



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105829341 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201480068381.5

(22)申请日 2014.12.13

(30)优先权数据

PCT/US2013/075137 2013.12.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/070188 2014.12.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/089492 EN 2015.06.18

(71)申请人 宾夕法尼亚大学理事会

地址 美国宾夕法尼亚州

申请人 艾诺奥医药品有限公司

(72)发明人 大卫·B·韦纳

卡鲁皮亚·穆苏马尼

塞利克·夫林盖

尼兰詹·萨尔德赛

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/42(2006.01)

(54)发明名称

DNA抗体构建体及其使用方法

(57)摘要

本文中公开了包含编码抗体的重组核酸序列的组合物。本文中还公开了通过向受试者施用所述组合物在受试者中产生合成抗体的方法。本公开还提供了使用所述组合物和产生方法预防和/或治疗受试者的疾病的方法。

权利要求书4页 说明书61页

序列表62页 附图53页

1. 一种编码合成抗体的核酸分子,所述核酸分子包含在全长的选自由以下组成的组的核酸序列上具有至少约95%的同一性的核酸序列:

- (a)SEQ ID NO:44中所示的核酸序列;
- (b)SEQ ID NO:67中所示的核酸序列;
- (c)SEQ ID NO:69中所示的核酸序列;
- (d)SEQ ID NO:71中所示的核酸序列;
- (e)SEQ ID NO:73中所示的核酸序列;
- (f)SEQ ID NO:75中所示的核酸序列;
- (g)SEQ ID NO:77中所示的核酸序列;
- (h)SEQ ID NO:58中所示的核酸序列;
- (i)SEQ ID NO:60中所示的核酸序列;和
- (j)SEQ ID NO:65中所示的核酸序列。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述核酸序列选自由以下组成的组:

- (a)SEQ ID NO:44中所示的所述核酸序列;
- (b)SEQ ID NO:67中所示的所述核酸序列;
- (c)SEQ ID NO:69中所示的所述核酸序列;
- (d)SEQ ID NO:71中所示的所述核酸序列;
- (e)SEQ ID NO:73中所示的所述核酸序列;
- (f)SEQ ID NO:75中所示的所述核酸序列;
- (g)SEQ ID NO:77中所示的所述核酸序列;
- (h)SEQ ID NO:58中所示的所述核酸序列;
- (i)SEQ ID NO:60中所示的所述核酸序列;和
- (j)SEQ ID NO:65中所示的所述核酸序列。

3. 一种编码合成抗体的核酸分子,所述核酸分子包含编码在全长的选自由以下组成的组的氨基酸序列上具有至少约95%的同一性的蛋白质的核酸序列:

- (a)SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列;
- (b)SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列;
- (c)SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列;
- (d)SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列;
- (e)SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列;
- (f)SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列;
- (g)SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列;
- (h)SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列;
- (i)SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列;和
- (j)SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求3所述的核酸分子,其中所述核酸编码具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的蛋白质:

- (a)SEQ ID NO:45中所示的所述氨基酸序列;
- (b)SEQ ID NO:68中所示的所述氨基酸序列;

- (c)SEQ ID NO:70中所示的所述氨基酸序列;
- (d)SEQ ID NO:72中所示的所述氨基酸序列;
- (e)SEQ ID NO:74中所示的所述氨基酸序列;
- (f)SEQ ID NO:76中所示的所述氨基酸序列;
- (g)SEQ ID NO:78中所示的所述氨基酸序列;
- (h)SEQ ID NO:59中所示的所述氨基酸序列;
- (i)SEQ ID NO:61中所示的所述氨基酸序列;和
- (j)SEQ ID NO:66中所示的所述氨基酸序列。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸序列编码轻链多肽、重链多肽、轻链多肽和重链多肽两者、或它们的片段。

6.根据权利要求5所述的核酸分子,其中当所述核酸序列编码轻链多肽和重链多肽时,所述核酸序列还编码蛋白酶切割位点。

7.根据权利要求6所述的核酸分子,其中所述蛋白酶切割位点位于所述轻链多肽与所述重链多肽之间并且其中所述蛋白酶切割位点包括弗林蛋白酶切割位点和2A肽序列。

8.根据权利要求1-4中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸分子还编码免疫球蛋白(Ig)信号肽。

9.根据权利要求8所述的核酸分子,其中所述Ig信号肽包含IgE信号肽。

10.根据权利要求1-4中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含表达载体。

11.一种组合物,所述组合物包含权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。

12.根据权利要求11所述的组合物,所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

13.一种预防有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述疾病是通过基孔肯雅热病毒(CHIKV)或登革热病毒(DENV)感染。

15.根据权利要求14所述的方法,其中当所述疾病是通过CHIKV感染时,所述核酸序列选自由以下组成的组:

- (a)SEQ ID NO:58中所示的所述核酸序列;
- (b)SEQ ID NO:60中所示的所述核酸序列;和
- (c)SEQ ID NO:65中所示的所述核酸序列。

16.根据权利要求14所述的方法,其中当所述疾病是通过DENV感染时,所述核酸序列选自由以下组成的组:

- (a)SEQ ID NO:44中所示的所述核酸序列;
- (b)SEQ ID NO:67中所示的所述核酸序列;
- (c)SEQ ID NO:69中所示的所述核酸序列;
- (d)SEQ ID NO:71中所示的所述核酸序列;
- (e)SEQ ID NO:73中所示的所述核酸序列;
- (f)SEQ ID NO:75中所示的所述核酸序列;和
- (g)SEQ ID NO:77中所示的所述核酸序列。

17.根据权利要求14所述的方法,其中当所述疾病是通过CHIKV感染时,所述氨基酸序

列选自以下组成的组：

- (a)SEQ ID NO:59中所示的所述氨基酸序列；
- (b)SEQ ID NO:61中所示的所述氨基酸序列；和
- (c)SEQ ID NO:66中所示的所述氨基酸序列。

18.根据权利要求14所述的方法，其中当所述疾病是通过DENV感染时，所述氨基酸序列选自自由以下组成的组：

- (a)SEQ ID NO:45中所示的所述氨基酸序列；
- (b)SEQ ID NO:68中所示的所述氨基酸序列；
- (c)SEQ ID NO:70中所示的所述氨基酸序列；
- (d)SEQ ID NO:72中所示的所述氨基酸序列；
- (e)SEQ ID NO:74中所示的所述氨基酸序列；
- (f)SEQ ID NO:76中所示的所述氨基酸序列；和
- (g)SEQ ID NO:78中所示的所述氨基酸序列。

19.根据权利要求13所述的方法，其中施用包括电穿孔和注射的至少一种。

20.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。

21.根据权利要求20所述的方法，其中所述疾病是通过基孔肯雅热病毒(CHIKV)或登革热病毒(DENV)感染。

22.根据权利要求21所述的方法，其中当所述疾病是通过CHIKV感染时，所述核酸序列选自自由以下组成的组：

- (a)SEQ ID NO:58中所示的所述核酸序列；
- (b)SEQ ID NO:60中所示的所述核酸序列；和
- (c)SEQ ID NO:65中所示的所述核酸序列。

23.根据权利要求21所述的方法，其中当所述疾病是通过DENV感染时，所述核酸序列选自自由以下组成的组：

- (a)SEQ ID NO:44中所示的所述核酸序列；
- (b)SEQ ID NO:67中所示的所述核酸序列；
- (c)SEQ ID NO:69中所示的所述核酸序列；
- (d)SEQ ID NO:71中所示的所述核酸序列；
- (e)SEQ ID NO:73中所示的所述核酸序列；
- (f)SEQ ID NO:75中所示的所述核酸序列；和
- (g)SEQ ID NO:77中所示的所述核酸序列。

24.根据权利要求21所述的方法，其中当所述疾病是通过CHIKV感染时，所述氨基酸序列选自自由以下组成的组：

- (a)SEQ ID NO:59中所示的所述氨基酸序列；
- (b)SEQ ID NO:61中所示的所述氨基酸序列；和
- (c)SEQ ID NO:66中所示的所述氨基酸序列。

25.根据权利要求21所述的方法，其中当所述疾病是通过DENV感染时，所述氨基酸序列选自自由以下组成的组：

- (a)SEQ ID NO:45中所示的所述氨基酸序列;
- (b)SEQ ID NO:68中所示的所述氨基酸序列;
- (c)SEQ ID NO:70中所示的所述氨基酸序列;
- (d)SEQ ID NO:72中所示的所述氨基酸序列;
- (e)SEQ ID NO:74中所示的所述氨基酸序列;
- (f)SEQ ID NO:76中所示的所述氨基酸序列;和
- (g)SEQ ID NO:78中所示的所述氨基酸序列。

26.根据权利要求20所述的方法,其中施用包括电穿孔和注射的至少一种。

DNA抗体构建体及其使用方法

[0001] 相关申请的引证

[0002] 本申请要求2013年12月13日提交的国际申请No. PCT/US2013/075137的优先权,所述国际申请通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及包含用于在体内产生合成抗体或其片段的重组核酸序列的组合物,以及通过施用所述组合物预防和/或治疗受试者疾病的方法。

背景技术

[0004] 免疫球蛋白分子包含轻链(L)和重链(H)的每一种类型的2条链,所述轻链和重链通过半胱氨酸残基之间的二硫键(显示为S-S)共价连接。重链(VH)和轻链(VL)的可变结构域促成抗体分子的结合位点。重链恒定区由3个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)和(柔性)铰链区组成。轻链也具有恒定结构域(CL)。重链和轻链的可变区包含4个框架区(FR;FR1、FR2、FR3和FR4)和3个互补决定区(CDR;CDR1、CDR2和CDR3)。因此,这些是在体内难以装配的非常复杂的遗传系统。

[0005] 靶向单克隆抗体(mAb)代表过去25年中最重要医学治疗进展之一。该类型的基于免疫的疗法现在被常规地用于抗宿主的自身免疫性疾病,治疗癌症以及感染性疾病。对于恶性肿瘤,将许多目前使用的基于免疫球蛋白(Ig)的疗法与针对肿瘤的细胞毒性化疗方案组合。该组合方法已显著提高总生存率。多种mAb制剂被批准用于针对特定癌症,包括瑞图宣(利妥昔单抗),一种靶向CD20以用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkins lymphoma)的嵌合mAb,和伊匹单抗(Yervoy),一种阻断CTLA-4并且已被用于治疗黑色素瘤和其它恶性肿瘤的人mAb。此外,贝伐单抗(阿瓦斯丁)是另一个突出的人源化mAb,其靶向VEGF和肿瘤新血管形成,并已用于治疗结直肠癌。也许最为人所知的用于治疗恶性肿瘤的mAb是曲妥珠单抗(赫赛汀),一种已被证明在一个亚组的患者中具有相当的抗乳腺癌功效的靶向Her2/neu的人源化制剂。此外,许多mAb用于治疗自身免疫性病症和特定的血液病症。

[0006] 除了癌症治疗以外,多克隆Ig的被动转移介导抗许多感染性疾病包括白喉、甲型和乙型肝炎、狂犬病、破伤风、水痘和呼吸道合胞病毒(RSV)的保护性功效。事实上,在当来不及通过主动接种来产生保护性Ig的情况下,几种多克隆Ig制剂提供为旅行至疾病流行地区的个体提供抗特定传染性病原体的临时保护。此外,在具有免疫缺陷的儿童中,帕利珠单抗(Synagis),一种靶向RSV感染的mAb,已被证明在临床上保护免受RSV感染。

[0007] 基于抗体的治疗不是没有风险的。一个这样的风险是抗体依赖性增强作用(ADE),当非中和抗病毒蛋白促进病毒进入宿主细胞时该作用发生,从而导致细胞中增强的感染性。一些细胞在它的表面上不具有病毒用于获得进入的常见受体。抗病毒蛋白(即抗体)结合这些细胞中的一些在质膜中所具有的抗体Fc受体。病毒结合抗体的另一末端上的抗原结合位点。该病毒可使用该机制来感染人巨噬细胞,从而使轻度的病毒感染变成威胁生命的。

ADE的最广泛已知的实例在登革热病毒(DENV)的感染背景中发生。当先前已被一个血清型的DENV感染的人在许多个月或年后被不同血清型感染时,观察到该现象。在此类案例中,疾病的临床过程更严重,并且这些人相较于其中未发生ADE的那些人具有较高的病毒血症。这解释了虽然原发(第一)感染在儿童中主要引起小的疾病(DF),但继发感染(晚期的再感染)在儿童和成人中更可能与严重疾病(DHF和/或DSS)相关。存在四种抗原性不同的DENV的血清型(DENV-1-DENV-4)。DENV感染诱导提供针对感染性血清型的终生免疫的中和同型免疫球蛋白G(IgG)抗体的产生。DENV感染还产生一定程度的针对另外3种血清型的交叉保护性免疫。除了诱导中和异型抗体以外,DENV感染还可诱导仅部分或根本不中和病毒的异型抗体。此类交叉反应性但非中和抗体的产生可能是更严重的继发感染的原因。一旦在白细胞内,病毒就不可检测地复制,最终产生引起严重疾病的极高的病毒滴度。

[0008] mAb疗法的临床影响是令人印象深刻的。然而,仍然存在限制该治疗方法的使用和传播的问题。这些问题中的一些包括这些复杂生物制品的高生产成本,这可限制它们在更广泛群体中,特别在其中它们可具有巨大影响的发展中国家使用。此外,对重复施用mAb以获得和维持功效的频繁需要在物流和患者依从性方面可成为障碍。需要可因与血清IgG竞争而降低或消除治疗性抗体的低体内功效的新抗体。需要可消除病毒如登革热病毒、HIV、RSV及其它病毒的抗体依赖性增强的新抗体。需要双特异性抗体、双功能抗体和抗体混合物来进行可证明是治疗性的或预防性的几个功能。此外,这些抗体制剂的长期稳定性通常很短并且在最佳状态以下。因此,在本领域仍然需要可以以安全且成本有的方式递送至受试者的合成抗体分子。

发明内容

[0009] 本发明涉及编码合成抗体的核酸分子,所述核酸分子包含在全长的选自由以下组成的组的核酸序列上具有至少约95%的同一性的核酸序列:(a)SEQ ID NO:44中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:67中所示的核酸序列;(c)SEQ ID NO:69中所示的核酸序列;(d)SEQ ID NO:71中所示的核酸序列;(e)SEQ ID NO:73中所示的核酸序列;(f)SEQ ID NO:75中所示的核酸序列;(g)SEQ ID NO:77中所示的核酸序列;(h)SEQ ID NO:58中所示的核酸序列;(i)SEQ ID NO:60中所示的核酸序列;和(j)SEQ ID NO:65中所示的核酸序列。本发明还涉及预防有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用上述核酸分子。本发明还涉及治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用上述核酸分子。

[0010] 本发明还涉及编码合成抗体的核酸分子,所述核酸分子包含编码在全长的选自由以下组成的组的氨基酸序列上具有至少约95%的同一性的蛋白质的核酸序列:(a)SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列;(c)SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列;(d)SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列;(e)SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列;(f)SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列;(g)SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列;(h)SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列;(i)SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列;和(j)SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。本发明还涉及包含上述核酸分子的组合物。本发明还涉及预防有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用上述核酸分子。本发明还涉及治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用上述核

酸分子。

附图说明

[0011] 图1显示编码如实施例1中描述的IgG重链的核酸序列。

[0012] 图2显示编码如实施例1中描述的IgG轻链的核酸序列。

[0013] 图3显示标绘时间(小时)对OD 450nm(1:100的组织培养上清液的稀释度)的图。

[0014] 图4显示蛋白质印迹的图像。

[0015] 图5显示pHIV-1Env-Fab的产生和表达的确认。(A和B)使用VRC01重(H)和轻(L)可变链Ig基因设计pHIV-1Env Fab抗-gp120Fab表达构建体的环状质粒图谱。当构建Fab质粒时包括几个修饰以提高表达的水平。将如显示的Fab VL和VH片段基因单独地克隆在pVax1载体的BamH1与Xho1限制位点之间。(C)pHIV-1Env Fab的体外表表达。该图显示293T细胞转染后pHIV-1Env Fab的表达的时间动力学。表示表达的指定的值是一式三份的孔的平均OD450nm±SD。作为对照,也用pVax1主链转染293T细胞。

[0016] 图6显示由pHIV-1Env Fab产生的抗HIV Env特异性Fab的时间产生的测量。(A)抗-HIV1Fab的产生的时程。在施用pHIV-1Env Fab后,在10天的时期中通过ELISA测量终稀释度为1:100的血清中的特异性Fab的产量,并将其表示为OD450nm。来自施以pVax1的小鼠的血清用作阴性对照。(B)在用重组gp120(rgp120)免疫后抗-gp120抗体应答的比较测量。如实施例2中所述,通过rgp120的单次注射免疫小鼠,随后测量抗-gp120抗体的产量达10天,并将其表示为OD450nm值。将PBS用作本研究的阴性对照注射。(C)通过免疫印迹分析确认HIV1Env-Fab结合。如实施例中所指示的,将5或10μg的gp120注射至SDS-PAGE,并进行硝酸纤维素印迹,随后用来自施以pHIV-1Env Fab的小鼠的血清孵育印迹。所述免疫印迹表明,实验性血清识别结合的rgp120,从而确认产生的Fab的特异性。(D)人IgG1Fab的时间定量,测量为pHIV-1Env-Fab施用后小鼠血清中的IgG1。在指定的时间点上利用标准ELISA试剂盒测量IgG1,并表示为Fab(μg/mL)±SD。来自施以pVax1的小鼠的血清用作阴性对照。在x-轴上指定的时间点分析血清样品。在(A)、(B)和(D)中展示的图中显示的箭头指示DNA质粒施用的点。

[0017] 图7显示HIV1Env Fab与进化枝A HIV Env糖蛋白的FACS结合分析。(A)FACS扫描指示抗-HIV1Env-Fab与HIV-1进化枝A Env糖蛋白的结合。将表达共有(pCon-Env-A)或“优化的”(pOpt-Env-A)HIV-1进化枝A包膜的DNA转染进293T细胞。转染后2天,用纯化的天然VRC01Ig,从pHIV-1Env Fab产生的血清(在单次质粒施用后48小时收集的)或从pIgG-E1M2施用产生的对照Ig对细胞进行染色。将血清和VRC01抗体分别在50μl PBS中以1:4或1:100稀释,并在室温下孵育30分钟。随后用适当的缀合有第二藻红蛋白(PE)的Ig对细胞进行染色,随后针对单重态和活细胞对所述细胞进行门控以进行FACS分析。在每一个扫描中指示阳性细胞的百分比结合。(B)FACS结合数据的图解表示法。将每一个Ig/血清测试组中的染色细胞的数目(即指示表达水平)除以本底染色值,并表示为作为经测试的不同HIV进化枝A Env制剂的函数的y-轴上的特异性结合的百分比。

[0018] 图8显示来自施以pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清对HIV-1的中和的时程。在图中指定的时间点上收集用于分析血清的中和活性的血清。使用一小组HIV-1假型病毒:Bal26(小组A;进化枝B,Tier 1)、Q23Env17(小组B;进化枝A,Tier 1)、SF162S(小组C;进化枝B,Tier

1)和ZM53M(小组D;进化枝C,Tier 2)在TZM-BL细胞中进行中和分析。如实施例2中所描绘的,以0.01的MOI感染细胞,并在含有从pHIV-1Env Fab施用产生的Fab的血清(1:50的终稀释度)存在的情况下孵育所述细胞。显示了百分比中和值,其计算描述于实施例2中。同样地,在每一个图中提供了水平线,其指示实验性血清介导50%病毒中和所处的大致时间点。

[0019] 图9显示编码实施例2-7中描述的HIV-1Env Fab的重链(VH-CH1)的核酸序列。

[0020] 图10显示编码实施例2-7中描述的HIV-1Env Fab的轻链(VL-CL)的核酸序列。

[0021] 图11显示用编码HIV Env的质粒转染的细胞的免疫荧光。用来自pVAX1(左图框)或pHIV-Env-Fab(右图框)的制剂对细胞进行染色。

[0022] 图12显示绘制抗原的类型对比血清浓度(ng/mL)的图。

[0023] 图13显示编码合成IgG1抗体的构建体的示意图。

[0024] 图14显示由图13的构建体编码的装配的抗体(在表达后)的示意图。

[0025] 图15显示VRC01IgG的氨基酸序列。

[0026] 图16显示(A)编码HIV-1Env-PG9Ig的构建体的示意图;(B)含有(A)的构建体的载体的示意图;和(C)染色的凝胶的图像。

[0027] 图17显示(A)编码HIV-1Env-4E10Ig的构建体的示意图;(B)含有(A)的构建体的载体的示意图;和(C)染色的凝胶的图像。

[0028] 图18显示在用费林蛋白酶切割之前的HIV-1Env-PG9Ig的氨基酸序列。

[0029] 图19显示利用费林蛋白酶切割之前的HIV-1Env-4E10Ig的氨基酸序列。

[0030] 图20显示(A)编码CHIKV-Env-Fab的重(VH-CH1)链的构建体的示意图;和(B)编码CHIKV-Env-Fab的轻(VL-CL)链的构建体的示意图。

[0031] 图21显示含有编码CHIKV-Env-Fab的重(VH-CH1)或轻(VL-CL)链的构建体的表达载体的示意图。

[0032] 图22显示绘制以小时(hr)计的时间对比OD450nm的图。

[0033] 图23显示免疫印迹的图像。

[0034] 图24显示DNA施用的定时以及获得预出血和出血的示意图。

[0035] 图25显示绘制以天数计的时间对比OD450nm的图。

[0036] 图26显示绘制攻击后天数对比百分比存活率的图。

[0037] 图27显示绘制小鼠组对比TNF- α 的pg/mL的图。

[0038] 图28显示绘制小鼠组对比IL-6的pg/mL的图。

[0039] 图29显示说明编码VH-CH1并且在启动子的控制下的构建体的示意图。

[0040] 图30显示说明编码VL-CL并且在启动子的控制下的构建体的示意图。

[0041] 图31显示说明被克隆进表达载体的编码抗-Her-2Fab的VH-CH1或VL-CL的构建体的示意图。

[0042] 图32显示编码抗-Her-2Fab的VH-CH1的核酸序列。

[0043] 图33显示由图32的核酸序列编码的氨基酸序列(即,抗-Her-2Fab的VH-CH1的氨基酸序列)。

[0044] 图34显示编码抗-Her-2Fab的VL-CL的核酸序列。

[0045] 图35显示由图34的核酸序列编码的氨基酸序列(即,抗-Her-2Fab的VL-CL的氨基酸序列)。

- [0046] 图36显示绘制转染的细胞的类型对比IgG浓度($\mu\text{g/mL}$)的图。
- [0047] 图37显示说明编码免疫球蛋白G(IgG)重链的可变重区(VH)、可变重恒定区1(CH1)、铰链区、可变重恒定区2(CH2)、可变重恒定区3(CH3)以及编码IgG轻链的可变轻区(VL)和可变轻恒定区(CL)的构建体的示意图。IgG的重链和轻链由蛋白酶切割位点分隔,并且各自位于信号肽(由前导序列编码)之后。
- [0048] 图38显示编码抗-登革热病毒(DENV)人IgG的核酸序列。
- [0049] 图39显示由图39的核酸序列编码的氨基酸序列(即,抗-DENV人IgG的氨基酸序列)。在该氨基酸序列中,蛋白酶切割还未发生来将重链和轻链分离成两个单独的多肽。
- [0050] 图40显示绘制小鼠组对比OD 450nm的图。
- [0051] 图41显示绘制注射后天数对比人IgG浓度(ng/mL)的图。
- [0052] 图42显示由图1的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:6)。该氨基酸序列是下文实施例1中描述的IgG重链的氨基酸序列。
- [0053] 图43显示由图2的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:7)。该氨基酸序列是下文实施例1中描述的IgG轻链的氨基酸序列。
- [0054] 图44显示由图9的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:3)。该氨基酸序列是实施例2-7中描述的HIV-1Env-Fab的重链(VH-CH1)的氨基酸序列。
- [0055] 图45显示由图10的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:4)。该氨基酸序列是实施例2-7中描述的HIV-1Env-Fab的轻链(VL-CL)的氨基酸序列。
- [0056] 图46显示编码下文实施例11中描述的HIV-1PG9单链Fab(scFab)的核酸序列。
- [0057] 图47显示由图46的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:50)。该氨基酸序列是下文实施例11中描述的HIV-1PG9scFab的氨基酸序列。
- [0058] 图48显示编码下文实施例13中描述的HIV-1 4E10单链Fab(scFab)的核酸序列。
- [0059] 图49显示由图48的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:52)。该氨基酸序列是下文实施例13中描述的HIV-1 4E10scFab的氨基酸序列。
- [0060] 图50显示说明编码免疫球蛋白G(IgG)重链的可变重区(VH)、可变重恒定区1(CH1)、铰链区、可变重恒定区2(CH2)、可变重恒定区3(CH3)的构建体的示意图。编码IgG重链的核酸序列位于前导序列之后。
- [0061] 图51显示说明编码IgG轻链的可变轻区(VL)和可变轻恒定区(CL)的构建体的示意图。编码IgG轻链的核酸序列位于前导序列之后。
- [0062] 图52显示编码下文实施例9中描述的HIV-1VRC01IgG1重链的核酸序列。
- [0063] 图53显示由图52的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:54)。该氨基酸序列是下文实施例9中描述的HIV-1VRC01IgG1重链的氨基酸序列。
- [0064] 图54显示编码下文实施例9中描述的HIV-1VRC01IgG轻链的核酸序列。
- [0065] 图55显示由图54的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:56)。该氨基酸序列是下文实施例9中描述的HIV-1VRC01IgG轻链的氨基酸序列。
- [0066] 图56显示编码下文实施例14中描述的CHIKV-Env-Fab的重链(VH-CH1)的核酸序列。
- [0067] 图57显示由图56的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:58)。该氨基酸序列是下文实施例14中描述的CHIKV-Env-Fab的重链(VH-CH1)的氨基酸序列。

- [0068] 图58显示编码下文实施例14中描述的CHIKV-Env-Fab的轻链(VL-CL)的核酸序列。
- [0069] 图59显示由图58的核酸序列编码的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:60)。该氨基酸序列是下文实施例14中描述的CHIKV-Env-Fab的轻链(VL-CL)的氨基酸序列。
- [0070] 图60显示编码下文实施例12中描述的HIV-1Env-4E10Ig的核酸序列。
- [0071] 图61显示编码下文实施例10中描述的HIV-1Env-PG9Ig的核酸序列。
- [0072] 图62显示编码VRC01IgG的核酸序列(SEQ ID NO:64)。
- [0073] 图63显示表达抗体的质粒的示意性设计以及在CHIKV-Fab表达质粒的单次EP介导的注射后抗体的表达的确认和结合动力学。(A)对于CHIKV-Fab和CHIKV-IgG,将选定的抗-CHIKV人单克隆的可变轻和重(VL和VH)IgG片段基因分别克隆入优化的DNA质粒载体。(B)将编码抗-CHIKV VL和VH-Fab基因或CHIKV-IgG的DNA质粒一起转染入293T细胞以通过ELISA测定它们各自的体外表达。利用空对照pVax1质粒转染的细胞用作阴性对照。(C)在EP介导的递送后抗-CHIKV-IgG抗体的体内表达。向小鼠(B6.Cg-Foxn1^{nu}/J)单次肌肉注射CHIKV-IgG质粒(总共100μg),随后进行EP(n=5只小鼠/组)来进行施用。空pVax1载体的注射用作阴性对照。(D)利用从CHIKV-IgG和重组CHIKV-Env免疫的小鼠收集的血清通过ELISA测定测量对CHIKV-Env抗原的特异性结合,并将其表示为不同时间点上单只小鼠的OD 450nm值。(E)在不同的时间点测量利用如实施例17中所述的CHIKV-IgG肌肉注射的小鼠中的人IgG浓度的血清水平。(F)抗体结合亲和力和特异性的评估。如下文中的实施例中所述,使用来自CHIKV感染的细胞的细胞裂解物,通过免疫印迹测试来自注射了CHIKV-IgG的小鼠的血清(第14天)对靶蛋白的结合亲和力功能性。
- [0074] 图64显示CHIKV-IgG表达质粒的单次电穿孔介导的注射后的IgG的表达和结合动力学。(A)来自被施用CHIKV-Fab的小鼠的血清对于CHIKV-Env抗原是特异的。用重组CHIKV-Env或HIV-1Env(B亚型;MN)蛋白涂覆ELISA板,并且在第一次注射后如所指示的获得来自注射了CHIKV-IgG或pVax1的小鼠的血清。利用收集的血清,通过ELISA测定来测量CHIKV-Env抗原的特异性结合,并将其表示为不同时间点上的单只小鼠的OD 450nm值。(B)免疫荧光测定(IFA)结果表明从被施用CHIKV-Fab的小鼠产生的CHIKV-Fab能够结合CHIKV-Env糖蛋白。在感染后24小时固定CHIKV感染的Vero细胞,随后进行免疫荧光测定来检测CHIKV-Env抗原表达。用DAPI对细胞核进行染色。利用CHIKV-Fab抗体在Vero细胞中观察到中等量的CHIKV-Env蛋白表达。将pVax1免疫的小鼠的血清用作阴性对照。(C)来自注射了质粒的小鼠的血清对CHIKV感染的细胞的结合的FACS分析。x-轴指示使用与CHIKV-Env互补的慢病毒GFP假病毒进行的GFP染色。y-轴显示小鼠中产生的测试的人IgG的染色。双阳性细胞是血清结合CHIKV感染的细胞的指示/测量。
- [0075] 图65显示来自用CHIKV-IgG加上EP注射的小鼠的血清表现出针对多个CHIKV株的中和活性。(A-F)显示针对6个不同的CHIKV病毒株:Ross、LR2006-OPY1、IND-63-WB1、PC-08、B448-China和Bianchi测量的来自被施用CHIKV-IgG和EP的小鼠的血清的中和活性。将中和抗体(nAb)滴度作为在Vero细胞中导致至少50%的CPE的抑制的最高血清稀释度来作图。在2个独立实验(对于每一个实验,利用每组至少10只小鼠)中观察到类似结果。利用Prism GraphPad软件进行IC-50值。
- [0076] 图66显示在利用CHIKV-Fab的免疫后抗-CHIKV-Env IgG以及血清和粘膜IgG应答的耐久性,以及IgG表达和攻击研究。(A)IgG质粒免疫和CHIKV-攻击的示意性图示。(B-C)在

