



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0031439
(43) 공개일자 2019년03월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/248 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7035166
- (22) 출원일자(국제) 2017년05월05일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년12월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/031193
- (87) 국제공개번호 WO 2017/192933
국제공개일자 2017년11월09일
- (30) 우선권주장
62/332,377 2016년05월05일 미국(US)

- (71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트스트리트 3160
더 위스타 인스티튜트 오브 아나토미 앤드 바이올로지
미국 펜실바니아 19104 필라델피아 스프루스 스트리트 3601
- (72) 발명자
웨이너, 데이비드
미국, 펜실베니아 19066, 메리언, 717 베컴 레인
엘리엇, 사라
미국, 워싱턴 99163, 풀만, 피.오. 박스 301
- (74) 대리인
이명진

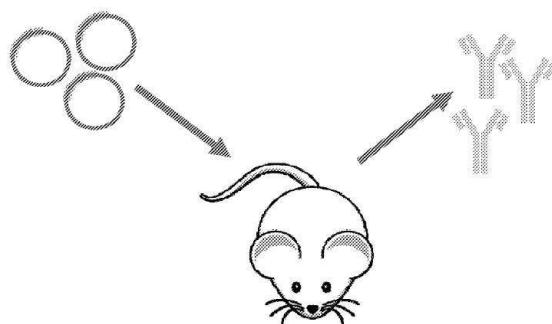
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 IL-6 및 CD126을 표적으로 하는 DNA 단클론성 항체

(57) 요약

본 명세서에는 항-IL-6 및/또는 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물이 개시되어 있다. 본 개시내용은 또한 상기 조성물을 이용해서 대상체에서 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법 및 생성방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 합성 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 하나 이상의 핵산 분자는,

- a) 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열;
- b) 항-IL-6 합성 항체의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열;
- c) 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- d) 항-CD126 항체의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 2의 단편, 서열번호 2에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 4, 서열번호 4의 단편, 서열번호 4에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 6, 서열번호 6의 단편, 서열번호 6에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 8, 서열번호 8의 단편, 또는 서열번호 8에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 서열번호 1의 단편, 서열번호 1에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 3, 서열번호 3의 단편, 서열번호 3에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 5, 서열번호 5의 단편, 서열번호 5에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 7, 서열번호 7의 단편, 또는 서열번호 7에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 10, 서열번호 10의 단편, 서열번호 10에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 12, 서열번호 12의 단편, 및 서열번호 12에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9, 서열번호 9의 단편, 서열번호 9에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 서열번호 11, 서열번호 11의 단편, 및 서열번호 11에 대해서 90% 초과의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및 항-CD126 항체를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 절단 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 항-IL-6의 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 항-CD126의 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 인간 IgG1 κ의 불변 중쇄 영역 및 불변 경쇄 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 항-IL-6의 가변 중쇄 영역; 인간 IgG1 κ의 불변 중쇄 영역; 절단 도메인; 항-IL-6의 가변 경쇄 영역; 및 IgG1 κ의 불변 경쇄 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 항-CD126의 가변 중쇄 영역; 인간 IgG1 κ의 불변 중쇄 영역; 절단 도메인; 항-CD126의 가변 경쇄 영역; 및 IgG1 κ의 불변 경쇄 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 리더 서열을 암호화하는, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 발현 벡터를 포함하는, 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 17

대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서,

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제15항 또는 제16항의 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 질환은 암인, 질환을 치료하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 질환은 자가면역 질환인, 질환을 치료하는 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 질환은 패혈증인, 질환을 치료하는 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 질환은 바이러스 감염인, 질환을 치료하는 방법.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 질환은 다발성 캐슬만병(multicentric Castleman disease)인, 질환을 치료하는 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 질환은 고열과 연관된, 질환을 치료하는 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 질환은 이식편-대-숙주(GVH) 질환인, 질환을 치료하는 방법.

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 질환은 세포 용해 증후군인, 질환을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참고문헌

본 출원은 2016년 5월 5일자로 출원된 미국 가출원 제62/332,377호를 우선권으로 주장하며, 이러한 기초 출원은 그 전문이 본 명세서에 참고로 원용된다.

[0003] 기술 분야

본 발명은 생체 내에서 항-IL-6 및 항-CD126 항체, 및 이들의 기능적 단편을 비롯하여 하나 이상의 합성 항체를 생성시키기 위한 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물, 및 상기 조성물을 투여함으로써 대상체에서 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 전염증성 사이토카인 IL-6은 선천적인 염증 및 패혈증에서 실질적인 역할을 한다. 상승된 수준의 IL-6은, 수많은 연구가 IL-6 신호 전달과 종양 발달 간의 연관을 입증하고 있으므로, 불량한 암 예측과 임상적으로 연결된다. 현재, IL-6 및 이의 수용체인 CD126을 표적으로 하는 치료적 항체는 다발성 캐슬만병(multicentric Castleman disease) 및 류마티스 관절염의 치료를 위하여 승인되어 있다. 불행하게도, 정제된 항-IL-6 및 항-CD126 항체의 제조와 전달은 높은 비용이 듈다. 또한, 이들 항체 요법은 매주-대-매달 재투여되어야 하며 - 이는 암 및 자가면역 질환과 같은 만성 병태의 치료에서 도전적인 고려사항이다.

[0006] 따라서, 당업계에서는 암 및 자가면역 질환의 치료를 위하여 IL-6 및 CD126을 표적으로 하는 개선된 조성물 및 방법에 대한 요구가 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 하나 이상의 합성 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 여기서 하나 이상의 핵산 분자는 a) 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; b) 항-IL-6 합성 항체의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; c) 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; 및 d) 항-CD126 항체의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함한다.

[0008] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열; 및 항-CD126 항체를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0009] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 절단 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0010] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 가변 중쇄 영역 및 항-IL-6의 가변 경쇄 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열

을 포함한다.

[0011] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 가변 중쇄 영역 및 항-CD126의 가변 경쇄 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0012] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 인간 IgG1 κ의 불변 중쇄 영역 및 불변 경쇄 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0013] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 항-IL-6의 가변 중쇄 영역; 인간 IgG1 κ의 불변 중쇄 영역; 절단 도메인; 항-IL-6의 가변 경쇄 영역; 및 IgG1 κ의 불변 경쇄 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0014] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 항-CD126의 가변 중쇄 영역; 인간 IgG1 κ의 불변 중쇄 영역; 절단 도메인; 항-CD126의 가변 경쇄 영역; 및 IgG1 κ의 불변 경쇄 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0015] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 리더 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0016] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 발현 벡터를 포함한다.

[0017] 각종 실시형태에 있어서, 본 발명은 핵산 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 실시형태에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함한다.

[0018] 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 대상체에서 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하되, 해당 방법은 본 명세서에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 암이다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 자가면역 질환. 일 실시형태에 있어서, 질환은 폐혈증이다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 바이러스 감염이다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 다발성 캐슬만병이다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 고열과 연관된다. 일 실시형태에 있어서, 질환은 이식편-대-숙주(GVH) 질환이다. 일 실시형태에 있어서, 질환 is 세포 용해 증후군이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 항-IL-6 및 항-CD126을 암호화하는 DNA 작제물을 나타내는 기략도이다.

도 2A 내지 도 2C를 포함하는 도 2는, DMAb 작제물이 293T 세포에서 발현되는 것을 입증하는 실험 결과를 묘사한다. HEK 293T 세포는 항-IL-6(IL-6 1 내지 4) 또는 항-CD126(CD126 1 내지 2) 작제물을 보유하는 플라스미드 DNA로 형질주입되었다. 빈 플라스미드는 음성 대조군으로서 역할한다. (도 2A 및 도 2B) 인간 IgG1 κ 발현은 정량적 ELISA(N=3 형질주입 반복부, ± SEM)에 의해 결정되었다. (도 2C) 대표적인 웨스턴 블로트는 상청액 중쇄 및 경쇄 웅타이드 절단 및 발현을 나타낸다.

도 3A 및 도 3B를 포함하는 도 3은, DMAb가 근육내 전기천공법 후 마우스 혈청에서 생체내 발현되는 것을 입증하는 실험 결과를 묘사한다. BALB/c 마우스는 100mg i.m. 플라스미드 DNA로 주입 후에 전기천공법이 시행되었다. 7일 후에, 혈청 인간 IgG1 κ 항체 수준은 ELISA에 의해 결정되었다. (도 3A) 항-IL-6 DMAb는 기준선인 제0일 출혈전 수준에 대해서 1.5 μ g/ml 내지 7.0 μ g/ml(평균) 발현되었다. (도 3B) 항-CD126 DMAb는 기준선인 제0일 출혈전 수준에 대해서 1.6 μ g/ml 내지 4.1 μ g/ml(평균) 발현되었다. (N=5, 평균 ± SEM.)

도 4는 근육-전기천공된 마우스로부터의 혈청 내 DMAb가 그의 표적 항원에 결합하는 것을 입증하는 실험 결과를 묘사한다. BALB/c 마우스는 100 μ g 플라스미드 DNA의 주입 후에 근육내 전기천공법을 시행하였다. 1주 후에, 재조합 인간 IL-6(좌측) 및 인간 CD126(우측)에 결합하는 혈청 인간-IgG 항체는 ELISA에 의해 결정되었다. (N=5, 평균 ± SEM.).

도 5는 혈청 DMAb가 시험관내에서 IL-6-매개 세포 신호전달을 차단하는 것을 입증하는 실험 결과를 묘사한다. 인간 CD126 및 STAT3-유도성 분비 알칼리성 포스파타제(SEAP)가 안정적으로 형질 주입된 HEK-293 세포가 얻어졌다. 미치료 마우스로부터의 희석된(1:40) 혈청은 마우스-IL-6-촉진 SEAP 발현의 기준선 수준을 유도하였고, 이것은 세포 상청액 중 100% SEAP 활성도로 정규화되었다(회색 막대). DMAb-전기천공된 마우스로부터의 제7일 혈청이 희석되었고(1:40), 세포 상청액은 미치료 대조군의 퍼센트로서 SEAP 활성도에 대해서 검정되었다(흑색 막대). 비특이적 사이토카인 TNF α는 특이적 사이토카인 활성화에 대한 대조군으로서 작용하였다(흰색 막대). (N=4, 평균 ± SEM.)

도 6은 혈청 DMB가 시험관내에서 IL-6-매개 세포 신호전달을 차단하는 것을 입증하는 실험 결과를 묘사한다. 인간 CD126 및 STAT3-유도성 분비 알칼리성 포스파타제(SEAP)로 안정적으로 형질주입된 HEK-293 세포가 얻어졌다. 미치료 마우스로부터의 희석된(1:40 내지 1:40960) 혈청은 마우스-IL-6-촉진 SEAP 발현의 기준선 수준을 유도하였고, 이것은 세포 상청액 중 100% SEAP 활성도로 정규화되었다(흑색선). DMB-전기천공된 마우스로부터의 제7일 혈청이 희석되었고(1:40 내지 1:40960), 세포 상청액은 나타낸 바와 같이 SEAP 활성도에 대해서 검정되었다(청색선). 비특이적 사이토카인 TNF α 는 특이적 사이토카인 활성화(흑색선)에 대한 대조군으로서 작용하였다. (N=4, 평균 \pm SEM.).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

본 발명은 항체를 암호화하는 재조합 핵산 서열, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 조성물은 합성 항체의 생체내 발현 및 형성을 촉진시키기 위해 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0021]

특히, 재조합 핵산 서열로부터 발현된 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드는 합성 항체 내에 어셈블링될 수 있다. 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드는, 어셈블리가 목적하는 표적(예컨대, IL-6 및 CD126)을 결합시키고, 본 명세서에 기술된 바와 같이 어셈블링되지 않은 항체와 비교하여 더욱 면역원성이고, 목적하는 표적에 대한 면역반응을 유발하거나 유도할 수 있는 합성 항체를 형성시키도록 서로 상호작용할 수 있다.

[0022]

추가적으로, 이러한 합성 항체는 항원 유도 면역 반응에 반응하여 생성된 항체보다 대상체에서 더욱 신속하게 발생된다. 합성 항체는 소정 범위의 표적을 효과적으로 결합하고 중화시킬 수 있다. 합성 항체는 또한, 질환을 효과적으로 방어하고/하거나 질환 생존율을 촉진시킬 수 있다. 따라서, 합성 DNA 플라스미드의 형태로 조작된 단클론성 항체(MAb)에 관하여, 본 발명은 항체, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 생체내 발현 및 합성 항체의 형성을 용이하기 하기 위하여 이를 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 본 명세서에 기재되어 있다. 예를 들어, 일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 변이체 또는 이의 단편을 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 변이체 또는 이의 단편을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 본 명세서에 기재된 DNA 서열로부터 전사된 RNA 서열을 포함한다. 예를 들어, 일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11의 DNA 서열에 의해 전사된 RNA 서열, 또는 이의 변이체 또는 이의 단편을 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 DNA 서열에 의해 전사된 RNA 서열, 또는 이의 변이체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0023]

일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해서 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐서 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 암호화한다. 일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해서 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐서 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 단편을 암호화한다.

[0024]

일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9 및 서열번호 11로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 대해서 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸쳐서 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일성을 갖는다. 일 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9 및 서열번호 11로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 대해서 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸쳐서 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 단편이다.

[0025]

1. 정의

[0026]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 상충될 때, 정의를 포함하여 본 문서가 우선시 될 것이다. 바람직한 방법 및 물질이 하기에 기재되어 있지만, 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 평

가에서 이용될 수 있다. 본 명세서에서 언급된 모든 공보, 특허출원, 특허 및 다른 참고문헌은 이들의 전문이 참고로 포함된다. 본 명세서에 개시된 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것으로서, 제한하려는 것은 아니다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함한다", "포함된다", "갖는", "갖는다", "수 있다", "함유한다" 및 이들의 변형예는 추가적인 행위 또는 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형 전이 어구, 용어 또는 단어로 의도된다. 문맥상 명백하게 달리 기술하지 않는 한, 단수 형태에는 복수 대상물이 포함된다. 본 개시는 또한 명시적으로 기술하는 지의 여부와는 관계없이, 본 명세서에 제시된 실시형태 또는 요소를 "포함하는", "이로 구성된" 및 "본 질적으로 이로 구성된" 다른 실시형태를 고려한다.

[0028] "항체"는 Fab, F(ab')2, Fd, 및 단일쇄 항체, 및 이들의 유도체를 포함하는 클래스 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE의 항체, 또는 단편, 이의 단편 또는 유도체를 의미할 수 있다. 항체는 원하는 에피토프 또는 이로부터 유래된 서열에 충분한 결합 특이성을 나타내는 포유류 혈청 샘플에서 단리된 항체, 다클론성 항체, 친화도 정제된 항체, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 이용되는 바와 같은 "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 아이소형에 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(diabody), 단일쇄 Fv(scFv) 분자, 하나의 경쇄 가변 도메인만 함유하는 단일쇄 폴리펩타이드, 경쇄 가변 도메인의 세 개의 CDR을 함유하는 단일쇄 폴리펩타이드, 하나의 중쇄 가변 영역만 함유하는 단일쇄 폴리펩타이드, 및 중쇄 가변 영역의 세 개의 CDR을 함유하는 단일쇄 폴리펩타이드가 포함된다.

[0030] "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.

