcagggccag gtgacaatct ctgccgaca aagcatttcc	300
actgcttata tgcagtggag ctccctgaag gcttccgata ccgcaatgta ctattgcgcc	360
aggcagacag gcttctgtg gtctagtac ctgtggggga gaggcaccct ggtcacagt	420
tcaagcgct ctaccaaagg accaagcgtg ttcccactgg ctcttctc taagtctact	480
agtggcgga cgcgcgtct gggatgtctg gtgaaggatt acttccctga gccagtcaca	540
gtgtcctgga actctggcgc tctgaccagc ggagtccaca catttccgc agtgctgcag	600
agttcaggcc tgiactcct gagtccgtg gtcacagtcc cttctagttc actgggaact	660
cagacctata tctgcaacgt gaatcacaaa cttccaata ctaaggtcga caagaaagt	720
gaacaaaat cttgtgata gacacatact tgcctcctc gtccagcacc tgagctgctg	780
ggcggcccaa gcgtgttct gtttccacc aagcccaaag ataccctgat gattagcagg	840
acaccagaag tcaattgcgt ggtcgtggac gtgtcccacg aggacccga agtcaagttc	900
aactggtacg tggacggcgt cgaggtgcat aatgctaaga ccaaaccaag agaggaacag	960
tacaactcaa cctatcgggt cgtgagcgtc ctgacagtgc tgcaccagga ctggctgaac	1020
ggaaaggagt ataagtcaa agtgtctaac aaggccctgc cagctcccat cgagaagact	1080
attagcaagg ctaaaggga gccacgcga cccaggtgt acaccctgcc tccatcacga	1140
gatgagctga caaaaaacca ggtctctctg acttgtctgg tgaagggtt ctatccctct	1200
gacatcgag tggagtggga aagtaatggg cagcctgaaa acaattaca gaccacacc	1260
cctgtgctgg acagtgatg atcattcttt ctgtatagta aactgaccgt ggataagtca	1320
agatggcagc aggggaacgt cttttcatgc agcgtgatgc atgaggccct gcacaatcat	1380
tacaccaga agtccctgtc tctgagtcct ggcaaacggg gacgcaagag gagatcagga	1440
agcggggcta caaacttct cctgtgaag caggcagggg acgtggagga aaatcctggc	1500
ccaatggtcc tgcagacca ggtgtttatc tcctgtctgc tgtggatttc tggggcatac	1560
ggcgccatcc agctgacaca gtctcccagc tcctgtccg catctgtcgg cgaccgagt	1620

accatcacat gtagggccag ccaggatatt tctagtgtc tggcatggta ccagcagaag 1680
cctgggaaag caccaaagct gctgatctat gatgcctcaa gcctggaatc cggagtgcct 1740

agccggttct ccggatacgg aagtgggaca gactttactc tgaccattaa cagcctgcag 1800
cctgaggatt tcgccactta ctattgccag cagttcaata gctatccact gacttttggg 1860
gggggcacca aagtggaaat caagcgaact gtcgcagccc ctacgtgtt catttttcca 1920
ccctccgatg agcagctgaa gagcggcacc gcttccgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 1980
taccacgcg aggccaaagt ccagtgggaag gtggacaacg ctctgcagtc tggaaatagt 2040
caggagtcag tgactgaaca ggacagcaaa gattccacct attctctgtc ctctacactg 2100
actctgagca aggcagacta cgagaagcat aaagtgtatg cctgcgaagt caccaccag 2160

gggctgtcct caccagtcac taaatctttc aatcggggag aatgttgata actcgag 2217

<210> 80

<211> 731

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PSMA amino acid sequence

<400> 80

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45

Thr Ser Asn Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser

65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu Trp

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

 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr

 465 470 475 480
 Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 485 490 495
 Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile
 500 505 510
 Ser Gly Ala Tyr Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 515 520 525
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 530 535 540

 Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 545 550 555 560
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro
 565 570 575
 Ser Arg Phe Ser Gly Tyr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 580 585 590
 Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe
 595 600 605
 Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 610 615 620

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 625 630 635 640
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 645 650 655
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 660 665 670
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 675 680 685

 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 690 695 700
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 705 710 715 720
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 725 730