第0天用pVax1、CHIKV-IgG或CHIKV-Fab注射BALB/c小鼠,以及在第2天(B)或第30天(C)用CHIKV-De1-03(JN578247)CHIKV株(1×10^7 PFU于25u1的总体积中)攻击所述小鼠。在病毒攻击后,每天监测小鼠,并记录存活率,持续20天。(D-E)免受来自不同途径的CHIKV病毒感染的小鼠的保护。利用100ug的CHIKV-IgG通过肌肉(IM)注射免疫两组小鼠,第2天通过皮下途径(s.c)(D)攻击一组小鼠,并且通过鼻内途径(i.n)攻击另一组小鼠。(E)利用CHIKV的接种。在病毒攻击后每天监测小鼠,并记录存活率,持续20天。 $\uparrow$ 表示DNA施用; $\star$ 表示病毒攻击。每一组由10只小鼠组成并且结果代表2个独立的实验。

[0077] 图67显示通过CHIKV-攻击研究的立即和持久保护。(A)CHIKV-IgG接种和攻击研究的示意性图示。组I攻击:在第0天用CHIKV-IgG、CHIKV-Env或pVax1注射BALB/c小鼠,第2天用CHIKV-De1-03(JN578247)病毒株(1×10^7 PFU于25u1的总体积中)攻击所述小鼠。组II攻击:在第0天给予BALB/c小鼠单次CHIKV-IgG免疫或在指定的天给予小鼠多次CHIKV-Env免疫,随后在与组I攻击相同的条件下在第35天攻击所述小鼠。 $\uparrow$ 表示DNA施用; $\star$ 表示病毒攻击。对于每一个研究,监测小鼠20天,并记录存活率。(B)来自组I攻击研究的小鼠的存活曲线。注意,在CHIKV-IgG免疫的小鼠中记录了100%存活率。(C)来自组II攻击研究的小鼠的存活曲线。(D)在用CHIKV-IgG加上EP免疫后,在指定的时间点测量抗-CHIKV人IgG的浓度水平。(E)在CHIKV-IgG和CHIKV-Env免疫后于小鼠中产生的持久性和系统性抗-CHIKV-Env抗体的诱导。

[0078] 图68显示响应CHIKV感染的离体细胞因子产生。(A)第45天(即攻击后10天)来自组II攻击研究的被施用CHIKV-IgG和CHIKV-Env小鼠中的病毒滴度。每一个数据点代表来自10只小鼠的平均病毒滴度。一组pVax1免疫的小鼠用作对照。病毒载量在CHIKV-IgG($p=0.0244$)和CHIKV-Env($p=0.0221$)中相较于pVax1小鼠显著降低。(B及C)来自CHIKV感染的小鼠的血清促炎细胞因子水平(TNF- α 和IL-6)的表征。第45天(攻击后15天)通过特异性ELISA测定测量小鼠的细胞因子水平。注射了CHIKV-IgG或CHIKV-Env的小鼠具有类似的且比对照组显著更低的血清水平的TNF- α 和IL-6($p<0.0001$)。数据代表每小鼠3个小孔的平均值($n=10$ /组)。(D)利用小鼠的CHIKV-IgG或CHIKV-Env免疫,随后利用CHIKV特异性肽刺激的小鼠的脾细胞中的T细胞应答。显示的数据代表至少2个单独的实验。

[0079] 图69显示由编码抗体的DNA构建体递送的人抗-DENV中和mAb的体外表达。(a)用于递送的DNA质粒的示意性说明;抗体重链与轻链序列以弗林蛋白酶和2A切割位点的组合间隔。(b)pDVSF-3WT或LALA转染的293T细胞的上清液中的人IgG的ELISA定量分析。(c)含有DVSF-3WT的pDVSF-3WT转染的293T细胞的上清液的免疫印迹分析。通过蛋白A旋转柱纯化抗体,并在还原(左)和非还原(右)条件下通过SDS-PAGE分离所述抗体。(d)不感染(模拟物)Vero细胞或利用DENV1、2、3或4感染所述细胞,随后对细胞进行固定、透化,和用pDVSF-3WT或LALA转染的293T细胞的上清液对其进行染色。

[0080] 图70显示小鼠血清中的中和DENV抗体的长期表达的结果。(a)在编码抗-DENV人IgG抗体DVSF-1的DNA质粒至Foxn1/NuJ免疫缺陷型小鼠的单次肌肉注射后,通过ELISA测量人IgG的总的血清可检测水平。第0-4(左)与第19周(右)之间的人IgG水平。每一条线(左)或点(右)代表单只小鼠($n=5$)。(b)在于129/Sv小鼠($n=4-5$ /组)中肌肉注射pDVSF-3WT或pDVSF-3LALA质粒后通过ELISA测量血清中的总的人IgG。(c)不感染(模拟物)Vero细胞或利用DENV1、2、3或4感染所述细胞,随后对其进行固定、透化,和利用在pDVSF-3WT或pDVSF-

3LALA的DNA注射后第0天或第7天采集的129/Sv小鼠血清(n=5/组)进行染色。(d)在添加至Vero细胞之前,通过用在pDVSF-3WT或pDVSF-3LALA的DNA注射后第7天采集的129/Sv小鼠血清(n=5/组)的系列稀释物孵育DENV1、2、3或4来评估中和。显示了被感染的细胞的百分比。

[0081] 图71显示编码抗体的DNA构建体的递送保护免受仅用病毒导致的疾病和抗体增强的疾病。(a)仅用病毒的攻击:AG129小鼠在用亚致死剂量的DENV2S221(n=5-6/组;对于pDVSF-3LALA与pDVSF-3WT之间的比较, $p \leq 0.0084$)攻击前5天接受pDVSF-3WT、pDVSF-3LALA或pVax空载体的肌肉注射。(b)抗体依赖性增强攻击:在施用增强剂量的非中和抗-DENV mAb 2H2之前5天,AG129小鼠接受pDVSF-3WT、pDVSF-3LALA或pVax空载体的肌肉注射。30分钟后,用亚致死剂量的DENV2S221(n=5-6/组;对于pDVSF-3LALA与pDVSF-3WT之间的比较, $p \leq 0.0072$)攻击小鼠。Kaplan-Meier存活曲线示于(a-b)中。

[0082] 图72显示pDVSF-3WT和LALA编码的抗体的体外功能分析。(a)pDVSF-3WT或LALA转染的293T细胞的上清液中的人IgG针对纯化的重组DENV E蛋白的ELISA结合分析。(b)在添加至K562细胞之前,通过用pDVSF-3WT或LALA转染的293T细胞的上清液的血清稀释物孵育DENV1、2、3或4来评估抗体依赖性增强。显示了被感染的细胞的百分比。

[0083] 图73显示在编码抗体的DNA构建体递送后AG129小鼠中的抗-DENV人IgG的攻击前水平。(a)在于AG129小鼠(n=5-6/组;对于pDVSF-3WT与pVax之间的比较, $p \leq 0.0005$;对于pDVSF-3LALA与pVax之间的比较, $p \leq 0.0001$)中进行各自质粒的DNA肌肉注射(在DENV2攻击前一天)和EP后4天通过ELISA测量血清中的DVSF-3WT或DVSF-3LALA的总的人IgG。

[0084] 图74显示小鼠中多个编码DENV抗体的质粒的递送产生增加的DENV1-4抗血清。(a)在于129/Sv小鼠(n=5/组;对于pDVSF-1WT与pDVSF-1+3之间的比较, $p \leq 0.0088$;对于pDVSF-3WT与pDVSF-1+3之间的比较, $p \leq 0.0240$)中进行各自质粒的DNA肌肉注射和EP后7天,通过ELISA测量血清中的DVSF-3WT、DVSF-1WT或DVSF-3WT和DVSF-1WT的总的人IgG。

[0085] 图75在顶图中显示DVSF-3WT结合于人FcγR1a,然而DVSF-3LALA不结合FcγR1a。底部4个图显示抗体依赖性增强测定的结果:DENV-1、-2、-3或-4与DVSF-3LALA一起的孵育不导致人单核细胞(K562细胞系)感染,然而DVSF-3WT确实增强DENV-1、-2和-3的感染。

具体实施方式

[0086] 本发明涉及包含编码抗体、其片段、其变体或其组合的重组核酸序列的组合物。可向有此需要的受试者施用所述组合物以促进合成抗体的体内表达和形成。

[0087] 具体地,从所述重组核酸序列表达的重链和轻链多肽可装配成合成抗体。所述重链多肽和轻链多肽可彼此相互作用,以便装配导致合成抗体能够结合抗原,相较于未按本文中所描述装配的抗体更具免疫原性,并且能够引发或诱发抗所述抗原的免疫应答。

[0088] 此外,这些合成抗体比响应抗原诱发的免疫应答而产生的抗体更快地在受试者中产生。合成抗体能够有效地结合并中和一系列抗原。合成抗体也能够有效地保护免受疾病侵袭和/或促进疾病的存活。

[0089] 1. 定义

[0090] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员理解的含义相同的含义。在冲突的情况下,以本文件(包括定义)为准。下文中描述了优选的方法和材料,尽管可在本发明的实施或测试中使用与本文中描述的那些方法和材料类似或

等同的方法和材料。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入。本文中公开的材料、方法以及实施例仅仅是说明性的并非意在限制。

[0091] 如本文中所用,术语“包含/包括”、“包括”、“具有”、“有”、“可以”、“含有”及其变型意欲为不排除另外的行为或结构的可能性的开放式过渡短语、术语或词语。除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个(a)”、“和(and)”以及“该(the)”包括复数参考物。本公开还涵盖“包含/包括”本文中提出的实施方案或组件、“由所述实施方案或组件组成”和“基本上由所述实施方案或组件组成”的其它实施方案,无论是否明确地显示。

[0092] “抗体”可意指种类IgG、IgM、IgA、IgD或IgE或其片段、片段或其衍生物的抗体(包括Fab、F(ab')₂、Fd和单链抗体)及其衍生物。抗体可以是从小哺乳动物的血清样品分离的抗体、多克隆抗体、亲和纯化的抗体或其混合物,所述抗体展现足够的对期望的表位或来源于其的序列的结合特异性。所述抗体可以是如本文所述的合成抗体。

[0093] 如在本文中可互换使用的“抗体片段”或“抗体的片段”是指包含抗原结合位点或可变区的完整抗体的部分。所述部分不包括完整抗体的Fc区域的恒定重链结构域(即取决于抗体同种型,CH₂、CH₃或CH₄)。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段、双链抗体、单链Fv(scFv)分子、仅含1个轻链可变结构域的单链多肽、含有轻链可变结构域的3个CDR的单链多肽、仅含1个重链可变区的单链多肽和含有重链可变区的3个CDR的单链多肽。

[0094] “抗原”是指具有在宿主中产生免疫应答的能力的蛋白质。抗原可被抗体识别并结合。抗原可源于身体内部或源自外部环境。

[0095] 如本文中所用,“编码序列”或“编码核酸”可意指包含编码本文中所示的抗体的核苷酸序列的核酸(RNA或DNA分子)。编码序列还可包括有效地连接于能够在向其施用了核酸的个体或哺乳动物的细胞中指导表达的调控元件(包括启动子和多聚腺苷酸化信号)的起始和终止信号。编码序列还可包括编码信号肽的序列。

[0096] 如本文中所用,“互补”或“互补的”可意指可核酸,可意指核酸分子的核苷酸或核苷酸类似物之间的沃森-克里克(Watson-Crick)(例如,A-T/U和C-G)或Hoogsteen碱基配对。

[0097] 如本文中所用,“恒定电流”定义由组织或限定所述组织的细胞在整个递送至相同组织的电脉冲的持续过程中接收或经历的电流。从本文中描述的电穿孔装置递送电脉冲。该电流在电脉冲的整个过程中在所述组织中维持恒定的安培度,因为本文中提供的电穿孔装置具有反馈元件,优选地具有瞬时反馈。反馈元件可测量整个脉冲持续过程中组织(或细胞)的阻抗,并使电穿孔装置改变其电能输出(例如,提高电压),这样相同组织中的电流在整个电脉冲(大约数微秒)中以及在脉冲间维持恒定。在一些实施方案中,反馈元件包括控制器。

[0098] 如本文中所用,“电流反馈”或“反馈”可互换使用,并且可意指提供的电穿孔装置的主动响应,其包括测量组织中电极之间的电流和相应地改变由EP装置递送的能量输出,以将电流维持在恒定水平。该恒定水平由用户在开始脉冲序列或电处理之前预先设定。反馈可由电穿孔组件例如电穿孔装置的控制器来实现,因为其中的电路能够连续监测组织中电极之间的电流并将该监测的电流(或组织内的电流)与预设电流相比较,以及连续进行能量输出调整以将监测的电流维持在预设水平。反馈回路可以是瞬时的,因为其模拟闭环

反馈。

[0099] 如本文中所用的“分散电流”可意指从本文中描述的电穿孔装置的各种针电极阵列递送的电流的模式,其中所述模式使待电穿孔的组织任何区域上的电穿孔相关热应激的发生降至最低或优选消除。

[0100] 如本文中可互换使用的,“电穿孔”、“电-透化”或“电动增强”(“EP”)可指使用跨膜电场脉冲来诱发生物膜中的微观通路(孔);它们的存在允许生物分子诸如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子和水从细胞膜的一侧通过进入另一侧。

[0101] 如本文中所用,“内源性抗体”可指在被施以有效剂量的抗原以诱发体液免疫应答的受试者中产生的抗体。

[0102] 如本文中所用,“反馈机制”可指通过软件或硬件(或固件)进行的过程,该过程接收期望的组织的阻抗(在递送能量脉冲之前,期间和/或之后)并将其与现有值(优选地当前)相比较,随后调整被递送的能量的脉冲以达到预设值。可通过模拟闭环电路进行反馈机制。

[0103] “片段”可意指具有功能的,即可结合至期望的靶并具有与全长抗体相同的期望的作用的抗体的多肽片段。除从N和/或C末端失去至少一个氨基酸外,抗体的片段可与全长抗体100%相同,在每一种情况下具有或不具有信号肽和/或位置1上的甲硫氨酸。片段可包含20%或更多、25%或更多、30%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、91%或更多、92%或更多、93%或更多、94%或更多、95%或更多、96%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多百分比的特定全长抗体的长度,不包括任何添加的异源信号肽。片段可包括多肽的片段,所述多肽的片段与抗体具有95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高或99%或更高同一性,并且额外地包含当计算百分比同一性时被包括的N末端甲硫氨酸或异源信号肽。片段还可包含N末端甲硫氨酸和/或信号肽,诸如免疫球蛋白信号肽,例如IgE或IgG信号肽。可将N末端甲硫氨酸和/或信号肽连接于抗体的片段。

[0104] 在具有或不具有编码信号肽和/或位置1上的甲硫氨酸的序列的每一种情况下,编码抗体的核酸序列的片段可与全长100%相同,除从5'和/或3'末端失去至少一个核苷酸外。片段可包含20%或更多、25%或更多、30%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、91%或更多、92%或更多、93%或更多、94%或更多、95%或更多、96%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多百分比的特定全长编码序列的长度,不包括任何添加的异源信号肽。片段可包含编码多肽的片段,所述多肽与抗体具有95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高或99%或更高的同一性,并且额外地任选地包含当计算百分比同一性时未包括的编码N末端甲硫氨酸或异源信号肽的序列。片段还可包含N末端甲硫氨酸和/或信号肽,诸如免疫球蛋白信号肽例如IgE或IgG信号肽的编码序列。可将编码N末端甲硫氨酸和/或信号肽的编码序列连接于编码序列的片段。

[0105] 如本文中所用的“遗传构建体”是指包含编码蛋白质诸如抗体的核苷酸序列的DNA或RNA分子。所述编码序列包括有效地连接于能够在向其施用了核酸分子的个体的细胞中指导表达的调控元件(包括启动子和多聚腺苷酸化信号)的起始和终止信号。如本文中所用,术语“可表达的形式”是指基因构建体,所述基因构建体含有有效地连接于编码蛋白质

的编码序列的必需调控元件,以便当存在于个体的细胞中时,所述编码序列可被表达。

[0106] 如在本文中在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中所用,“相同的”或“同一性”可意指序列具有指定百分比的在指定区域上相同的残基。可通过如下步骤计算百分比:将两个序列最佳地比对,在指定的区域上比较两条序列,测定在两个序列中在其上存在相同残基的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以指定区域中的位置总数,及将结果乘以100来产生序列同一性的百分比。在其中两条序列具有不同长度或比对产生一个或多个交错末端以及指定的比较区域仅包括单个序列的情况下,将单个序列的残基包括在计算的分母而非分子中。当比较DNA和RNA时,可胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可被认为是等同的。人工或通过使用计算机序列算法诸如BLAST或BLAST 2.0来获得同一性。

[0107] 当讨论反馈机制时可使用如本文中所用的“阻抗”,并且可按照欧姆定律将其转换成电流值,从而使得能够与预设电流比较。

[0108] 如本文中所用的“免疫应答”可意指宿主的免疫系统,例如哺乳动物的免疫系统,响应一种或多种核酸和/或肽的引入的激活。免疫应答可以以细胞或体液应答的形式或这两种形式存在。

[0109] 如本文中所用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”可意指共价连接在一起的至少两个核苷酸。单链的描述也限定了互补链的序列。因此,核酸还包括描述的单链的互补链。核酸的许多变体可出于相同的目的作为给定的核酸使用。因此,核酸还包括基本上相同的核酸和其补体。单链提供可在严格杂交条件下与靶序列杂交的探针。因此,核酸还包括在严格杂交条件下杂交的探针。

[0110] 核酸可以是单链或双链的,或可含有双链和单链序列的部分。核酸可以是DNA(基因组DNA和cDNA)、RNA或杂交体,其中核酸可含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的组合,碱基(包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤次黄嘌呤、异胞嘧啶和异鸟嘌呤)的组合。核酸可以通过化学合成法或通过重组法获得。

[0111] 如本文中所用的“有效连接的”可意指基因的表达在与其空间上连接的启动子的控制下。启动子可位于在其控制下的基因的5'(上游)或3'(下游)。启动子与基因之间的距离可与在所述启动子所源自的基因中该启动子与其控制的基因之间的距离大致相同。如在本领域中是已知的,可接受该距离的变化而不丧失启动子功能。

[0112] 如本文中所用的“肽”、“蛋白质”或“多肽”可意指氨基酸的连接的序列,并且可以是天然的、合成的或者经修饰的或天然和合成的组合。

[0113] 如本文中所用的“启动子”可意指能够赋予、激活或增强核酸在细胞中的表达的合成或天然来源的分子。启动子可包含一个或多个特定的转录调控序列以进一步增强所述序列的表达和/或改变其的空间表达和/或时间表达。启动子还可包含与转录起始位点相距多达数千碱基对的远端增强子或阻遏子元件。启动子可源自包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。启动子可针对其中发生表达的细胞、组织或器官或针对表达发生所处的发育阶段,或响应外部刺激(诸如生理应激、病原体、金属离子或诱导剂)而组成型地,或差异地调控基因组分的表达。启动子的代表性实例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、lac操纵子-启动子、tac启动子、SV40晚期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV 40晚期启动子和CMV IE启动子。

[0114] “信号肽”和“前导序列”在本文中可互换使用,并且是指可被连接在本文中所示的

蛋白质的氨基末端上的氨基酸序列。信号肽/前导序列通常指导蛋白质的定位。本文中使用的信号肽/前导序列优选促进蛋白质从产生其的细胞分泌。在从细胞分泌后,通常从蛋白质的其余部分(通常称为成熟蛋白)切割信号肽/前导序列。信号肽/前导序列连接在蛋白质的N末端上。

[0115] 如本文中所用的“严格杂交条件”可意指第一核酸序列(例如,探针)将与第二核酸序列(例如,靶)(诸如在核酸的复杂混合物中)杂交的条件。严格条件是序列依赖性的,并且在不同的情况下是不同的。可选择比特定序列在限定的离子强度、pH下的热熔点(T_m)低约5-10℃作为严格条件。 T_m 可以是50%的与靶互补的探针在平衡(由于靶序列过量存在,因此在 T_m 下,50%的探针在平衡时被占据)时与靶序列杂交时的温度(在限定的离子强度、pH和核酸浓度下)。严格条件可以是在pH 7.0至8.3下盐浓度低于约1.0M钠离子,诸如约0.01-1.0M的钠离子浓度(或其它盐)以及温度为至少约30℃(对于短探针(例如,约10-50个核苷酸))和至少约60℃(对于长探针(例如,大于约50个核苷酸))的那些条件。严格条件还可通过添加去稳定剂诸如甲酰胺来实现。对于选择性或特异性杂交,阳性信号可以为至少2至10倍本底杂交。示例性严格杂交条件包括下列条件:50%甲酰胺、5x SSC和1%SDS在42℃下孵育,或者5x SSC、1%SDS在65℃下孵育,在65℃于0.2x SSC和0.1%SDS中洗涤。

[0116] 如本文中可互换所用的“受试者”和“患者”是指任何脊椎动物,包括但不限于哺乳动物(例如,牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠、非人灵长类动物(例如,猴,诸如食蟹猴或恒河猴、黑猩猩等)和人)。在一些实施方案中,受试者可以是人或非人。受试者或患者可以正接受其他形式的治疗。

[0117] 如本文中所用的“基本上互补的”可意指第一序列与第二序列的互补序列在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或更多个核苷酸或氨基酸的区域上具有至少60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,或两条序列在严格杂交条件下杂交。

[0118] 如本文中所用的“基本上相同的”可意指第一与第二序列在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、1100或更多个核苷酸或氨基酸的区域上至少60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同,或对于核酸,如果第一序列与第二序列的补体基本上互补的话,则它们是基本上相同的。

[0119] 如本文中所用的“合成抗体”是指由本文中描述的重组核酸序列或其变体编码并且在受试者中产生的抗体。所述合成抗体可被工程化来结合所需靶分子,从而引发生物学效应。所需靶分子可以是抗原、受体配体、受体(包括受体上的配体结合位点)、配体-受体复合物、标志物(包括癌症的标志物),以及可被抗体结合的任何其它分子或靶。在一些实施方案中,所述重组核酸序列可以具有SEQ ID NO:3、4、6、7、40、42、44、50、52、54、56、58、60、62、63、64、65、67、69、71、73、75或77中所示的核酸序列。在一些实施方案中,所述重组核酸序列可编码SEQ ID NO:1、2、5、41、43、45、46、47、48、49、51、53、55、57、59、61、66、68、70、72、74、76或78中所示的氨基酸序列。

[0120] 如本文中所用的“治疗”或“处理”可意指通过预防、抑制、压制或完全消除疾病来

保护受试者免受疾病侵害。预防疾病包括在疾病发作之前向受试者施用本发明的疫苗。抑制疾病包括在疾病引发后但在其临床表现之前向受试者施用本发明的疫苗。压制疾病包括在疾病临床表现后向受试者施用本发明的疫苗。

[0121] 如本文中针对核酸所用的“变体”可意指(i)参照的核苷酸序列的部分或片段;(ii)参照的核苷酸序列或其部分的补体;(iii)与参照核酸或其互补序列基本上同一的核酸;或(iv)在严格条件下与参照核酸、其补体或与其基本上相同的序列杂交的核酸。

[0122] 对于肽或多肽,“变体”是指在氨基酸序列上相异于氨基酸的插入、缺失或保守取代,但保留至少一种生物活性的肽或多肽。变体还可意指具有与参照蛋白质的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的,保留至少一种生物活性的蛋白质。氨基酸的保守取代,即利用具有相似性质(例如,疏水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸替代氨基酸,在本领域中被公认为通常牵涉较小变化。如本领域中所理解的,这些较小变化可部分通过考虑氨基酸的亲疏水性指数(hydrophobic index)来鉴定。Kyte等人,J.Mol.Biol.157:105-132(1982)。氨基酸的亲疏水性指数基于对其疏水性和电荷的考虑。在本领域中已知具有相似亲疏水性指数的氨基酸可被取代并且仍然保留蛋白质功能。在一个方面,具有 ± 2 的亲疏水性指数的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可用于显示可导致保留生物功能的蛋白质的取代。在肽的上下文中考虑氨基酸的亲水性允许计算该肽的最大局部平均亲水性,这是一种已被报导与抗原性和免疫原性密切相关的有用的度量。美国专利No.4,554,101(通过引用完全并入本文)。如本领域中所理解的,具有相似亲水性值的氨基酸的取代可导致保留生物活性例如免疫原性的肽。可利用彼此亲水性值在 ± 2 以内的氨基酸进行取代。氨基酸的疏水性指数和亲水性值受该氨基酸的特定侧链影响。与该观察一致,与生物功能相容的氨基酸取代经了解取决于氨基酸,并且具体地那些氨基酸的侧链的相对相似性,如通过疏水性、亲水性、电荷、大小和其它性质显示的。

[0123] 变体可以是在全长的全基因序列或其片段上基本上相同的核酸序列。核酸序列可在全长的基因序列或其片段上具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。例如,所述核酸序列可在全长的SEQ ID NO:3、4、6、7、40、42、44、50、52、54、56、58、60、62、63、64、65、67、69、71、73、75或77中所示的核酸序列或其片段上具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。变体可以是在全长的氨基酸序列或其片段上基本上相同的氨基酸序列。氨基酸序列可在全长的所述氨基酸序列或其片段上具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。例如,氨基酸序列可在全长的SEQ ID NO:1、2、5、41、43、45、46、47、48、49、51、53、55、57、59、61、66、68、70、72、74、76或78中所示的氨基酸序列或其片段上具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。

[0124] 如本文中所述的“载体”可意指含有复制起始点的核酸序列。载体可以是质粒、噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。载体可以是DNA或RNA载体。载体可以是自主复制的染色体外载体或整合进宿主基因组的载体。

[0125] 对于本文中数值范围的引述,明确地以相同的精度包括其间的每一个中介数。例

如,对于6-9的范围,除了6和9外还包括数值7和8,而对于范围6.0-7.0,明确地包括数值6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0126] 2.组合物