[0031] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "코딩 서열" 또는 "암호화 핵산"은 본 명세서에 나타낸 바와 같은 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미할 수 있다. 코딩 서열은 또한 RBA 서열을 암호화하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 코딩 서열은 핵산이 투여되는 개인 또는 포유류의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다. 코딩 서열은 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "상보체" 또는 "상보적인"은 핵산이 핵산 분자의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 간 왓슨-크릭(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 후그스틴(Hoogsteen) 염기쌍 형성을 의미할 수 있음을 의미할 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "정전류"는 조직 또는 상기 조직을 정의하는 세포가 동일한 조직에 전달되는 전기 자극 기간에 걸쳐 수신하거나 경험하는 전류를 정의하기 위한 것이다. 전기 자극은 본 명세서에 기재된 전기천공 장치로부터 전달된다. 상기 전류는 본 명세서에서 제공된 전기천공 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, 전기천공장치가 그 전기 에너지 출력을 변경하도록(예컨대, 전압을 증가하도록) 유도하여 동일한 조직에서의 전류가 전기 자극 동안(마이크로초 수준) 그리고 자극 별로 변하지 않고 유지될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 피드백 요소는 컨트롤러를 포함한다.

[0034] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "전류 피드백" 또는 "피드백"은 상호 호환 가능하게 이용될 수 있고 제공된 전기천공 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 사용자에 의해 사전 설정된다. 내부 전기 회로가 전극 간에 조직내 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 조정을 수행할 수 있으므로, 피드백은 전기천공 장치의 전기천공 성분, 예를 들어, 컨트롤러에 의해 수행될 수 있다. 피드백 루프는 이것이 아닐로그 폐쇄 루프 피드백이므로, 즉각적일 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "분산된 전류"는 본 명세서에 기재된 전기천공 장치의 다양한 바늘 전극 어레이로부터 전달되는 전기적 전류 패턴을 의미할 수 있고, 여기서 이 패턴은 조직이 전기천공되는 임의의 영역 상에서 전기천공 관련된 열 스트레스의 발생을 최소화하거나 바람직하게 제거한다.

- [0036] 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 이용되는 바와 같은 "전기천공", "전기-투과화", 또는 "전기-역학 증강"("EP")은 생체막에서 미시적 경로(구멍)를 유도하기 위한 막관통 전기장 자극의 이용을 나타낼 수 있다; 이들의 존재는 생체분자, 예를 들어, 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온, 및 물이 세포막의 한쪽에서 다른 쪽으로 이동할 수 있게 한다.
- [0037] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "내인성 항체"는 체액성 면역 반응의 유도를 위해 유효 용량의 항원이 투여되는 대상체에서 생성되는 항체를 나타낼 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "피드백 메커니즘"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 메커니즘은 아날로그 폐쇄 루프 회로에 의해 수행될 수 있다.
- [0039] "단편"은 기능하고, 즉 원하는 표적에 결합할 수 있고, 전장 항체와 동일한 목적 효과를 갖는 항체의 폴리펩타이드 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 펩타이드 및/또는 메티오닌을 갖거나 갖지 않는다. 단편은 부가된 임의의 이종성 신호 펩타이드를 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 폴리펩타이드의 단편을 포함하며, 추가적으로 동일성 백분율 계산 시 포함되지 않는 N 말단 메티오닌 또는 이종성 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. 단편은 추가로 N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩타이드, 예를 들어, 면역글로불린 신호 펩타이드, 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩타이드는 항체의 단편에 연결될 수 있다.
- [0040] 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 펩타이드 및/또는 메티오닌을 암호화하는 서열을 갖거나 갖지 않는다. 단편은 부가된 임의의 이종성 신호 펩타이드를 제외하고, 특정한 전장 코딩 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 폴리펩타이드를 암호화하는 단편을 포함하고 선택적으로는 동일성 백분율 계산 시 포함되지 않는 N 말단 메티오닌 또는 이종성 신호 펩타이드를 암호화하는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 단편은 추가로 N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩타이드, 예를 들어, 면역글로불린 신호 펩타이드, 예를 들어 IgE 또는 IgG 신호 펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. N 말단 메티오닌 및/또는 신호 펩타이드를 암호화하는 코딩 서열이 항체 서열의 단편에 연결될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "유전적 작제물"은 단백질, 예를 들어, 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 나타낸다. 유전적 작제물은 또한 RNA 분자를 전사하는 DNA 분자를 지칭할 수 있다. 코딩 서열에는 핵산 분자가 투여되는 개인의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호가 포함된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현 가능한 형태"는 개인의 세포에 존재하는 경우, 코딩 서열이 발현되도록 단백질을 암호화하는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 함유하는 유전자 작제물을 나타낸다.
- [0042] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 맥락에서 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "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, 매칭된 위치의 수를 명시된 영역에서 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱해서 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 두 서열이 상이한 길이이거나 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 수동으로 또는 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 서열 알고리즘을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0043] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "임피던스"는 피드백 메커니즘을 논의할 때 이용될 수 있고, 옴의 법칙에 따

라 전류값으로 전환되어 사전 설정된 전류와의 비교를 가능케 할 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "면역 반응"은 하나 이상의 핵산 및/또는 웹타이드의 도입에 반응하는 숙주의 면역계, 예를 들어, 포유류의 면역계 활성화를 의미할 수 있다. 면역 반응은 세포성 또는 체액성 반응의 형태 또는 둘 다일 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 서로 공유 연결된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 단일쇄의 도시는 또한 상보쇄의 서열을 정의한다. 따라서 핵산은 또한 도시된 단일쇄의 상보쇄를 포괄한다. 핵산의 여러 변이체가 주어진 핵산과 동일한 목적을 위해 이용될 수 있다. 따라서 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이들의 상보체를 포괄한다. 단일쇄는 염격한 혼성화 조건 하에 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서 핵산은 또한 염격한 혼성화 조건 하에 혼성화하는 프로브를 포괄한다.

[0046] 핵산은 단일쇄 또는 이중쇄일 수도 있고, 또는 이중쇄 및 단일쇄 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, 아이소시토신 및 아이소구아닌을 포함하는 염기의 조합을 함유할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법에 의해 또는 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 이용되는 "작동 가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 이것이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어 하에 있음을 의미할 수 있다. 프로모터는 그 제어 하 유전자의 5'(업스트림) 또는 3'(다운스트림)에 배치될 수 있다. 프로모터 및 유전자 간 거리는 프로모터가 유래된 유전자에서 이것이 제어하는 유전자 및 프로모터 간 거리와 대략 동일할 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 상기 거리의 변동은 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 이용되는 "웹타이드", "단백질", 또는 "폴리웹타이드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있고, 천연, 합성, 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 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 원위인해서 또는 억제 유전자 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, 예를 들어, 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.

[0050] "신호 웹타이드" 및 "리더 서열"은 본 명세서에서 상호 교환적으로 이용되며, 본 명세서에 나타낸 단백질의 아미노 말단에 연결될 수 있는 아미노산 서열을 나타낸다. 신호 웹타이드/리더 서열은 전형적으로 단백질의 위치 선정을 지시한다. 본 명세서에서 이용된 신호 웹타이드/리더 서열은 바람직하게는 이것이 생산되는 세포로부터 단백질의 분비를 촉진한다. 신호 웹타이드/리더 서열은 종종 세포로부터의 분비 시, 종종 성숙 단백질로 불리는 단백질의 나머지로부터 절단된다. 신호 웹타이드/리더 서열은 단백질의 N 말단에 연결된다.

[0051] 본 명세서에서 이용되는 "엄격한 혼성화 조건"은 제1 핵산 서열(예를 들어, 프로브)이 제2 핵산 서열(예를 들어, 표적)에, 예를 들어, 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 내지 10°C 더 낮게 선택될 수 있다. T_m 은 표적에 상보적인 프로브의 50%가 평형 시(표적 서열이 과량으로 존재하므로, T_m 에서 프로브의 50%가 평형 시 점유됨) 표적 서열에 혼성화하는 온도(정의된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하에)일 수 있다. 엄격한 조건은 염 농도가 약 1.0M 나트륨 이온 미만, 예를 들어, pH 7.0 내지 8.3에서 약 0.01 내지 1.0M 나트륨 이온 농도(또는 다른 염)이고 온도가 짧은 프로브(예컨대, 약 10 내지 50 개 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 30°C이고 긴 프로브(예컨대, 약 50개 초과 뉴클레오타이드)에 대해 적어도 약 60°C인 것들일 수 있다. 엄격한 조건은 또한 탈안정화제, 예를 들어, 품아마이드의 첨가로 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 혼성화를 위해, 양성 신호는 배경 혼성화의 적어도 2 내지 10배일 수 있다. 예시적인

엄격한 혼성화 조건에는 하기가 포함된다: 50% 품아마이드, 5×SSC, 및 1% SDS, 42°C에서 항온처리하거나, 또는 5×SSC, 1% SDS, 65°C에서 항온처리하고, 65°C에서 0.2×SSC, 및 0.1% SDS 중에 세척.

[0052] 본 명세서에서 상호 교환적으로 이용되는 "대상체" 및 "환자"는 비제한적으로 포유류(예를 들어, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아피그, 고양이, 개, 래트 및 마우스, 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 예를 들어, 게잡이 또는 붉은털 원숭이, 침팬지 등) 및 인간)를 포함하는 임의의 척추동물을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 인간 또는 비-인간일 수 있다. 대상체 또는 환자는 다른 형태의 치료를 거치고 있을 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 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 초과의 뉴클레오타이드 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.

[0054] 본 명세서에서 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 초과의 뉴클레오타이드 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.

[0055] 본 명세서에서 이용되는 "합성 항체"는 본 명세서에서 기재된 재조합 핵산 서열에 의해 암호화되고 대상체에서 생성되는 항체를 나타낸다.

[0056] 본 명세서에서 이용되는 "치료" 또는 "치료하는"은 질환의 예방, 억제, 진압 또는 완전 제거 수단을 통한 대상체의 질환으로부터의 방어를 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.

[0057] 핵산에 대해 본 명세서에서 이용되는 "변이체"는 (i) 참조된 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 단편; (ii) 참조된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 일부의 상보체; (iii) 참조된 핵산 또는 이들의 상보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 참조된 핵산, 이들의 상보체, 또는 이들과 실질적으로 동일한 서열에 엄격한 조건 하에 혼성화하는 핵산을 의미할 수 있다.

[0058] 웨타이드 또는 폴리웨타이드에 대한 "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 상이하지만 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 참조된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉 유사한 특성(예를 들어, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산을 이용한 아미노산 대체는 당해 분야에서 전형적으로 작은 변화가 관여되는 것으로 인식된다. 이러한 작은 변화는, 부분적으로 당해 분야에서 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 당해 분야에 공지되어 있다. 하나의 측면에서, ±2의 수치 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 생성할 치환을 드러내기 위해 이용될 수 있다. 웨타이드의 맥락에서 아미노산의 친수성 고려는 항원성 및 면역원성과 잘 연관되는 것으로 보고된 유용한 척도인 해당 웨타이드의 가장 큰 국소 평균 친수성 계산을 허용한다(본 명세서에 전체가 참고로 포함된 미국 특허 제4,554,101호). 당해 분야에서 이해되는 바와 같은, 유사한 친수성값을 갖는 아미노산의 치환은 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 보유하는 웨타이드를 생성할 수 있다. 치환은 서로 ±2 내의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값을 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.

[0059] 변이체는 전체 유전자 서열의 전장 또는 이의 단편에 걸쳐 실질적으로 동일한 핵산 서열일 수 있다. 핵산 서열은 유전자 서열의 전장 또는 이의 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 이의 단편에 걸쳐 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 아미노산 서열의 전장 또는 이의 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.

[0060] 본 명세서에서 이용되는 "벡터"는 복제 기원을 함유하는 핵산 서열을 의미할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자가-복제 염색체와 벡터 또는 숙주 세포 내로 통합되는 벡터일 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 수치 범위의 언급에 있어서, 동일한 정도의 정밀도를 갖는 그 사이의 각각의 개입 숫자가 명시적으로 고려된다. 예를 들어, 6 내지 9의 범위에 있어서, 숫자 7 및 8은 6 및 9에 부가하여 고려되며, 범위 6.0 내지 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.

2. 조성물

[0063] 본 발명은 항체, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 포유류 세포에서 항체를 생산하기 위하여 또는 박테리아, 효모뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함하는 DNA 또는 RNA 벡터에서 전달을 위하여 사용하기 위한 신규한 서열을 포함한다. 핵산 서열은 DNA 서열, RNA 서열, 또는 이들의 조합 및/또는 유도체일 수 있다. 조성물은, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 경우, 대상체에서 합성 항체의 생성을 일으킬 수 있다. 합성 항체는 대상체에 존재하는 표적 분자(즉, IL-6 및 CD126)에 결합할 수 있다. 이러한 결합은 표적을 중화시키거나, 다른 분자, 예를 들어, 단백질 또는 핵산에 의한 표적의 인식을 차단하거나, 표적에 대한 면역 반응을 유발 또는 유도할 수 있다.

[0064] 일 실시형태에 있어서, 조성물은 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 조성물은 제1 합성 항체를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 제2 합성 항체를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 절단 도메인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0065] 일 실시형태에 있어서, 제1 합성 항체를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열은 제1 합성 항체의 중쇄 영역을 암호화하는 제1 도메인 및 경쇄 영역을 암호화하는 제2 도메인을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 제2 합성 항체를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열은 제2 합성 항체의 중쇄 영역을 암호화하는 제1 도메인 및 경쇄 영역을 암호화하는 제2 도메인을 포함한다.

[0066] 일 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 항-IL-6 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 항-IL-6의 가변 VH 및 VL 영역을 암호화하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 인간 IgG1 κ의 CH 및 CL 영역을 암호화하는 코돈 최적화된 핵산을 포함한다.

[0067] 일 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 항-CD126의 가변 VH 및 VL 영역을 암호화하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 일 실시형태에 있어서, 항-CD126 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 인간 IgG1 κ의 CH 및 CL 영역을 암호화하는 코돈 최적화된 핵산을 포함한다.

[0068] 일 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8로부터 선택된 아미노산 서열, 이의 단편, 또는 이의 상동 서열을 포함하는 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0069] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0070] 서열번호 2의 단편이 제공될 수 있다. 단편은 서열번호 2의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편에는 리더 서열이 없다.

[0071] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 서열번호 4의

아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0072] 서열번호 4의 단편이 제공될 수 있다. 단편은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열번호 4를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편에는 리더 서열이 없다.

[0073] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0074] 서열번호 6의 단편이 제공될 수 있다. 단편은 서열번호 6의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편에는 리더 서열이 없다.

[0075] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0076] 서열번호 8의 단편이 제공될 수 있다. 단편은 서열번호 8의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편에는 리더 서열이 없다.

[0077] 소정의 실시형태에서, 핵산 분자는 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1; 서열번호 3; 서열번호 5, 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열, 이의 단편, 또는 이의 상동 서열을 포함한다.

[0078] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0079] 몇몇 실시형태는 서열번호 1의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 1의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다.

[0080] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0081] 몇몇 실시형태는 서열번호 3의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 3의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다.

[0082] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함한다.

[0083] 몇몇 실시형태는 서열번호 5의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 5의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적

어도 99%일 수 있다.

- [0084] 일 실시형태에 있어서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항-IL-6 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함한다.
- [0085] 몇몇 실시형태는 서열번호 7의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 7의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다.
- [0086] 일 실시형태에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 10, 서열번호 12로부터 선택된 아미노산 서열, 이의 단편, 또는 이의 상동 서열을 포함하는 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0087] 일 실시형태에 있어서, 항-CD126 합성 항체는 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항-CD126 합성 항체는 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0088] 서열번호 10의 단편이 제공될 수 있다. 단편은 서열번호 10의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편에는 리더 서열이 없다.
- [0089] 일 실시형태에 있어서, 항-CD126 합성 항체는 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항-CD126 합성 항체는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0090] 서열번호 12의 단편이 제공될 수 있다. 단편은 서열번호 12의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편은 리더 서열, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더를 포함한다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단편에는 리더 서열이 없다.
- [0091] 소정의 실시형태에서, 핵산 분자는 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 여기서 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9; 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열; 이의 단편, 또는 이의 상동 서열을 포함한다.
- [0092] 일 실시형태에 있어서, 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함한다.
- [0093] 몇몇 실시형태는 서열번호 9의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 9의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다.
- [0094] 일 실시형태에 있어서, 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항-CD126 합성 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 전체 길이에 대해서 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 포함한다.
- [0095] 몇몇 실시형태는 서열번호 11의 단편에 관한 것이다. 단편은 서열번호 11의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 조성물은 IL-6 및/또는 CD126 활성도와 연관된 임의의 질환, 장애, 또는 질환을 치료, 예방 및/또는 방어할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 염증을 치료, 예방 및/또는 방어할 수 있다. 소정의 실시형태

에서, 조성물은 자가면역 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 방어할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 암을 치료, 예방 및/또는 방어할 수 있다.

[0097] 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 질환을 치료, 예방 및/또는 방어할 수 있다. 표적을 결합시킴으로써 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 질환을 치료, 예방 및/또는 방어할 수 있다. 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 질환 생존율을 촉진시킬 수 있다. 합성 항체는 조성물이 투여된 대상체에서 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 질환 생존율을 제공할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 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 생존율을 제공할 수 있다.

[0098] 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.

[0099] 조성물은, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 경우, 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.

[0100] 본 발명의 조성물은 조성물이 질환 또는 사망을 유도하지 않으므로 안전하고; 질환을 방어하며; 투여 용이성, 적은 부작용, 생물학적 안정성 및 낮은 용량 별 비용을 제공하는 것과 같이 효과적인 조성물에 요구되는 특징을 가질 수 있다.

3. 재조합 핵산 서열

[0102] 전술한 바와 같이, 조성물은 재조합 핵산 서열을 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열은 항체, 이의 단편, 이들의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화할 수 있다. 항체는 하기에서 보다 상세히 기재된다.

[0103] 재조합 핵산 서열은 이종성 핵산 서열일 수 있다. 재조합 핵산 서열에는 적어도 하나의 이종성 핵산 서열 또는 하나 이상의 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다.

[0104] 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(예를 들어, GCC ACC)의 부가; 신호 웨პ타이드를 암호화하는 면역글로불린(Ig) 리더 서열의 부가; 및 시스-작용 서열 모티프(즉 내부 TATA 박스)가 작용 가능한 범위까지의 제거.

a. 재조합 핵산 서열 작제물

[0106] 재조합 핵산 서열에는 하나 이상의 재조합 핵산 서열 작제물이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 성분이 포함될 수 있고, 이는 하기에서 보다 상세히 기재된다.

[0107] 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩타이드, 이의 단편, 이들의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 경쇄 폴리펩타이드, 이의 단편, 이들의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에는 또한 프로테아제 또는 웨პ타이드 절단 부위를 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물은 하나 이상의 리더 서열을 포함할 수 있으며, 여기서, 각 리더 서열은 신호 웨პ타이드를 암호화한다. 재조합 핵산 서열 작제물은 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 신호를 포함할 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물은 또한, 하나 이상의 링커 또는 태그 서열을 포함할 수 있다. 태그 서열은 헤마글루티닌(HA) 태그를 암호화할 수 있다.

[0108] **(1) 중쇄 폴리펩타이드**

[0109] 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩타이드, 이의 단편, 이들의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화하는 이종성 핵산이 포함될 수 있다. 중쇄 폴리펩타이드에는 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.

[0110] 몇몇 실시형태에 있어서, 중쇄 폴리펩타이드에는 VH 영역 및 CH1 영역이 포함될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 중쇄 폴리펩타이드에는 VH 영역, CH1 영역, 힌지 영역, CH2 영역, 및 CH3 영역이 포함될 수 있다.

[0111] 중쇄 폴리펩타이드에는 상보성 결정 영역(complementarity determining region: "CDR") 세트가 포함될 수 있다. CDR 세트는 VH 영역의 세 고가변 영역을 함유할 수 있다. 중쇄 폴리펩타이드의 N-말단에서 시작하여, 이를 CDR은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 표시된다. 중쇄 폴리펩타이드의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항원의 결합 또는 인식에 기여할 수 있다.

[0112] **(2) 경쇄 폴리펩타이드**

[0113] 재조합 핵산 서열 작제물에는 경쇄 폴리펩타이드, 이의 단편, 이들의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 경쇄 폴리펩타이드에는 가변 경쇄(VL) 영역 및/또는 불변 경쇄(CL) 영역이 포함될 수 있다.

[0114] 경쇄 폴리펩타이드에는 상보성 결정 영역("CDR") 세트가 포함될 수 있다. CDR 세트는 VL 영역의 세 고가변 영역을 함유할 수 있다. 경쇄 폴리펩타이드의 N-말단에서 시작하여, 이를 CDR은 각각 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 표시된다. 경쇄 폴리펩타이드의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항원의 결합 또는 인식에 기여할 수 있다.

[0115] **(3) 프로테아제 절단 부위**

[0116] 재조합 핵산 서열 작제물에는 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 프로테아제 절단 부위는 프로테아제 또는 웨티다제에 의해 인식될 수 있다. 프로테아제는 엔도펩티다제 또는 엔도 프로테아제, 예를 들어 비제한적으로 퓨린, 엘라스타제, HtrA, 칼파인, 트립신, 키모트립신, 트립신, 및 웨신일 수 있다. 프로테아제는 퓨린일 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 프로테아제는 세린 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 아스파르테이트 프로테아제, 메탈로프로테아제, 글루탐산 프로테아제, 또는 내부 웨타이드 결합을 절단하는(즉, N-말단 또는 C-말단 웨타이드 결합을 절단하지 않는) 임의의 프로테아제일 수 있다.

[0117] 프로테아제 절단 부위에는 절단 효율을 촉진시키거나 증가시키는 하나 이상의 아미노산 서열이 포함될 수 있다. 하나 이상의 아미노산 서열은 별도의 폴리펩타이드를 형성 또는 생성하는 효율을 촉진하거나 증가시킬 수 있다. 하나 이상의 아미노산 서열에는 2A 웨타이드 서열이 포함될 수 있다.

[0118] **(4) 링커 서열**

[0119] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 링커 서열이 포함될 수 있다. 링커 서열은 본 명세서에 기재된 하나 이상의 성분을 공간적으로 분리하거나 연결할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 링커 서열은 두 개 이상의 폴리펩타이드를 공간적으로 분리하거나 연결하는 아미노산 서열을 암호화할 수 있다.

[0120] **(5) 프로모터**

[0121] 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 폴리머라제를 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 유래됨으로, 재조합 핵산 서열 작제물에서 전사 개시로부터 대략 동일한 거리에 배치될 수 있다. 그러나 상기 거리의 변동이 프로모터의 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

[0122] 프로모터는 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터는 진핵 세포에서 발현에 효과적으로 나타난 프로모터일 수 있다. 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 CMV 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40)에서 유래된 프로모터, 예를 들어, SV40 조기 프로모터 및 SV40 후기 프로모터, 마우스 유방암 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 프로모터, 예를 들어, 소 면역결핍 바이러스(BIV) 긴 말단 반복서열(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터,

조류 백혈증 바이러스(ALV) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 예를 들어, CMV 최초기 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 또는 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 인간 유전자, 예를 들어, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 인간 폴리헤드린, 또는 인간 메탈로티오나인에서 유래된 프로모터일 수 있다.

[0123] 프로모터는 구성적 프로모터 또는 숙주 세포가 일부 특정 외부 자극에 노출되는 경우에만 전사를 개시하는 유도 가능한 프로모터일 수 있다. 다세포 개체의 경우, 프로모터는 또한 특정 조직 또는 기관 또는 발달 단계에 특이 적일 수 있다. 프로모터는 또한 천연 또는 합성의 조직 특이적 프로모터, 예를 들어, 근육 또는 피부 특이적 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터의 예는 미국 특허출원 공개 번호 US20040175727호에 기재되며, 그 내용은 전문이 본 명세서에 포함된다.

[0124] 프로모터는 인핸서와 연관될 수 있다. 인핸서는 코딩 서열의 업스트림에 배치될 수 있다. 인핸서는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 또는 바이러스 인핸서, 예를 들어, CMV, FMDV, RSV 또는 EBV 유래의 인핸서일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 기능 증강은 미국 특허 제5,593,972호, 제5,962,428호, 및 WO94/016737호에 기재되며, 각각의 내용은 전체가 참고로 포함된다.

(6) 인트론

[0125] 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.

(7) 전사 종결 영역

[0126] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 전사 종결 영역이 포함될 수 있다. 전사 종결 영역은 효율적인 종결을 제공하기 위해 코딩 서열의 다운스트림일 수 있다. 전사 종결 영역은 전술한 프로모터와 동일한 유전자에서 수득될 수도 있고, 또는 하나 이상의 상이한 유전자에서 수득될 수도 있다.

(8) 개시 코돈

[0127] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 개시 코돈이 포함될 수 있다. 개시 코돈은 코딩 서열의 업스트림에 배치될 수 있다. 개시 코돈은 코딩 서열과 같은 틀에 있을 수 있다. 개시 코돈은 효율적인 번역 개시를 위해 필요한 하나 이상의 신호, 예를 들어 비제한적으로 리보솜 결합 부위에 연합될 수 있다.

(9) 종결 코돈

[0128] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 종결 또는 정지 코돈이 포함될 수 있다. 종결 코돈은 코딩 서열의 다운스트림일 수 있다. 종결 코돈은 코딩 서열과 같은 틀에 있을 수 있다. 종결 코돈은 효율적인 번역 종결을 위해 필요한 하나 이상의 신호에 연합될 수 있다.

(10) 폴리아데닐화 신호

[0129] 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 코딩 서열의 다운스트림에 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, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)로부터의 폴리아데닐화 신호일 수 있다.

(11) 리더 서열

[0130] 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 리더 서열이 포함될 수 있다. 리더 서열은 신호 웨타이드를 암호화할 수 있다. 신호 웨타이드는 면역글로불린(Ig) 신호 웨타이드, 예를 들어 비제한적으로 IgG 신호 웨타이드 및 IgE 신호 웨타이드일 수 있다.

d. 재조합 핵산 서열 작제물의 배열

[0131] 전술한 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. 몇몇 실시형태에 있어서, 하나 이상의 성분은 아래 기재된 바와 같이 재조합 핵산 서열 작제물에 배열될 수 있다.

(1) 배열 1

하나의 배열에서, 제1 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있고, 제2 재조합 핵산 서열 작제물에는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다.

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 하기에서 보다 상세히 기재된다.

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 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열의 업스트림(또는 5')에 배치된다. 따라서 리더 서열에 의해 암호화된 신호 펩타이드는 중쇄 폴리펩타이드에 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있다.

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 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열의 업스트림(또는 5')에 배치된다. 따라서 리더 서열에 의해 암호화된 신호 펩타이드는 경쇄 폴리펩타이드에 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있다.

따라서 배열 1의 하나의 예에는 VH 및 CH1이 포함되는 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 벡터(및 이에 따른 제1 재조합 핵산 서열 작제물), 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩타이드를 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 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 벡터(및 이에 따른 제1 재조합 핵산 서열 작제물), 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 벡터(및 이에 따른 제2 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있다.

(2) 배열 2

제2 배열에서, 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열은 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열의 업스트림(또는 5')에 배치될 수 있다. 대안적으로, 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열의 업스트림(또는 5')에 배치될 수 있다.

재조합 핵산 서열 작제물은 하기에서 보다 상세히 기재된 바와 같이 벡터에 배치될 수 있다.

재조합 핵산 서열 작제물에는 프로테아제 절단 부위 및/또는 링커 서열을 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 재조합 핵산 서열 작제물에 포함되는 경우, 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이종성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 간에 배치될 수 있다. 따라서 프로테아제 절단 부위는 발현 시 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드의 다른 폴리펩타이드로의 분리를 허용한다. 다른 실시형태에 있어서, 링커 서열이 재조합 핵산 서열 작제물에 포함되는 경우, 링커 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 간에 배치될 수 있다.

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 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열에 연관될 수 있고 제2 프로모터가 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열에 연관될 수 있도록 두 프로모터가 포함될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 재조합 핵산 서열 작제물에는 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열에 연관된 하나의 프로모터가 포함될 수 있다.

재조합 핵산 서열 작제물에는 2개의 리더 서열이 추가로 포함될 수 있고, 여기서 제1 리더 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열의 업스트림(또는 5')에 배치되고 제2 리더 서열은 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열의 업스트림(또는 5')에 배치된다. 따라서 제1 리더 서열에 의해 암호화된 제1 신호 펩타이드가 중쇄 폴리펩타이드에 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있고, 제2 리더 서열에 의해 암호화된 제2

신호 펩타이드가 경쇄 폴리펩타이드에 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있다.

[0151] 따라서 배열 2의 하나의 예에는 VH 및 CH1이 포함되는 중쇄 폴리펩타이드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 링커 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 간에 배치된다.

[0152] 배열 2의 제2 예에는 VH 및 CH1이 포함되는 중쇄 폴리펩타이드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이종성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 간에 배치된다.

[0153] 배열 2의 제3 예에는 VH, CH1, 힌지 영역, CH2, 및 CH3이 포함되는 중쇄 폴리펩타이드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 링커 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 간에 배치된다.

[0154] 배열 2의 제4 예에는 VH, CH1, 힌지 영역, CH2, 및 CH3이 포함되는 중쇄 폴리펩타이드 및 VL 및 CL이 포함되는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터(및 이에 따른 재조합 핵산 서열 작제물)가 포함될 수 있고, 여기서 프로테아제 절단 부위를 암호화하는 이종성 핵산 서열은 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 간에 배치된다.

e. 재조합 핵산 서열 작제물로부터의 발현

[0156] 전술한 바와 같이, 재조합 핵산 서열 작제물에는 하나 이상의 성분 가운데, 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 이종성 핵산 서열이 포함될 수 있다. 따라서 재조합 핵산 서열 작제물은 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드의 발현을 촉진할 수 있다.

[0157] 전술한 바와 같은 배열 1이 이용되는 경우, 제1 재조합 핵산 서열 작제물은 중쇄 폴리펩타이드의 발현을 촉진할 수 있고, 제2 재조합 핵산 서열 작제물은 경쇄 폴리펩타이드의 발현을 촉진할 수 있다. 전술한 바와 같은 배열 2가 이용되는 경우, 재조합 핵산 서열 작제물은 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드의 발현을 촉진할 수 있다.

[0158] 예를 들어, 비제한적으로 세포, 개체 또는 포유류에서의 발현 시, 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드는 합성 항체로 조립될 수 있다. 특히, 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드는 조립으로 항원에 결합할 수 있는 합성 항체가 생성되도록 서로 상호작용할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드는 조립으로 본 명세서에 기재된 바와 같이 조립되지 않은 항체에 비해 더 면역원성이 높은 합성 항체를 생성하도록 서로 상호작용할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드는 조립으로 항원에 대해 면역 반응을 야기하거나 유도할 수 있는 합성 항체를 생성하도록 서로 상호작용할 수 있다.

d. 벡터

[0160] 벡터는 플라스미드, 발현 벡터, 재조합 바이러스, 임의의 형태의 재조합 "네이키드 DNA" 벡터, 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. "벡터"는 세포를 감염, 형질주입, 일시적으로 또는 영구적으로 형질도입할 수 있는 핵산을 포함한다. 벡터가 네이키드 핵산, 또는 단백질 또는 지질과 복합화된 핵산일 수 있다는 것이 인지될 것이다. 벡터는 선택적으로, 바이러스 또는 박테리아 핵산 및/또는 단백질, 및/또는 막(예를 들어, 세포막, 바이러스 지질 엔벨로프 등)을 포함한다. 벡터는 레플리콘(예를 들어, RNA 레플리콘, 박테리오파지)를 포함하지만, 이로 제한되지 않으며, 여기에 DNA의 단편이 부착되고 복제될 수 있다. 이에 따라, 벡터는 RNA, 자율 자가-복제 원형 또는 선형 DNA 또는 RNA(예를 들어, 플라스미드, 바이러스, 등, 미국 특허 제5,217,879호 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지 않고, 발현 및 비-발현 플라스미드 둘 모두를 포함한다. 재조합 미생물 또는 세포 배양물이 "발현 벡터"를 숙주화하는 것으로 기술되는 경우에, 이는 염색체와 원형 및 선형 DNA 및 숙주 염색체(들) 내에 도입된 DNA 둘 모두를 포함한다. 벡터가 숙주 세포에 의해 유지되는 경우에, 벡터는 자율 구조(autonomous structure)로서 유사분열 동안 세포에 의해 안정적으로 복제될 수 있거나 숙주 세포 내에 도입된다. 위에서 기재된 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 염색체의 벡터, 또는 숙주 세포 내로 통합되는 벡터일

수 있다.