[0127] 本发明涉及包含编码抗体、其片段、其变体或其组合的重组核酸序列的组合物。当向有此需要的受试者施用,所述组合物可导致在受试者中产生合成抗体。所述合成抗体可结合存在于受试者中的靶分子(例如,抗原(其在下文中被更详细地论述)、配体(包括受体的配体)、受体(包括受体上的配体结合位点);配体-受体复合物和标志物(包括癌症标志物))。这样的结合可中和抗原,阻断另一种分子例如蛋白质或核酸对抗原的识别,以及引发或诱发对抗原的免疫应答。

[0128] 所述合成抗体可治疗、预防被施以所述组合物的受试者的疾病和/或保护其免受所述疾病侵害。所述合成抗体通过结合抗原可治疗、预防被施以所述组合物的受试者的疾病和/或保护其免受所述疾病侵害。所述合成抗体可提高被施以所述组合物的受试者的疾病存活率。所述合成抗体可提供至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的被施以所述组合物的受试者的疾病存活率。在其它实施方案中,所述合成抗体可提供至少约65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%或80%的被施以所述组合物的受试者的疾病存活率。

[0129] 所述组合物可导致在向受试者施用所述组合物至少约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、20小时、25小时、30小时、35小时、40小时、45小时、50小时或60小时内所述受试者中产生所述合成抗体。所述组合物可导致在向受试者施用所述组合物至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天内所述受试者中产生所述合成抗体。所述组合物可导致在向受试者施用所述组合物约1小时至约6天、约1小时至约5天、约1小时至约4天、约1小时至约3天、约1小时至约2天、约1小时至约1天、约1小时至约72小时、约1小时至约60小时、约1小时至约48小时、约1小时至约36小时、约1小时至约24小时、约1小时至约12小时或约1小时至约6小时内所述受试者中产生所述合成抗体。

[0130] 所述组合物,当向有此需要的受试者施用,可导致合成抗体在所述受试者中的持久产生。所述组合物可导致合成抗体在所述受试者中产生,持续至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40天、41天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天、50天、51天、52天、53天、54天、55天、56天、57天、58天、59天或60天。

[0131] 当向有此需要的受试者施用,所述组合物可在受试者中导致比被施以抗原以诱发体液免疫应答的受试者的内源抗体的产生更快的合成抗体的产生。所述组合物可在被施以抗原以诱发体液免疫应答的受试者的内源抗体产生之前至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天导致所述合成抗体的产生。

[0132] 本发明的组合物可具有有效组合物的期望特性,诸如是安全的,以便所述组合物不引起疾病或死亡;具有抵抗疾病的保护作用;以及提供施用的容易性、极少的副作用、生物稳定性和每剂量的低成本。

[0133] 3.重组核酸序列

[0134] 如上所述,所述组合物可包含重组核酸序列。所述重组核酸序列可编码抗体、其片段、其变体或其组合。在下文中更详细地描述了抗体。

[0135] 所述重组核酸序列可以是异源核酸序列。所述重组核酸序列可包括至少一个异源核酸序列或一个或多个异源核酸序列。

[0136] 所述重组核酸序列可以是优化的核酸序列。这样的优化可增强或改变抗体的结合,特别是生物学效应(包括中和作用)。优化还可改进转录和/或翻译。优化可包括以下的一个或多个方面:低GC含量的前导序列,以增加转录;mRNA稳定性和密码子优化;添加kozak序列(例如,GCC ACC)以增加翻译;添加编码信号肽的免疫球蛋白(Ig)前导序列;和尽可能消除顺式作用序列基序(即,内部TATA盒)。

[0137] a. 重组核酸序列构建体

[0138] 所述重组核酸序列可包括一个或多个重组核酸序列构建体。所述重组核酸序列构建体可包括在下文中更详细地描述的一个或多个组件。

[0139] 所述重组核酸序列构建体可包括编码重链多肽、其片段、其变体或其组合的异源核酸序列。所述重组核酸序列构建体可包括编码轻链多肽、其片段、其变体或其组合的异源核酸序列。所述重组核酸序列构建体还可包括编码蛋白酶或蛋白酶切割位点的异源核酸序列。所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个前导序列,其中每个前导序列编码信号肽。所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个启动子、一个或多个内含子、一个或多个转录终止区、一个或多个起始密码子、一个或多个终止密码子(termination or stop codon)和/或一个或多个多聚腺苷酸化信号。所述重组核酸序列构建体还可包括一个或多个接头或标签序列。所述标签序列可编码血凝素(HA)标签。

[0140] (1)重链多肽

[0141] 所述重组核酸序列构建体可包括编码重链多肽、其片段、其变体或其组合的异源核酸。所述重链多肽可包括可变重链(VH)区和/或至少一个恒定重链(CH)区。所述至少一个恒定重链区可包括恒定重链区1(CH1)、恒定重链区2(CH2)和恒定重链区3(CH3)和/或铰链区。

[0142] 在一些实施方案中,所述重链多肽可包括VH区和CH1区。在其它实施方案中,所述重链多肽可包括VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。

[0143] 所述重链多肽可包括互补决定区(“CDR”)组。所述CDR组可含有VH区的3个高变区。从重链多肽的N末端开始,这此CDR分别被命名为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。重链多肽的CDR1、CDR2和CDR3可促成抗原的结合或识别。

[0144] (2)轻链多肽

[0145] 所述重组核酸序列构建体可包括编码轻链多肽、其片段、其变体或其组合的异源核酸序列。所述轻链多肽可包括可变轻链(VL)区和/或恒定轻链(CL)区。

[0146] 所述轻链多肽可包括互补决定区(“CDR”)组。所述CDR组可含有VL区的3个高变区。从轻链多肽的N末端开始,这些CDR分别被命名为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。轻链多肽的CDR1、CDR2和CDR3可促成抗原的结合或识别。

[0147] (3)蛋白酶切割位点

[0148] 所述重组核酸序列构建体可包括编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列。所述蛋白酶切割位点可被蛋白酶或肽酶识别。所述蛋白酶可以是肽链内切酶或内切蛋白酶,例如但

不限于费林蛋白酶、弹性蛋白酶、HtrA、钙蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶。所述蛋白酶可以是费林蛋白酶。在其它实施方案中,所述蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、谷氨酸蛋白酶或切割内部肽键(即,不切割N末端或C末端肽键)的任何蛋白酶。

[0149] 所述蛋白酶切割位点可包括一个或多个促进或增强切割效率的氨基酸序列。所述一个或多个氨基酸序列可促进或增强形成或产生分离的多肽的效率。所述一个或多个氨基酸序列可包括2A肽序列。所述2A肽序列是来源于口蹄疫病毒(FMDV)的自我加工肽。

[0150] 在一些实施方案中,蛋白酶切割位点可包括弗林蛋白酶切割位点后随2A肽序列的组合(例如,融合物)。此类组合的实例可包括在排列2中,其在下文中进行了更详细地描述,并且可以见于例如图69A中。如在下文中更详细地论述的,弗林蛋白酶切割位点后随2A肽序列的该组合可位于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。因此,该组合允许在表达后重链多肽与轻链多肽至不同多肽内的分离,并且可有利于重链多肽和轻链多肽的等摩尔表达。

[0151] (4)接头序列

[0152] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个接头序列。所述接头序列可在空间上分离或连接一个或多个本文中描述的组件。在其它实施方案中,所述接头序列可编码在空间上分离或连接两个或更多个多肽的氨基酸序列。

[0153] (5)启动子

[0154] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个启动子。所述一个或多个启动子可以是能够驱动基因表达和调控基因表达的任何启动子。这样的启动子是经由DNA依赖性RNA聚合酶的转录所需的顺式作用序列元件。用于指导基因表达的启动子的选择取决于特定应用。可将启动子在重组核酸序列构建体中置于离转录起始位点与其在天然背景中离转录起始位点的距离相同的距离。然而,可接受该距离的变化而不丧失启动子功能。

[0155] 可将所述启动子有效地连接于编码重链多肽和/或轻链多肽的异源核酸序列。所述启动子可以是经显示对于在真核细胞中的表达是有效的启动子。有效地连接于编码序列的启动子可以是CMV启动子,来自猿猴病毒40(SV40)的启动子,诸如SV40早期启动子和SV40晚期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子诸如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复(LTR)启动子、莫洛尼病毒启动子(Moloney virus)、禽类白血病病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子诸如CMV立即早期启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein Barr virus,EBV)启动子或劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)启动子。所述启动子还可以是来自人基因诸如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸、人多角体蛋白或人金属硫蛋白的启动子。

[0156] 所述启动子可以是组成型启动子或诱导型启动子,所述诱导型启动子仅当宿主细胞被暴露于某些特定外部刺激时起始转录。在多细胞生物体的情况下,所述启动子还可于对特定的组织或器官或发育阶段是特异性的。所述启动子还可以是组织特异性启动子,诸如肌肉或皮肤特异性启动子(天然或合成的)。此类启动子的实例描述于美国专利申请公开号US20040175727(其内容以其整体并入本文)中。

[0157] 所述启动子可与增强子相联。增强子可位于编码序列的上游。所述增强子可以是人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或病毒增强子,诸如来自CMV、FMDV、RSV

或EBV的增强子。多核苷酸功能增强子描述于美国专利No.5,593,972、5,962,428和W094/016737(所述每一个专利或专利申请公开的内容通过引用完全并入)中。

[0158] (6)内含子

[0159] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个内含子。每一个内含子可包括功能剪接供体和受体位点。所述内含子可包括剪接的增强子。所述内含子可包括一个或多个有效剪接所需的信号。

[0160] (7)转录终止区

[0161] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个转录终止区。所述转录终止区可位于编码序列的下游以提供高效终止。所述转录终止区可获自与上述启动子相同的基因,或可获自一个或多个不同的基因。

[0162] (8)起始密码子

[0163] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个起始密码子。所述起始密码子可位于编码序列的上游。所述起始密码子可在具有编码序列的框内。所述起始密码子可与一个或多个有效翻译起始所需的信号,例如但不限于核糖体结合位点相关。

[0164] (9)终止密码子

[0165] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个终止密码子(termination or stop codon)。所述终止密码子可位于编码序列的下游。所述终止密码子可在具有编码序列的框内。所述终止密码子可与一个或多个有效翻译终止所需的信号相关。

[0166] (10)多聚腺苷酸化信号

[0167] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个多聚腺苷酸化信号。所述多聚腺苷酸化信号可包括转录物的有效多腺苷酸化所需的一个或多个信号。所述多聚腺苷酸化信号可位于编码序列的下游。所述多聚腺苷酸化信号可以是SV40多聚腺苷酸化信号、LTR多聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化信号、人生长激素(hGH)多聚腺苷酸化信号或人 β -珠蛋白多聚腺苷酸化信号。所述SV40多聚腺苷酸化信号可以是来自pCEP4质粒(Invitrogen, San Diego, CA)的多聚腺苷酸化信号。

[0168] (11)前导序列

[0169] 所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个前导序列。所述前导序列可编码信号肽。所述信号肽可以是免疫球蛋白(Ig)信号肽,例如但不限于IgG信号肽和IgE信号肽。

[0170] b. 重组核酸序列构建体的排列

[0171] 如上所述,所述重组核酸序列可包括一个或多个重组核酸序列构建体,其中每一个重组核酸序列构建体可包括一个或多个组件。所述一个或多个组件在上文中进行了详细描述。所述一个或多个组件,当包括在重组核酸序列构建体中时,可相对彼此以任意顺序排列。在一些实施方案中,可如下所述,在重组核酸序列构建体中排列所述一个或多个组件。

[0172] (1)排列1

[0173] 在一个排列中,第一重组核酸序列构建体可包括编码重链多肽的异源核酸序列,并且第二重组核酸序列构建体可包括编码轻链多肽的异源核酸序列。

[0174] 所述第一重组核酸序列构建体可被置于载体中。所述第二重组核酸序列构建体可被置于第二或单独的载体中。在下文中更详细地描述了将重组核酸序列构建体置于载体中。

[0175] 所述第一重组核酸序列构建体还可包括启动子、内含子、转录终止区、起始密码子、终止密码子和/或多聚腺苷酸化信号。所述第一重组核酸序列构建体还可包括前导序列,其中所述前导序列位于编码重链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。因此,由前导序列编码的信号肽可通过肽键连接至重链多肽。

[0176] 所述第二重组核酸序列构建体还可包括启动子、起始密码子、终止密码子和多聚腺苷酸化信号。所述第二重组核酸序列构建体还可包括前导序列,其中所述前导序列位于编码轻链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。因此,由前导序列编码的信号肽可通过肽键连接至轻链多肽。

[0177] 因此,排列1的一个实例包括编码包括VH和CH1的重链多肽的第一载体(和从而第一重组核酸序列构建体)和编码包括VL和CL的轻链多肽的第二载体(和从而第二重组核酸序列构建体)。排列1的第二实例可包括编码包括VH、CH1、铰链区、CH2和CH3的重链多肽的第一载体(和从而第一重组核酸序列构建体)和编码包括VL和CL的轻链多肽的第二载体(和从而第二重组核酸序列构建体)。

[0178] (2)排列2

[0179] 在第二排列中,所述重组核酸序列构建体可包括编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列。所述编码重链多肽的异源核酸序列可被置于编码轻链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。或者,所述编码轻链多肽的异源核酸序列可被置于编码重链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。

[0180] 所述重组核酸序列构建体可被置于下文中更详细描述载体中。

[0181] 所述重组核酸序列构建体可包括编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列和/或接头序列。如在上文中更详细地论述的,在一些实施方案中,蛋白酶切割位点可包括弗林蛋白酶切割位点后随2A肽序列的组合(例如,融合物),例如,如图69A中显示的。

[0182] 如果包括在所述重组核酸序列构建体中,则编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列可位于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。因此,所述蛋白酶切割位点允许重链多肽和轻链多肽在表达后分离为不同的多肽,并且可有利于重链和轻链多肽的等摩尔表达。

[0183] 在其它实施方案中,如果将接头序列包括在重组核酸序列构建体中,那么可将所述接头序列置于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0184] 所述重组核酸序列构建体还可包括启动子、内含子、转录终止区、起始密码子、终止密码子和/或多聚腺苷酸化信号。所述重组核酸序列构建体可包括一个或多个启动子。所述重组核酸序列构建体可包括2个启动子,以便一个启动子可与编码重链多肽的异源核酸序列相联,并且第二启动子可与编码轻链多肽的异源核酸序列相联。在其它实施方案中,所述重组核酸序列构建体可包括一个与编码重链多肽的异源核酸序列和编码轻链多肽的异源核酸序列相联的启动子。

[0185] 所述重组核酸序列构建体还可包括2个前导序列,其中第一前导序列位于编码重链多肽的异源核酸序列的上游(或5'),并且第二前导序列位于编码轻链多肽的异源核酸序列的上游(或5')。因此,由第一前导序列编码的第一信号肽可通过肽键连接于重链多肽并且由第二前导序列编码的第二信号肽可通过肽键连接于轻链多肽。

[0186] 因此,排列2的一个实例可包括编码包括VH和CH1的重链多肽和包括VL和CL的轻链

多肽的载体(和从而重组核酸序列构建体),其中接头序列位于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0187] 排列2的第二实例可包括编码包括VH和CH1的重链多肽和包括VL和CL的轻链多肽的载体(和从而重组核酸序列构建体),其中编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列位于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0188] 排列2的第三实例可包括编码包括VH、CH1、铰链区、CH2和CH3的重链多肽和包括VL和CL的轻链多肽的载体(和从而重组核酸序列构建体),其中接头序列位于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0189] 排列2的第四实例可包括编码包括VH、CH1、铰链区、CH2和CH3的重链多肽和包括VL和CL的轻链多肽的载体(和从而重组核酸序列构建体),其中编码蛋白酶切割位点的异源核酸序列位于编码重链多肽的异源核酸序列与编码轻链多肽的异源核酸序列之间。

[0190] c. 来自重组核酸序列构建体的表达

[0191] 如上所述,所述重组核酸序列构建体可,在一个或多个组分当中,包括编码重链多肽的异源核酸序列和/或编码轻链多肽的异源核酸序列。因此,所述重组核酸序列构建体可有利重链多肽和/或轻链多肽的表达。

[0192] 当使用如上所述的排列1时,所述第一重组核酸序列构建体可促进重链多肽的表达,并且所述第二重组核酸序列构建体可促进轻链多肽的表达。当使用如上所述的排列2时,所述重组核酸序列构建体可促进重链多肽和轻链多肽的表达。

[0193] 在例如但不限于细胞、生物体或哺乳动物中表达后,所述重链多肽和轻链多肽可装配成合成抗体。具体地,所述重链多肽和轻链多肽可彼此相互作用,以便装配产生能够结合所需靶分子,例如在下文中更详细地论述的抗原、配体(包括受体的配体)、受体(包括受体上的配体结合位点)、配体-受体复合物和标志物(包括癌症标志物)的合成抗体。在其它实施方案中,所述重链多肽和轻链多肽可彼此相互作用,以便装配产生相较于未如本文中所述装配的抗体在结合其靶分子上更有效的合成抗体。在一些实施方案中,重链多肽和轻链多肽可彼此相互作用,以便组装产生具有所需生物学效应例如中和、配体与受体的结合的抑制以及免疫细胞至被合成抗体靶向的细胞的募集的合成抗体。在其它实施方案中,所述重链多肽和轻链多肽可彼此相互作用,以便装配导致能够消除或诱发针对抗原的免疫应答的合成抗体。

[0194] d. 载体

[0195] 可将上述重组核酸序列构建体置于一个或多个载体中。所述一个或多个载体可含有复制起始点。所述一个或多个载体可以是质粒、噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。所述一个或多个载体可以是自主复制的染色体外载体,或整合进宿主基因组的载体。

[0196] 所述一个或多个载体可以是异源表达构建体,其通常是用于将特定基因引入靶细胞的质粒。一旦表达载体在细胞内,由所述重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽由细胞转录和翻译机器核糖体复合物产生。所述一个或多个载体可表达大量稳定的信使RNA,从而表达蛋白质。

[0197] (1)表达载体

[0198] 所述一个或多个载体可以是环状质粒或线性核酸。所述环状质粒和线性核酸能够在适当的主题细胞中指导特定核苷酸序列的表达。所述一个或多个包含重组核酸序列构建

体的载体可以是嵌合的,这意味着其组件的至少一个对于其至少一个其它组件是异源的。

[0199] (2)质粒

[0200] 所述一个或多个载体可以是质粒。所述质粒可用于用重组核酸序列构建体转染细胞。所述质粒可用于将所述重组核酸序列构建体引入受试者。所述质粒还可包含调控序列,其可非常适合用于在施用了质粒的细胞中进行基因表达。

[0201] 所述质粒还可包含哺乳动物复制起始点以在染色体外维持质粒并在细胞中产生多个拷贝的质粒。所述质粒可以是来自Invitrogen(San Diego,CA)的pVAX1、pCEP4或pREP4,所述质粒可包含爱泼斯坦-巴尔病毒复制起始点和细胞核抗原EBNA-1编码区,其可产生高拷贝附加型复制而无需整合。质粒的主链可以是pAV0242。所述质粒可以是复制缺陷型腺病毒5型(Ad5)质粒。

[0202] 所述质粒可以是pSE420(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可用于在大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E.coli*)中产生蛋白质。所述质粒还可以是p YES2(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可用于在酵母的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株中产生蛋白质。所述质粒还可以是MAXBAC™完全杆状病毒表达系统(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可用于在昆虫细胞中产生蛋白质。所述质粒还可以是pcDNA1或pcDNA3(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可用于在哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生蛋白质。

[0203] (3)环状和线性载体

[0204] 所述一个或多个载体可以是环状质粒,其可通过整合进细胞基因组转化靶细胞或存在于染色体外(例如,具有复制起始点的自主复制质粒)。所述载体可以是pVAX、pcDNA3.0或provax,或能够表达由所述重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽的任何其它表达载体。

[0205] 本文中还提供了能够经由电穿孔被有效地递送至受试者,并且表达由所述重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽的线性核酸或线性表达盒(“LEC”)。所述LEC可以是不存在任何磷酸主链的任何线性DNA。所述LEC可以不含任何抗生素抗性基因和/或磷酸主链。所述LEC可以不含与期望的基因表达无关的其它核酸序列。

[0206] 所述LEC可来源于能够被线性化的任何质粒。所述质粒可以能够表达由所述重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽。所述质粒可以是pNP(Puerto Rico/34)或pM2(New Caledonia/99)。所述质粒可以是WLV009、pVAX、pcDNA3.0或provax,或能够表达由所述重组核酸序列构建体编码的重链多肽和/或轻链多肽的任何其它表达载体。

[0207] 所述LEC可以是pcrM2。所述LEC可以是pcrNP。pcrNP和pcrMR可分别来源于pNP(Puerto Rico/34)和pM2(New Caledonia/99)。

[0208] (4)制备载体的方法

[0209] 本文中提供了用于制备一个或多个其中已放置了所述重组核酸序列构建体的载体的方法。在最终的亚克隆步骤后,可使用本领域已知的方法将所述载体用在大规模发酵罐中接种细胞培养物。

[0210] 在其它实施方案中,在最终的亚克隆步骤后,可将所述载体与一个或多个电穿孔(EP)装置一起使用。在下文中更详细地描述了EP装置。

[0211] 可使用已知的装置和技术的组合配制或制造所述一个或多个载体,但优选使用

2007年5月23日提交的批准的、共同未决的美国临时申请美国序列No.60/939,792中描述的质粒制造技术来制造它们。在一些实例中,可以以大于或等于10mg/mL的浓度配制本文中描述的DNA质粒。所述制造技术除了美国序列No.60/939792中描述的那些装置和方案(包括2007年7月3日提交的批准的专利、美国专利No.7,238,522中描述的那些装置和方案)之外,还包括或包含对于本领域普通技术人员来说是公知的各种装置和方案。以上提及的申请和专利(分别为美国序列No.60/939,792和美国专利No.7,238,522)在此整体并入。

[0212] 4. 抗体

[0213] 如上所述,所述重组核酸序列可编码抗体、其片段、其变体或其组合。所述抗体可结合所需靶分子或与其反应,所述靶分子可以是在下文中更详细地描述的抗原、配体(包括受体的配体)、受体(包括受体上的配体结合位点)、配体-受体复合物和标志物(包括癌症标志物)。

[0214] 所述抗体可包含分别插入重链和轻链框架(“FR”)组之间的重链和轻链互补决定区(“CDR”)组,所述框架组为CDR提供支持并且限定CDR相对于彼此的空间关系。所述CDR组可含有重链或轻链V区的3个高变区。从重链或轻链的N末端开始,这些区域被分别命名为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。抗原结合位点从而可包含6个CDR,包括来自每一个重链和轻链V区的CDR组。

[0215] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生几个片段,所述片段中的两个(F(ab)片段)各自包含共价异二聚体,所述共价异二聚体包含完整抗原结合位点。所述酶胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供几个片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。因此,所述抗体可以是Fab或F(ab')₂。所述Fab可包括重链多肽和轻链多肽。所述Fab的重链多肽可包括VH区和CH1区。所述Fab的轻链可包括VL区和CL区。

[0216] 所述抗体可以是免疫球蛋白(Ig)。所述Ig可以是例如IgA、IgM、IgD、IgE和IgG。所述免疫球蛋白可包括重链多肽和轻链多肽。所述免疫球蛋白的重链多肽可包括VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。所述免疫球蛋白的轻链多肽可包括VL区和CL区。

[0217] 所述抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。所述抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体或完全人抗体。所述人源化抗体可以是来自非人物种的结合期望的抗原的抗体,所述抗体具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0218] 所述抗体可以是如下文中更详细描述的双特异性抗体。所述抗体可以是也如下文中更详细描述的双功能抗体。

[0219] 如上所述,抗体可在向受试者施用组合物后在受试者中产生。所述抗体可在受试者内具有半衰期。在一些实施方案,可修饰所述抗体以延长或缩短其在受试者内的半衰期。此类修饰在下文中进行了更详细地描述。

[0220] a. 双特异性抗体

[0221] 重组核酸序列可编码双特异性抗体、其片段、其变体或其组合。双特异性抗体可结合两种抗原(例如在下文中更详细地描述的抗原中的两种抗原)或与所述两种抗原反应。双特异性抗体可由两种本文所述的抗体的片段组成,从而允许双特异性抗体结合两个所需靶分子或与两个所需靶分子反应,所述靶分子可包括在下文中进行更详细地描述的抗原、配体(包括受体的配体)、受体(包括受体上的配体结合位点)、配体-受体复合物以及标志物

(包括癌症标志物)。

[0222] b. 双功能抗体

[0223] 重组核酸序列可编码双功能抗体、其片段、其变体或其组合。双功能抗体可结合下述抗原或与其反应。还可修饰双功能抗体以赋予抗体除对抗原的识别和结合以外的另外的功能性。此类修饰可包括,但不限于,与因子H或其片段偶联。因子H是补体激活的可溶性调节剂并因此,可通过补体介导的裂解(CML)促成免疫应答。

[0224] c. 抗体半衰期的延长

[0225] 如上所述,可修饰抗体以延长或缩短抗体在受试者中的半衰期。所述修饰可延长或缩短抗体在受试者的血清中的半衰期。

[0226] 修饰可存在于抗体的恒定区中。修饰可以是抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸取代,所述取代相较于不含所述一个或多个氨基酸取代的抗体的半衰期延长抗体的半衰期。修饰可以是抗体的CH2结构域中的一个或多个氨基酸取代,所述取代相较于不含所述一个或多个氨基酸取代的抗体的半衰期延长抗体的半衰期。

[0227] 在一些实施方案中,恒定区中的一个或多个氨基酸取代可包括用酪氨酸残基替代恒定区中的甲硫氨酸残基、用苏氨酸残基替代恒定区中的丝氨酸残基、用谷氨酰胺残基替代恒定区中的苏氨酸残基,或其任意组合,从而延长抗体的半衰期。

[0228] 在其它实施方案中,恒定区中的一个或多个氨基酸取代可包括用酪氨酸残基替代CH2结构域中的甲硫氨酸残基、用苏氨酸残基替代CH2结构域中的丝氨酸残基、用谷氨酰胺残基替代CH2结构域中的苏氨酸残基,或其任意组合,从而延长抗体的半衰期。

[0229] 5. 抗原

[0230] 所述合成抗体针对抗原或其片段或变体。所述抗原可以是核酸序列、氨基酸序列或其组合。所述核酸序列可以是DNA、RNA、cDNA、其变体、其片段或其组合。所述氨基酸序列可以是蛋白质、肽、其变体、其片段或其组合。

[0231] 所述抗原可来自许多生物体,例如病毒、寄生虫、细菌、真菌或哺乳动物。所述抗原可与自身免疫性疾病、过敏症或哮喘相关。在其它实施方案中,所述抗原可与癌症、疱疹、流感、乙型肝炎、丙型肝炎、人乳头状瘤病毒(HPV)或人免疫缺陷病毒(HIV)相关。

[0232] 在一些实施方案中,所述抗原是外来的。在一些实施方案中,所述抗原是自体抗原。

[0233] a. 外来抗原

[0234] 在一些实施方案中,所述抗原是外来的。外来抗原是当被引入体内时,能够刺激免疫应答的任何非自身物质(即,来源于受试者外部)。

[0235] (1) 病毒抗原

[0236] 外来抗原可以是病毒抗原或其片段或其变体。所述病毒抗原可来自下列科之一的病毒:腺病毒科(Adenoviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、丝状病毒科(Filoviridae)、嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、乳多空病毒科(Papovaviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、细小病毒科(Parvoviridae)、微小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)、痘病毒科(Poxviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、逆转录病毒科

(Retroviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)或披膜病毒科(Togaviridae)。所述病毒抗原可来自人免疫缺陷病毒(HIV)、基孔肯雅热病毒(CHIKV)、登革热病毒、乳头状瘤病毒,例如人类乳头状瘤病毒(HPV)、脊髓灰质炎病毒、肝炎病毒,例如甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)和戊型肝炎病毒(HEV)、天花病毒(重型天花和类天花)、牛痘病毒、流感病毒、鼻病毒、马脑炎病毒、风疹病毒、黄热病毒、诺沃克病毒(Norwalk virus)、甲型肝炎病毒、人类T细胞白血病病毒(HTLV-I)、多毛细胞白血病病毒(HTLV-II)、加利福尼亚脑炎病毒、汉坦病毒(Hanta virus,出血热)、狂犬病病毒、埃博拉出血热病毒(Ebola fever virus)、马尔堡病毒(Marburg virus)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、单纯疱疹1(口腔疱疹)、单纯疱疹2(生殖器疱疹)、带状疱疹(水痘-带状疱疹,又名,水痘)、巨细胞病毒(CMV),例如人CMV、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、黄病毒、口蹄疫病毒、拉沙病毒、沙粒病毒或致癌病毒。