[0161] 하나 이상의 벡터는 이종성 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 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드가 세포-전사 및 번역 기전 리보솜 복합체에 의해 생성된다. 하나 이상의 벡터는 다양한 안정한 메신저 RNA, 그리고 이에 따라 단백질을 발현할 수 있다.

[0162] (1) 발현 벡터

[0163] 하나 이상의 벡터는 원형 플라스미드 또는 선형 핵산일 수 있다. 원형 플라스미드 및 선형 핵산은 적절한 대상체 세포에서 특정 뉴클레오타이드 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 이종성이다.

[0164] (2) 플라스미드

[0165] 하나 이상의 벡터는 플라스미드일 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 서열 작제물로 세포를 형질주입하기 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.

[0166] 플라스미드는 또한 염색체외로 플라스미드를 유지하고 세포에서 복수의 플라스미드 사본을 생산하기 위해 포유류 복제 기원을 포함할 수 있다. 플라스미드는 Invitrogen(캘리포니아주 샌디에이고 소재)의 pVAX, pCEP4 또는 pREP4일 수 있고, 이는 엡스타인 바 바이러스 복제 기원 및 핵 항원 EBNA-1 코딩 영역을 포함할 수 있고, 이는 통합 없이 고사본 에피솜 복제를 생산할 수 있다. 플라스미드 골격은 pAV0242일 수 있다. 플라스미드는 복제 결합 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 플라스미드일 수 있다.

[0167] 플라스미드는 pSE420(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있고, 이는 대장균(E.coli)에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다. 플라스미드는 또한 pYES2(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있으며, 이는 효모의 사카로마이세스 세레비시애 균주에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다. 플라스미드는 또한 MAXBAC™ 완전 배클로바이러스 발현 시스템(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있고, 이는 곤충 세포에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다. 플라스미드는 또한 pcDNA1 또는 pcDNA3(Invitrogen, 캘리포니아주 샌디에이고 소재)일 수 있고, 이는 포유류 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 단백질 생산을 위해 이용될 수 있다.

[0168] (3) RNA 벡터

[0169] 일 실시형태에 있어서, 핵산은 RNA 분자이다. 일 실시형태에 있어서, RNA 분자는 본 명세서에 기재된 DNA 서열로부터 전사된다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에 있어서, RNA 분자는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11 중 하나, 또는 이의 변이체 또는 이의 단편에 의해 암호화된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12의 폴리펩타이드 서열, 또는 이의 변이체 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA 서열에 의해 전사된 RNA 서열을 포함한다. 따라서, 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 항체 또는 다른 분자 중 하나 이상을 암호화하는 RNA 분자를 제공한다. RNA는 플러스-가닥(plus-strand)일 수 있다. 따라서, 몇몇 실시형태에 있어서, RNA 분자는 임의의 개재 복제 단계, 예를 들어, 역전사를 필요로 하지 않으면서 세포에 의해 번역될 수 있다. 본 발명에서 유용한 RNA 분자는 5' 캡(예를 들어, 7-메틸구아노신)을 가질 수 있다. 이러한 캡은 RNA의 생체내 번역을 향상시킬 수 있다. 본 발명에서 유용한 RNA 분자의 5' 뉴클레오타이드는 5' 트리포스페이트 기를 가질 수 있다. 캡핑된 RNA에서, 이러한 것은 5'-대-5' 브릿지를 통해 7-메틸구아노신에 연결될 수 있다. RNA 분자는 3' 폴리-A 테일을 가질 수 있다. 이는 또한, 이의 3' 단부 부근에 폴리-A 폴리미라제 인지 서열(예를 들어, AAUAAA)을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유용한 RNA 분자는 단일-가닥일 수 있다.

[0170] (4) 원형 및 선형 벡터

[0171] 하나 이상의 벡터는 하나 이상의 원형 플라스미드일 수 있고, 이는 세포 게놈 내로의 통합에 의해 표적 세포를 형질전환시키거나 염색체외(예를 들어, 복제 기원이 있는 자가 복제 플라스미드)로 존재할 수 있다. 벡터는 pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

[0172] 또한 선형 핵산, 또는 선형 발현 카세트("LEC")가 본 명세서에 제공되며, 이는 전기천공을 통해 대상체에 효율적으로 전달되고 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수

있다. LEC는 임의의 인산염 골격이 없는 임의의 선형 DNA일 수 있다. DNA는 하나 이상의 항체를 암호화할 수 있다. LEC는 프로모터, 인트론, 정지 코돈, 폴리아데닐화 신호를 포함할 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.

[0173] LEC는 선형화될 수 있는 임의의 플라스미드에서 유래될 수 있다. 이들은 또한 박테리아 성장 없이 그리고 선형화된 서열로부터가 아니라 합성적으로 제조될 수 있다. 플라스미드는 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수 있다. 플라스미드는 pNP(Puerto Rico/34) 또는 pM2(New Caledonia/99)일 수 있다. 플라스미드는 WLV009, pVAX, pcDNA3.0, 또는 provax, 또는 재조합 핵산 서열 작제물에 의해 암호화된 중쇄 폴리펩타이드 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

[0174] 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.

[0175] (5) 바이러스 벡터

[0176] 일 실시형태에 있어서, 세포에 본 발명의 핵산을 전달할 수 있는 바이러스 벡터가 본 명세서에서 제공된다. 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (2001), 및 Ausubel et al. (1997)]에 그리고 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기술되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 복제 기능의 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택 가능한 마커를 포함한다(예를 들어, WO 01/96584호; WO 01/29058호; 및 미국 특허 제6,326,193호). 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는 포유동물, 예를 들어 인간 세포에 유전자를 삽입하기 위한 가장 널리 사용된 방법이 된다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스, 등으로부터 유도될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,350,674호 및 제5,585,362호 참조).

[0177] (6) 벡터의 제조방법

[0178] 재조합 핵산 서열 작제물이 배치된 하나 이상의 벡터의 제조 방법이 본 명세서에서 제공된다. 최종 서브클로닝 단계 후, 벡터는 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 대규모 발효 탱크에서 세포 배양에 접종하기 위해 이용될 수 있다.

[0179] 다른 실시형태에 있어서, 최종 서브클로닝 단계 후, 벡터는 하나 이상의 전기천공(EP) 장치와 함께 이용될 수 있다. EP 장치는 하기에서 보다 상세히 기재된다.

[0180] 하나 이상의 벡터는 공지된 장치 및 기법의 조합을 이용하여 제형화되거나 제조될 수 있지만, 바람직하게는 2007년 5월 23일자로 출원된, 라이센스 받고 공동 계류 중인 미국 출원 제60/939,792호에 기재된 플라스미드 제조 기법을 이용하여 제조된다. 일부 예에서, 본 명세서에 기재된 DNA 플라스미드는 10 mg/ml 이상의 농도로 제형화될 수 있다. 제조 기법에는 또한 미국 출원 제60/939792호에 기재된 것에 더하여, 2007년 7월 3일자로 허여된 라이센스 받은 특허, 미국 특허 제7,238,522호에 기재된 것들을 포함하는 당업자에게 일반적으로 공지된 다양한 장치 및 프로토콜이 포함되거나 도입된다. 상기 인용된 출원 및 특허인, 미국 출원 제60/939,792호 및 미국 특허 제7,238,522호는 각각 이들의 전문이 본 명세서에 포함된다.

[0181] 3. 항체

[0182] 전술한 바와 같이, 재조합 핵산 서열은 항체, 이의 단편, 이들의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화할 수 있다. 항체는 항원에 결합하거나 이와 반응할 수 있고, 이는 하기에서 보다 상세히 기재된다.

[0183] 항체는 본 발명의 조성물이 투여된 대상체에서 질환을 치료, 방어 및/또는 예방할 수 있다. 항원을 결합함으로써 항체는 본 발명의 조성물이 투여된 대상체에서 질환을 치료, 방어 및/또는 예방할 수 있다. 항체는 본 발명의 조성물이 투여된 대상체에서 질환 생존율을 촉진시킬 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 항체는 항체가 투여되지 않았던 질환을 가진 대상체의 예상되는 생존율에 비해서 대상체에서의 증가된 질환 생존율을 제공할 수 있다. 각종 실시형태에 있어서, 항체는, 조성물의 부재에서의 예상되는 생존율에 비해서 본 발명의 조성물이 투여된 대상체에서 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%,

50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 질환 생존율 제공할 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 항체는 항체가 투여되지 않았던 대상체의 예상되는 방어에 비해서 대상체에서 질환의 증가된 방어를 제공할 수 있다. 각종 실시형태에 있어서, 항체는 조성물의 부재 시 예상되는 방어에 비해서 조성물이 투여된 대상체에서 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 질환을 방어할 수 있다.

[0184] 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 세 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.

[0185] 단백분해 효소 파파인은 우선적으로 IgG 분자를 절단하여 몇몇 단편을 생성하며, 그 중 둘(F(ab) 단편)은 각각 온전한 항원-결합 부위가 포함되는 공유 이종이량체를 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')₂일 수 있다. Fab에는 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드가 포함될 수 있다. Fab의 중쇄 폴리펩타이드에는 VH 영역 및 CH1 영역이 포함될 수 있다. Fab의 경쇄에는 VL 영역 및 CL 영역이 포함될 수 있다.

[0186] 항체는 면역글로불린(Ig)일 수 있다. Ig는, 예를 들어 IgA, IgM, IgD, IgE, 및 IgG일 수 있다. 면역글로불린에는 중쇄 폴리펩타이드 및 경쇄 폴리펩타이드가 포함될 수 있다. 면역글로불린의 중쇄 폴리펩타이드에는 VH 영역, CH1 영역, 헌지 영역, CH2 영역, 및 CH3 영역이 포함될 수 있다. 면역글로불린의 경쇄 폴리펩타이드에는 VL 영역 및 CL 영역이 포함될 수 있다.

[0187] 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.

[0188] 항체는 하기에서 더욱 상세히 기술되는 바와 같은 이중특이적 항체일 수 있다. 항체는 또한 하기에 더욱 상세히 기술되는 바와 같은 이중기능성 항체일 수 있다.

[0189] 전술한 바와 같이, 항체는 대상체에 조성물의 투여 시에 대상체에서 생성될 수 있다. 항체는 대상체 내에 반감기를 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항체는 대상체 내에서 이의 반감기를 연장하거나 단축시키기 위해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 하기에서 더욱 상세히 기술된다.

[0190] 항체는 하기에서 더욱 상세히 기술되는 바와 같이 탈포코실화될 수 있다.

[0191] 항체는 하기에서 더욱 상세히 기술되는 바와 같이 항원과 관련된 질환의 항체-의존 항상(ADE)을 감소 또는 예방하기 위해 변형될 수 있다.

a. 이중특이적 항체

[0193] 재조합 핵산 서열은 이중특이적 항체, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화할 수 있다. 이중특이적 항체는 2개의 항원, 예를 들어, 하기에서 더욱 상세히 기술되는 항원들 중 2개와 결합 또는 반응할 수 있다. 이중특이적 항체는 본 명세서에 기술된 항체 중 2개의 단편으로 이루어질 수 있으며, 이에 의해, 이중특이적 항체를 2개의 요망되는 표적 분자와 결합 또는 반응시킬 수 있으며, 이는 하기에서 더욱 상세히 기술되는 항원, 수용체를 위한 리간드를 포함하는 리간드, 수용체 상의 리간드-결합 부위를 포함하는 수용체, 리간드-수용체 복합물, 및 마커를 포함할 수 있다.

b. 이중기능성 항체

[0195] 재조합 핵산 서열은 이중기능성 항체, 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화할 수 있다. 이중기능성 항체는 하기에 기술된 항체와 결합 또는 반응할 수 있다. 이중기능성 항체는 또한, 항원의 인식 및 항원에 대한 결합을 넘어서 항체에 대한 추가적인 기능성을 부여하기 위해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 인자 H 또는 이의 단편에 대한 커플링을 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 인자 H는 보체 활성화의 가용성 조절제이고, 이에 따라, 보체-매개 용해(CML)를 통해 면역 반응에 기여할 수 있다.

c. 항체 반감기의 연장

- [0197] 위에서 기술된 바와 같이, 항체는 대상체에서 항체의 반감기를 연장하거나 단축시키기 위해 변형될 수 있다. 변형은 대상체의 혈청에서 항체의 반감기를 연장하거나 단축시킬 수 있다.
- [0198] 변형은 항체의 불변 영역에 존재할 수 있다. 변형은 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하지 않는 항체의 반감기와 비교하여 항체의 반감기를 연장하는 항체의 불변 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환일 수 있다. 변형은 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하지 않는 항체의 반감기와 비교하여 항체의 반감기를 연장하는 항체의 CH2 도메인에서의 하나 이상의 아미노산 치환일 수 있다.
- [0199] 몇몇 실시형태에 있어서, 불변 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환은 불변 영역에서의 메티오닌 잔부를 티로신 잔부로, 불변 영역에서의 세린 잔부를 트레오닌 잔부로, 불변 영역에서의 트레오닌 잔부를 글루타메이트 잔부로, 또는 이들의 임의의 조합으로 대체하는 것을 포함할 수 있으며, 이에 의해 항체의 반감기를 연장할 수 있다.
- [0200] 다른 실시형태에 있어서, 불변 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환은 CH2 도메인에서의 메티오닌을 티로신 잔부로, CH2 도메인에서의 세린 잔부를 트레오닌 잔부로, CH2 도메인에서의 트레오닌 잔부를 글루타메이트 잔부로, 또는 이들의 임의의 조합으로 대체하는 것을 포함할 수 있으며, 이에 의해, 항체의 반감기를 연장할 수 있다.
- [0201] **d. 탈푸코실화**
- [0202] 재조합 핵산 서열은 푸코실화되지 않은 항체(즉, 탈푸코실화 항체 또는 비-푸코실화 항체), 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이들의 조합을 암호화할 수 있다. 푸코실화는 분자에 당 푸코스의 첨가, 예를 들어, N-글리칸, O-글리칸 및 인지질에 푸코스의 부착을 포함한다. 이에 따라, 탈푸코실화된 항체에서, 푸코스는 불변 영역의 탄수화물 사슬에 부착되지 않는다. 또한, 이러한 푸코실화의 결여는 푸코실화된 항체와 비교하여 항체에 의해 Fcγ RIIIa 결합 및 항체 지향 세포 독성(ADCC) 활성을 개선시킬 수 있다. 이에 따라, 비-푸코실화된 항체는 푸코실화된 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 나타낼 수 있다.
- [0203] 항체는 항체의 푸코실화를 예방 또는 억제하기 위해 변형될 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 이러한 변형된 항체는 비변형된 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 나타낼 수 있다. 변형은 중쇄, 경쇄, 또는 이들의 조합에서 이루어질 수 있다. 변형은 중쇄에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 경쇄에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0204] **e. 감소된 ADE 반응**
- [0205] 항체는 항원과 관련된 질환의 항체-의존 항상(ADE)을 감소 또는 예방하기 위해 변형될 수 있지만, 여전히 항원을 중화시킨다.
- [0206] 몇몇 실시형태에 있어서, 항체는 FcγR1a에 대한 항체의 결합을 감소 또는 예방하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하기 위해 변형될 수 있다. 하나 이상의 아미노산 치환은 항체의 불변 영역에 존재할 수 있다. 하나 이상의 아미노산 치환은 항체의 불변 영역에서 류신 잔부를 알라닌 잔부로 대체하는 것을 포함할 수 있으며, 즉, 또한, 본 명세서에서 LA, LA 돌연변이 또는 LA 치환으로서 알려져 있다. 하나 이상의 아미노산 치환은 항체의 불변 영역에서, 2개의 류신 잔부를 각각 알라닌 잔부로 대체하는 것을 포함할 수 있고, 이는 또한, 본 명세서에서 LALA, LALA 돌연변이, 또는 LALA 치환으로서 알려져 있다. LALA 치환의 존재는 FcγR1a에 대한 결합으로부터 항체를 예방 또는 차단할 수 있으며, 이에 따라, 변형된 항체는 항원과 관련된 질환의 ADE를 향상 또는 야기시키지 않지만, 여전히 항원을 중화시킨다.
- [0207] **5. 표적**
- [0208] 합성 항체는 표적 또는 이의 단편 또는 변이체에 관한 것이다. 표적은 핵산 서열, 아미노산 서열, 또는 이들의 조합일 수 있다. 핵산 서열은 DNA, RNA, cDNA, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이들의 조합일 수 있다. 아미노산 서열은 단백질, 펩타이드, 이의 변이체, 이의 단편, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0209] 일 실시형태에 있어서, 표적은 IL-6이다. 일 실시형태에 있어서, 표적은 CD126이다.
- [0210] IL-6 및 이의 수용체인 CD126은, 당뇨병, 죽상동맥경화증, 우울증, 알츠하이머병, 전신성 홍반루푸스, 다발성 골수종, 암, 베체트병, 및 류마티스 관절염을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌 많은 질환에서 염증 및 자가면역 과정을 자극한다.

[0211] 6. 조성물의 부형제 및 다른 성분

[0212] 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 기능적 분자, 예를 들어, 운반체, 담체, 또는 희석제일 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 형질주입 촉진제일 수 있고, 여기에는 표면 활성제, 예를 들어, 면역 자극 복합체(immune-stimulating complexes: ISCOMS), 프로인트 불완전 보강제, LPS 유사체, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A, 무라밀 웨타이드, 퀴논 유사체, 소포체, 예를 들어, 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 히알루론산, 지질, 리포좀, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중 음이온, 다중 양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질주입 촉진제가 포함될 수 있다.

[0213] 형질주입 촉진제는 다중 음이온, 다중 양이온, 예를 들어, 폴리-L-글루타메이트(LGS), 또는 지질이다. 형질주입 촉진제는 폴리-L-글루타메이트이고, 폴리-L-글루타메이트는 6 mg/ml 미만의 농도로 조성물에 존재할 수 있다. 형질주입 촉진제에는 또한 표면 활성제, 예를 들어, 면역-자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 보강제, LPS 유사체, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A, 무라밀 웨타이드, 퀴논 유사체 및 소포체, 예를 들어, 스쿠알렌 및 스쿠알렌이 포함될 수 있고, 히알루론산이 또한 조성물과 함께 투여되어 이용될 수 있다. 조성물에는 또한 형질주입 촉진제, 예를 들어, 지질, 리포좀, 예를 들어, 레시틴 리포좀 또는 당해 분야에 공지된 다른 리포좀, 예를 들어, DNA-리포좀 혼합물(예를 들어 W09324640 참고), 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중 음이온, 다중 양이온, 또는 나노입자, 또는 다른 공지된 형질주입 촉진제가 포함될 수 있다. 형질주입 촉진제는 다중 음이온, 다중 양이온, 예를 들어, 폴리-L-글루타메이트(LGS), 또는 지질이다. 백신 중 형질주입 제제의 농도는 4 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 0.750 mg/ml 미만, 0.500 mg/ml 미만, 0.250 mg/ml 미만, 0.100 mg/ml 미만, 0.050 mg/ml 미만, 또는 0.010 mg/ml 미만이다.

[0214] 조성물은 전문이 참고로 도입되는 1994년 4월 1일자로 출원된 미국 일련번호 제021,579호에 기재된 바와 같은 유전적 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0215] 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 실시형태에 있어서, 본 발명에 따른 조성물은 약 5나노그램 내지 약 1000마이크로그램의 DNA를 포함한다. 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 조성물은 약 10나노그램 내지 약 800마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 조성물은 약 0.1 내지 약 500마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 조성물은 약 1 내지 약 350마이크로그램의 DNA를 함유할 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에 있어서, 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.

[0216] 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, 엑스트로스, 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.

[0217] 7. 합성 항체를 생산하는 방법

[0218] 본 발명은 또한 합성 항체의 생성 방법에 대한 것이다. 방법에는 하기에서 보다 상세히 기재된 전달 방법을 이용함으로써 이를 필요로 하는 대상체에게 조성물을 투여하는 단계가 포함될 수 있다. 따라서 합성 항체는 대상체에 대한 조성물의 투여 시 생체 내 또는 대상체에서 생성된다.

[0219] 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.

[0220] 8. 항체에 대한 동정 또는 스크리닝 방법

- [0221] 본 발명은 추가로 전술한 항원에 반응성이거나 이에 결합하는 전술한 항체의 확인 또는 스크리닝 방법에 관한 것이다. 항체의 확인 또는 스크리닝 방법은 항체를 확인하거나 스크리닝하기 위해 당업자에게 공지된 방법론으로 항원을 이용할 수 있다. 이러한 방법론에는 비제한적으로 라이브러리(예를 들어, 파지 디스플레이)로부터의 항체 선택 및 동물의 면역화 이후 항체의 단리 및/또는 정제가 포함될 수 있다.
- [0222] **9. 조성물의 전달 방법**
- [0223] 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상체에 조성물을 전달하는 방법에 관한 것이다. 전달 방법에는 대상체에게 조성물을 투여하는 단계가 포함될 수 있다. 투여에는 비제한적으로 생체 내 전기천공을 포함하는 그리고 포함하지 않는 핵산(예컨대, DNA 및/또는 RNA, 또는 이의 변형된 버전) 주입, 리포좀 매개된 전달 및 나노입자 촉진된 전달이 포함될 수 있다.
- [0224] 조성물 전달을 수신하는 포유류는 인간, 영장류, 비인간 영장류, 젖소, 육우, 양, 염소, 영양, 유럽들소, 물소, 유럽들소, 소과, 사슴, 고슴도치, 코끼리, 라마, 알파카, 마우스, 래트 및 닭일 수 있다.
- [0225] 조성물은 경구, 비경구, 설하, 경피, 직장, 경점막, 국소, 흡입을 통해, 협측 투여를 통해, 흉막내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내 경막내, 및 관절내 또는 이들의 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 주입 장치, "마이크로돌출형 폭탄 곤 건(microprojectile bombardment gone gun)", 또는 다른 물리적 방법, 예를 들어, 전기천공("EP"), "수력학적 방법", 또는 초음파에 의해 투여될 수 있다.
- [0226] **a. 전기천공**
- [0227] 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 사용자에 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 과형 생성기, 임피던스 평가기, 과형 로거, 입력 요소, 상태 보고 요소, 소통 포트, 메모리 성분, 전원 및 전력 스위치. 전기천공은 플라스미드에 의한 세포의 형질주입을 촉진시키기 위해, 생체 내 전기천공 장치, 예를 들어 CELLECTRA EP 시스템(Inovio Pharmaceuticals, 펜실베니아주 플리머스 미팅에 소재) 또는 Elgen 전기천공기(Inovio Pharmaceuticals, 펜실베니아주 플리머스 미팅에 소재)를 이용해서 달성될 수 있다.
- [0228] 전기천공 성분은 전기천공 장치의 하나의 요소로 기능할 수 있고, 다른 요소가 전기천공 성분과 소통하는 별도의 요소(또는 성분)이다. 전기천공 성분은 전기천공 장치의 둘 이상의 요소로 기능할 수 있고, 이는 전기천공 성분과 별도의 전기천공 장치의 다른 요소와 여전히 소통할 수 있다. 하나의 전기기계적 또는 기계적 장치의 일부로 존재하는 전기천공 장치의 요소는 요소가 하나의 장치로 또는 서로 소통하는 별도 요소로서 기능할 수 있는 것으로 제한되지 않을 수 있다. 전기천공 성분은 원하는 조직에서 정전류를 생성하는 에너지 자극을 전달할 수 있고, 피드백 메커니즘이 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 임피던스와 소통한다. 피드백 메커니즘은 측정된 임피던스를 수신할 수 있고, 정전류를 유지하기 위해 전기천공 성분에 의해 전달된 에너지 자극을 조정할 수 있다.
- [0229] 복수의 전극은 분산된 패턴으로 에너지 자극을 전달할 수 있다. 복수의 전극은 프로그래밍된 순서로 전극 제어를 통해 분산된 패턴으로 에너지 자극을 전달할 수 있고, 프로그래밍된 순서는 전기천공 성분으로 사용자에 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.
- [0230] 피드백 메커니즘은 하드웨어 또는 소프트웨어에 의해 수행될 수 있다. 피드백 메커니즘은 아날로그 폐쇄-루프 회로에 의해 수행될 수 있다. 피드백은 $50\mu\text{s}$, $20\mu\text{s}$, $10\mu\text{s}$ 또는 $1\mu\text{s}$ 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 메커니즘으로 임피던스를 소통할 수

있고, 피드백 메커니즘은 임피던스에 반응하여 정전류를 사전 설정된 전류와 유사한 값으로 유지하기 위해 에너지 자극을 조정한다. 피드백 메커니즘은 에너지 자극의 전달 동안 연속적으로 및 순간적으로 정전류를 유지할 수 있다.

[0231] 본 발명의 조성물 전달을 촉진할 수 있는 전기천공 장치 및 전기천공 방법의 예에는 그 내용의 전문이 본 명세서에 참고로 도입된 미국 특허 제7,245,963호(Draghia-Akli 등), 미국 특허 공개 제2005/0052630호(Smith 등)에 기재된 것들이 포함된다. 조성물의 전달을 촉진시키기 위해 이용될 수 있는 다른 전기천공 장치 및 전기천공 방법에는 2006년 10월 17일자로 출원된 미국 출원 제60//852,149호 및 2007년 10월 10일자로 출원된 제 60/978,982호에 대해 35 USC 119(e) 하에 이익을 청구하는, 2007년 10월 17일자로 출원된 공동 계류 중이고 공동 소유된 미국 특허 출원 제11/874072호에 제공된 것들이 포함되며, 모두 본 명세서에 이들의 전문이 도입된다.

[0232] 미국 특허 제7,245,963호(Draghia-Akli 등)는 체내 또는 식물에서 선택된 조직 세포 내 생체분자의 도입을 촉진시키기 위한 모듈형 전극 시스템 및 이들의 용도를 기재한다. 모듈형 전극 시스템은 복수의 바늘 전극; 피하 바늘; 프로그래밍 가능한 정전류 자극 컨트롤러로부터 복수의 바늘 전극으로 전도성 링크를 제공하는 전기 커넥터; 및 전원을 포함할 수 있다. 운영는 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 활성화되면 정전류 전기 자극이 복수의 바늘 전극에 적용된다. 적용된 정전류 전기 자극은 복수의 전극 간에서 세포 내로 생체분자의 도입을 촉진한다. 미국 특허 제 7,245,963호의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0233] 미국 특허 공개 제2005/0052630호(Smith 등)는 체내 또는 식물에서 선택된 조직 세포 내로 생체분자의 도입을 효과적으로 촉진시키기 위해 이용될 수 있는 전기천공 장치를 기재한다. 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, 주입 바늘을 위한 중심 주입 채널, 및 제거 가능한 가이드 디스크를 갖는 대체 가능한 전극 디스크를 포함한다. 미국 특허 공개 제 2005/0052630호의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0234] 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 제2005/0052630호에 기재된 전극 어레이 및 방법은 근육과 같은 조직뿐만 아니라 다른 조직 또는 기관 내로의 심부 침투를 위해 채택될 수 있다. 전극 어레이의 구조로 인해, (선택한 생체분자의 전달을 위한) 주입 바늘도 표적 기관 내로 완전 삽입되고, 주입은 전극에 의해 사전-서술된 영역에서 해당 표적에 수직으로 투여된다. 미국 특허 제7,245,963호 및 미국 특허 공개 제2005/005263호에 기재된 전극은 바람직하게는 20 mm 길이 및 21 게이지이다.

[0235] 추가적으로, 전기천공 장치 및 이들의 용도를 도입하는 몇몇 실시형태에, 하기 특허에 기재된 것들인 전기천공 장치가 고려된다: 1993년 12월 28일자로 허여된 미국 특허 제5,273,525호, 2000년 8월 29일자로 허여된 미국 특허 제6,110,161호, 2001년 7월 17일자로 허여된 제6,261,281호, 및 2005년 10월 25일자로 허여된 제6,958,060호, 및 2005년 9월 6일자로 허여된 미국 특허 제6,939,862호. 또한, 임의의 다양한 장치를 이용한 DNA 전달에 관한 2004년 2월 24일자로 허여된 미국 특허 제6,697,669호, 및 DNA의 주입 방법에 대한 2008년 2월 5일자로 허여된 미국 특허 제7,328,064호에서 제공된 요지를 포함하는 특허가 본 명세서에서 고려된다. 상기 특허는 이들의 전문이 참고로 포함된다.

10. 치료 방법

[0237] 또한 대상체에서 합성 항체를 생성함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료, 방어 및/또는 예방하는 방법이 본 명세서에서 제공된다. 이 방법은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 대상체에의 조성물의 투여는 전술한 전달 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0238] 소정의 실시형태에서, 본 발명은 IL-6 및/또는 CD126과 연관된 질환을 치료, 방어 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 일 실시형태에 있어서, 이러한 방법은 자가면역 장애를 치료, 방어 및/또는 예방한다. 일 실시형태에 있어서, 상기 방법은 암을 치료, 방어 및/또는 예방한다. 본 발명의 조성물에 의한 치료에 의해서 치료 또는 예방되는 예시적인 질환 또는 장애는, 당뇨병, 죽상동맥경화증, 우울증, 알츠하이머병, 전신성 홍반루푸스, 다발성 골수종, 암, 베체트병, 류마티스 관절염, 패혈증, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 다발성 캐슬만병, 고열과 연관된 임의의 질환, 이식편-대-숙주(GVH) 질환, 세포 용해 증후군 등을 포함하지만

이들로 제한되는 것은 아니다.

[0239] 대상체에서 합성 항체의 생성 시, 합성 항체는 항원에 결합할 수 있거나 항원과 반응할 수 있다. 이러한 결합은 항원을 중화시키거나, 다른 문자, 예를 들어 단백질 또는 핵산에 의한 항원의 인식을 차단하거나, 항원에 대한 면역 반응을 야기 또는 유도시킴으로써, 대상체에서 항원과 연관된 질환을 치료, 방어 및/또는 예방할 수 있다.

[0240] 조성물 용량은 1 μ g 내지 100mg의 활성 성분/체중kg/시간일 수 있고, 20 μ g 내지 100mg 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.

[0241] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 예시되는 여러 양상을 갖는다.

11. 실시예

[0243] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 예시된다. 이러한 실시예가 본 발명의 바람직한 실시형태를 명시하지만, 단지 예시로서 제공되는 것으로 이해되어야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당업자라면 본 발명의 본질적 특징을 확인할 수 있고, 이들의 요지 및 범위에서 벗어나지 않고 다양한 이용 및 조건에 이를 채택하기 위해 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 수행할 수 있다. 따라서 본 명세서에 나타내고 기재된 것들에 부가하여 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재로부터 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 또한 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것이다.