[0237] (a)人免疫缺陷病毒(HIV)抗原

[0238] 所述病毒抗原可来自人免疫缺陷病毒(HIV)病毒。在一些实施方案中,所述HIV抗原可以是亚型A包膜蛋白,亚型B包膜蛋白,亚型C包膜蛋白,亚型D包膜蛋白,亚型B Nef-Rev蛋白,Gag亚型A、B、C或D蛋白,MPol蛋白,Env A、Env B、Env C、Env D、B Nef-Rev、Gag的核酸或氨基酸序列或其任意组合。

[0239] 对于HIV是特异性的合成抗体可包括Fab片段,所述Fab片段包含由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的SEQ ID NO:48的氨基酸序列,和由SEQ ID NO:4的核酸序列编码的SEQ ID NO:49的氨基酸序列。所述合成抗体可包含由SEQ ID NO:6的核酸序列编码的SEQ ID NO:46的氨基酸序列,和由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的SEQ ID NO:47的氨基酸序列。所述Fab片段包含由SEQ ID NO:50的核酸序列编码的SEQ ID NO:51的氨基酸序列。所述Fab可包含由SEQ ID NO:52的核酸序列编码的SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0240] 对于HIV是特异性的合成抗体可包括包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的Ig。所述Ig可包含由SEQ ID NO:62的核酸序列编码的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。所述Ig可包含由SEQ ID NO:63的核酸序列编码的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。所述Ig可包含由SEQ ID NO:54的核酸序列编码的SEQ ID NO:55的氨基酸序列,和由SEQ ID NO:56的核酸序列编码的SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0241] (b)基孔肯雅热病毒

[0242] 所述病毒抗原可来自基孔肯雅热病毒。基孔肯雅热病毒属于披膜病毒科的 α 病毒属。基孔肯雅热病毒通过感染的蚊子(例如伊蚊属(Aedes))叮咬传播给人。

[0243] 在一个实施方案中,对于CHIKV特异的合成抗体可由重组核酸序列编码,所述重组核酸序列包括如上文中更详细描述的安排1中的第一和第二重组核酸构建体。对于CHIKV特异性的合成抗体可包括Fab片段,所述Fab片段包含由SEQ ID NO:58的核酸序列编码的SEQ ID NO:59的氨基酸序列,和由SEQ ID NO:60的核酸序列编码的SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0244] 在另一个实施方案中,对于CHIKV特异的合成抗体可由重组核酸序列编码,所述重组核酸序列包括如上文中更详细描述的安排2中的重组核酸构建体。对于CHIKV特异的合成抗体可包括包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的免疫球蛋白(Ig),所述SEQ ID NO:66的氨基酸序列由SEQ ID NO:65的核酸序列编码。

[0245] 对于CHIKV特异的合成抗体可提供免受早期和晚期对CHIKV的暴露的侵害的保护。对于CHIKV特异的合成抗体可提供免受多个不同途径(例如,但不限于,皮下或鼻内途径)的对CHIKV的暴露的侵害的保护。对于CHIKV特异的合成抗体可提供免受CHIKV感染的保护,从而导致所述感染的存活。

[0246] (c)登革热病毒

[0247] 所述病毒抗原可来自登革热病毒。所述登革热病毒抗原可以是形成病毒颗粒的3种蛋白或多肽(C、prM和E)之一。所述登革热病毒抗原可以是参与病毒的复制的7种其它蛋白或多肽(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)之一。所述登革热病毒可以是所述病毒的5个菌株或血清型之一,包括DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4。所述抗原可以是多种登革热病毒抗原的任意组合。

[0248] 在一个实施方案中,DENV的合成抗体可由重组核酸序列编码,所述重组核酸序列包括如上文中更详细地描述的排列2中的重组核酸构建体。对于登革热病毒是特异性的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:44的核酸序列编码的SEQ ID NO:45的氨基酸序列的Ig。在另一个实施方案中,对于登革热病毒特异的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:67的核酸序列编码的SEQ ID NO:68的氨基酸序列的Ig。在另一个实施方案中,对于登革热病毒特异的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:71的核酸序列编码的SEQ ID NO:72的氨基酸序列的Ig。在另一个实施方案中,对于登革热病毒特异的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:75的核酸序列编码的SEQ ID NO:76的氨基酸序列的Ig。

[0249] 在一些实施方案中,对于登革热病毒特异的合成抗体可包括一个或多个减少或阻止抗体对FcγR1a的结合的氨基酸取代。所述一个或多个氨基酸取代可存在于抗体的恒定区中。所述一个或多个氨基酸取代可包括在抗体的恒定区中用丙氨酸残基替代亮氨酸残基,即在本文中也称为LA、LA突变或LA取代。所述一个或多个氨基酸取代可包括在抗体的恒定区中各自用丙氨酸残基替代两个亮氨酸残基,在本文中也称为LALA、LALA突变或LALA取代。LALA取代的存在可阻止或阻断抗体结合FcγR1a,从而,所述抗体不增强或引起ADE,但仍然中和DENV。

[0250] 在一些实施方案中,对于登革热病毒特异的并且含有LALA取代的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:69的核酸序列编码的SEQ ID NO:70的氨基酸序列的Ig。在其它实施方案中,对于登革热病毒特异的并且含有LALA取代的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:73的核酸序列编码的SEQ ID NO:74的氨基酸序列的Ig。在其它实施方案中,对于登革热病毒特异的并且含有LALA取代的合成抗体可包括包含由SEQ ID NO:77的核酸序列编码的SEQ ID NO:78的氨基酸序列的Ig。

[0251] 在一些实施方案中,对于登革热病毒特异的合成抗体可以是抗-登革热抗体,例如两种或更多种,三种或更多种,或四种或更多种抗体的组合。此类组合可提供多个血清型的DENV的中和。

[0252] (d)肝炎抗原

[0253] 所述病毒抗原可包括肝炎病毒抗原(即,肝炎抗原)或其片段或其变体。所述肝炎抗原可以是来自甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)和/或戊型肝炎病毒(HEV)的一种或多种的抗原或免疫原。

[0254] 所述肝炎抗原可以是来自HAV的抗原。所述肝炎抗原可以是HAV衣壳蛋白、HAV非结

构蛋白、其片段、其变体或其组合。

[0255] 所述肝炎抗原可以是来自HCV的抗原。所述肝炎抗原可以是HCV核衣壳蛋白(即,核心蛋白)、HCV包膜蛋白(例如,E1和E2)、HCV非结构蛋白(例如,NS1、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a和NS5b)、其片段、其变体或其组合。

[0256] 所述肝炎抗原可以是来自HDV的抗原。所述肝炎抗原可以是HDV δ 抗原、其片段或其变体。

[0257] 所述肝炎抗原可以是来自HEV的抗原。所述肝炎抗原可以是HEV衣壳蛋白、其片段或其变体。

[0258] 所述肝炎抗原可以是来自HBV的抗原。所述肝炎抗原可以是HBV核心蛋白、HBV表面蛋白、HBV DNA聚合酶、由基因X编码的HBV蛋白、其片段、其变体或其组合。所述肝炎抗原可以是HBV基因型A核心蛋白、HBV基因型B核心蛋白、HBV基因型C核心蛋白、HBV基因型D核心蛋白、HBV基因型E核心蛋白、HBV基因型F核心蛋白、HBV基因型G核心蛋白、HBV基因型H核心蛋白、HBV基因型A表面蛋白、HBV基因型B表面蛋白、HBV基因型C表面蛋白、HBV基因型D表面蛋白、HBV基因型E表面蛋白、HBV基因型F表面蛋白、HBV基因型G表面蛋白、HBV基因型H表面蛋白、其片段、其变体或其组合。

[0259] 在一些实施方案中,所述肝炎抗原可以是来自HBV基因型A、HBV基因型B、HBV基因型C、HBV基因型D、HBV基因型E、HBV基因型F、HBV基因型G或HBV基因型H的抗原。

[0260] (e)人乳头状瘤病毒(HPV)抗原

[0261] 所述病毒抗原可包括来自HPV的抗原。所述HPV抗原可来自HPV型16、18、31、33、35、45、52和58,其引起宫颈癌、直肠癌和/或其它癌症。所述HPV抗原可来自HPV 6型和11型,其可引起生殖器疣,并且已知是头颈癌的病因。

[0262] 所述HPV抗原可以是来自每一个HPV型的HPV E6或E7结构域。例如,对于HPV 16型(HPV16),所述HPV16抗原可包括HPV16E6抗原、HPV16E7抗原、其片段、变体或组合。类似地,所述HPV抗原可以是HPV 6E6和/或E7、HPV 11E6和/或E7、HPV 18E6和/或E7、HPV 31E6和/或E7、HPV 33E6和/或E7、HPV 52E6和/或E7或HPV 58E6和/或E7、其片段、变体或组合。

[0263] (f)RSV抗原

[0264] 所述病毒抗原可包括RSV抗原。所述RSV抗原可以是人RSV融合蛋白(在本文中也被称为“RSV F”、“RSV F蛋白”和“F蛋白”)或其片段或变体。所述人RSV融合蛋白在RSV亚型A与B之间可能是保守的。RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23994.1)的RSV F蛋白或其片段或变体。RSV抗原可以是来自RSV A2株(GenBank AAB59858.1)的RSV F蛋白,或其片段或变体。RSV抗原可以是RSV F蛋白或其片段或变体的单体、二聚体或三聚体。

[0265] 所述RSV F蛋白可以融合前形式或融合后形式存在。RSV F的融合后形式在经免疫的动物中引发高滴度中和抗体,并且保护动物免受RSV攻击。

[0266] 所述RSV抗原还可以是人RSV附着糖蛋白(在本文中也被称为“RSV G”、“RSV G蛋白”和“G蛋白”),或其片段或变体。所述人RSV G蛋白在RSV亚型A与B之间不同。所述抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23993)的RSV G蛋白,或其片段或变体。所述RSV抗原可以是来自RSV亚型B分离株H5601、RSV亚型B分离株H1068、RSV亚型B分离株H5598、RSV亚型B分离株H1123的RSV G蛋白,或其片段或变体。

[0267] 在其它实施方案中,RSV抗原可以是人RSV非结构蛋白1(“NS1蛋白”),或其片段或

变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23987.1)的RSV NS1蛋白,或其片段或变体。人RSV抗原还可以是RSV非结构蛋白2(“NS2蛋白”),或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23988.1)的RSV NS2蛋白,或其片段或变体。RSV抗原还可以是人RSV核衣壳(“N”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23989.1)的RSV N蛋白,或其片段或变体。RSV抗原可以是人RSV磷蛋白(“P”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23990.1)的RSV P蛋白,或其片段或变体。RSV抗原还可以是人RSV基质蛋白(“M”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23991.1)的RSV M蛋白,或其片段或变体。

[0268] 在其它实施方案中,RSV抗原可以是人RSV小疏水(“SH”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23992.1)的RSV SH蛋白,或其片段或变体。RSV抗原还可以是人RSV基质蛋白2-1(“M2-1”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23995.1)的RSV M2-1蛋白,或其片段或变体。RSV抗原还可以是人RSV基质蛋白2-2(“M2-2”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23997.1)的RSV M2-2蛋白,或其片段或变体。人RSV抗原可以是RSV聚合酶L(“L”)蛋白,或其片段或变体。例如,RSV抗原可以是来自RSV Long株(GenBank AAX23996.1)的RSV L蛋白,或其片段或变体。

[0269] 在其它实施方案中,RSV抗原可具有NS1、NS2、N、P、M、SH、M2-1、M2-2或L蛋白的优化的氨基酸序列。RSV抗原可以是人RSV蛋白或重组抗原,诸如由人RSV基因组编码的蛋白的任一种。

[0270] 在其它实施方案中,RSV抗原可以是但不限于来自RSV Long株的RSV F蛋白、来自RSV Long株的RSV G蛋白、优化的氨基酸RSV G氨基酸序列、RSV Long株的人RSV基因组、优化的氨基酸RSV F氨基酸序列、来自RSV Long株的RSV NS1蛋白、来自RSV Long株的RSV NS2蛋白、来自RSV Long株的RSV N蛋白、来自RSV Long株的RSV P蛋白、来自RSV Long株的RSV M蛋白、来自RSV Long株的RSV SH蛋白、来自RSV Long株的RSV M2-1蛋白、来自RSV Long株的RSV M2-2蛋白、来自RSV Long株的RSV L蛋白、来自RSV亚型B分离株H5601的RSV G蛋白、来自RSV亚型B分离株H1068的RSV G蛋白、来自RSV亚型B分离株H5598的RSV G蛋白、来自RSV亚型B分离株H1123的RSV G蛋白或其片段或其变体。

[0271] (g)流感抗原

[0272] 病毒抗原可包括来自流感病毒的抗原。流感抗原是能够引发哺乳动物中的针对一个或多个流感血清型的免疫应答的那些抗原。所述抗原可包括全长翻译产物HA0、亚单位HA1、亚单位HA2、其变体、其片段或其组合。流感血凝素抗原可来源于甲型流感血清型H1、血清型H2的多个病毒株、来源于不同组的甲型流感血清型H1的多个病毒株或来源于乙型流感的多个病毒株的杂交序列。流感血凝素抗原可来自乙型流感。

[0273] 流感抗原还可含有至少一种抗原表位,所述表位可有效地抗可针对其引发免疫应答的特定流感免疫原。所述抗原可提供存在于完整流感病毒中的免疫原性位点和表位的完整库。所述抗原可来源于来自一个血清型的多个甲型流感病毒株(诸如血清型H1或血清型H2的多个甲型流感病毒株)的血凝素抗原序列。所述抗原可以通过合并两个不同血凝素抗原序列或其部分衍生的杂交血凝素抗原序列。两个不同血凝素抗原序列的每一个可来源

于不同组的一个血清型的多个甲型流感病毒株诸如血清型H1的多个甲型流感病毒株。所述抗原可以是来源于来自多个乙型流感病毒株的血凝素抗原序列的血凝素抗原序列。

[0274] 在一些实施方案中,流感抗原可以是H1HA、H2HA、H3HA、H5HA或BHA抗原。

[0275] (h)埃博拉病毒

[0276] 病毒抗原可来自埃博拉病毒。埃博拉病毒病(EVD)或埃博拉出血热(EHF)包括5种已知的埃博拉病毒中的4种的任一种,包括本迪布焦病毒(Bundibugyo virus,BDBV)、埃博拉病毒(EBOV)、苏丹病毒(Sudan virus,SUDV)及塔伊病毒(Tai Forest virus,TAFV,也被称为科特迪瓦埃博拉病毒(象牙海岸埃博拉病毒,CIEBOV))。

[0277] (2)细菌抗原

[0278] 外来抗原可以是细菌抗原或其片段或变体。所述细菌可来自下列门的任一个:酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、产水菌门(Aquificae)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、嗜热丝菌门(Caldiseptica)、衣原体门(Chlamydiae)、绿菌门(Chlorobi)、绿弯菌门(Chloroflexi)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、网团菌门(Dictyoglomi)、迷踪菌门(Elusimicrobia)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、互养菌门(Synergistetes)、软壁菌门(Tenericutes)、热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria)、热袍菌门(Thermotogae)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。

[0279] 细菌可以是革兰阳性细菌或革兰阴性细菌。细菌可以是好氧细菌或厌氧细菌。细菌可以是自养细菌或异养细菌。细菌可以是嗜温菌、嗜中性菌、嗜极菌、嗜酸菌、嗜碱菌、嗜热菌、嗜冷菌、嗜盐菌或嗜高渗菌。

[0280] 细菌可以是炭疽杆菌(anthrax bacterium)、耐抗生素细菌、致病菌、食物中毒细菌、感染性细菌、沙门菌属(Salmonella)细菌、葡萄球菌属(Staphylococcus)细菌、链球菌属(Streptococcus)细菌或破伤风(tetanus)细菌。该细菌可以是分枝杆菌属生物(myco bacteria)、破伤风梭菌(Clostridium tetani)、鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)(MRSA)或艰难梭菌(Clostridium difficile)。细菌可以结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)。

[0281] (a)结核分枝杆菌抗原

[0282] 细菌抗原可以是结核分枝杆菌抗原(即,TB抗原或TB免疫原),或其片段或其变体。TB抗原可来自TB抗原的Ag85家族,例如,Ag85A和Ag85B。TB抗原可来自TB抗原的Esx家族,例如,EsxA、EsxB、EsxC、EsxD、EsxE、EsxF、EsxH、EsxO、EsxQ、EsxR、EsxS、EsxT、EsxU、EsxV和EsxW。

[0283] (3)寄生虫抗原

[0284] 外来抗原可以是寄生虫抗原,或其片段或变体。寄生虫可以是原生动物、蠕虫或体外寄生虫。蠕虫(helminth)(即,蠕虫(worm))可以是扁虫(例如,吸虫和绦虫)、棘头蠕虫或蛔虫(例如,蛲虫)。体外寄生虫可以是虱子、跳蚤、蜱和螨虫。

[0285] 寄生虫可以是引起下列疾病的任一种的任何寄生虫：棘阿米巴角膜炎、阿米巴病、蛔虫病、巴贝虫病、小袋虫病、浣熊蛔虫病(Baylisascariasis)、南美锥虫病、华支睾吸虫病、锥蝇(Cochliomyia)、隐孢子虫病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、棘球蚴病、象皮肿、蛲虫病、片形吸虫病、姜片虫病、丝虫病、贾第虫病、颚口线虫病、膜壳绦虫病、等孢子球虫病、片山热、利什曼病、莱姆病(Lyme disease)、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、疥疮、血吸虫病、昏睡病、类圆线虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形体病、旋毛虫病和鞭虫病。

[0286] 寄生虫可以是棘阿米巴属(Acanthamoeba)、异尖属(Anisakis)、蛔虫(Ascaris lumbricoides)、马蝇(Botfly)、结肠小袋纤毛虫(Balantidium coli)、臭虫(Bedbug)、多节绦虫亚纲(Cestoda)(绦虫)、恙螨(Chiggers)、锥形蛆蝇(Cochliomyia hominivorax)、痢疾阿米巴(Entamoeba histolytica)、肝片形吸虫(Fasciola hepatica)、兰伯贾第虫(Giardia lamblia)、钩虫、利什曼原虫属(Leishmania)、锯齿状舌形虫(Linguatula serrata)、肝吸虫(Liver fluke)、罗阿丝虫(Loa loa)、并殖吸虫属(Paragonimus)-肺吸虫、蛲虫、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、血吸虫属、粪类圆线虫(Strongyloides stercoralis)、螨、绦虫、刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)、锥虫属(Trypanosoma)、鞭虫或班氏吴策线虫(Wuchereria bancrofti)。

[0287] (a)疟疾抗原

[0288] 外来抗原可以是疟疾抗原(即,PF抗原或PF免疫原)、或其片段或其变体。所述抗原可来自引发疟疾的寄生虫。引发疟疾的寄生虫可以是恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)。恶性疟原虫抗原可包括环孢子(CS)抗原。

[0289] 在一些实施方案中,疟疾抗原可以是恶性疟原虫(P.falciparum)免疫原CS、LSA1、TRAP、CelTOS和Ama1之一。免疫原可以是全长蛋白的全长或免疫原性片段。

[0290] 在其它实施方案中,疟疾抗原可以是也被称为SSP2的TRAP。在其它实施方案中,疟疾抗原可以是也被称为Ag2并且是高度保守的疟原虫属抗原的CelTOS。在其它实施方案中,疟疾抗原可以是高度保守的疟原虫属抗原的Ama1。在一些实施方案中,疟疾抗原可以是CS抗原。

[0291] 在其它实施方案中,疟疾抗原可以是包含本文中所示的PF蛋白的两种或更多种的组合的融合蛋白。例如,融合蛋白可包含彼此直接邻接或通过之间的间隔子或一个或多个氨基酸连接的CS免疫原、ConLSA1免疫原、ConTRAP免疫原、ConCelTOS免疫原和ConAma1免疫原的两个或更多个免疫原。在一些实施方案中,融合蛋白包含2个PF免疫原;在一些实施方案中,融合蛋白包含3个PF免疫原,在一些实施方案中融合蛋白包含4个PF免疫原,以及在一些实施方案中融合蛋白包含5个PF免疫原。具有2个PF免疫原的融合蛋白可包含:CS和LSA1;CS和TRAP;CS和CelTOS;CS和Ama1;LSA1和TRAP;LSA1和CelTOS;LSA1和Ama1;TRAP和CelTOS;TRAP和Ama1;或CelTOS和Ama1。具有3个PF免疫原的融合蛋白可包含:CS、LSA1和TRAP;CS、LSA1和CelTOS;CS、LSA1和Ama1;LSA1、TRAP和CelTOS;LSA1、TRAP和Ama1;或TRAP、CelTOS和Ama1。具有4个PF免疫原的融合蛋白可包含:CS、LSA1、TRAP和CelTOS;CS、LSA1、TRAP和Ama1;CS、LSA1、CelTOS和Ama1;CS、TRAP、CelTOS和Ama1;或LSA1、TRAP、CelTOS和Ama1。具有5个PF免疫原的融合蛋白可包含CS或CS-alt、LSA1、TRAP、CelTOS和Ama1。

[0292] (4)真菌抗原

[0293] 外来抗原可以是真菌抗原,或其片段或变体。真菌可以是曲霉菌属(Aspergillus)

各种、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、念珠菌属(*Candida*)酵母(例如,白色念珠菌(*Candida albicans*))、球孢子菌属(*Coccidioides*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*)、表皮寄生菌(dermatophyte)、镰刀菌属(*Fusarium*)各种,荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、毛霉菌亚门(*Mucoromycotina*)、杰氏肺囊虫肺炎(*Pneumocystis jirovecii*)、申克氏孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)、突脐蠕孢属(*Exserohilum*)或枝孢属(*Cladosporium*)。

[0294] b. 自体抗原

[0295] 在一些实施方案中,抗原是自体抗原。自体抗原可以是受试者自己身体的能够刺激免疫应答的成分。在一些实施方案中,除非受试者处于疾病状态,例如自身免疫性疾病,否则自体抗原不激发免疫应答。

[0296] 自体抗原可包括但不限于细胞因子、抗病毒诸如上文中所列的那些病毒(包括HIV和登革热)的抗体、影响癌症进展或发展的抗原以及细胞表面受体或跨膜蛋白。

[0297] (1) WT-1

[0298] 自体抗原可以是维尔姆斯肿瘤(Wilm's tumor)抑制基因1(WT1)、其片段、其变体或其组合。WT1是在N末端上含有富含脯氨酸/谷氨酰胺的DNA结合结构域和在C末端上含有4个锌指基序的转录因子。WT1在泌尿生殖系统的正常发育中起着作用,并且与许多因子例如,p53(一种已知的肿瘤抑制基因)和丝氨酸蛋白酶HtrA2(其可在用细胞毒性药物处理后在多个位点上切割WT1)相互作用。WT1的突变可导致肿瘤或癌症形成,例如,维尔姆斯肿瘤或表达WT1的肿瘤。

[0299] (2) EGFR

[0300] 自体抗原可包括表皮生长因子受体(EGFR)或其片段或变体。EGFR(也被称为ErbB-1和HER1)是细胞外蛋白配体的表皮生长因子家族(EGF-家族)的成员的细胞表面受体。EGFR是受体的ErbB家族的成员,其包括4个密切相关的受体酪氨酸激酶:EGFR(ErbB-1)、HER2/c-neu(ErbB-2)、Her 3(ErbB-3)和Her 4(ErbB-4)。影响EGFR表达或活性的突变可导致癌症。

[0301] 抗原可包括ErbB-2抗原。Erb-2(人表皮生长因子受体2)也被称为Neu、HER2、CD340(分化簇340)或p185,并且由ERBB2基因编码。已显示该基因的扩增或过表达在某些侵袭性类型的乳腺癌的发展和进展中起作用。在大约25-30%的患有乳腺癌的妇女中,在ERBB2基因中发生遗传改变,这导致在肿瘤细胞表面上增加的量的HER2的产生。HER2的该过表达促进快速细胞分裂,从而HER2标志肿瘤细胞。

[0302] 对于HER2是特异性的合成抗体可包括Fab片段,所述Fab片段包含由SEQ ID NO:40的核酸序列编码的SEQ ID NO:41的氨基酸序列,和由SEQ ID NO:42的核酸序列编码的SEQ ID NO:43的氨基酸序列。

[0303] (3) 可卡因

[0304] 自体抗原可以是可卡因受体抗原。可卡因受体包括多巴胺转运蛋白。

[0305] (4) PD-1

[0306] 自体抗原可包括程序化死亡1(PD-1)。程序化死亡1(PD-1)及其配体PD-L1和PD-L2,递送调控T细胞活化、耐受性与免疫病理学之间的平衡的抑制性依赖。PD-1为288个氨基酸的细胞表面蛋白分子,其包括细胞外IgV结构域,随后的跨膜区和细胞内尾。

[0307] (5) 4-1BB

[0308] 自体抗原可包括4-1BB配体。4-1BB配体是属于TNF超家族的2型跨膜糖蛋白。4-1BB配体可在活化的T淋巴细胞上表达。4-1BB是活化诱导的T细胞共刺激分子。经由4-1BB的信号传导上调存活基因,增强细胞分裂,诱发细胞因子产生,和阻止T细胞中活化诱发的细胞死亡。

[0309] (6)CTLA4

[0310] 自体抗原可包括CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4),也称为CD152(分化簇152)。CTLA-4是在T细胞表面上发现的蛋白质受体,其导致对抗原的细胞免疫攻击。所述抗原可以是CTLA-4的片段,诸如细胞外V结构域、跨膜结构域和细胞质尾或其组合。

[0311] (7)IL-6

[0312] 自体抗体可包括白细胞介素6(IL-6)。IL-6刺激许多疾病包括但不限于糖尿病、动脉粥样硬化、抑郁症、阿尔茨海默氏病、全身性红斑狼疮、多发性骨髓瘤、癌症、白塞氏病(Behcet's)和类风湿性关节炎的炎性和自身免疫过程。

[0313] (8)MCP-1

[0314] 自体抗原可包括单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)。MCP-1也被称为趋化因子(C-C基序)配体2(CCL2)或小可诱导细胞因子A2。MCP-1是属于CC趋化因子家族的细胞因子。MCP-1招募单核细胞、记忆T细胞和树突状细胞至由组织损伤或感染产生的炎症位点。

[0315] (9)淀粉样蛋白 β

[0316] 自体抗原可包括淀粉样蛋白 β (A β)或其片段或变体。A β 抗原可包含A β (X-Y)肽,其中所述氨基酸序列来自人序列A β 蛋白的氨基酸位置X至氨基酸Y(包括X和Y),特别是氨基酸序列DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIV的氨基酸位置X至氨基酸位置Y(对应于氨基酸位置1至47;人查询序列)的氨基酸序列或其变体。A β 抗原可包含A β (X-Y)多肽的A β 多肽,其中X可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或32并且Y可以是47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16或15。A β 多肽可包含为至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少30、至少35、至少36、至少37、至少38、至少39、至少40、至少41、至少42、至少43、至少44、至少45或至少46个氨基酸的片段。

[0317] (10)IP-10

[0318] 自体抗原可包括干扰素(IFN)- γ -诱发的蛋白10(IP-10)。IP-10也被称为小可诱导的细胞因子B10或C-X-C基序趋化因子10(CXCL10)。CXCL10由几个细胞类型诸如单核细胞、内皮细胞和成纤维细胞响应IFN- γ 而分泌。

[0319] (11)PSMA

[0320] 自体抗原可包括前列腺特异性膜抗原(PSMA)。PSMA也被称为谷氨酸羧肽酶II(GCPII)、N-乙酰基-L-天冬氨酰基-L-谷氨酸肽酶I(NAALAD酶I)、NAAG肽酶或叶酸水解酶(FOLH)。PSMA是由前列腺癌细胞高度表达的膜内在蛋白。