실시예 1

[0245] 본 명세서에서 제시되는 연구는 플라스미드 DNA의 근육내 전기천공법을 통해서 기능적 항-IL-6 및 항-CD126 "DNA 단클론성 항체"(DMab)의 생성을 입증한다.

[0246] 이들 연구는 IL-6 및 CD126을 표적으로 하는 기능성 DNA 단클론성 항체(DMab)가 생체내에서 발현되는 것을 입증한다. 인간 IgG1 불변 도메인 상의 4개의 항-IL-6 및 2개의 항-CD126 단클론성 항체로부터의 코돈-최적화된 가변 영역 DNA 서열이 제작되었다. 각 항체를 암호화하는 플라스미드 DNA를 누드(nude) 및 면역-반응성(immune-competent) 마우스에게 전기 천공법으로 근육내 전달하였다. DMab 전달의 다수의 양상은 - 항체 서열, 플라스미드 중쇄 및 경쇄 배열 및 형성을 비롯하여 - 최적화되어 생체내 발현을 증대시켰다.

[0247] 항-IL-6 및 항-CD126 DMab는 BALB/c 마우스에서 1.5 μ g/ml 내지 7.1 μ g/ml의 범위의 수준으로 혈청에서 발현되었다. 또한, 누드 마우스에서의 장기 DMab 발현이 관찰되었다. 혈청 DMab는 정제된 IL-6 및 CD126에 대한 기능적 결합을 보유하였다. 혈청 DMab는 또한 시험관내에서 다운스트림 IL-6 세포 신호전달을 차단하였다. 연구는 패혈증을 조절하고, 급성 바이러스 감염 동안 염증을 제한하며, 종양 진행을 늦춤에 있어서의 역할에 대해서 항-IL-6 및 항-CD126 DMab에 대해서 조사를 하기 위하여 행해졌다. 이러한 연구는 면역 병리학에 있어서 생체내 IL-6 신호전달의 역할을 더욱 규정하기 위하여 신규한 방법을 제공할 뿐만 아니라, 단백질 항체 요법에 대한 대체물로서 DMab를 규정한다.

[0248] 이 연구는 기존의 생물학적 요법에 대한 대체물로서 DMab를 뒷받침하며, 면역 병리학에 있어서 생체내 IL-6 신호전달의 역할을 더욱 규정하기 위하여 신규한 방법을 제공한다.

[0249] 방법 및 재료는 이제 기술된다.

항체 DNA 서열 및 클로닝:

[0251] 항-IL6 항체(클라자키주맙(Clazakizumab)[Alder Biopharmaceuticals], 올로키주맙(Olokizumab)[R-Pharm], 실특시맙(Siltuximab)[Sylvant®, Janssen Biotech], 시루쿠맙(Centocor/GSK)) 및 항-CD126 항체(Sarilumab[Regeneron Pharmaceuticals], 토실리주맙(Tocilizumab)[Actemra®, Genentech])의 가변 VH 및 VL 아미노산 서열이 코돈-최적화되었다. DNA 서열은 코돈-최적화된 불변 인간 IgG1 κ로 합성되었고, 변형된 pVax-1(Invitrogen) 포유류 발현 플라스미드에 클로닝되었다. 퓨린/2A 웨بت아이드 절단 부위가 중쇄 및 경쇄 웨بت아이드의 분리를 위하여 포함되었다(도 1).

형질주입:

[0253] 1×10^6 293T 세포에 젠잼머(GeneJammer)(Agilent Technologies)를 이용해서 0.5 μ g 플라스미드 DNA로 형질주입하였다. 세포 상청액 및 전체 용해물을 형질주입 후 48시간에 수집하였다.

- [0254] **DMAb 전기천공법:**
- [0255] BALB/c 마우스에게는 사두근에 근육내 전달된 플라스미드 DNA 100 μ g을 공급하고 나서 이미 기재된 바와 같이 CELLECTRA® 3P 디바이스(Inovio Pharmaceuticals, 펜실베니아주 플리머스 미팅에 소재)로 전기천공법을 수행하였다(Flingai et al., 2015, Sci Rep, 5:12616; Muthumani et al., 2013, Hum Vaccin Immunother, 9(10): 2253-63).
- [0256] **ELISA 및 웨스턴 블롯:**
- [0257] 인간 IgG1 κ 는 항-인간-Fc 단편을 이용해서 포획하고 2차 항-카파-경쇄 HRP 접합된 항체로 검출되었으며 인간 IgG1 κ 대조군(베틸(Bethyl))에 대해서 정량하였다. 재조합 인간 IL-6 및 CD126(Sino Biological)에 대한 결합은 HRP-접합된 항-인간-IgG 2차 항체(Sigma)로 검출되었다. 웨스턴 블롯은 접합된 항-인간 IgG 800nm 항체(Licor)로 전개되었다.
- [0258] **STAT3 신호전달 검정:**
- [0259] 인간 CD126 및 STAT3-유도된 분비된 알칼리성 포스파타제로 안정적으로 형질주입된 HEK-BlueTM 293 세포는 InVivoGen으로부터 구입하였다. 마우스 혈청은 배양배지 중에 1:40으로 희석시키고, 1ng/ml의 재조합 인간 IL-6으로 처리된 세포에 첨가하였다. 상청액 SEAP는 열량측정 Quant iBlueTM 검정(InVivoGen)에 의해 24시간 후에 검정하였다. 흡광도값은 미처리(DMAb 무첨가) 마우스로부터의 혈청을 공급받은 세포에서의 SEAP 발현으로 정규화되었다. 10 μ g/ml TNF알파는 대조군으로서 역할하였다.
- [0260] 실험 결과가 이제 기술된다.
- [0261] 항-IL-6 및 항-CD126 항체 서열을 함유하는 플라스미드 DNA의 근육내 전기천공법은 근육 조직으로부터 생체내에서 단클론성 항체를 생성한다
- [0262] 항-IL-6 및 항-CD126 단클론성 항체로부터의 코돈-최적화된 가변 영역 DNA 서열을 인간 IgG1 불변 도메인 상에 합성하였다. 항체를 암호화하는 플라스미드 DNA를 BALB/c 마우스에 전달하였다(도 1). 단클론성 항체 가변 VH 및 VL 아미노산 서열은 DNA 코돈 최적화되었다. 코돈 최적화된 DNA는 인간 IgG1 κ 항체 불변 CH 및 CL 영역 DNA 서열로 합성하였다. 조작된 DNA 서열을 변형된 pVax-1 발현 벡터로 클로닝하였다. 플라스미드 작제물을 근육내 주사하고 나서 CELLECTRA® 디바이스(Inovio Pharmaceuticals)로 전기천공하였다. 생체내에서 생산된 인간 IgG1 κ 의 발현 및 기능을 측정하였다.
- [0263] **DMAb 작제물이 형질주입된 293T 세포로부터 발현되고 분비된다**
- [0264] 실험은 DMAb 작제물에 의해 암호화된 항-IL-6 및 항-CD126의 발현 및 분비를 평가하기 위하여 수행되었다. HEK 293T 세포에는 항-IL-6 또는 항-CD126 작제물을 보유하는 플라스미드 DNA를 형질주입하였다. 빈 플라스미드는 음성 대조군으로서 역할하였다. 인간 IgG1 κ 발현을 정량적 ELISA에 의해 결정하고 웨스턴 블롯을 수행하여 상청액 중쇄 및 경쇄 웨بت아이드 절단 및 발현을 검출하였다(도 2A 내지 도 2C). 도 2A 및 도 2B에 도시된 바와 같이, 항-IL-6 및 항-CD126이 HEK 293T 상청액에서 관찰되고 HEK 293T 용해물은 항-IL-6 및 항-CD126의 발현 및 분비를 유도하는 DMAb 작제물의 능력을 입증하고 있다.
- [0265] **마우스에서의 DNA 전기천공 후의 항-IL-6 및 항-CD126 DNA 단클론성 항체의 강인한 혈청 수준**
- [0266] 실험은 DMAb가 생체내에서 항-IL-6 및 항-CD126의 발현을 유도했는지의 여부를 평가하기 위하여 수행되었다. BALB/c 마우스에게는 100 μ g i.m. 플라스미드 DNA를 주사하고 나서 전기천공법을 행하였다. 7일 후에, 혈청 인간 IgG1 κ 항체 수준은 ELISA에 의해 결정되었다. 도 3A 및 도 3B에 도시된 바와 같이, 높은 수준의 항-IL-6 및 항-CD126 항체가 근육의 DNA 전기천공법 후에 마우스 혈청에서 생산된다.
- [0267] **혈청 DNA 단클론성 항체는 표적 항원인 IL-6 및 CD126과 결합한다**
- [0268] 실험은 발현된 항-IL-6 및 항-CD126의 기능성을 조사하기 위하여 수행되었다. BALB/c 마우스에게는 100 μ g의 플라스미드 DNA를 주입하고 나서 근육내 전기천공법을 행하였다. 1주 후에, 재조합 인간 IL-6 및 인간 CD126에 결합하는 혈청 인간-IgG 항체는 ELISA에 의해 결정되었다. 도 4에 도시된 바와 같이, 발현된 항체는 IL-6 및 CD126 항원을 표적으로 하도록 결합한다.
- [0269] **혈청 DNA 단클론성 항체는 시험관내 IL-6-매개 세포 신호전달을 차단한다**
- [0270] 실험은 발현된 항체가 IL-6 매개 신호전달을 저해할 수 있는지의 여부를 조사하기 위하여 수행되었다. 인간

CD126 및 STAT3-유도성 분비 알칼리성 포스파타제(SEAP)가 안정적으로 형질주입된 HEK-293 세포가 얻어졌다. 미치료 마우스로부터의 회석된(1:40) 혈청은 기준선 수준의 마우스-IL-6-촉진 SEAP 발현을 유도하였고, 이것은 세포 상청액 중 100% SEAP 활성도로 정규화되었다. DMAb-전기천공된 마우스로부터의 제7일 혈청을 회석시키고(1:40), 세포 상청액은 미처리 대조군의 퍼센트로서 SEAP 활성도에 대해서 검정되었다. HEK-293 세포는 IL-6 신호전달에 반응하여 SEAP를 분비한다. 도 5에 도시된 바와 같이, 항-IL-6을 암호화하는 DMAb 작제물로 처리된 마우스로부터의 혈청은 SEAP 활성도를 차단하였고, 이것은 암호화된 항체가 IL-6 매개 신호전달을 차단할 수 있는 것을 입증한다.

[0271] 본 명세서에서 제공되는 실험은 항-IL-6 및 항-CD126 DNA 단클론성 항체(DMAb)가 코돈-최적화된 항체 가변 서열을 발현하는 플라스미드 DNA 작제물의 균육내 전기천공법 후에 마우스 혈청 내에서 높은 수준에서 생체내 발현되는 것을 입증한다. 생체내에서 균육 세포로부터 생산된 항체는 기능적이며, 결합하고 시험관내에서 신호전달 한다. DMAb는 IL-6 및 CD126을 표적으로 하는 정제된 단백질 단클론성 항체 요법에 대한 안전하고 경제적이며 실제적인 대체물을 제공한다. 패혈증을 조절하고, 급성 바이러스 감염 동안 염증을 제한하며, 종양 진행을 늦춤에 있어서 IL-6의 역할이 수행된다.

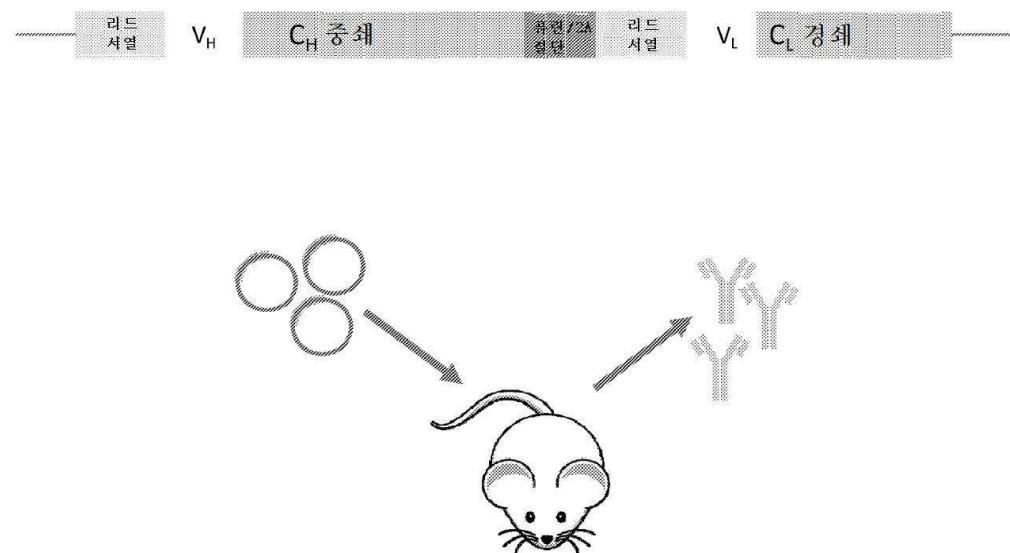
[0272] DMAb는 정제된 단백질 mAb 및 바이러스-백터에 비해서 몇 가지 이점을 갖는다. 단백질 mAb에 관하여, DMAb는 제조하는데 비교적 저렴하고; 열적으로 안정적이며; 분배하기 용이하고; 변형 가능하며; 빈번한 재투여를 필요로 하는 일 없이 지속적인 발현을 유도한다. 바이러스 백터와 관련하여, DMAb는 안전하고 비-분해성이고; 비면역원성이며; 반복해서 전달될 수 있고; 기존의 혈청 시험이 없으며; 신속한 투여에 대해서 급성 발현을 유도할 수 있다. DMAb의 강력하고 지속적인 발현은 암 및 자가면역 질환과 같이 재투여를 위한 잠재적인 필요성을 가진 만성 형태의 치료에서 실질적인 유익을 제공한다. 비싸지 않은 DNA 백터 생산 및 분포는 특히 개발도상국 및 만성적 요구가 있는 곳에서 증대된 적정가격성(affordability)을 제공한다.

[0273] 이상의 상세한 설명 및 수반되는 실시예는 단지 예시적인 것이며, 오로지 첨부된 청구범위 및 이들의 균등부에 대해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 되는 것으로 이해된다.

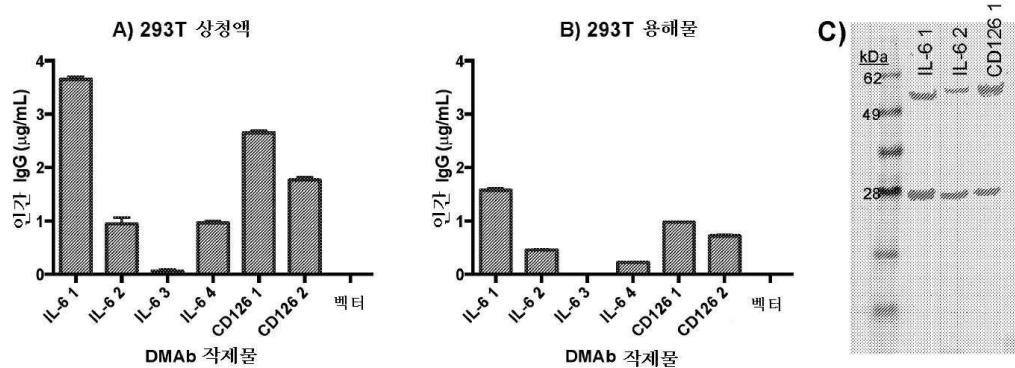
[0274] 개시된 실시형태에 대한 다양한 변화 및 변형은 당업자에게 자명할 것이다. 비제한적으로 본 발명의 화학적 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 조성물, 제형 또는 이용 방법에 관한 것들을 포함하는 이러한 변화 및 변형이 발명의 정신 및 범위로부터 벗어나는 일 없이 이루어질 수 있다.

도면

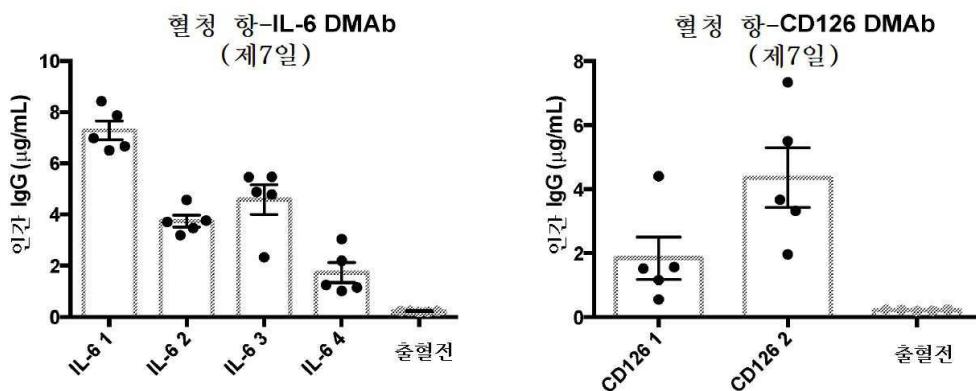
도면1



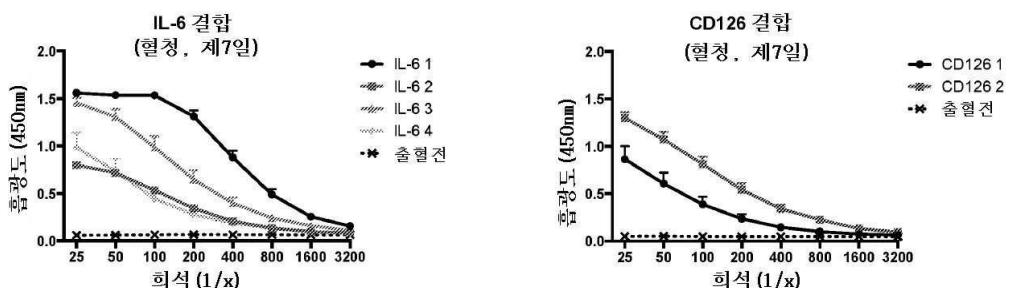
도면2



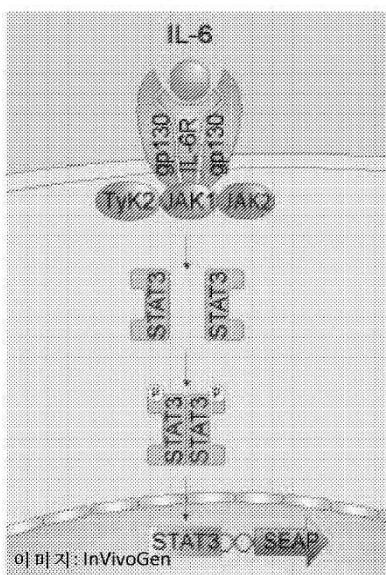
도면3



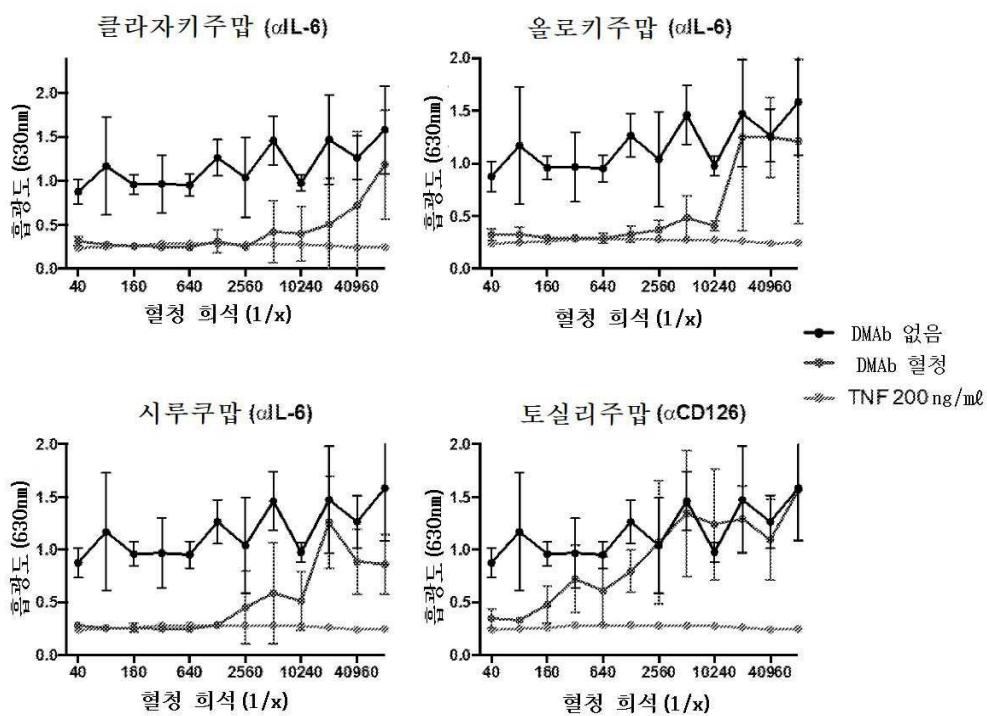
도면4



도면5



도면6



서 열 목록

- <110> Weiner, David
 Elliott, Sarah
- <120> DNA Monoclonal Antibodies Targeting IL-6 and CD126
- <130> MPI18-021
- <150> US 62/332,377
- <151> 2016-05-05

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6 1 DNA

<400> 1

atggactgga ctggaggat tctgttctg gtcggcccg ccactggaac tcacggcag	60
gtcagctgg tcaatcagg aggaggactg gtgcagccctg gcgatctt gggctgagt	120
tgcggcctt caggttcaa cttaatgac tacttcatga actgggtcag gcaggctcca	180
ggaaaaggc tggagtgggt ggcacagatg agaaacaaga attaccagta tgggactac	240
tatgccagt cactggaagg caggttccacc atcagcagg acgatagcaa aaactccctg	300
tacctgcaga tgaattctt gaagactgag gacaccgcag tgtactattg tgcccgagaa	360
tcatactatg gttcaccag ctattgggc cagggAACAC tggtaactgt gagctccgt	420
tctacaaagg gccctagcgt gttccccctg gcaccttgct ctgcagttac ctcagagagc	480
acagcagccc tggctgtct ggtgaaggat tacttcccg aacctgtcac cgtgttttgg	540
aacagtggag ccctgacaag cgggtccac actttccag ctgtgctgca gtctagtggaa	600
ctgtactccc tgtcaagcgt ggtcacagtg ccattctcta gtctggggac taaaacctat	660
acatgcaacg tggaccataa gcccagtaat accaaggtcg ataaaagggt ggagtccaag	720
tacggccctc cctgcccacc ctgtccagca ccagagtcc tggcgccccc aagcgtgttc	780
ctgtttctc caaaggctaa agacacactg atgatcagca gaactcctga ggtcacctgc	840
gtggctgtgg acgtgtccca ggaggacccc gaagtccagt tcaactggta cgtggatggc	900
gtcgaagtgc acaatgccaa gacaaacca cgcgaggaac agttaactc cacataccga	960
gtcgtgtctg tcctgactgt gctgcatcag gactggctga acggaaagga gtataagtgc	1020
aaagtgtcta acaagggct gccctcaagc atcgagaaga caattagcaa ggcaaaaggc	1080
cagccaagag aaccccgagt gtacactctg ccccttctc aggagggaaat gactaaaaac	1140
caggtcagcc tgacctgtct ggtgaagggg ttctatccat ccgacattgc tgtggatgg	1200
gaatctaattt gccagccccga gaacaattac aaaaccacac caccgtgtcc ggactcagat	1260
ggcagcttctt ttctgtatag cagactgacc gtggataagt cccggggca ggaggaaac	1320
gtctttctt gctctgtatgc acgaagcc ctgcacaatc attacactca gaaaagtctg	1380

tcactgagcg gcaaacgggg acgcaagagg agatccgggt ctggccac caacttcagc	1440
ctgctgaagc aggctggcga cgtggaggaa aatccctggac caatggctt gcagacacag	1500
gtgttatca gtctgctgct gtggattca gggcctatg gcatatcca gatgactcag	1560
tctccctctt ctctgagtgc ctcagtcggc gaccgggtga ctattacctg tcaggctagc	1620
caggatatcg gcattagct gtcctggta cagcagaagc ctggaaaagc tccaaagctg	1680
ctgatctata acgccaacaa tctggctgac ggagtgccta gccgcttctc tggaagtggg	1740
tcagggactg actttacact gactattagt tcactgcagc ccgaggattt cgcaacctac	1800
tattgcctgc agcacaattc cgcccttac accttggac agggacaaa actggagatc	1860
aagcggaccg tcgetgcacc cagcgtgttc atcttcctc caagtgcga acagctgaag	1920
agcggaaacg cctccgttgt gtgcctgtg aacaatttctt accctcgac ggcaaaagtc	1980
cagtggagg tggataacgc cctgcagtcc ggaaattctc aggagagtgt gaccgaacag	2040
gactcaaaag atagcacata ttccctgagc tccaccctga cactgtccaa ggctgattac	2100
gagaagcata aagtgtatgc atgcgaggta actcaccagg ggctgtcaag tccagtcact	2160
aagtccctca atagagggga atgc	2184
<210> 2	
<211> 728	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6 1 Protein

<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 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20	25	30
----	----	----

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe

35	40	45
----	----	----

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu

50	55	60
----	----	----

Glu Trp Val Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu

340 345 350

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

355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gly

450 455 460

Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser

465 470 475 480

Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val

485 490 495

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

500 505 510

Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580	585	590	
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala			
595	600	605	
Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val			
610	615	620	
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys			
625	630	635	640
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
645	650	655	
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
660	665	670	
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
675	680	685	
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
690	695	700	
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
705	710	715	720
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
725			
<210> 3			
<211> 2190			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> IL-6 2 DNA			
<400> 3			
atggactgga cctggagaat cctgttcctg gtggcagcag caaccggaac acacgcagag 60			
gtgcagctgg tggagagcgg cggcaagctg ctgaagccag gcggtccct gaagctgtct 120			
tgcgcagcaa gcccgttcac cttcagcagc ttgcgcatgt ctgggttgc gcagagccca 180			
gagaagcgcc tggagtgggt ggcagagatc tctagggcg gctttatac ctactatccc 240			
gacaccgtga caggcaggtt caccatcagc agagataacg ccaagaatac actgtacctg 300			
gagatgtcct ctctgcggtc cgaggacaca gccatgtact attgcgccag gggcctgtgg 360			
ggatactatg cactggatta ttggggccag ggcaccagcg tgacagttag ctccgcctcc 420			

accaaggac ctacgtgtt cccactggca cttcttagca agtctaccag cggccgcaca	480
gccgcctgg gatgtctggt gaaggactac ttccctgagc cagtgaccgt gagctggac	540
tccggcgcac tgacctccgg agtgcacaca ttccctgccg tgctgcagtc ctctggcctg	600
tattctctga gctccgtggt gaccgtgcca tctagctccc tggcaccca gacatacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc ttctaataca aagggtggaca agaagggtgga gccaaagagc	720
tgtgataaga cccacacatg ccctccctgt ccagcacctg agctgctggg cggcccaagc	780
gtgttcctgt ttccacccaa gcccaaggac accctgatga tctccgcac cccagaggtg	840
acatgcgtgg tggtgacgt gtctcacgag gaccccgagg tgaagttcaa ctggtagtg	900
gatggcgtgg aggtgcacaa tgccaaagacc aagcccgagg aggagcagta taacagcacc	960
tacagagtgg tgtccgtgct gacagtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaggagtag	1020
aagtgcagg tgagcaataa ggccctgcca gccccatcg agaagaccat ctccaaggca	1080
aaggacacgc caaggagggcc acaggtgtat acactgcctc caagcagaga cgagctgacc	1140
aagaaccagg tgcctgac atgtctggtg aagggtttct acccctccga tatgcctgt	1200
gagtgggagt ctaatggcca gcctgagaac aattataaga ccacaccccc tgtgctggac	1260
tctgatggca gttttttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagttccag gtggcagcag	1320
ggcaacgtgt tttctgctc tgtgatgeac gaggeccctgc acaatacta caccagaag	1380
agccgtccc tgtctccagg caagagggga aggaagagga gaagcggctc cggccacca	1440
aacttctccc tgctgaagca ggccggcgt gtggaggaga atcctggccc aatggtgctg	1500
cagacccagg ttttatctc tctgctgtg tggatcagcg gcgcctacgg ccagatctgt	1560
ctgatccaga gcccagcaat catgtctgcc agccctggag agaagggtgac catgacatgt	1620
tccgcctcta gtcctgtc ttacatgtat tggtaaccagc agaagcctgg ctctagccca	1680
cggctgtga tctatgacac atccaacctg gcatctggag tgcctgtgct cttctccggc	1740
tctggcagcg gcacccctca ctctctgaca atctccagga tggaggccga ggatgccc	1800
acctactatt gccagcgtg gagcggctat ccctacacct tcggccggg cacaagctg	1860
gagatcaaga gaaccgtggc cggccctagc gtgttcatct ttccacccag cgacgagcag	1920
ctgaagagcg gcacagccctc cgtgggtgc ctgctgaaca atttctatcc tcggaggcc	1980
aagggtgcagt ggaagggtgga taacgcccgt cagtccggca attctcagga gagcgtgacc	2040
gagcaggact ccaaggattc tacatacagc ctgtccctcta ccctgacact gtccaaaggcc	2100
gactatgaga agcacaaggt gtacgcatgc gaggtgaccc accaggact gagctcccc	2160
gtgacaaaga gcttaatag aggcgagtgt	2190

<211> 730

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6 2 Protein

<400> 4

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 Lys Leu Leu Lys

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Phe Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro

65 70 75 80

Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Trp Gly 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 Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile
 500 505 510
 Ser Gly Ala Tyr Gly Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met
 515 520 525
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser
 530 535 540
 Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro
 545 550 555 560
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val
 565 570 575
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 580 585 590
 Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 595 600 605
 Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 610 615 620
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 625 630 635 640
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 645 650 655
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 660 665 670
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 675 680 685
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 690 695 700
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