[0321] c. 其它抗原

[0322] 在一些实施方案中,抗原是除外来抗原和/或自体抗原外的抗原。

[0323] (a)HIV-1VRC01

[0324] 另一种抗原可以是HIV-1VRC01。HIV-1VRC01是HIV的中和CD4-结合位点-抗体。

HIV-1VCR01接触包括在HIV-1的gp120环D、CD4结合环和V5区域内的HIV-1的部分。

[0325] (b)HIV-1PG9

[0326] 另一种抗原可以是HIV-1PG9。HIV-1PG9是聚糖依赖性人抗体的扩大的家族的创立成员,其优先结合HIV(HIV-1)包膜(Env)糖蛋白(gp)三聚体并且广泛地中和病毒。

[0327] (c)HIV-1 4E10

[0328] 另一种抗原可以是HIV-1 4E10。HIV-1 4E10是中和抗-HIV抗体。HIV-1 4E10针对定位至HIV-1的近膜端外部区(MPER)的线性表位,该表位位于gp41胞外域的C末端。

[0329] (d)DV-SF1

[0330] 另一种抗原可以是DV-SF1。DV-SF1是结合4种登革热病毒血清型的包膜蛋白的中和抗体。

[0331] (e)DV-SF2

[0332] 另一种抗原可以是DV-SF2。DV-SF2是结合登革热病毒表位的中和抗体。DV-SF2对于DENV4血清型可以是特异性的。

[0333] (f)DV-SF3

[0334] 另一种抗原可以是DV-SF3。DV-SF3是结合登革热病毒包膜蛋白的EDIII A链的中和抗体。

[0335] 6.组合物的赋形剂和其它组分

[0336] 组合物还可包含药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂可以是功能性分子诸如媒介物、载体或稀释剂。药学上可接受的赋形剂可以是转染促进剂,其可包括表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCMS)、弗氏不完全佐剂(Freunds incomplete adjuvant), LPS类似物,包括单磷酸脂质A、胞壁酰肽、醌类似物、囊泡诸如角鲨烯和角鲨烯、透明质酸、脂质、脂质体、钙离子、病毒蛋白、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒,或其它已知的转染促进剂。

[0337] 转染促进剂是多聚阴离子、多聚阳离子,包括聚-L-谷氨酸(LGS)或脂质。转染促进剂是聚-L-谷氨酸,并且所述聚-L-谷氨酸可以以低于6mg/ml的浓度存在于组合物中。转染促进剂还可包括表面活性剂诸如免疫刺激复合物(ISCMS)、弗氏不完全佐剂, LPS类似物,包括单磷酸脂质A、胞壁酰肽、醌类似物和囊泡诸如角鲨烯和角鲨烯,并且还可将透明质酸与组合物结合施用。所述组合物还可包括转染促进剂,诸如脂质、脂质体,包括卵磷脂脂质体或本领域中已知的其它脂质体,作为DNA-脂质体混合物(参见例如W09324640)、钙离子、病毒蛋白质、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒,或其它已知的转染促进剂。转染促进剂是聚阴离子、聚阳离子,包括聚-L-谷氨酸(LGS)或脂质。疫苗中的转染剂的浓度低于4mg/ml、低于2mg/ml、低于1mg/ml、低于0.750mg/ml、低于0.500mg/ml、低于0.250mg/ml、低于0.100mg/ml、低于0.050mg/ml或低于0.010mg/ml。

[0338] 组合物还可包含1994年4月1日提交的美国序列No.021,579(其通过引用完全并入)中描述的基因促进剂。

[0339] 组合物可以以约1纳克至100毫克、约1微克至约10毫克,或优选地约0.1微克至约10毫克,或更优选约1毫克至约2毫克的量包含DNA。在一些优选实施方案中,根据本发明的组合物包含约5纳克至约1000微克的DNA。在一些优选实施方案中,组合物可含有约10纳克至约800微克DNA。在一些优选实施方案中,组合物可含有约0.1至约500微克的DNA。在一些

优选实施方案中,组合物可含有约1至约350微克的DNA。在一些优选实施方案中,组合物可含有约25至约250微克、约100至约200微克、约1纳克至100毫克、约1微克至约10毫克、约0.1微克至约10毫克、约1毫克至约2毫克、约5纳克至约1000微克、约10纳克至约800微克、约0.1至约500微克、约1至约350微克、约25至约250微克、约100至约200微克的DNA。

[0340] 可按照待使用的施用模式配制组合物。可注射药物组合物可以是无菌、无热原和无颗粒的。可使用等渗制剂或溶液。用于等渗性的添加剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇和乳糖。所述组合物可包含血管收缩剂。等渗溶液可包括磷酸盐缓冲盐溶液。组合物还可包含稳定剂,包括明胶和白蛋白。稳定剂可使得制剂在室温或环境温度长时间稳定,包括LGS或聚阳离子或聚阴离子。

[0341] 7.产生合成抗体的方法

[0342] 本发明还涉及产生合成抗体的方法。所述方法可包括通过使用下文中更详细地描述的递送方法向有此需要的受试者施用组合物。因此,在向受试者施用组合物后在受试者中或体内产生合成抗体。

[0343] 所述方法还可包括将组合物引入一个或多个细胞,从而可在一个或多个细胞中产生或生成合成抗体。所述方法还可包括将组合物引入一个或多个组织,例如但不限于皮肤和肌肉,从而可在一个或多个组织中产生或生成合成抗体。

[0344] 8.鉴定或筛选抗体的方法

[0345] 本发明还涉及鉴定和筛选上述抗体的方法,所述抗体与本文中描述的抗原反应或结合。鉴定或筛选抗体的方法可使用本领域技术人员已知的鉴定和筛选抗体的方法中的抗原。这类方法可包括但不限于从文库选择抗体(例如,噬菌体展示)和免疫动物,随后分离和/或纯化抗体。

[0346] 9.组合物的递送方法

[0347] 本发明还涉及将组合物递送至有此需要的受试者的方法。所述递送方法可包括向受试者施用组合物。施用可包括但不限于通过和不通过体内电穿孔的DNA注射、脂质体介导的递送和纳米颗粒促进的递送。

[0348] 接受组合物的递送的哺乳动物可以是人、灵长类动物、非人灵长类动物、母牛、牛、绵羊、山羊、羚羊、野牛、水牛、野牛、牛科动物、鹿、刺猬、大象、骆驼、羊驼、小鼠、大鼠和鸡。

[0349] 组合物可以通过不同的途径(包括口服、肠胃外、舌下、经皮、经直肠、经粘膜、局部、经由吸入、经颊施用、胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鼻内鞘内和关节内或其组合)施用。对于兽医学用途,可按照正常兽医实践以适当地可接受的制剂施用组合物。兽医可以容易地确定最适合于特定动物的给药方案和施用途径。组合物可通过常规注射器、无针注射装置、“微弹轰击基因枪”或其它物理方法诸如电穿孔(“EP”)、“流体动力法”或超声波进行施用。

[0350] a.电穿孔

[0351] 可使用电穿孔装置来实现经由电穿孔的组合物的施用,所述电穿孔装置被构造来向哺乳动物的期望的组织递送有效地在细胞膜中引起可逆孔形成的能量的脉冲,并且优选的能量脉冲是与由用户预设的电流输入相似的恒定电流。电穿孔装置可包括电穿孔组件和电极部件或操作部件。电穿孔组件可包括和包含电穿孔装置的各种元件的一个或多个,包括:控制器、电流波形发生器、阻抗测试器、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端

口、记忆组件、电源和电源开关。电穿孔可使用体内电穿孔装置例如CELLECTRA EP系统(Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA)或Elgen电穿孔器(Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA)促进质粒对细胞的转染来实现。

[0352] 电穿孔组件可作为电穿孔装置的一个元件起作用,并且其它元件是与所述电穿孔组件通信的单独的元件(或组件)。电穿孔组件可作为电穿孔装置的多于一个元件起作用,其可以与同所述电穿孔组件分开的所述电穿孔设备的另外的其它元件通信。作为机电或机械装置的部分存在的电穿孔装置的元件可以不受限制,因为所述元件可作为一个装置或作为彼此相互通信的单独的元件起作用。电穿孔组件可以能够递送在期望的组织中产生恒定电流的能量脉冲,并且包括反馈机制。电极部件可包括在空间排列上具有多个电极的电极阵列,其中所述电极组件接收来自电穿孔组件的能量脉冲并将其通过电极递送至期望的组织。多个电极的至少一个在能量脉冲的递送过程中是中性的,并且测量期望的组织的阻抗,以及与将所述阻抗传达给电穿孔组件。反馈机制可接收测量的阻抗,并可调整通过电穿孔组件递送的能量脉冲以维持恒定电流。

[0353] 多个电极可以以分散模式递送能量脉冲。众多的电极可通过在程序化顺序下控制电极以分散模式递送能量脉冲,并且所述程序化顺序由用户输入至电穿孔组件中。程序化顺序可包含多个按顺序递送的脉冲,其中多个脉冲的每一个脉冲通过至少两个有源电极(其中一个中性电极测量阻抗)来递送,并且其中多个脉冲的随后脉冲通过至少两个有源电极(一个中性电极测量阻抗)的一个不同的电极来递送。

[0354] 可通过硬件或软件来进行反馈机制。可通过模拟闭环电路来进行反馈机制。反馈每50 μ s、20 μ s、10 μ s或1 μ s产生一次,但优选地是实时反馈或瞬时反馈(即,基本上同时的,如通过可获得的用于测定反应时间的技术测定)。中性电极可测量期望的组织中的阻抗,并将所述阻抗传达到反馈机制,并且所述反馈机制响应所述阻抗并调整能量脉冲以将恒定电流维持在与预设电流相似的值上。反馈机制可在能量脉冲递送过程中连续和瞬时地维持恒定电流。

[0355] 可促进本发明的组合物的递送的电穿孔装置和电穿孔方法的实例包括在Draghia-Akli等人的美国专利No.7,245,963、由Smith等人提交的美国专利公开2005/0052630(其内容在此通过引用整体并入)中描述的那些电穿孔装置和方法。可用于促进组合物的递送的其它电穿孔装置和电穿孔方法包括2007年10月17日提交的共同未决和共同拥有的美国专利申请序列No.11/874072中提供的那些电穿孔装置和方法,所述专利申请序列要求2006年10月17日提交的美国临时申请序列No.60/852,149和2007年10月10日提交的60/978,982(其全都在此整体并入)在35USC 119(e)下的权益。

[0356] Draghia-Akli等人的美国专利No.7,245,963描述了模块化电极系统及它们用于促进将生物分子引入至身体或植物的选择的组织的细胞中的用途。模块化电极系统可包含多种针电极;皮下针头;提供从可编程恒定电流脉冲控制器至多个针电极的导电连接的电连接器;和电源。操作者可抓住多个安装在支持结构上的针电极,并将它们牢固地插入身体或植物的选择的组织中。随后经由皮下针头将生物分子递送至选择的组织。激活可编程恒定电流脉冲控制器,并将恒定电流电极脉冲施加于多个针电极。施加的恒定电流电脉冲促进将生物分子引入至多个电极之间的细胞中。美国专利No.7,245,963的整个内容在此通过引用并入。

[0357] 由Smith等人提交的美国专利公开2005/0052630描述了可用于有效地促进将生物分子引入至身体或植物的选择的组织的细胞中的电穿孔装置。所述电穿孔装置包含其操作通过软件或固件来指定的电动力学装置(“EKD装置”)。EKD装置基于脉冲参数的用户控制和输入在阵列中的电极之间产生一系列可编程的恒定电流脉冲波形,并且允许存储和获取电流波形数据。电穿孔装置还包含具有一个阵列的针电极的可替换电极盘、用于注射针的中央注射通道和可移去的引导盘。美国专利公开2005/0052630的整个内容在此通过引用并入。

[0358] 美国专利No.7,245,963和美国专利公开2005/0052630中描述的电极阵列和方法可适用于不仅至组织诸如肌肉,而且还至其它组织或器官内的深度穿透。由于电极阵列配置的原因,还可将注射针(以递送选择的生物分子)完全插入靶器官,并且在利用电极预先描绘的区域中垂直于靶组织施用注射剂。美国专利No.7,245,963和美国专利公开2005/005263中描述的电极优选为20mm长和21规格。

[0359] 此外,在一些包括电穿孔装置及其用途的实施方案中,设想存在电穿孔装置,其为在下列专利:1993年12月28日颁布的美国专利5,273,525、2000年8月29日颁布的美国专利6,110,161、2001年7月17日颁布的6,261,281和2005年10月25日颁布的6,958,060,以及2005年9月6日颁布的美国专利6,939,862中描述的那些电穿孔装置。此外,本文设想了针对注射DNA的方法设计的涵盖2004年2月24日颁布的美国专利6,697,669(其涉及使用各多装置的任一种递送DNA)和2008年2月5日颁布的美国专利7,328,064中提供的主题的专利。上述专利通过引用整体并入。

[0360] 10. 治疗方法

[0361] 本文中还提供了通过在受试者中产生合成抗体来治疗有此需要的受试者的疾病、保护其免受疾病侵害和/或预防所述疾病的方法。所述方法可包括向受试者施用组合物。向受试者施用组合物可使用上述递送方法来进行。

[0362] 在于受试者中产生合成抗体后,所述合成抗体可结合至抗原或与其反应。这样的结合可中和抗原、阻断另一分子例如蛋白质或核酸对抗原的识别,以及引发或诱发对所述抗原的免疫应答,从而治疗受试者的与所述抗原相关的疾病,保护受试者免受所述疾病侵害和/或预防所述疾病。

[0363] 组合物剂量可以为1 μ g至10mg活性组分/kg体重/时间,以及可以为20 μ g至10mg组分/kg体重/时间。可以每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或31天施用组合物一次。用于有效治疗的组合物的剂量数可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次。

[0364] 本发明具有通过下列非限定性实施例说明的多个方面。

[0365] 11. 实施例

[0366] 本发明将在下面的实施例中进一步说明。应理解,这些实施例,虽然指示了本发明的优选实施方案,但仅是以说明性方式给出的。根据上面的讨论和这些实施例,本领域普通技术人员可确定本发明的本质特征,并且在不背离其精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种改变和改进,以使其适应各种用途和条件。因此,根据前述描述,除了本文中显示和描述的那些改进之外的本发明的各种改进对于本领域技术人员来说将显而易见。此类改进也意欲落入所附权利要求的范围内。

[0367] 实施例1

[0368] 构建用于体内免疫球蛋白(Ig)产生的高表达系统。具体地,修饰Ig重链和轻链序列以提高完全装配的Ig分子的体内表达,所述分子包括2个重链和2个轻链多肽。产生gp120IgG-重链和轻链分子的构建体,并将其单独地插入pVAX1载体(Life Technologies, Carlsbad, CA)。该抗体具有确定的性质,所述性质允许其用于如下所述的表征研究中。当产生构建体时可包括几种修饰来优化Ig在体内的表达。优化包括密码子优化和kozak序列(GCC ACC)的引入。Ig的重链和轻链的优化构建体的核酸序列分别示于SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7(分别是图1和2)中。在图1和2中,加以下划线和加以双下划线标示用于将构建体克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:6编码SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列,即IgG重链的氨基酸序列(图42)。SEQ ID NO:7编码SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列,即IgG轻链的氨基酸序列(图43)。

[0369] 用天然Ig构建体(即,未优化的)或含有SEQ ID NO:6和7的构建体(即,优化的)转染细胞。转染后,测量来自转染的细胞的IgG分泌,并且IgG合成的动力学示于图3中。如图3中所示,未优化的和优化的构建体都表达Ig的重链和轻链以形成IgG,但优化的构建体导致IgG抗体更快积累。用含有SEQ ID NO:6和7(即,优化的Ig序列)的质粒转染的细胞显示比用含有非优化的Ig序列的质粒转染的细胞产生更多的完全装配的Ig分子。因此,构建体的优化或修饰显著增加Ig表达。换句话说,由于用于产生SEQ ID NO:6和7的优化或修饰,含有SEQ ID NO:6和7的构建体提供了相较于天然构建体显著更高的Ig表达。这些数据还表明可在体内从质粒系统高效地装配Ig的重链和轻链。

[0370] 为了进一步检查含有SEQ ID NO:6和7的构建体,向小鼠施用含有SEQ ID NO:6和7所示的序列的质粒。具体地,使用电穿孔施用质粒。施用后,通过蛋白质印迹(即,将小鼠的血清用于检测gp120抗原)评价对经免疫的小鼠的免疫应答(即,IgG水平)的诱发。如图4中所示,因为在蛋白质印迹分析中观察到抗体的结合,因此施以含有SEQ ID NO:6和7的质粒的小鼠导致强抗体产生。只需一次施用就可观察到该抗体产生。

[0371] 总之,这些数据表明编码Ig重链和轻链的核酸序列,当包括在表达载体诸如pVAX1中时,在转染的细胞和施以所述表达载体的小鼠中导致装配的IgG(即,重链和轻链一起形成结合其抗原的抗体)表达。这些数据还表明编码Ig重链和轻链的核酸序列的优化或修饰显著增加Ig产量。

[0372] 实施例2**[0373] 用于实施例3-7的材料和方法**

[0374] 细胞和试剂。将293T和TZM-B1细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS)和抗生素的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM; Gibco-Invitrogen, CA)中,并且在汇合后进行传代。重组HIV-1p24和gp120Env(rgp120)蛋白获自Protein Science Inc.,并且缀合有过氧化物酶的链霉抗生物素蛋白来自Jackson Laboratory。所列的细胞系和其它试剂获自AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH。

[0375] 动物和蛋白质以及质粒施用和递送。雌性BALB/c小鼠(8周龄)购自Taconic Farms (Germantown, NY)。对于这些施用,肌肉注射(IM)25μg的50μl体积中的质粒DNA(pVax1或

pHIV-1Env-Fab),随后MID-EP系统(CELLECTRA®;Inovio Pharmaceuticals,Blue Bell,PA)进行EP介导的增强递送。用于递送的脉冲参数为:3个脉冲的0.5Amp恒定电流(间隔1秒,长度为52ms)。每一只动物接受实验性或对照质粒制剂的单次施用。对于蛋白质免疫分析,使用来自JRFL株(购自Immune Technology Corp,NY)的HIV-1重组gp120(rgp120)。在蛋白质免疫研究中,将单次25µg剂量的rgp120与TiterMax佐剂混合,随后进行皮下注射。根据具体的分析,在不同的时间点收集来自施以pHIV-1Env Fab或rgp120的小鼠的血清。

[0376] HIV-1Env-Fab质粒DNA的构建。通过使用具有几个修饰的合成寡核苷酸产生来自抗-Env VRC01人mAb的HIV-1Env-Fab(序列VH和VL)。重链(VH-CH1)由SEQ ID NO:3所示的核酸序列编码,并且轻链(VL-CL)由SEQ ID NO:4所示的核酸序列编码(分别地,图9和10)。在图9和10中,加以下划线和加以双下划线标示用于将编码核酸序列克隆进pVAX1的HindIII(AAG CTT)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA或TAA)密码子。SEQ ID NO:3编码SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列,即HIV-1Env-Fab的VH-CH1的氨基酸序列(图44)。SEQ ID NO:4编码SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列,即HIV-1Env-Fab的VL-CL的氨基酸序列(图45)。

[0377] 将有效IgE前导序列掺入Env抗原基因序列以增加表达。对所得的经修饰的和增强的HIV-1Env-Fab DNA免疫原进行密码子优化和RNA优化,然后利用GenScript(Piscataway, NJ)将其克隆进pVax1表达载体,随后大规模产生这些构建体。将VH和VL基因(分别地,SEQ ID NO:3和4)插入在BamHI与XhoI限制位点之间。随后在水中配制纯化的质粒DNA,以用于随后施用至小鼠体内。对于阴性对照质粒,使用产生“无关”/对照Ig的pIgG-E1M2。

[0378] HIV-1Env-Fab表达和免疫印迹分析。使用由制造商推荐的方法,将293T细胞系用于使用非脂质体FuGENE6转染试剂(Promega,WI)的表达分析中。简而言之,以50-70%汇合($1-3 \times 10^5$ 个细胞/2mL/孔,于35mm培养皿中)接种细胞24小时,之后用5µg pVax1对照或pHIV-1Env-Fab进行转染。在长达70小时的不同时间点收集上清液,并通过标准ELISA法评估其特定Fab分子的水平。将来自pVax1转染的细胞的上清液用作阴性对照。此外,用HIV gp160Env蛋白的基因转染293T细胞。

[0379] 通过免疫印迹分析进一步确认产生的Fab对天然HIV-1Env蛋白的识别。对于本研究,将上述rgp120在12%SDS-PAGE上进行电泳。将凝胶印迹于硝酸纤维素膜(Millipore, Bedford,MA)上,并用5%w/v的于PBS-T(0.05%)中的脱脂奶粉进行封闭。随后将硝酸纤维素切成单条以用于分析。以1:100将施用后48小时收集的施以pHIV-1Env Fab的小鼠的血清于PBS中进行稀释,并将所述血清与单个硝酸纤维素条反应1小时。随后,用Tris-缓冲盐溶液-0.2%Tween洗涤条4次,将其与偶联有过氧化物酶的针对小鼠IgG的抗血清(Jackson Laboratories,ME)反应,并用二氨基联苯胺底物(Sigma,St.Louis,MO)进行孵育,从而使得能够显现产生的HIV-1Env Fab对gp120的正确结合。

[0380] Ig结合分析-ELISA。通过ELISA评价DNA质粒产生的Fab或抗-rgp120抗体对rgp120的结合的确认。用来自施以pHIV-1Env Fab、pVax1或rgp120蛋白的单个动物的血清进行Ig结合测定。再次地,对于该基础Ig免疫测定分析,在单次DNA质粒施用后48小时收集血清样品。简而言之,用于PBS中稀释的进化枝B HIV MN rgp120(2µg/mL)在4℃涂覆96孔高结合聚苯乙烯板(Corning,NY)过夜。第2天,用PBS-T(PBS,0.05%Tween 20)洗涤板,用3%于PBS-T中的BSA封闭1小时,及在37℃用来自自己免疫的小鼠和首次接触实验的小鼠的血清以1:100

的稀释度孵育1小时。按1:5,000的稀释度使用山羊抗-小鼠IgG-HRP(Research Diagnostics,NJ)检测结合的IgG。通过添加色原体底物溶液TMB(R&D Systems)检测结合的酶,并在Biotek EL312e Bio-Kinetics读数器上于450nm处读数。以一式二份测试所有血清样品。进行额外的免疫测定分析,所述分析使用商业IgG1定量ELISA试剂盒定量来自施以pHIV-1Env Fab的小鼠的血清中的Fab浓度。该分析按照制造商的说明书进行。

[0381] 流式细胞分析(FACS)。对于流式细胞分析(FACS),用共有进化枝A Env质粒(pCon-Env-A)或表达来自原代病毒分离株(Q23Env17)的Env的优化的进化枝A质粒(pOpt-Env-A)转染293T细胞。通过标准方法进行转染。在确认转染后,利用冰冷缓冲液A(PBS/0.1%BSA/0.01%NaN₃)洗涤细胞,并在4℃下用第一Ig(纯化的VRC01或在质粒施用后48小时收集的,来自用pHIV-1Env Fab或对照pIgG-E1M2质粒注射的小鼠的血清)的1:100稀释物孵育20分钟。随后洗涤,并用50μl的1:100稀释的荧光标记的缀合于藻红蛋白(PE)的第二Ig再孵育20分钟。随后洗涤细胞,并立即在流式细胞仪(Becton Dickinson FACS)上进行分析。用冰冷缓冲液A在4℃下进行所有孵育和洗涤。针对单重态和活细胞对细胞进行门控。为了评估GFP表达,用FACS-LSR仪,使用CellQuest软件(BD Bioscience)进行GFP阳性细胞分析。利用Flow Jo软件分析数据。

[0382] 单循环HIV-1中和测定。用基于TZM-BI(HeLa细胞衍生的)的测定测量Fab介导的HIV-1中和分析,其中在于实验性血清或对照血清存在或不存在的条件下利用Env-假型病毒进行单轮感染后,将荧光素酶基因表达的减少用作中和的终点。将TZM-BI细胞工程化以表达CD4和CCR5,并且所述细胞含有萤火虫荧光素酶的报告基因。在该测定中,将仅施以pVax1或施以pHIV-1Env Fab的小鼠的血清在各孔中以1:50稀释,随后以0.01的复合感染(MOI)添加假型HIV-1Bal26、Q23Env17、SF162S或ZM53M无细胞病毒。Bal26和SF162S都是进化枝B tier 1病毒,该tier状态表明所述病毒具有高的对中和的敏感性或高于平均敏感性的敏感性。Q23Env17和ZM53M分别是进化枝A(Tier 1)和进化枝C(Tier 2)病毒。Tier 2的状态表明所述病毒具有平均或适度的对中和的敏感性。随后在该测定中,将10⁴TZM-BL细胞添加至每一个孔,孵育48小时,裂解,之后随后添加100μl的Bright-Glo底物(Luciferase Assay System,Promega,WI),随后使用光度计进行荧光素酶定量。该测定的读出是RLU(相对光单位)。将RLU减少的百分比计算为(1-(实验样品的平均RLU-对照的平均RLU)/来自对照孔的平均RLU-无添加对照孔的平均RLU))x100。随后将HIV-1中和表达为RLU的百分比减少,其表示感染的百分比抑制。

[0383] 实施例3

[0384] 抗-HIV-1Env-Fab表达构建体的产生

[0385] 通过NIH AIDS Research and Reference Reagent Program从VRC(疫苗研究中心,NIH)获得编码广泛中和人mAb VRC01的抗-HIV-1包膜的VH和VL-Ig(免疫球蛋白)链的cDNA,随后将其克隆进pVax1载体。将如上文实施例2中指定的几个修饰掺入表达载体以最大化和优化生物活性Ig分子的产生。具体地,这些修饰包括密码子和RNA优化和稳定化、增强的前导序列效用、以高浓度进行的质粒产生,以及通过EP促进的体内质粒递送。将产生的构建体置于来自人巨细胞病毒(CMV)的立即早期启动子的控制之下,这对于在哺乳动物细胞和组织中的适当且高效表达是非常重要的。本研究使用的构建体的示意性图谱示于表5A和5B中。

[0386] 此外,由pHIV-Env-Fab制备抗-HIV-1Env Fab,并将其用于对用编码HIV Env的质粒转染的细胞进行染色。pVAX1用作对照。如图11中所示,免疫荧光染色显示载体pHIV-Env-Fab允许制备抗-HIV-1Env Fab,因为抗-HIV-1Env Fab染色用编码HIV Env的质粒转染的细胞。因此,抗-HIV-1Env Fab对于与HIV Env糖蛋白的结合是特异性。

[0387] 实施例4

[0388] 通过转染的细胞进行的Ig产生

[0389] 为了评价pHIV-1Env-Fab的表达,将所述构建体转染进293T细胞中。使用共有HIV-1进化枝B gp120蛋白的ELISA免疫测定确认抗-HIV-1Env-Fab存在于来自早至转染后24小时的转染的293T细胞的上清液中(图5C)。在来自转染后24至72小时的细胞提取物中检测到高OD450nm值(即范围从约0.5至0.8),并且该值随后达到峰值并在48小时达到平台。这些结果确认了抗-HIV-1Env Fab对于HIV Env糖蛋白的特异性。图5C中提供的数据的统计分析如下:来自注射pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清的OD450nm值从22至72小时的时间点测量相较于pVax1对照是显著的($p < 0.05$, 学生t检验)。

[0390] 实施例5

[0391] HIV-1Env Fab的体内表征

[0392] 为了证明Fab在体内从DNA质粒体产生,通过肌内途径,随后进行通过EP的增强递送向小鼠施用pHIV-1Env Fab。递送DNA质粒的单次注射,并在施用后第12小时和第1、2、3、4、7和10天收集血清。随后通过ELISA分析评价血清(以1:100的稀释度)的Ig/Fab水平,如图6A中显示的。将图6A中的数据呈现(来自pVax1和HIV-1Env-Fab组中的单个小鼠)为OD450nm,所述OD450nm与Ig/Fab的水平成正比。这些数据表明,pHIV-1Env-Fab的单次施用后的Fab的相对水平在第1天变得可检测,并且随后随时间提高。为了进行比较,对Balb/C小鼠进行rgp120的单次施用/免疫(如上文实施例2中描述的),随后随时间收集血清并通过ELISA进行分析(以1:100的稀释度),以测定特异性抗-gp120抗体的水平的程度和寿命。图6B显示结果。

[0393] 在该蛋白质递送研究中,仅在免疫后10天才可检测到高于本底的抗原特异性Ig水平。这与通过pHIV-1Env Fab施用(图6A)引发的Fab水平形成对比,其中OD450nm值在施用后第1天达到至少0.10OD450nm单位,并在第10天达到平台,水平为0.28至0.35OD单位。因此,pHIV-1Env Fab的递送导致比常规蛋白质免疫更快速的特定Fab的产生。该发现强调了该DNA质粒递送法用于产生生物活性Ig的潜在临床效用。

[0394] 进行另外的分析以确保通过DNA递送技术产生的重组Fab的质量及数量。具体地,使用经电泳和印迹的重组HIV-1gp120蛋白进行免疫印迹分析,并用来自施用后48小时的pHIV-1Env-Fab小鼠的血清进行探测(图6C)。印迹指示适合gp120蛋白的分子量的条带,从而确认其具有功能性并且能够结合gp120。同样地,通过ELISA进行人Fab定量,并将其表示为质粒施用后时间的函数(即天)(图6D)。结果表明产生的Fab的水平在2-3 μ g/ml达到峰值。这些结果表明产生的基于VRC01的Fab的VH和VL链的正确多肽装配以及识别并特异性结合HIV-1Env蛋白的能力。

[0395] 图6中提供的数据的统计分析如下。对于图6A中概述的数据,来自注射pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清的OD450nm值从第1天至第10天测量时间点相较于来自注射pVax1的小鼠的血清在统计上升高($p < 0.05$, 学生t检验)。对于图6B中概述的数据,来自rgp120组的

OD450nm值从第10天至第14天时间点测量相较于PBS对照显著升高($p < 0.05$, 学生t检验)。对于图6D中概述的数据, 来自注射pHIV-1Env-Fab的小鼠的OD450nm值从第2天至第10天时间点测量显著升高($p < 0.05$, 学生t检验)。

[0396] 实施例6

[0397] Fab/Ig对表达不同HIV-1Env蛋白的细胞的结合: 基于FACS的分析

[0398] 来自施以pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清也用于测试产生的Fab与由293T细胞瞬时表达的不同HIV-Env蛋白的结合。将天然形式的VRC01-mAb用作阳性对照, 以确保Env蛋白在细胞表面上的正确表达和检测。如更早指示的, “无关/不相关” Ig(Ig-E1M2)用作阴性对照。如图7A和7B中显示的, 对于pVax1(即缺乏Env插入物)转染的细胞, 只存在使用不同Ig/Fab进行的本底染色。然而, 对于纯化的VRC01mAb和来自施用pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清, 都存在表达共有进化枝A Env质粒(pCon-Env-A)以及优化的进化枝C质粒(pOpt-Env-A)和表达来自原代HIV-1分离株pQ23Env17的Env的转染细胞的显著阳性染色。此外, 来自施用pIg-E1M2的小鼠的血清未能显示高于本底水平的任何HIV1Env转染的细胞的染色。显示这些结果的FACS分析提供于图7A中。显示该实验的FACS分析(即, 图7A)的数据的代表性图提供于图7B中。

[0399] 图7B中呈现的数据的统计分析如下。在天然VRC01抗体与来自注射pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清之间对由pCon-Env-A产生的包膜糖蛋白的特异性结合上不存在显著差异($p < 0.05$, 学生t检验)。然而, VRC01抗体与由pOpt-Env-A产生的包膜糖蛋白的结合比通过来自注射pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清的结合显著更强($p < 0.05$, 学生t检验)。

[0400] 实施例7

[0401] 由pHIV-1Env Fab产生的Ig的HIV中和活性

[0402] 将来自施以pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清用于测定HIV-Env Fab与被瞬时转染至293T细胞中表达的HIV-1Env蛋白的结合。在pHIV-1Env-Fab施用后6天从小鼠获得血清。具体地, 用从其表达来自进化枝A、B或C株的HIV-1Env的质粒转染细胞。进化枝A、B和C株是92RW020、SF162和ZM197。如图12中所示, 来自施以pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清结合来自进化枝A、B和C HIV-1株的HIV-1Env, 从而表明所述血清含有与来自多个亚型的HIV-1的HIV-1Env交叉反应的抗体(即, HIV-Env Fab)。

[0403] 为了评估本研究中产生的HIV-Env Fab的潜在HIV-1中和活性, 进行基于使用TZM-B1靶细胞的基于发光的中和测定。如上文实施例2中所述, 在实验血清和对照不存在或存在的情况下用4种不同的假型HIV病毒分离株感染TZM-B1靶细胞。

[0404] 图8描绘来自注射pHIV-1Env Fab的小鼠的血清针对HIV假型病毒的中和曲线。具体地测试HIV-1 tier 1病毒Ba126和SF162S(两者都是进化枝B)以及Q23Env(进化枝A)。此外, 还针对HIV-1进化枝C tier 2病毒ZM53M测试血清。数据呈现为HIV感染的百分比中和/抑制。图中的阴影水平线指示测定中50%的中和/抑制水平。将阳性中和对照mAb(数据未显示)在本研究中用于确认该测定法的实用性和有效性。简而言之, 所述中和mAb的阳性对照能够抑制所有4种病毒假型的感染至少50%。

[0405] 来自施以pHIV-1Env Fab的小鼠的血清显示在质粒施用后随时间的HIV中和活性增强, 对于Ba125、Q23Env17和SF162S, 百分比中和到第2天达到50%。同样地, 这3种病毒的平台百分比中和分别约为62、60和70%。对于ZM53M, 直至第3天才达到50%的中和阈值, 并

且平台中和未超过50%。相较于测试的另外3种病毒,该不太强的中和特征可能反映其为不太可中和的Tier 2病毒。总之,本研究中产生的Fab能够有效地中和一系列HIV分离株。图8中呈现的数据的统计分析如下。基于Kruskal-Wallis非参数分析,仅由来自注射pHIV-1Env-Fab的小鼠的血清诱发的ZM53M进化枝C病毒(图8D)的HIV中和水平与其它测试的病毒显著不同(图8A、8B和8C)。该差异在于达到50%中和所需的时间(天数)以及最大获得的中和水平。

[0406] 总结实施例3-7,施以pHIV-1Env Fab的小鼠中的VRC01Fab的血清浓度在注射后第12天达到峰值2-3 μ g/mL。该范围可与目前由FDA批准的单克隆抗体的数目相当,这表明我们的抗体法在该小动物模型中产生显著的和生物学相关水平的抗体。具体地,优特克单抗(商品名称:Stelara)和戈利木单抗(Simponi),被指定用于抗自身免疫性疾病诸如斑块状银屑病和关节炎的两种抗体,分别具有 $0.31 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ 和 $1.8 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ 的平均 $\pm$ SD血清浓度。此外,TNF抑制剂阿达木单抗(Humira)具有约6 μ g/mL的平均血清谷浓度(mean rough serum concentration)。在这点上,实施例4-8中描述的数据显示编码抗体的DNA递送至生物体导致在体内被组装,使得显著的和生物学相关水平的抗体存在于生物体中。

[0407] 这些数据还显示在pHIV-1Env Fab的单次EP增强施用后,相较于由常规蛋白质施用产生的Ig,在体内更快速地产生Fab的能力(图6A和6B)。此外,还阐明了产生针对不同疫苗靶的功能性保护Ig样分子的能力。迄今为止,在主动接种后诱发HIV-1中和抗体一直以来非常困难,并且在初次感染过程中,中和抗体直至传染后数年才产生。借助于该DNA质粒法,在递送后1-2天内观察到中和滴度,而在施用后1周出现峰值中和Fab血清浓度($3.31 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$)(图6D)。该Ig水平与在最近的研究中已被证明提供免受感染的完全保护的8.3 μ g/mL浓度相对相似。这些数据证明了生物活性Ig片段的快速诱发。

[0408] 这些数据还显示中和抗体滴度和通过HIV-1Env-Fab DNA施用引发的针对HIV-1原代分离株的应答。针对一小组不同的病毒tier 1和2病毒分离株测试血清,所述病毒分离株代表了来自进化枝A、B和C的实例。结果表明产生针对这些病毒的强效中和活性(图8)。

[0409] 因此,该基于DNA质粒方法在体内产生特异性和生物活性Fab或Ig分子,避免使用常规基于抗原的接种来进行抗体产生的需要,以及避免在体外产生Ig和纯化产生的Ig的需要。

[0410] 实施例8

[0411] 编码人Ig抗体的质粒的构建

[0412] 如上所述,从VRC01抗体产生Fab,即在对受试者施用所述编码核酸后在体内产生的HIV-Env Fab。为了进一步扩展这些研究,产生编码来源于VRC01抗体的IgG1抗体的核酸序列。如图13中的示意图中所示,该核酸序列编码被费林蛋白酶切割位点和编码P2A肽序列的核酸序列分隔的IgG重链和轻链。P2A肽序列增强蛋白酶的切割效率,从而在切割后导致分开的多肽。

[0413] 所述IgG重链包括可变重(VH)区、恒定重1(CH1)区、铰链区、恒定重2(CH2)区和恒定重3(CH3)区。所述IgG轻链包括可变轻(VL)区和恒定轻(CL)区。将该构建体例如在表达载体pVAX1中置于巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下。该构建体导致为反应性gp120(即,被VRC01抗体识别的抗原)的完全装配的IgG抗体产生(如图14中显示的)。该完全装配的IgG在本文中被称为VRC01IgG。VRC01IgG的氨基酸序列(在被费林蛋白酶切割前)示于图15中,并

且示于SEQ ID NO:5中。

[0414] 具体地, VRC01 IgG的氨基酸序列(在被费林蛋白酶切割前; SEQ ID NO:5和图15)具有下列结构: 免疫球蛋白E1(IgE1)信号肽、可变重区(VH)、恒定重区1(CH1)、铰链区、恒定重区2(CH2)、恒定重区3(CH3)、费林蛋白酶切割位点、GSG接头、P2A肽、IgE1信号肽、可变轻区(VL)和恒定轻区(CL, 具体地为κ)。在下文中提供了所述结构的每一个部分的序列(其全部序列以上述和图13中显示的顺序包含在SEQ ID NO:15内)。

[0415] VRC-1 IgG的IgE1信号肽-MDWTWILFLVAAATRVHS(SEQ ID NO:8)。

[0416] VRC01 IgG的可变重区-QVQLVQSGGQMCKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGW LKPRGGAVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGNCDYNWDFEHWGRGTPVIVSSPSTKG (SEQ ID NO:9)。

[0417] VRC01 IgG的恒定重区1(CH1)-PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSC(SEQ ID NO:10)。

[0418] VRC01 IgG的铰链区EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:11)。

[0419] VRC01 IgG的恒定重区2(CH2)-APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK(SEQ ID NO:12)。

[0420] VRC01 IgG的恒定重区3(CH3)-GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:13)。

[0421] VRC01 IgG的费林蛋白酶切割位点-RGRKRRS(SEQ ID NO:14)。

[0422] VRC01 IgG的GSG接头和P2A肽-GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:15)。

[0423] VRC01 IgG的IgE1信号肽-MDWTWILFLVAAATRVHS(SEQ ID NO:8)。

[0424] VRC01 IgG的可变轻区(VL)-EIVLTQSPGTLSLSPGETAIIISCRTSQYGLAWYQQRPQGAPRLVI YSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYNTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIKR(SEQ ID NO:16)。

[0425] VRC01 IgG的恒定轻区(CL, κ)-TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:17)。

[0426] 实施例9

[0427] 由两个质粒编码的HIV-1 VRC01 IgG

[0428] 如上文实施例2-8中所描述的, 从VRC01抗体产生Fab(从单独的质粒表达的每一条链), 即HIV-Env Fab, 并且从VRC01抗体产生IgG(从单个质粒表达), 即VRC01 IgG。为了进一步扩展这些研究, 从VRC01抗体产生IgG, 其中重链(即, 可变重区(VH)、恒定重区1(CH1)、铰链区、恒定重区2(CH2)和恒定重区3(CH3))以及轻链(即, 可变轻区(VL)和恒定轻区(CL))由单独的构建体编码(图50和51)。该IgG在本文中被称作HIV-1 VRC01 IgG。

[0429] 每一个构建体还包括前导序列以用于一旦抗体在体内产生就优化抗体的分泌。将每一个构建体克隆进pVAX1载体的BamHI和XhoI位点, 从而将构建体置于巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下(图50和51)。因此, 为了在体内形成或产生VRC01 IgG, 必须向受试者施用质粒的混合物, 即含有编码重链的构建体的质粒和含有编码轻链的构建体的质粒。

[0430] 此外, 进一步优化每一个构建体。优化包括kozak序列(GCC ACC)的添加和密码子优化。编码HIV-1 VRC01 IgG的IgG1重链的核酸序列示于SEQ ID NO:54和图52中。在图52中, 加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和

XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:54编码SEQ ID NO:55和图53中所示的氨基酸序列,即HIV-1VRC01IgG的IgG1重链的氨基酸序列。

[0431] 编码HIV-1VRC01IgG的IgG轻链的核酸序列示于SEQ ID NO:56和图54中。在图54中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:56编码SEQ ID NO:57和图55中所示的氨基酸序列,即HIV-1VRC01IgG的IgG轻链的氨基酸序列。

[0432] 实施例10

[0433] HIV-1Env-PG9Ig

[0434] 除了VRC01IgG以外,还可产生编码与HIV-1Env反应的IgG的另一个构建体。该构建体是已被优化并且被克隆进表达载体的HIV-1Env-PG9(图16A和16B)。优化包括引入kozak序列(例如,GCC ACC)、前导序列的引入和密码子优化。含有编码HIV-1Env-PG9Ig的核酸序列的表达载体的产生通过如图16C中显示的限制性酶消化来确认。在图16C中,泳道1是未消化的表达载体,泳道2是用BamHI和XhoI消化的表达载体,而泳道M是标记。

[0435] 编码HIV-1Env-PG9Ig的核酸序列示于SEQ ID NO:63和图61中。在图61中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起点(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:63编码SEQ ID NO:2和图18中所示的氨基酸序列,即HIV-1Env-PG9Ig的氨基酸序列(在被费林蛋白酶切割之前)。

[0436] 在该氨基酸序列中,信号肽通过肽键连接至每一条重链和轻链以增加体内产生的抗体的分泌。此外,编码P2A肽的核酸序列位于编码重链与轻链的核酸序列之间,以允许将翻译的多肽更高效地切割成单独的含有重链或轻链的多肽。

[0437] 具体地,HIV-1Env-PG9Ig的氨基酸序列(在被费林蛋白酶切割之前;SEQ ID NO:2和图18)具有下列结构:人IgG重链信号肽、可变重区(VH)、恒定重区1(CH1)、铰链区、恒定重区2(CH2)、恒定重区3(CH3)、费林蛋白酶切割位点、GSG接头、P2A肽、人 λ 轻链信号肽、可变轻区(VL)和恒定轻区(CL,具体地 λ)。下文中提供了所述结构的每一个部分的序列(其全部序列以上述顺序包含在SEQ ID NO:2内)。

[0438] HIV-1Env-PG9Ig的人IgG重链信号肽-MDWTWRILFLVAAATGTHA(SEQ ID NO:18)。

[0439] H I V - 1 E n v - P G 9 I g 的 可 变 重 区 - EFGLSWVFLVAFLRGVQCQRLVESGGGVVQPGSSLRLSCAASGFDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEKYH ADSVWGRLSISRDN SKDTLYLQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYDFYDGYNYHYMDVWGKGT TTVTVSS (SEQ ID NO:19)。

[0440] H I V - 1 E n v - P G 9 I g 的 恒 定 重 区 1 (C H 1) - ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRV(SEQ ID NO:20)。

[0441] HIV-1Env-PG9Ig的铰链区-EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:21)。

[0442] H I V - 1 E n v - P G 9 I g 的 恒 定 重 区 2 (C H 2) - APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK(SEQ ID NO:22)。

[0443] HIV-1Env-PG9Ig的恒定重区3(CH3)-GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:23)。

[0444] HIV-1Env-PG9Ig的费林蛋白酶切割位点-RGRKRRS(SEQ ID NO:24)。

[0445] HIV-1Env-PG9Ig的GSG接头和P2A肽-GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:25)。

[0446] HIV-1Env-PG9Ig的人λ轻链信号肽-MAWTPLFLFLLTCCPGGSNS(SEQ ID NO:26)。

[0447] HIV-1Env-PG9Ig的可变轻区(VL)-QSALTQPASVSGSPGQSITISCNGTSDNVGGYESVSWYQQHPGKAPKVVIIYDVSKRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEGDYYCKSLTSTRRRVFGTGTKLTVL(SEQ ID NO:27)。

[0448] HIV-1Env-PG9Ig的恒定轻区(CL, λ)-GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID NO:28)。

[0449] 实施例11

[0450] HIV-1PG9单链Fab(scFab)

[0451] 除了上述HIV-1Env-PG9Ig以外,还可基于PG9抗体(在本文中被称为HIV-1PG9scFab)产生单链Fab(即,由被转录成单个转录物并被翻译成单个多肽的核酸序列编码的VH/CH1和VL/CL)。编码HIV-1PG9scFab的核酸序列示于SEQ ID NO:50和图46中。在图46中,加以下划线和加以双下划线标示用于将该酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG),而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:50中所示的核酸序列是优化的核酸序列,即包含kozak序列(GCC ACC)、密码子优化和前导序列。前导序列位于构建体的5'末端,即在单链Fab之前,从而由接头序列编码的信号肽通过肽键连接于单链Fab的氨基末端。SEQ ID NO:50中所示的核酸序列还包括位于编码VH/CH1的核酸序列与编码VL/CL的核酸序列之间的接头序列。因此,在由SEQ ID NO:50编码的多肽中,由接头序列编码的氨基酸序列使VH/CH1和VL/CL保持在一起。SEQ ID NO:50编码SEQ ID NO:51和图47中所示的氨基酸序列,即HIV-1PG9scFab的氨基酸序列。

[0452] 实施例12

[0453] HIV-1Env-4E10Ig

[0454] 除了VRC01IgG和HIV-1Env-PG9Ig以外,还产生了编码与HIV-1Env反应的IgG的另一种构建体。该构建体是HIV-1Env-4E10,其已被优化并且被插入表达载体(图17A和17B)。优化包括引入kozak序列(例如,GCC ACC)、前导序列和密码优化。含有编码HIV-1Env-4E10Ig的核酸序列的表达载体的产生通过如图17C中显示的限制性酶消化来确认。在图17C中,泳道1是未被消化的表达载体,泳道2是用BamHI和XhoI消化的表达载体,且泳道M是标记。

[0455] 编码HIV-1Env-4E10Ig的核酸序列示于SEQ ID NO:62和图60中。在图60中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:62编码SEQ ID NO:1和图19中所示的氨基酸序列,即,HIV-1Env-4E10Ig的氨基酸序列(在被费林蛋白酶切割前)。

[0456] 在该氨基酸序列中,信号肽通过肽键连接于重链和轻链的每一个以增加体内产生的抗体的分泌。此外,编码P2A肽的核酸序列位于编码重链与轻链的核酸序列之间,以允许翻译的多肽更高效地切割成含有重链或轻链的单独多肽。

[0457] 具体地,HIV-1Env-4E10Ig的氨基酸序列(在被费林蛋白酶切割之前;SEQ ID NO:1和图19)具有下列结构:人IgG重链信号肽、可变重区(VH)、恒定重区1(CH1)、铰链区、恒定重区2(CH2)、恒定重区3(CH3)、费林蛋白酶切割位点、GSG接头、P2A肽、人κ轻链信号肽、可变轻区(VL)和恒定轻区(CL,具体地κ)。在下文中提供了所述结构的每一个部分的序列(其全部序列以上述顺序包含在SEQ ID NO:1中)。

[0458] HIV-1Env-4E10Ig的人IgG重链信号肽-MDWTWRILFLVAAATGTHA(SEQ ID NO:29)。

[0459] H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g 的 可 变 重 区 - QVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALS~~WVRQAPGRGLEWMGGV~~IPLLTITNYAPRFQGRITITADRSTS TAYLELNSLRPEDTAVYYCAREGTTGWGWL~~GKPIGAF~~AHWGQGT~~LVTVSS~~(SEQ IDNO:30)。

[0460] H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g 的 恒 定 重 区 1 (C H 1) - ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TVPS~~SSLG~~ TQTYICNVNHKPSNTKVDKKV(SEQ ID NO:31)。

[0461] HIV-1Env-4E10Ig的铰链区-EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:32)。

[0462] H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g 的 恒 定 重 区 2 (C H 2) - APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK(SEQ ID NO:33)。

[0463] H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g 的 恒 定 重 区 3 (C H 3) - GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:34)。

[0464] HIV-1Env-4E10Ig的费林蛋白酶切割位点-RGRKRRS(SEQ ID NO:35)。

[0465] HIV-1Env-4E10Ig的GSG接头和P2A肽-GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:36)。

[0466] HIV-1Env-4E10Ig的人κ轻链信号肽-MVLQTQVFISLLLWISGAYG(SEQ ID NO:37)。

[0467] H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g 的 可 变 轻 区 (V L) - EIVLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVADRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGQSLSTFGQGTKVE(SEQ ID NO:38)。

[0468] H I V - 1 E n v - 4 E 1 0 I g 的 恒 定 轻 区 (C L , κ) - KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE(SEQ ID NO:39)。

[0469] 实施例13

[0470] HIV-1 4E10ScFab

[0471] 除了上述HIV-1Env-PG9Ig以外,基于4E10抗体(在本文中被称为HIV-1 4E10scFab)产生单链Fab(即,由被转录成单个转录物并被翻译成单个多肽的核酸序列编码的VH/CH1和VL/CL)。编码HIV-14E10scFab的核酸序列示于SEQ ID NO:52和图48中。在图48中,加以下划线和加以双下划线标示用于将该核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG),而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:52中所示的核酸序列是优化的核酸序列,即包含kozak序列(GCC ACC)、密码子优化和前导序列。前

导序列位于构建体的5'末端,即在单链Fab之前,从而由接头序列编码的信号肽通过肽键连接于单链Fab的氨基末端。SEQ ID NO:52中所示的核酸序列还包括位于编码VH/CH1的核酸序列与编码VL/CL的核酸序列之间的接头序列。因此,在由SEQ ID NO:52编码的多肽中,由接头序列编码的氨基酸序列使VH/CH1和VL/CL保持在一起。SEQ ID NO:52编码SEQ ID NO:53和图49中所示的氨基酸序列,即HIV-1 4E10scFab的氨基酸序列。

[0472] 实施例14

[0473] CHIKV-Env-Fab

[0474] 如上所述,在编码HIV-1Env Fab的重链(VH-CH1)和轻链(VL-CL)的核酸序列被递送至细胞或小鼠后,在体内装配或产生与HIV-1Env反应的Fab。为了确定与其它抗原反应的Fab是否可在编码核酸序列被递送至细胞或受试者后在体内产生,产生编码与基孔肯雅热病毒(CHIKV)的包膜蛋白(Env)反应的抗体的重链(VH-CH1)和轻链(VL-CL, λ 型)的构建体。这些构建体的产生描述于实施例14以及还有下面的实施例17和18中。

[0475] 每一个构建体包括如图20A、20B和21中显示的前导序列和kozak序列。将编码VH-CH1和VL-CL的构建体克隆进表达载体,从而将其置于巨细胞病毒(CMV)启动子的控制之下(图21)。含有编码VH-CH1和VL-CL的构建体的表达载体分别被称为CHIKV-H和CHIKV-L。综上所述,CHIKV-H和CHIKV-L载体的混合物被称为pCHIKV-Env-Fab,并且该混合物在体内(即,在引入细胞或受试者后)产生CHIKV-Env-Fab。换句话说,需要两种载体来在体内产生CHIKV-Env-Fab,如下文中更详细描述。

[0476] 所述构建体也被优化以用于表达。具体地,将前导序列包含在每一个构建体中以在体内产生CHIKV-Env-Fab后提高CHIKV-Env-Fab的分泌效率。也对每一个构建体进行密码子优化,并且使其包含kozak序列(GCC ACC)。编码CHIKV-Env-Fab的重链(VH-CH1)的核酸序列示于SEQ ID NO:58和图56中。在图56中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:58编码SEQ ID NO:59和图57中所示的氨基酸序列,即CHIKV-Env-Fab的重链(VH-CH1)的氨基酸序列。

[0477] 编码CHIKV-Env-Fab的轻链(VL-CL)的核酸序列示于SEQ ID NO:60和图58中。在图58中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:60编码SEQ ID NO:61和图59中所示的氨基酸序列,即CHIKV-Env-Fab的轻链(VL-CL)的氨基酸序列。

[0478] 为了测量CHIKV-Env-Fab体内产生的时间动力学,用pVAX1、CHIKV-H、CHIKV-L或pCHIKV-Env-Fab转染细胞。转染后,将ELISA用于测量随时间CHIKV-Env-Fab产生的水平。如图22中所示,用pVAX1、CHIKV-H或CHIKV-L转染的细胞不产生与CHIKV Env抗原反应的抗体。相反地,用pCHIKV-Env-Fab转染的细胞产生与CHIKV Env抗原反应的抗体(即,CHIKV-Env-Fab,也被称为CHIKV-Fab)。因此,这些数据表明编码CHIKV-Env-Fab的重链(VH-CH1)和轻链(VL-CL)的核酸序列的递送导致结合于CHIKV-Env抗原或与其反应的Fab的产生。

[0479] 此外,将CHIKV-Env-Fab用于获自用pCHIKV-Env转染的细胞的裂解物的蛋白质印迹,所述pCHIKV-Env是编码CHIKV-Env抗原的质粒。如图23中所示,经由CHIKV-Env-Fab检测到CHIKV-Env抗原,这表明该Fab结合于所述抗原。

[0480] 为了进一步研究CHIKV-Env-Fab在体内的产生或装配,向小鼠施用pCHIKV-Env-Fab(即,12.5 μ g CHIKV-H和12.5 μ g CHIKV-L)。此外,向第2、第3和第4组小鼠分别施用25 μ g pVAX1、CHIKV-H和CHIKV-L,并将其用作对照。具体地,在获得前血样品的第0天,向各自组的小鼠施用所述质粒。在第1天、第2天、第3天、第5天、第7天和第10取血(图24)。对这些血液进行ELISA测量以测定与CHIKV-Env抗原反应的抗体的水平。如图25中所示,施以pCHIKV-Env-Fab的小鼠导致与CHIKV-Env抗原反应的抗体(即,CHIKV-Env-Fab)的产生。施以pVAX1、CHIKV-H或CHIKV-L的小鼠不产生与CHIKV-Env抗原具有显著反应性的抗体。因此,这些数据还显示在递送编码CHIKV-Env-Fab的重(VH-CH1)链和轻(VL-CL)链的核酸序列后,在体内(即,在小鼠)中产生该Fab,并且所述Fab与其抗原(即,CHIKV-Env)反应,从而证明所述Fab在体内被正确装配。

[0481] 为了确定CHIKV-Env-Fab是否可保护免受CHIKV感染,在第0天向C57BL/6小鼠(2-3周龄;体重约20-25克)施用pCHIKV-Env-Fab(50 μ g)或pVAX1。施用pCHIKV-Env-Fab后6小时,通过鼻内途径用7log₁₀ PFU(于25 μ l的总体积中)接种每一只小鼠。在随后的每一天,测定每一只小鼠的体重,并且如果体重减轻超过30%则处死小鼠。

[0482] 如图26中所示,约75%的施以pCHIKV-Env-Fab的小鼠到研究的第14天为止幸免于CHIKV感染,然而到第14天,所有施以pVAX1的小鼠死亡。此外,施以pCHIKV-Env-Fab的小鼠相较于施以pVAX1的小鼠与更低的细胞因子TNF- α 和IL-6水平相关(图27和28)。测量获自小鼠的血清的TNF- α 和IL-6水平。这些存活小鼠未表现病变体征、体重减轻,并且具有更低水平的细胞因子TNF- α 和IL-6。因此,这些数据表明pCHIKV-Env-Fab的施用保护小鼠免受CHIKV感染并且提高CHIKV感染的存活率。换句话说,CHIKV-Env-Fab在小鼠中的体内产生保护免受CHIKV感染和提高所述感染的存活率。