705	710	715	720						
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
725	730								
<210>	5								
<211>	2190								
<212>	DNA								
<213>	Artificial Sequence								
<220><223>	IL-6 3 DNA								
<400>	5								
atggactgga	catggagaat	cctgttcccg	gtggcagcag	caaccggaac	acacgcagag		60		
gtgcagctgg	tggagagcgg	cggcggcccg	gtgcagcccg	gcccgtccct	gaggctgtct		120		
tgcgcagcaa	gcccgttcac	ctttccct	ttcgccatgt	cttgggtgct	ccaggcacca		180		
ggcaaggac	tggagtgggt	ggccaagatc	tccctggcg	gctttggac	ctactattcc		240		
gacaccgtga	caggcaggtt	tacaatcagc	agagataacg	ccaagaattc	cctgtacctg		300		
catatgtact	ctctgagggc	cgaggacacc	gcccgtgtact	attgcgccag	acagctgtgg		360		
ggctactatg	ccctggatat	ctggggccag	ggcaccacag	tgaccgtgag	ctccggccagc		420		
acaaaggcc	cttccgtgtt	tccctggcc	ccttctagca	agtctaccag	cgccggcaca		480		
gccggccctgg	gatgtctggt	gaaggactac	ttccctgagc	cagtgaccgt	gagctggaac		540		
tccggcgtccc	tgacctctgg	agtgcacaca	tttccagccg	tgctgcagtc	ctctggccctg		600		
tattccctga	gtcccggtgt	gaccgtgcc	tctagctccc	tgggcaccca	gacatacatc		660		
tgcaacgtga	atcacaagcc	ctctaataca	aagggtggaca	agaagggtgga	gcctaagagc		720		
tgtgataaga	cccacacatg	ccctccctgt	ccagcacctg	agctgctggg	cgccccaagc		780		
gtgttcctgt	ttccacccaa	gcccaggac	acactgtatga	tctccaggac	ccctgaggtg		840		
acatgcgtgg	tggtgacgt	gtctcacgag	gaccggagg	tgaagttcaa	ctggtagctg		900		
gatggcgtgg	aggtgcacaa	tgccaaagacc	aagccacggg	aggagcagta	taactctacc		960		
taccgcgtgg	tgagcgtgct	gacagtgtc	caccaggatt	ggctgaacgg	caaggagtagc		1020		
aagtgcagg	tgagcaataa	ggccctgcca	gccccatcg	agaagaccat	ctccaaaggca		1080		
aaggacacg	cacgggagcc	acaggtgtat	acactgcctc	caagccgcga	cgagctgacc		1140		
agaaccagg	tgtccctgac	atgtctggtg	aaggcttct	accatccga	tatgcggcgt		1200		
gagtggaggt	ctaatggcca	gcccggagaac	aattataaga	ccacaccccc	tgtgctggac		1260		
tctgatggca	gcttctttct	gtacagcaag	ctgaccgtgg	acaagtcccg	gtggcagcag		1320		
ggcaacgtgt	tttccctgctc	tgtgatgcac	gaggccctgc	acaatcacta	caccagaag		1380		

agcctgtccc tgtctccagg caagagggga aggaagagga gaagcggctc cggccacaca	1440
aacttcagcc tgctgaagca ggccggcgat gtggaggaga atcctggccc aatggtgctg	1500
cagacccagg ttttatctc cctgctgtg tggatctctg ggcctatgg agagatctg	1560
ctgacccagt ccccaagccac actgtctctg agccctggag agagggccac cctgtcctgt	1620
tctgccagca tctccgtgtc ttacatgtat tggtaaccaggc agaaggctgg ccaggccccca	1680
aggctgtga tctacgacat gagcaacctg gcatccggca tccccgaag attcagccgc	1740
tccggctctg gcaccgactt taccctgaca atctctagcc tggagcccgaa ggatttcgcc	1800
gtgtactatt gcatgcagtg gagcggctat ctttacacct tcggcggcgg cacaaaggta	1860
gagatcaaga ggaccgtggc cgcccttagc gtgttcatct ttccacccag cgacgagcag	1920
ctgaagtctg gcacagccag cgtgggtgtc ctgtgaaca atttctatcc aagagaggcc	1980
aagggtgcagt ggaagggtgga taacgcccctg cagtccggca attctcagga gagcgtgacc	2040
gagcaggact ccaaggattc tacatacagc ctgtcctcta ccctgacact gagcaaggcc	2100
gattatgaga agcacaaggt gtacgcattc gaggtgaccc accaggact gagctccccca	2160
gtgacaaagt ccttaatag aggcgagtgt	2190
<210> 6	
<211> 730	
<212> PRT	

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6 3 Protein

<400> 6

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

35	40	45
----	----	----

Ser Pro Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu

50	55	60
----	----	----

Glu Trp Val Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

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

500 505 510

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

515 520 525

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ile

530 535 540

Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

545 550 555 560

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala

565 570 575

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

580	585	590	
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser			
595	600	605	
Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
610	615	620	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
625	630	635	640
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
645	650	655	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
660	665	670	
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
675	680	685	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
690	695	700	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
705	710	715	720
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
725	730		
<210> 7			
<211> 2205			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> IL-6 4 DNA			
<400> 7			
atggattgga cctggagaat cctgttcctg gtggcagcag caaccggaac acacgcagag 60			
gtgcagctgg tggagagcgg cggccgcctg gtgcagcccg gcggtccct gaggctgtct 120			
tgcgccgcca gcccgtttag cctgtccaa tactatgtga cctgggtgag acaggcacct 180			
ggcaaggac tggagtgggt gggcatcatc tacggcagcg acgagaccgc ctatgccaca 240			
tccgccatcg gcaggttcac catctccaga gataactcta agaatacact gtacctgcag 300			
atgaacagcc tgagggccga ggacacagcc gtgtactatt gcgccagaga cgatagctcc 360			
gactggatg ccaagttcaa tctgtgggc cagggcaccc tggtgacagt gtctagcgc 420			

tctaccaagg gaccaagcgt gttccactg gcacccct ctaagtctac cagcggcgc	480
acagccgccc tggatgtct ggtgaaggat tactccctg agccagtgc cgtgagctgg	540
aactccggcg ccctgacctc cggagtgcac acattccag ccgtgctgca gagctccggc	600
ctgtacagcc tgtctagcgt ggtgacagtg ccctccctca gcctggcac ccagacatat	660
atctgcaacg tgaatcacaa gccaagcaat accaagggtgg acaagccgggt ggagcccaag	720
tcctgtata agacccacac atgcctccc tgtccagcac ctgagctgct gggccggcca	780
agcgttcc tggccacc caagcctaag gataactga tgatctctcg caccggcag	840
gtgacatgctg tgggtggta cgtgagccac gaggaccccg aggtgaagtt caactggta	900
gtggacggcg tggaggtgca caatgccaag accaaggctc gggaggagca gtacccctcc	960
acctatcgctg tgggtctgt gctgacagtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	1020
tataagtgca aggtgtccaa taaggccctg ccagcccca tcgagaagac catctctaag	1080
gcaaaggac acccacggga gccacaggtg tacacactgc ctccatcccg cgaggagatg	1140
accaagaacc aggtgtctct gacatgtctg gtgaaggct tctatccttc tgatatcgcc	1200
gtggagtggg agagcaatgg ccagccagag aacaattaca agaccacacc ccctgtgt	1260
gactctgatg gcagcttctt tctgtattct aagctgaccg tggacaagag ccgggtggcag	1320
caggcaacg tggcccttg ctctgtatg cacgaggccc tgcacaatca ctacacacag	1380
aagagcctgt ccctgtctcc tggcaagagg ggaaggaaga ggagaagcgg ctccggagca	1440
accaacttct ccctgctgaa gcaggccggc gatgtggagg agaatcctgg cccaatgg	1500
ctgcagacac aggtgtttat cagcctgtg ctgtggatct ccggcccta tggccatc	1560
cagatgaccc agtccccatc ctctgtctg gccagcgtgg gcgcacagggt gaccatcaca	1620
tgtcaggcct cccagtctat caacaatgag ctgagctggt accagcagaa gcctggcaag	1680
gccccaaagc tgctgatcta tagggcaagc accctggcat ccggagtgcc ttctagattc	1740
agcggctccg gctctggcac agacttacc ctgacaatca gtccttgca gccagacgat	1800
ttcggccacct actattgcca gcaggcgtac agcctgcgga acatcgataa tgccttcggc	1860
ggcggcacca aggtggagat caagcgcaca gtggccccc catccgtttt catcttcca	1920
ccctctgacg agcagctgaa gagcggaaacc gcacccgtgg tgtgcctgct gaacaatttc	1980
taccccaagg aggccaaggt gcagtggaaag gtggataacg ccctgcagtc cggcaattct	2040
caggagagcg tgaccgagca ggactccaag gattctacat atgcctgtc tagcaccctg	2100
acactgtcca aggccgacta cgagaagcac aagggttatg catgcgaggt gaccaccag	2160
ggactgtctt ctccctgtac aaagagctt aacagaggcg agtgt	2205

<211> 735

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6 4 Protein

<400> 8

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Gly Ile Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Thr

65 70 75 80

Ser Ala Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Asp Asp Ser Ser Asp Trp Asp Ala Lys Phe Asn Leu

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 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 Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala
 465 470 475 480
 Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 485 490 495
 Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Trp
 500 505 510
 Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 515 520 525
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
 530 535 540
 Gln Ser Ile Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 545 550 555 560

 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
 565 570 575
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 580 585 590
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 595 600 605
 Gly Tyr Ser Leu Arg Asn Ile Asp Asn Ala Phe Gly Gly Thr Lys
 610 615 620
 Val Glu Ile Lys Arg 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 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
725	730	735		
<210> 9				
<211> 2184				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> CD126 1 DNA				
<400> 9				
atggactgga catggagaat cctgttcccg gtcgcgcgc caaccgggac tcacgcagaa	60			
gtgcagctgg tcgaaagtgg agggggcctg gtgcagcccg gccgaagtct gaggctgtca	120			
 tgcgccgcta gccgattcac ctttgacgat tacgctatgc actgggttag gcaggcacct	180			
ggaaaagggc tggagtgggt cagcggcatc tcctggact ctggccggat tggatatgct	240			
gacagcgtga aggaaagatt cacaatctcc cgggataacg cagaaaattc tctgtttctg	300			
catatgaatg ggctgagagc agaggacact gcccgtact attgcgc当地 gggccgggac	360			
agcttcgata ttggggcca gggaaaccatg gtcacagtga gctccgcaag caccaaaggc	420			
ccctccgtgt ttccctggc cccttcttagt aagtccactt ctggcggAAC cgccgcctg	480			
ggatgtctgg tgaaggattt cttcccttag ccaagtacag tgagttggaa ctcaggcgcc	540			
 ctgaccagcg gagtgcatac atttcctgtgt tcctgcagt caagcggct gtacagcctg	600			
tcctctgtgg tcaccgtgcc aagttcaagc ctgggactc agacctatct ctgcaacgtg	660			
aatcacaacatccaaatc aaaggtcgac aagaaagtgg aacccaaatc ttgtgataag	720			
acacataactt gccc当地ctg tccagcacct gagctgctgg gccc当地caag cgtttctg	780			
tttccaccca agcctaaaga caccctgatg attagccca caccgaagt gacttgcgtg	840			
gtcggtggacg tgagccacga ggacccgaa gtgaagttca actggtagt ggatggcgcc	900			
gaggtgcata atgtaagac aaaacccagg gaggaacagt acaactctac ctatagatc	960			
 gtgaggtgtcc tgacagtgt gcaccaggac tggctgaacg ggaaggagta taagtgc当地aa	1020			
gtgtccaaaca aggc当地tgc当地 agctcccatc gagaagacaa ttcttaaggc caaaggccag	1080			
ccacgggaac cccaggtgta cactctgc当地 ccaagccgc acgagctgac aaaaaaccag	1140			
gtgaggtgtcc ctgtctgtt caagggattt tattcattctg atatcgctgt ggagtggaa	1200			
agtaatgggc agccagaaaa caattacaag accacacccc ctgtgttggaa cagcgatggc	1260			
agcttcttcc tttatagtaa actgaccgtg gacaagtcaa ggtggcagca gggaaacgtg	1320			

tttagttgct cagtcatgca tgaggccctg cacaatcatt acactcagaa aagcctgtcc	1380
ctgtctcctg ggaaacgggg ccgcaagagg agaagtgggt cagggcgtac aaacttctcc	1440
ctgctgaagc aggccagggta tgtggaggaa aatccctggcc caatgggtct gcagacccag	1500
gtctttatct cactgctgct gtggattagc ggagcctatg gggacatcca gatgacacag	1560
tccccagca gcgtgagcgc ctccgtggc gatcgcgtca ccatcacatg tcgagcctct	1620
cagggaaatta gttcatggct ggcttggta cagcagaagc ctggcaaagc accaaagctg	1680
ctgatctatg gagccagctc cctggaatcc ggggtgccat ctagattctc tggaagtggg	1740
tcaggcaccg actttactct gaccattct agtctgcagc cagaggattt cgcctctac	1800
tattgccagc aggttaactc ttcccctac actttggac aggggaccaa actggaaatc	1860
aagcgcactg tggctgcacc aagcgtctc attttccac cctccgacga gcagctgaag	1920
agtggAACCG cctcagtgggt gtgcctgctg aacaacttct acccccggaga agcaaaagtg	1980
cagtggaaagg tcgataacgc cctgcagtct ggcaatagtc aggagtcagt gactgaacag	2040
gacagcaaag attccaccta ttctctgtca agcacactga ctctgagcaa ggctgactac	2100
gagaagcaca aagtgtatgc atgcgaagtg acccaccagg ggctgagcag tccagtgacc	2160
aagtcttca atagaggaga atgc	2184

<210> 10

<211> 728

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD126 1 Protein

<400> 10

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 Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85 90 95

Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Arg Asp Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

115 120 125

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

130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

165 170 175

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

180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

275 280 285

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

290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

405 410 415

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

420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

450 455 460

Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser

465 470 475 480

Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val

485 490 495

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

500 505 510

Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser

515 520 525

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

530 535 540

Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580	585	590	
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe			
595	600	605	
Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val			
610	615	620	
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys			
625	630	635	640
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
645	650	655	
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
660	665	670	
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
675	680	685	
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
690	695	700	
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
705	710	715	720
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
725			
<210> 11			
<211> 2193			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> CD126 2 DNA			
<400> 11			
atggattgga cctggagaat cctgttcctg gtggcagcag caaccggaac acacgcacag 60			
gtgcagctgc aggagtccgg accaggactg gtgcgccaa gccagaccct gtccctgacc 120			
tgcacagtga gcggtactc catcacatct gaccacgcct ggagctgggt gggcagccc 180			
cctggaaggg gactggagtg gatcggtac atctttata gggcatcac cacatataac 240			
ccaaggctga agtccagggt gaccatgtg agagacacat ccaagaatca gttctcttg 300			
aggctgagct ccgtgaccgc agcagataca gccgtgtact attgcgccag gtctctggcc 360			
agaaccacag ccatggacta ctggggacag ggcagcctgg tgaccgtgtc taggccagc 420			

acaaggacatccgtttccactggccctctagtcacccctggctgtcgatggaggatggccgtttcccgatgtgcacacatgtacccgtgtttcccaaa	480
gcccgtttcccgatgtgcacacatgtacccgtgtttcccaaa	540
gcccgtttcccgatgtgcacacatgtacccgtgtttcccaaa	600
tgacccgtgtttcccaaa	660
tgcaacgtatcacaagccctctaatacacaaggatggacagaagggtggacgcctgatgtttcccaaa	720
tggtgataagccccacacatgtccaccgtgtttcccaaa	780
gtgttcgtttcccaaa	840
acatgcgtggatgtggacgtgttcacagagaccctcgaggatggacgtttcccaaa	900
gacggcgtggatgtggacgtgttcacagagaccctcgaggatggacgtttcccaaa	960
tatcgctggatgtggacgtgttcacagagaccctcgaggatggacgtttcccaaa	1020
aaatgtcaaggatggcaataa	1080
aaaggccatgttccatgtttcccaaa	1140
aaatgtcaaggatggcaataa	1200
aaatgtcaaggatggcaataa	1260
aaatgtcaaggatggcaataa	1320
aaatgtcaaggatggcaataa	1380
aaatgtcaaggatggcaataa	1440
aaatgtcaaggatggcaataa	1500
aaatgtcaaggatggcaataa	1560
aaatgtcaaggatggcaataa	1620
aaatgtcaaggatggcaataa	1680
aaatgtcaaggatggcaataa	1740
aaatgtcaaggatggcaataa	1800
aaatgtcaaggatggcaataa	1860
aaatgtcaaggatggcaataa	1920
aaatgtcaaggatggcaataa	1980
aaatgtcaaggatggcaataa	2040
aaatgtcaaggatggcaataa	2100
aaatgtcaaggatggcaataa	2160
aaatgtcaaggatggcaataa	2193

<211> 731

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD126 2 Protein

<400> 12

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 Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Ser 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 Glu Glu Met 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 Asp Ile Gln Met 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 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 545 550 555 560

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