[0483] 实施例15

[0484] 抗-Her-2Fab

[0485] 如上所述,在编码HIV-1Env Fab或CHIKV Env-Fab的重(VH-CH1)链和轻(VL-CL)链的核酸序列被递送至细胞或小鼠后,在体内装配或产生与HIV-1Env或CHIKV Env反应的Fab(即,VH/CH1和VL/CL)。为了确定与自体抗原(即,对于待施用编码所述Fab的核酸序列的受试者是内源的抗原)反应的Fab是否可在编码核酸序列被递送至细胞或受试者后体内产生,创建了编码与人表皮生长因子受体2(Her-2;也称为Erb2)反应的抗体的重链(VH-CH1)和轻链(VL-CL, κ 型)的构建体。每一个构建体包括前导序列和kozak序列(GCC ACC),所述kozak序列位于编码图28、30和31中显示的抗-Her-2Fab的VH-CH1或VL-CL的核酸序列之前。因此,这些构建体因前导序列和kozak序列的引入而被优化,并且还对其密码子使用进行优化。

[0486] 将编码VH-CH1和VL-CL的构建体克隆进pVAX1表达载体,即在BamHI与XhoI限制性位点之间,从而将其置于巨细胞病毒(CMV)启动子的控制之下。具体地,将编码VH-CH1和VL-CL的构建体克隆进两个单独的pVAX1载体,从而需要所得的两个质粒来在体内产生抗-Her-2Fab。

[0487] 编码抗-Her-2Fab的VH-CH1的核酸序列示于SEQ ID NO:40和图32中。在图32中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:40编码SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列,即抗-Her-2Fab的VH-CH1的氨基酸序列(图32和33)。

[0488] 编码抗-Her-2Fab的VL-CL的核酸序列示于SEQ ID NO:42和图34中。在图34中,加以下划线和加以双下划线标示用于将核酸序列克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和Xho(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。SEQ ID NO:42编码SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列,即抗-Her-2Fab的VL-CL的氨基酸序列(图34和35)。

[0489] 为了确定编码抗-Her-2Fab的VH-CH1和VL-CL的质粒的混合物是否在体内产生抗-Her-2Fab,用编码抗-Her-2Fab或pVAX1的重链(VH-CH1)和轻链(VL和CL)的质粒的混合物转染293T细胞。转染后,如图36中所示,测量总的IgG浓度。在图36中,误差条代表标准偏差。这些数据表明在引入所述两种质粒(各自编码抗-Her-2Fab的VH-CH1或VL-CL)后,在体内产生抗-Her-2Fab。

[0490] 实施例16

[0491] 抗-登革热病毒人IgG

[0492] 创建单质粒系统以在体内产生抗-登革热病毒(DENV)人IgG抗体。具体地,如图37的示意图中所示,产生构建体。具体地,将前导序列置于编码IgG重链(即,可变重区(VH)、恒定重区1(CH1)、铰链区、恒定重区2(CH2)和恒定重区3(CH3))的核酸序列的上游。反过来,编码蛋白酶切割位点的序列被置于编码IgG重链的核酸序列的下游。编码IgG轻链(即,可变轻区(VL)和恒定轻区(CL))的核酸序列位于编码蛋白酶切割位点(即,费林蛋白酶切割位点)的序列之后。由该构建体编码的信号肽是同源信号肽,从而在表达后提供了正确的抗体分泌。此外,在表达后,单个转录物被翻译成单个多肽,随后所述多肽被蛋白酶加工成对应于抗-DENV人IgG的重链和轻链的多肽。这些重链和轻链多肽随后装配成功能性抗-DENV人IgG,即结合其同源抗原的抗体。

[0493] 将该构建体克隆进表达载体pVAX1(即BamHI和XhoI位点),从而将其置于启动子的控制之下。该编码抗-登革热病毒人IgG的构建体具有SEQ ID NO:44(图38)中所示的核酸序列,所述核酸序列已被优化以用于表达。在图38中,加以下划线和加以双下划线标示用于将构建体克隆进pVAX1载体的BamHI(GGA TCC)和XhoI(CTC GAG)限制性酶位点,而粗体标示起始(ATG)和终止(TGA TAA)密码子。优化包括包含kozak序列(例如,GCC ACC)和密码子优化。SEQ ID NO:44编码SEQ ID NO:45和图39中所示的氨基酸序列,即在蛋白酶切割以将重链和轻链分离成2个单独的多肽之前的抗-DENV人IgG的氨基酸序列。

[0494] 向小鼠施用含有编码抗-登革热病毒人IgG的核酸序列的质粒以确定抗-登革热病毒人IgG是否在体内(即,在小鼠中)产生。在施用质粒后,从小鼠获取血清,并经由ELISA进行分析以确定所述血清是否含有与来自4种登革热病毒血清型即DENV-1、DENV-2、DENV-3和DENV-4的登革热E蛋白反应的抗体。如图40中所显示,来自施以含有编码抗-DENV人IgG的核酸序列的质粒的小鼠的血清与来自血清型DENV-1、-2、-3和-4的DENV E蛋白反应。同种型抗体用作阳性对照。因此,这些数据表明在将所述质粒引入小鼠后,编码抗-DENV人IgG的核酸序列被转录并被翻译成多肽,所述多肽经加工产生含有抗-DENV人IgG的重链和轻链。这些多肽装配成抗-DENV人IgG,从而提供了结合于DENV E蛋白或与其反应的功能性抗体。

[0495] 为了进一步研究通过施用单个质粒进行的抗-DENV人IgG的体内产生,经由注射向小鼠施用含有编码抗-DENV人IgG的核酸序列的质粒。具体地,向小鼠施用50μg或100μg质粒,并且每组有5只小鼠。在注射后第3天和第6天,检测小鼠的血清转换。如图41中所示,来自两个组的小鼠对于抗-DENV IgG抗体都是血清阳性的。具体地,施以50μg质粒的小鼠具有

约110ng/mL的人IgG,并且施用100μg质粒的小鼠具有约170ng/mL的人IgG。因此,这些数据进一步证明在施用编码抗-DENV人IgG的质粒后,在体内产生所述抗-DENV人IgG。这些数据还证明抗-DENV人IgG抗体产生在1周内发生,从而允许抗-DENV人IgG快速产生。

[0496] 实施例17

[0497] 用于实施例18-25的材料和方法

[0498] 设计并比较编码Fab片段(CHIKV-Fab)或靶向CHIKV包膜(Env)蛋白的全长抗体(CHIKV-IgG)的优化的DNA质粒。DNA构建体的任一种肌内递送至小鼠内导致它们的编码的抗体的快速产生以及来免受CHIKV的早期和晚期暴露侵害的保护功效。来自CHIKV-IgG免疫的小鼠的血清也离体地中和多个临床CHIKV分离株。利用CHIKV-IgG的单一免疫显示比抗原诱导性DNA质粒显著更好的免受早期病毒暴露的侵害的保护以及可比较水平的免受对CHIKV的暴露的侵害的保护。这些研究在下文中进行了更详细地描述。

[0499] 细胞。将人胚肾(HEK)293T细胞和Vero细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS)、100IU的青霉素/ml、100ug的链霉素/ml和2mM L-谷氨酰胺的达尔伯克改良伊格尔培养基(Gibco-Invitrogen)。

[0500] CHIKV-Fab和CHIKV-IgG的构建。为了构建表达抗-CHIKV Env抗体的质粒,通过使用具有几个修饰的合成寡核苷酸产生抗体的可变重(VH)和可变轻(VL)链区段。为了克隆全长抗体的Fab片段,组装含有重链和轻链、在重链与轻链之间的插入的弗林蛋白酶切割位点和P2A自加工肽位点的单个开放阅读框架。将该阅读框架掺入以从单个开入阅读框架表达全长抗体。在两种质粒中,将前导序列掺入每一个基因以增加表达。通过密码子和RNA优化修饰和增强所得的序列,并将其克隆入pVax1表达载体,以及大规模产生所得的构建体以用于本研究(GenScript,NJ)。在水中配制纯化的质粒DNA以用于随后至小鼠中的施用。将空对照pVax1表达载体用作阴性对照。具体地,从抗-Env特异性CHIKV中和人单克隆抗体/杂交瘤产生用于本研究的可变轻(VL)和可变(VH)(即Fab)链或完全免疫球蛋白(Ig)的DNA。

[0501] 在上面的实施例14中和下面的实施例18中也描述了CHIKV Fab的构建。

[0502] 在下面的实施例18中也描述了CHIKV Ig的构建。编码CHIKV Ig的核酸序列示于SEQ ID NO:65中。SEQ ID NO:65编码SEQ ID NO:66中所示的核酸序列。

[0503] 通过免疫印迹分析进行的来自CHIKV Fab或CHIKV-IgG的抗-CHIKV Env抗体的表达的测量。使用TurboFectin 8.0转染剂(Origene),将人293T细胞系用于表达分析。将这些细胞以50-70%汇合($1-3 \times 10^5$ 个细胞/孔,于2mL的总培养基体积中)接种在35mm培养皿中,进行24小时。24小时后,用10μg pVax1对照载体、CHIKV-Fab(5μg的VH和5μg的VL DNA)或CHIKV-IgG(10μg)转染细胞。在转染后48小时收集上清液,并使用CHIKV-Env重组蛋白作为涂覆抗原,通过ELISA评估其的抗-CHIKV抗体。将来自pVax1样品的上清液用作阴性对照。

[0504] 进行免疫印迹分析以确认通过利用CHIKV-Fab或CHIKV-IgG的转染产生的抗体的特异性结合。为了产生CHIKV包膜蛋白的来源,用10μg表达CHIKV-Env的DNA质粒转染293T细胞。转染后2天,裂解细胞,并在12% SDS-PAGE凝胶上电泳。使用iBlot2(Life Technologies)将凝胶转移至硝酸纤维素膜上。将样品在聚丙烯酰胺凝胶(12% NuPAGE Novex,Invitrogen)上分离,并转移至PDF膜(Invitrogen)。使用商业缓冲液(Odyssey Blocking Buffer,LiCor Biosciences)封闭膜,并在4℃用在小鼠中产生的特异性一抗以及β-肌动蛋白(Santa Cruz)孵育过夜。将IRDye800和IRD700山羊抗-兔或抗-小鼠第二抗体

用于检测(LiCor Biosciences)。

[0505] 病毒-特异性结合测定:免疫荧光分析。用来自原培养物的Vero细胞(1×10^4)接种腔室玻片(Nalgene Nunc, Naperville, Ill.)。生长细胞直至它们达到约80%汇合,随后以1的复合感染(m.o.i.)用CHIKV感染所述细胞,进行2小时。在37℃吸附2小时后,吸出病毒接种物,并用Iscove-10%FBS培养基漂洗细胞片3次。感染后24小时,用PBS洗涤细胞2次,用冷甲醇在室温下固定细胞20分钟,随后让其风干。通过在湿室中于37℃下添加来自被施用CHIKV-Fab的小鼠的免疫血清(1:100稀释)进行90分钟来检测抗体结合。在用PBS洗涤3次后,用缀合有FITC的山羊抗-人IgG(Santa Cruz Biotechnology Inc.,)在37℃孵育细胞60分钟。在室温下用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)进行另外的细胞核染色,持续20分钟。在每一次孵育步骤后进行1×PBS洗涤。随后使用DABCO将样品固定在玻璃载玻片上,并在共聚焦显微镜(LSM710;Carl Zeiss)下进行观察。使用Zen软件(Carl Zeiss)分析所得的图像。另外,在利用CHIKV-Env病毒感染的Vero细胞假型化的HIV-1GFP中测试CHIK-IgG免疫的血清的免疫反应性以通过流式细胞术测试结合活性。

[0506] 通过ELISA的抗体定量分析。利用来自被施用CHIKV-Fab、CHIKV-IgG或pVax1的小鼠的血清进行ELISA测定以测量抗体构建体的表达动力学和结合其靶抗原CHIKV-Env的能力。在不同时间点从注射质粒的小鼠收集血清样品。为了定量收集的血清样品中的总的人Fab,用1μg/孔的山羊抗-人IgG-Fab片段抗体(Bethyl Laboratories)在4℃下涂覆96孔高结合聚苯乙烯板(Corning)过夜。为了测量抗体构建体结合其靶抗原CHIKV Env蛋白的能力,用重组CHIKV Env蛋白在4℃涂覆盖ELISA析过夜。第二天,用PBS-T(PBS, 0.05% Tween20)洗涤板,以及在室温下用3%的PBS-T中的BSA封闭1小时。在再一次洗涤后,以1:100于1%的PBS-T中的FBS中稀释样品,将其添加至板,在室温下孵育1小时。洗涤板,添加缀合有HRP的山羊抗-人κ轻链(Bethyl Laboratories),在室温下进行1小时。随后使用Biotek EL312e Bio-Kinetics读数器在450nm读取板。利用SIGMAFAST OPD(Sigma-Aldrich)检测样品。为了进行定量,使用纯化的人IgG/κ(Bethyl Laboratories)产生标准曲线。以一式二份测试所有血清样品。

[0507] CHIKV-Env假型的产生和FACS分析。通过使用5μg的pNL4-3env-GFP和10μg的编码CHIKV病毒包膜的质粒来产生CHIKV-Env GFP假型。产生假型化的VSV。通过在4℃下在Sorvall Lynx 400超速离心机(Thermo Scientific)中于20%蔗糖垫中以28,000rpm进行超速离心浓缩1.5小时来浓缩假病毒体。将沉淀物在4℃重悬浮于HBSS中过夜。在p24ELISA分析后,将慢病毒假病毒体标准化以含有等数目的病毒颗粒。在感染前24小时,将细胞以 2.5×10^4 接种在48孔板中。感染后18小时分离细胞,用1%的PBS中的PFA固定10分钟,然后用0.1%(w/v)皂苷去垢剂溶液进行透化。用来自被施用pCHIKV-IgG的小鼠的血清和缀合有Alexa 594的山羊抗-人IgG第二抗体(Life Technologies)孵育CHIKV感染的细胞。利用流式细胞术(Becton-Dickinson)评估感染,使用FlowJo软件进行分析。

[0508] 小鼠中的IgG施用和CHIKV攻击研究。B6.Cg-Foxn1tm/J(The Jackson Laboratory)小鼠用于Fab和全长IgG产生、定量和功能表征。用50ul的总体积的pVax1DNA(100μg)、CHIKV-Fab DNA(50μg的VH和50μg的VL)或CHIKV-IgG(100μg)在四头肌中注射小鼠。DNA质粒施用后,立即进行优化的EP-介导的递送(CELLECTRA®; Inovio Pharmaceuticals, Inc.,)。EP递送的脉冲参数为3个脉冲的0.5Amp恒定电流,1秒的间隔以及52毫秒的长度。

[0509] 对于CHIKV攻击研究,用100 μ l总体积的CHIKV-Fab或CHIKV-IgG或空对照pVax1质粒(100 μ g)肌内注射BALB/c小鼠,随后立即进行Opt-EP介导的递送。DNA递送后2天,用总共 1×10^7 PFU(25 μ l)的CHIKV-De1-03(JN578247)(41)在每一只后足的背面经由皮下途径攻击小鼠。从0至14dpi每天用数字测径器测量足部肿胀(高 $\times$ 宽)。在3周的攻击后观察期中每日监测小鼠的存活和感染体征(即体重和昏睡)。使丧失超过30%身体质量的动物安乐死,收集血清样品以用于细胞因子定量和其它免疫分析。在攻击后第7至14天,通过尾部取血收集血液样品,通过菌斑测定(PFU/ml)分析病毒血症。进行两个独立实验。

[0510] 免疫细胞因子分析。从CHIKV-Fab或CHIKV-IgG注射的和病毒攻击的小鼠(在攻击后第10天)收集血清。按照制造商的说明书(R&D Systems)使用ELISA试剂盒测量TNF- α 、IL-1 β 、IP-10和IL-6血清细胞因子水平。

[0511] CHIKV中和测定。测定被施用CHIKV-Fab或CHIKV-IgG的小鼠的血清中的病毒中和抗体滴度。简言之,将Vero细胞(美国典型培养物保藏中心)以15,000个细胞/孔涂板在96孔板(Nunc)中。以一式三份在96孔板中制备热灭活的小鼠血清的两倍系列稀释物,向每一个小孔中添加100TCID₅₀的CHIKV病毒分离株悬浮物。在37 $^{\circ}$ C孵育1小时后,将样品添加至Vero细胞单层并孵育3天。随后固定Vero细胞单层,用0.05%结晶紫,20%甲醇(Sigma-Aldrich)进行染色。通过取其中Vero细胞单层保持完全完整的最后稀释度的倒数来测定中和滴度,并将其表示为仍然给予100%的致细胞病变效应的抑制的最高血清稀释度的倒数。利用GraphPad Prism 5软件包(GraphPad Software)产生图和统计数字。将与S型剂量-反应(可变斜率)拟合的非线性回归用于测定IC₅₀。

[0512] 统计分析。使用Graph Pad Prism软件(Prism Inc.)进行使用学生t检验或非参数Spearman相关检验的统计分析。使用Spearman秩相关检验在统计上评估对照与实验组中的变量之间的相关性。对于所有检验,小于0.05的p值被认为是显著的。

[0513] 实施例18

[0514] CHIKV单克隆抗体的构建体和功能性

[0515] 优化CHIKV-Fab和全长IgG构建体以用于增加的表达。图63A举例说明优化的抗-CHIKV-Fab和CHIKV-IgG质粒的设计。对于CHIKV-Fab,则单独地将VH和VL基因克隆入如上文实施例14和17中中所述的pVax1质粒载体。

[0516] 为了检查CHIKV-Fab和IgG的表达和功能性,体外产生这些抗体。具体地,用等量的CHIKV-Fab的重和轻链质粒或CHIKV-IgG的质粒转染人293T细胞,在转染后48小时收集来自转染的细胞的上清液。如图63B中指示的,只有利用CHIKV-Fab质粒或CHIKV-IgG质粒转染的细胞才产生可测量水平的抗-CHIKV抗体(如使用重组CHIKV包膜蛋白通过结合ELISA测量的),并且表明CHIKV-Fab或单一全长IgG的双质粒设计在体外产生正确组装的功能性CHIKV抗体。

[0517] 实施例19

[0518] EP介导的递送后CHIKV-IgG的增强的体内表达动力学和定量

[0519] 为了表征用于单克隆抗体递送的该DNA递送法,测试对CHIKV-IgG在体内产生功能性CHIKV抗体的能力的作用。该测试使用实施例17和18中的上述全长IgG构建体。通过IM注射向B6.Cg-Foxn1tm/J小鼠施用IgG质粒或pVax1载体,随后立即施用EP,如图63C中所指示的。除了用于比较目的CHIKV-IgG外,也在小鼠中单次施用重组CHIKV-Env蛋白以进行免疫。

在实验过程中在如所指定的不同时间点上收集来自所有小鼠的血清,以及通过ELISA测量结合CHIKV包膜蛋白的靶抗原。被施用CHIKV-IgG质粒的小鼠产生可检测水平的能够结合CHIKV包膜蛋白的并且在施用后第1-3天被引发的抗体,其中重组CHIKV-Env免疫的小鼠到施用后第8天才显示(图63D),该结果表明经由该质粒递送相较于蛋白质施用的快速IgG产生。

[0520] 此外,CHIKV-IgG质粒和EP在小鼠中的单次施用导致血清中可检测的人CHIKV-Ab的快速产生。CHIKV-Ab的血清水平到第5天达到600-800ng/mL,在第14天达到1300-1600ng/mL的峰值,并且直至第35天持续在>800ng/mL的水平上(图63E)。为了检查由质粒在体内产生的CHIKV-IgG的表达,使用重组CHIKV蛋白,通过免疫印迹分析确认从免疫的小鼠产生的抗-CHIKV抗体的结合特异性,显示了CHIKV-IgG的IgG-质粒设计在体内产生了正确切割的和组装的功能性CHIKV-IgG抗体(图63F)。这些实验提供了DNA递送的CHIKV-单克隆抗体不仅在体外而且在动物中在多天的时间过程中是稳定的证据。

[0521] 实施例20

[0522] CHIKV感染的细胞的结合特异性和免疫组织化学的表征

[0523] 扩展实施例19中的上述研究,并将感染用于表征DNA递送抗-CHIKV单克隆抗体的治疗潜力。CHIKV-ab特异性结合CHIKV-Env但不特异性结合其它蛋白质。使用CHIKV感染的细胞,通过结合ELISA、FACS分析和免疫组织化学评估CHIKV-Ab的特异性和靶结合性质。来自第14天的用编码CHIKV-IgG或CHIKV-Fab抗体的质粒注射的小鼠的血清的测试系列稀释物显示检测的抗体可特异性结合其靶抗原,即CHIKV-Env蛋白,但不特异性结合另一病毒蛋白质即,重组HIV-1包膜蛋白(图64A)。为了进一步分析体内产生的抗-CHIKV-IgG抗体的结合特异性,将来自小鼠的血清与已用CHIKV病毒感染的固定的Vero细胞一起孵育。免疫荧光成像突出显示结合抗-CHIKV-IgG存在于表达CHIKV包膜蛋白的细胞上而非存在于来自只有构建体pVax1的小鼠的小鼠血清中(图64B)。另外,通过FACS分析体内产生的抗体对于感染的细胞的结合特异性(图64C)。来自被施用CHIKV-IgG的小鼠的实验性血清样品结合CHIKV-Env靶抗原。

[0524] 实施例21

[0525] 来自注射了CHIKV-IgG的小鼠的血清显示针对临床CHIKV分离株的广泛中和活性

[0526] 为了评估从被施用CHIKV-Ig的小鼠收集的血清的潜在抗-CHIKV活性,针对多个CHIKV分离株测量中和活性,特别是CHIKV株系Ross、LR2006-OPY1、IND-63WB1、Ross、PC08、Bianchi和DRDE-06。测定每一个病毒分离株的IC₅₀值(导致至少50%抑制的血清的最高稀释度)(图65A-65F)。来自注射了CHIKV-IgG的小鼠的血清有效中和测试的所有6个病毒分离株,从而表明编码CHIKV-IgG的DNA的单次注射在小鼠中产生中和滴度的人抗-CHIKV Ig。结果表明从CHIKV-IgG的施用产生的抗体在体内递送后表现出相关的生物活性。

[0527] 实施例22

[0528] CHIKV-IgG贡献高水平的病毒特异性抗体活性和保护小鼠免受CHIKV攻击

[0529] 为了确定CHIKV-IgG构建体是否提供免受对CHIKV的早期暴露的侵害的保护,在第0天用CHIKV-IgG或CHIKV-Fab质粒注射小鼠的组,随后在第2天用病毒进行攻击。第3组小鼠接受空pVax1质粒以用作阴性对照。记录存活率和重量变化,持续20天。所有用pVax1质粒注射的小鼠在病毒攻击的一周内死亡(图66A)。在被攻击的小鼠中,在攻击后20天的观察期过

程中于被施用CHIKV-IgG或CHIKV-Fab的小鼠中观察到100%的存活率。这表明两种CHIKV构建体均早在递送后赋予抗CHIKV的保护性免疫(图66B)。

[0530] 随后,评估CHIKV-IgG和CHIKV-Fab是否产生长效保护性免疫。在用CHIKV-IgG质粒、CHIKV-Fab质粒或pVax1质粒单次注射后30天用CHIKV病毒攻击小鼠的组。随后在20天的时期中监测小鼠的存活率。用CHIKV-Fab注射的小鼠具有50%的存活率,然而在攻击后观察期过程中在用CHIKV-IgG注射的小鼠中观察到90%的存活率。这些结果表明CHIKV-IgG和CHIKV-Fab构建体均在体内提供长效保护性免疫,虽然由CHIKV-IgG赋予的保护可比利用CHIKV-Fab注射的记录的更持久和长效($p=0.0075$)(图66C)。

[0531] 蚊媒病毒如CHIKV可在人中引起严重脑炎。病毒攻击的不同模式诸如利用CHIKV的小鼠的鼻内、皮下和足垫感染已在感染的6-9天内导致高死亡率。另外,CHIKV在具有不同程度的发病机制的小鼠的感染后6-9天内造成高死亡率。因此,进行实验以比较抗利用鼻内和皮下病毒攻击的病毒感染的CHIKV-抗体疗法的效率。每一个组中20只小鼠,即,一个组利用pVax1以及一个组利用CHIKV-IgG质粒,接受单次免疫,并且通过CHIKV(在25 μ l的PBS中)的鼻内施用攻击每一个组中的一半小鼠,通过在第2天皮下注射CHIKV攻击余下的小鼠。通过测定体重减轻、后肢虚弱和昏睡来测量CHIKV-IgG的保护效率。无论皮下(图66D)($p<0.0024$)还是鼻内(图66E)($p<0.0073$)攻击,CHIKV-IgG均提供相较于对照小鼠显著的免受CHIKV感染的保护。接受皮下攻击的小鼠相较于鼻内攻击在平均体重减轻上具有延迟。综合以上数据,结果表明DNA递送的CHIKV-IgG产生保护免受常规(皮下)以及粘膜CHIKV攻击的广泛反应性中和抗体应答。

[0532] 实施例23

[0533] 在病毒攻击后立即和持久的CHIKV特异性IgG的评估

[0534] 在证明CHIKV-IgG在体内产生与CHIKV-Fab构建体同样快速的,但比其更持久的保护性免疫性应答后,将由CHIKV-IgG产生的保护效率与CHIKV-Env质粒(一种表达全长CHIKV包膜蛋白的DNA疫苗质粒)相比较。虽然此类DNA疫苗策略依赖于宿主免疫系统来识别靶抗原并对其作出应答,但CHIKV-IgG构建体赋予不依赖于宿主免疫应答的保护性免疫。考虑到该差异,因而确定CHIKV-IgG构建体是否提供更即时的免受对CHIKV的早期暴露的侵害的保护性体液免疫的来源。

[0535] 因而,给予小鼠的组单次CHIKV-IgG、CHIKV-Env或pVax1施用,随后在质粒免疫后2天用CHIKV进行攻击(图67A)。所有被施用CHIKV-Env或pVax1的小鼠在病毒攻击的6天内死亡,然而在用CHIKV-IgG免疫的小鼠中观察到100%存活率(图67B)。这说明CHIKV-IgG相比CHIKV-Env(一种抗原产生性DNA疫苗)在施用后早得多地赋予保护性免疫。

[0536] 随后评估由CHIKV-IgG和CHIKV-Env产生的抗-CHIKV应答的持续时间。将不同免疫方案用于确保由CHIKV-Env产生的强劲免疫应答的引入。因此,在第0天给予小鼠单次CHIKV-IgG免疫,或在于第35天病毒攻击前给予多次CHIKV-Env免疫(第0天、14天和28天)。第三组小鼠在第0天接受单次pVax1免疫并在第35天接受病毒攻击(图67A,第II组)。对于接受利用CHIKV-Env的多次加强免疫方案的小鼠记录了100%的存活率(图67C),这与先前利用同一DNA疫苗的单次注射免疫的小鼠的存活率形成鲜明对比(图67B)。这些发现与适应性免疫应答的动力学一致,所述适应性免疫应答在抗原暴露后花费约2周来发展,并且通常需要多轮抗体暴露来产生保护性免疫。

[0537] 此外,在20天的观察期过程中在接种了CHIKV-IgG的小鼠中记录了90%的存活率($p=0.0005$)(图67C);该图显示了到第43天CHIKV-IgG免疫的小鼠的<80%的存活率。然而,评估在质粒/疫苗施用后早期和晚期时间点于小鼠血清中检测到的人IgG的不同水平如何影响上述攻击结果。在单次CHIKV-IgG构建体注射的48小时内可检测到抗-CHIKV Env特异性人IgG,并且至注射后14天测量到峰值水平($\sim 1400\text{ng/mL}$)。在注射后45天仍然可检测到高于在第2天初始测量的值的水平的人IgG。该减弱的保护对应于测量的抗-CHIKV IgG的血清水平(图67D)。不断降低的水平保护性抗体可能归因于抗体的正常清除,这表明如果不再施用的话,CHIKV-IgG的水平可在延长的时期后降至低于保护的最低水平。总之,这些发现表明CHIKV-IgG的单次注射产生在质量和持久性与需要多次加强免疫的DNA疫苗诱导的免疫应答相似的保护性应答。

[0538] 实施例24

[0539] CHIKV-IgG和CHIKV-Env免疫后持久的和全身性抗-CHIKV-Env抗体的诱导

[0540] 鉴于在用CHIKV-IgG构建体和CHIKV-Env构建体免疫的小鼠中看到的CHIKV-IgG和CHIKV-Env保护性应答,进行另外的研究来评估抗体水平。在第0天用CHIKV-IgG DNA或第0、14和21天用CHIKV-Env DNA免疫BALB/c小鼠。图67E显示在指定的时间点上来自用CHIKV-IgG DNA或CHIKV-Env DNA免疫的小鼠的抗-CHIKV IgG的水平。测量CHIKV-IgG-免疫的小鼠中的抗-CHIKV人IgG和测量CHIKV-Env-免疫的小鼠中的抗-CHIKV小鼠IgG。结果显示CHIKV-IgG-免疫的小鼠中的人IgG的早期检测和快速增加。由CHIKV-Env诱发的小鼠IgG的滴度在免疫的2周内达到相似的峰值水平,但表现出较慢水平的抗体产生。

[0541] 实施例25

[0542] CHIKV病毒载量和细胞因子水平的降低导致感染的控制

[0543] CHIKV病毒载量和促炎细胞因子可与CHIKV相关疾病的严重度相关。因此,评估病毒攻击后早期和晚期时间点的CHIKV-IgG抑制这些相关疾病标志物(即,病毒载量和促炎细胞因子)的能力。来自用CHIKV-IgG DNA或CHIKV-Env DNA免疫的小鼠的血清表现出相较于pVax1对照动物显著下降的病毒载量(分别地 $p=0.0244$ 和 0.0221)(图68A)。CHIKV-IgG-免疫的小鼠显示出可与CHIKV-Env小鼠相比较的水平的病毒载量下降。还在第5次病毒攻击后从CHIKV-IgG-免疫的小鼠和CHIKV-Env免疫的小鼠测量选择的促炎细胞因子(TNF- α 和IL-6)。相较于pVax1-免疫的动物,CHIKV-IgG和CHIKV-Env免疫的动物在早期和晚期时间点表现出相似水平的两种细胞因子的下降的血清水平(图68B和68C)。由于CHIKV病毒TNF- α 和IL-6的血清水平与疾病严重度相关,因此这些发现表明利用CHIKV-IgG DNA的单次免疫在可与DNA疫苗诸如CHIKV-Env相比较的水平上提供了持久水平的免受CHIKV相关病状的保护。

[0544] 由于CTL在消除病毒感染的细胞中可以是重要的,因此进行进一步的分析以评估由CHIKV-Env和CHIKV-IgG诱导的T细胞应答。在所有免疫的小鼠中检测到IFN- γ 产生性细胞。图68D是来自先前用CHIKV-IgG DNA或CHIKV-Env DNA免疫的小鼠的T细胞应答的测量。结果显示CHIKV-Env引发强T细胞应答,如通过IFN- γ 水平测量的,然而CHIKV-IgG不引发强T细胞应答。

[0545] 综上所述,实施例14和17-25中的研究表明注射后48小时内编码的抗体在体内的快速产生。所产生的抗体也在接受动物内持续数周。利用CHIKV-IgG DNA注射的小鼠完全免

受致死CHIKV攻击(100%的保护)。病毒血症和促炎细胞因子水平在这些被保护的小鼠中也得到降低,并且CHIKV相关疾病病症也被抑制。

[0546] 具体地,在这些CHIKV-Fab和CHIKV-IgG研究中,在施用后前48至72小时记录了全身IgG的快速产生。产生的动力学和水平在早期时间点上在抗体的Fab与IgG形式之间是相似的,这对于感染性疾病预防是至关重要的。抗体模式的两种形式在免疫后2天均保护小鼠免受致死CHIKV攻击。然而,当疫苗递送后,在晚期时间点(免疫后30天)攻击小鼠时,保护的差异是明显的:90%的利用CHIKV-IgG免疫的小鼠存活,然而在CHIKV-Fab免疫的小鼠中记录了50%的存活。因此,虽然两种抗体构建体具有相同的抗原特异性和递送后快速表达,但全长IgG显示比Fab构建体长的半衰期,这被证明在维持保护性免疫是必需的。

[0547] 也将用于CHIKV感染的基于DNA的疫苗(称为CHIKV-Env)与编码的抗体相比较。当用单次剂量的CHIKV-IgG或CHIKV-Env注射小鼠并且在两天后用病毒攻击时,CHIKV-IgG注射组中的所有小鼠存活,这与CHIKV-Env组(其中无小鼠在感染中存活)形成对比。然而,在完全免疫方案(在三周时期中进行3次接种)后对于CHIKV-ENV观察到完全保护。在被施用单次剂量的CHIKV-IgG的小鼠中看到相似水平的保护,尽管该保护在延长的时期中下降至75%的存活率。

[0548] 实施例26

[0549] 针对DENV的交叉反应性中和抗体的递送

[0550] 设计并构建编码抗-DENV抗体DV87.1(具有中和DENV1-3的能力的人IgG1mAb)的重和轻链的优化的DNA质粒。具体地,构建两个优化的质粒:pDVSF-3WT,其编码DV87.1的重和轻链,和pDVSF-3LALA,其编码具有通过CH2区域中的两个亮氨酸至丙氨酸(LALA)突变消除的Fc γ R结合的DV87.1的Fc区域修饰的形式。进行这以消除抗体依赖性增强。每一个构建体中的重链和轻链基因相隔弗林蛋白酶切割位点和P2A自我加工肽。对每一个转基因进行遗传优化,合成,并亚克隆至经修饰的pVax1哺乳动物表达载体中(图69A)。

[0551] 抗体DVSF-3WT由SEQ ID NO:75中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:75编码SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列。质粒pDVSF-3WT中含有SEQ ID NO:75的核酸序列。

[0552] 抗体DVSF-3LALA由SEQ ID NO:77中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:77编码SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列。质粒pDVSF-3LALA中含有SEQ ID NO:77的核酸序列。

[0553] 将质粒转染入人胚肾(HEK)293T细胞,在48小时后通过酶联免疫吸附测定(ELISA)定量上清液中的分泌的抗体水平(图69B)。pDVSF-3WT和pDVSF-3LALA均产生600ng/mL的人IgG,从而确认所述质粒表达人IgG,以及LALA突变在体外对抗体表达水平没有作用。为了确认正确的抗体组装,从转染的HEK293T细胞的上清液收集DVSF-3和DVSF-3LALA抗体,并通过SDS-PAGE凝胶分离以进行免疫印迹分析(图69C)。重链和轻链蛋白具有它们的预期分子量,这表明正确的蛋白质切割和抗体组装。

[0554] 为了评估抗体的生物活性,进行测量含抗体的上清液是否结合重组DENV1-3E蛋白的结合ELISA测定。分泌DVSF-3WT或DVSF-3LALA抗体的HEK293T细胞的上清液能够识别DENV1-3E蛋白,然而DENV4不被识别,如所预期的(图72)。另外,含DVSF-3WT和DVSF-3LALA的上清液能够使被DENV1-3感染的Vero细胞染色,然而被DENV4感染的Vero细胞不被上清液染色(图69D)。每一个构建体显示DENV1-3的体外中和(数据未显示),但DVSF-3WT增强具有Fc γ R的人K562细胞的DENV感染,然而DVSF-3LALA没有这样的体外ADE活性(图72B和75(底

图))。另外,DVSF-3结合人FcγR1a然而DVSF-3LALA不结合FcγR1a(图75(顶图))。

[0555] 为了在体内研究抗体产生动力学,测定可在免疫容纳宿主中对抗体表达建模的DNA质粒编码的人IgG在裸鼠中的表达的持续时间。用100ug的编码另一种人IgG1抗-DENV抗体DVSF-1WT的DNA质粒静脉内注射小鼠,随后立即用EP静脉内注射小鼠。DVSF-1抗体由SEQ ID NO:67所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:67编码SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。

[0556] 血清中的人IgG浓度在注射的5天内可被检测到,在注射后2周达到约1000ng/mL的峰值水平(图70A,左图)。人IgG表达的持续时间持续至少19周(图70A,右图),从而举例说明了可利用DNA质粒获得的持续表达水平。

[0557] 鉴于小鼠DENV攻击模型使用来自129/Sv背景的小鼠,因此研究编码抗体的DNA质粒构建体以测定DVSF-3WT或LALA在该背景品系中的血清可检测水平的产生。来自接受pDVSF-3WT或pDVSF-3LALA的129/Sv小鼠的血清显示可比较的人IgG水平(图70B)并且可使利用DENV1-3感染的Vero细胞染色(图70C)。另外,含有WT和LALA的血清均能够中和DENV1-3(图70D)。

[0558] 为了评估表达DNA质粒编码的抗-DENV中和mAb的小鼠是否可被保护免受DENV攻击,使用AG129小鼠模型。该小鼠模型缺乏I型和II型干扰素(IFN)受体并且,在DENV感染后,概括了人疾病的许多方面。这些小鼠也表现出ADE,具有低剂量的血清特异性以及交叉反应性抗体,两者增色增强感染。对于这些研究,用小鼠适应性DENV2株系S221感染小鼠,所述株系,在亚中和量的抗-DENV mAb 2H2存在的情况下,引起抗体增强的严重疾病和在亚致死剂量上在AG129中引起急性致死(感染后4-6天)。

[0559] 为了确定表达pDVSF-3LALA的AG129小鼠是否可被保护免受仅用病毒的感染和抗体依赖性增强的疾病(ADE),给予AG129小鼠pDVSF-3WT或pDVSF-3LALA,随后立即地EP的单次肌内注射。阴性对照接受pVax1空载体,随后EP的单次肌内注射。5天后,在外源性抗-DENV mAb 2H2存在(ADE)或不存在(仅用病毒的感染)的情况下,利用亚致死剂量(1×10^9 GE)的DENV2S221攻击小鼠。在攻击后一天,pDVSF-3WT、pDVSF-3LALA和pVax1组群中的小鼠分别具有750ng/mL、1139ng/mL和不可检测水平的平均人IgG浓度(图73;对于pDVSF-3WT与pDVSF-3LALA之间的比较, $p \leq 0.0930$)。

[0560] 在仅用病毒的感染的条件下,预期pDVSF-3WT处理的小鼠经历ADE和急性致死,因为由DVSF-3WT抗体与DENV形成的免疫复合物应当导致增加的感染。相反地,pVax1和pDVSF-3LALA处理的小鼠预期得到保护免受严重疾病。事实上,6只pDVSF-3LALA处理的小鼠中的5只和所有5只pVax1小鼠得到保护免受严重疾病;所有pDVSF-3WT处理的小鼠到第5天死于疾病(图71A;对于pDVSF-3LALA与pDVSF-3WT之间的比较, $p \leq 0.0084$),这表明pDVSF-3LALA抗仅用病毒的感染的保护能力。

[0561] 在ADE条件下,预期pDVSF-3WT和pVax1处理的小鼠因增强的感染而经历急性致死,然而pDVSF-3LALA处理的小鼠应当得到保护免受严重疾病。所有5只接受pDVSF-3LALA的小鼠在ADE条件下存活,然而接受pDVSF-3WT或pVax1空载体的那些小鼠在4-5天内死于急性抗体增强的疾病(图71B;对于pDVSF-3LALA与pDVSF-3WT之间的比较, $p \leq 0.0072$)。综上所述,这些数据显示pDVSF-3LALA的注射在仅用病毒和ADE条件下均保护免受严重疾病。

[0562] 综上所述,编码经修饰的人抗-DENV1-3中和抗体的DNA质粒的单次肌内注射能够保护免受仅用病毒导致的DENV疾病和抗体增强的DENV疾病。由通过该DNA递送法表达的中

和抗-DENV mAb赋予的保护是快速的,在pDVSF-3LALA施用后1周以内被攻击的小鼠完全存活。此外,质粒编码的抗体递送在递送后5天内提供保护,这比疫苗驱动的保护显著更快。

[0563] 实施例27

[0564] 具有DVSF-1和DVSF-3构建体的制剂

[0565] DENV血清型可逃避中和。因此,进行研究以检查用于预防的靶向DENV病毒体上的多个表位的抗体混合物。在1条腿上用pDVSF-3WT(抗-DENV1-3)并且在另一条腿上用pDVSF-1WT(抗-DENV1-4)注射129/Sv小鼠。利用两种质粒注射的小鼠在第7天相较于接受单一质粒的小鼠具有显著更高的血清人抗体水平(图74;对于pDVSF-1WT与pDVSF-1+3之间的比较, $p \leq 0.0088$;对于pDVSF-3WT与pDVSF-1+3之间的比较, $p \leq 0.0240$)。此外,来自用两种质粒注射的小鼠的血清使利用所有4种DENV血清型感染的Vero细胞染色(数据未显示)。

[0566] 实施例28

[0567] 抗-DENV抗体

[0568] 如上所述,生成产生DVSF-1(即,WT)、DVSF-3WT和DVSF-3LALA的构建体。生成产生DVSF-1LALA、DVSF-2WT和DVSF-2LALA的另外的构建体。

[0569] 如上所述,DVSF-3WT由SEQ ID NO:75中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:75编码SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列。DVSF-3WT抗体中和DENV1-3(数据未显示)。

[0570] 如上所述,DVSF-3LALA由SEQ ID NO:77中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:77编码SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列。

[0571] DVSF-1WT由SEQ ID NO:67中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:67编码SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列。DVSF-1WT抗体中和DENV1-4(数据未显示)。

[0572] DVSF-1LALA由SEQ ID NO:69中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:69编码SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列。

[0573] DVSF-2WT由SEQ ID NO:71中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:71编码SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列。DVSF-2WT抗体中和DENV4(数据未显示)。

[0574] DVSF-2LALA由SEQ ID NO:73中所示的核酸序列编码。SEQ ID NO:73编码SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列。

[0575] 12.条款

[0576] 出于完整性的原因,本发明的各个方面示于以下编号的条款中:

[0577] 条款1.一种在受试者中产生合成抗体的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含编码抗体或其片段的重组核酸序列的组合物,其中所述重组核酸序列在所述受试者中表达以产生所述合成抗体。

[0578] 条款2.根据条款1所述的方法,其中所述抗体包含重链多肽或其片段和轻链多肽或其片段。

[0579] 条款3.根据条款2所述的方法,其中所述重链多肽或其片段由第一核酸序列编码并且所述轻链多肽或其片段由第二核酸序列编码。

[0580] 条款4.根据条款3所述的方法,其中所述重组核酸序列包含所述第一核酸序列和所述第二核酸序列。

[0581] 条款5.根据条款4所述的方法,其中所述重组核酸序列还包含用于在所述受试者中将所述第一核酸序列和所述第二核酸序列表达为单个转录物的启动子。

[0582] 条款6.根据条款5所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。

[0583] 条款7.根据条款5所述的方法,其中所述重组核酸序列还包含编码蛋白酶切割位点的第三核酸序列,其中所述第三核酸序列位于所述第一核酸序列与第二核酸序列之间。

[0584] 条款8.根据条款7所述的方法,其中所述受试者的蛋白酶识别并且切割所述蛋白酶切割位点。

[0585] 条款9.根据条款8所述的方法,其中所述重组核酸序列在所述受试者中表达以产生抗体多肽序列,其中所述抗体多肽序列包含所述重链多肽或其片段、所述蛋白酶切割位点和所述轻链多肽或其片段,其中由所述受试者产生的所述蛋白酶识别并且切割所述抗体多肽序列的蛋白酶切割位点,从而产生切割的重链多肽和切割的轻链多肽,其中所述合成抗体由所述切割的重链多肽和所述切割的轻链多肽产生。

[0586] 条款10.根据条款4所述的方法,其中所述重组核酸序列包含用于将所述第一核酸序列表达为第一转录物的第一启动子和用于将所述第二核酸序列表达为第二转录物的第二启动子,其中所述第一转录物被翻译成第一多肽,并且所述第二转录物被翻译成第二多肽,其中所述合成抗体由所述第一和第二多肽产生。

[0587] 条款11.根据条款10所述的方法,其中所述第一启动子和所述第二启动子相同。

[0588] 条款12.根据条款11所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。

[0589] 条款13.根据条款2所述的方法,其中所述重链多肽包含可变重区和恒定重区1。

[0590] 条款14.根据条款2所述的方法,其中所述重链多肽包含可变重区、恒定重区1、铰链区、恒定重区2和恒定重区3。

[0591] 条款15.根据条款2所述的方法,其中所述轻链多肽包含可变轻区和恒定轻区。

[0592] 条款16.根据条款1所述的方法,其中所述重组核酸序列还包含Kozak序列。

[0593] 条款17.根据条款1所述的方法,其中所述重组核酸序列还包含免疫球蛋白(Ig)信号肽。

[0594] 条款18.根据条款17所述的方法,其中所述Ig信号肽包括IgE或IgG信号肽。

[0595] 条款19.根据条款1所述的方法,其中所述重组核酸序列包含编码SEQ ID NO:1、2、5、41、43、45、46、47、48、49、51、53、55、57、59、61、66、68、70、72、74、76和78的至少一个氨基酸序列的核酸序列。

[0596] 条款20.根据条款1所述的方法,其中所述重组核酸序列包含SEQ ID NO:3、4、6、7、40、42、44、50、52、54、56、58、60、62、63、63、64、65、67、69、71、73、75和77的至少一个核酸序列。

[0597] 条款21.一种在受试者中产生合成抗体的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含编码重链多肽或其片段的第一重组核酸序列和编码轻链多肽或其片段的第二重组核酸序列的组合物,其中所述第一重组核酸序列在所述受试者中表达以产生第一多肽,并且所述第二重组核酸在所述受试者中表达以产生第二多肽,其中所述合成抗体由所述第一和第二多肽产生。

[0598] 条款22.根据条款21所述的方法,其中所述第一重组核酸序列还包含用于在所述受试者中表达所述第一多肽的第一启动子以及其中所述第二重组核酸序列还包含用于在所述受试者中表达所述第二多肽的第二启动子。

[0599] 条款23.根据条款22所述的方法,其中所述第一启动子和第二启动子相同。

- [0600] 条款24.根据条款23所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。
- [0601] 条款25.根据条款21所述的方法,其中所述重链多肽包含可变重区和恒定重区1。
- [0602] 条款26.根据条款21所述的方法,其中所述重链多肽包含可变重区、恒定重区1、铰链区、恒定重区2和恒定重区3。
- [0603] 条款27.根据条款21所述的方法,其中所述轻链多肽包含可变轻区和恒定轻区。
- [0604] 条款28.根据条款21所述的方法,其中所述第一重组核酸序列和所述第二重组核酸序列还包含Kozak序列。
- [0605] 条款29.根据条款21所述的方法,其中所述第一重组核酸序列和所述第二重组核酸序列还包含免疫球蛋白(Ig)信号肽。
- [0606] 条款30.根据条款29所述的方法,其中所述Ig信号肽包括IgE或IgG信号肽。
- [0607] 条款31.一种预防或治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括根据条款1或21所述的方法在受试者中产生合成抗体。
- [0608] 条款32.根据条款31所述的方法,其中所述合成抗体对于外来抗原是特异性的。
- [0609] 条款33.根据条款32所述的方法,其中所述外来抗原来源于病毒。
- [0610] 条款34.根据条款33所述的方法,其中所述病毒是人免疫缺陷病毒(HIV)、基孔肯雅热病毒(CHIKV)或登革热病毒。
- [0611] 条款35.根据条款34所述的方法,其中所述病毒是HIV。
- [0612] 条款36.根据条款35所述的方法,其中所述重组核酸序列包含编码SEQ ID NO:1、2、5、46、47、48、49、51、53、55和57的至少一个氨基酸序列的核酸序列。
- [0613] 条款37.根据条款35所述的方法,其中所述重组核酸序列包含SEQ ID NO:3、4、6、7、50、52、55、56、62、63和64的至少一个核酸序列。
- [0614] 条款38.根据条款34所述的方法,其中所述病毒是CHIKV。
- [0615] 条款39.根据条款38所述的方法,其中所述重组核酸序列包含编码SEQ ID NO:59、61和66的至少一个氨基酸序列的核酸序列。
- [0616] 条款40.根据条款38所述的方法,其中所述重组核酸序列包含SEQ ID NO:58、60和65的至少一个核酸序列。
- [0617] 条款41.根据条款34所述的方法,其中所述病毒是登革热病毒。
- [0618] 条款42.根据条款41所述的方法,其中所述重组核酸序列包含编码SEQ ID NO:45、68、70、72、74、76和78的至少一个氨基酸序列的核酸序列。
- [0619] 条款43.根据条款41所述的方法,其中所述重组核酸序列包含SEQ ID NO:44、67、69、71、73、75和77的至少一个核酸序列。
- [0620] 条款44.根据条款31所述的方法,其中所述合成抗体对于自体抗原是特异性的。
- [0621] 条款45.根据条款44所述的方法,其中所述自体抗原是Her2。
- [0622] 条款46.根据条款45所述的方法,其中所述重组核酸序列包含编码SEQ ID NO:41和43的至少一个氨基酸序列的核酸序列。
- [0623] 条款47.根据条款45所述的方法,其中所述重组核酸序列包含SEQ ID NO:40和42的至少一个核酸序列。
- [0624] 条款48.一种通过根据条款1-47所述的方法的任一方法产生的产物。
- [0625] 条款49.根据条款48所述的产物,其中所述产物是能够表达功能性抗体的单个DNA

质粒。

[0626] 条款50.根据条款48所述的产物,其中所述产物由两种不同的能够表达功能性抗体组分的DNA质粒组成,所述功能性抗体组分在体内组合以形成功能性抗体。

[0627] 条款51.一种治疗受试者的病原体感染的方法,其包括:施用编码对于所述病原体是特异性的合成抗体的核苷酸序列。

[0628] 条款52.根据条款51所述的方法,其还包括:施用所述病原体的抗原以在所述受试者中产生免疫应答。

[0629] 条款53.一种编码合成抗体的核酸分子,所述核酸分子包含在全长的选自由以下组成的组的核酸序列上具有至少约95%的同一性的核酸序列:(a)SEQ ID NO:44中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:67中所示的核酸序列;(c)SEQ ID NO:69中所示的核酸序列;(d)SEQ ID NO:71中所示的核酸序列;(e)SEQ ID NO:73中所示的核酸序列;(f)SEQ ID NO:75中所示的核酸序列;(g)SEQ ID NO:77中所示的核酸序列;(h)SEQ ID NO:58中所示的核酸序列;(i)SEQ ID NO:60中所示的核酸序列;和(j)SEQ ID NO:65中所示的核酸序列。

[0630] 条款54.根据条款53所述的核酸分子,其中所述核酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:44中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:67中所示的核酸序列;(c)SEQ ID NO:69中所示的核酸序列;(d)SEQ ID NO:71中所示的核酸序列;(e)SEQ ID NO:73中所示的核酸序列;(f)SEQ ID NO:75中所示的核酸序列;(g)SEQ ID NO:77中所示的核酸序列;(h)SEQ ID NO:58中所示的核酸序列;(i)SEQ ID NO:60中所示的核酸序列;和(j)SEQ ID NO:65中所示的核酸序列。

[0631] 条款55.一种编码合成抗体的核酸分子,所述核酸分子包含编码在全长的选自由以下组成的组的氨基酸序列上具有至少约95%的同一性的蛋白质的核酸序列:(a)SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列;(c)SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列;(d)SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列;(e)SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列;(f)SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列;(g)SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列;(h)SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列;(i)SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列;和(j)SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0632] 条款56.根据条款55所述的核酸分子,其中所述核酸序列编码具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的蛋白质:(a)SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列;(c)SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列;(d)SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列;(e)SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列;(f)SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列;(g)SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列;(h)SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列;(i)SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列;和(j)SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0633] 条款57.根据条款53-56中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸序列编码轻链多肽、重链多肽、轻链多肽和重链多肽两者,或其片段。

[0634] 条款58.根据条款57所述的核酸分子,其中当所述核酸序列分子编码轻链多肽和重链多肽时,所述核酸序列还编码蛋白酶切割位点。

[0635] 条款59.根据条款58所述的核酸分子,其中所述蛋白酶切割位点位于轻链多肽与重链多肽之间并且其中所述蛋白酶切割位点包括弗林蛋白酶切割位点和2A肽序列。

[0636] 条款60.根据条款53-56中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸分子还编码免疫

球蛋白(Ig)信号肽。

[0637] 条款61.根据条款60所述的核酸分子,其中所述Ig信号肽包含IgE信号肽。

[0638] 条款62.根据条款53-56中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含表达载体。

[0639] 条款63.一种组合物,所述组合物包含条款53-56中任一项的核酸分子。

[0640] 条款64.根据条款63所述的组合物,所述组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

[0641] 条款65.一种预防有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用条款53-56中任一项的核酸分子。

[0642] 条款66.根据条款65所述的方法,其中所述疾病是通过基孔肯雅热病毒(CHIKV)或登革热病毒(DENV)感染。

[0643] 条款67.根据条款66所述的方法,其中当所述疾病是通过CHIKV感染时,所述核酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:58中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:60中所示的核酸序列;和(c)SEQ ID NO:65中所示的核酸序列。

[0644] 条款68.根据条款66所述的方法,其中当所述疾病是通过DENV感染时,所述核酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:44中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:67中所示的核酸序列;(c)SEQ ID NO:69中所示的核酸序列;(d)SEQ ID NO:71中所示的核酸序列;(e)SEQ ID NO:73中所示的核酸序列;(f)SEQ ID NO:75中所示的核酸序列;和(g)SEQ ID NO:77中所示的核酸序列。

[0645] 条款69.根据条款66所述的方法,其中当所述疾病是通过CHIKV感染时,所述氨基酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列;和(c)SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0646] 条款70.根据条款66所述的方法,其中当所述疾病是通过DENV感染时,所述氨基酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列;(c)SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列;(d)SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列;(e)SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列;(f)SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列;和(g)SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列。

[0647] 条款71.根据条款65所述的方法,其中施用包括电穿孔和注射的至少一种。

[0648] 条款72.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用条款53-56中任一项的核酸分子。

[0649] 条款73.根据条款72所述的方法,其中所述疾病是通过基孔肯雅热病毒(CHIKV)或登革热病毒(DENV)感染。

[0650] 条款74.根据条款73所述的方法,其中当所述疾病是通过CHIKV感染时,所述核酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:58中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:60中所示的核酸序列;和(c)SEQ ID NO:65中所示的核酸序列。

[0651] 条款75.根据条款73所述的方法,其中当所述疾病是通过DENV感染时,所述核酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:44中所示的核酸序列;(b)SEQ ID NO:67中所示的核酸序列;(c)SEQ ID NO:69中所示的核酸序列;(d)SEQ ID NO:71中所示的核酸序列;(e)SEQ ID NO:73中所示的核酸序列;(f)SEQ ID NO:75中所示的核酸序列;和(g)SEQ ID NO:77中所示的核酸序列。

[0652] 条款76.根据条款73所述的方法,其中当所述疾病是通过CHIKV感染时,所述氨基酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:59中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列;和(c)SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列。

[0653] 条款77.根据条款73所述的方法,其中当所述疾病是通过DENV感染时,所述氨基酸序列选自由以下组成的组:(a)SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列;(b)SEQ ID NO:68中所示的氨基酸序列;(c)SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列;(d)SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列;(e)SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列;(f)SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列;和(g)SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列。

[0654] 条款78.根据条款72所述的方法,其中施用包括电穿孔和注射的至少一种。

[0655] 应理解,前文详述和所附实施例仅是例举性的并且无意被视为对本发明的范围的限制,所述范围仅由所附权利要求和它们的等同物确定。

[0656] 对公开的实施方案的各种改变和改进对于本领域技术人员来说是显而易见的。可在不背离其精神和范围的情况下进行这样的改变和改进,包括但不限于与化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或使用本发明的方法相关的那些改变和改进。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学理事会 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA)
 大卫·韦纳 (WEINER, David)
 卡鲁皮亚·穆苏马尼 (MUTHUMANI, Karupiah)
 朱厄尔·沃尔特斯 (WALTERS, Jewell)
 尼兰詹·萨尔德赛 (SARDESAI, Niranjan)

<120> DNA抗体构建体及其使用方法

<130> PW55573RESL

<150> PCT/US13/075137

<151> 2013-12-13

<160> 78

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的氨基酸序列

<400> 1

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Arg
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe
 35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

[0001]

Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Leu Leu Thr Ile Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Pro Arg Phe Gln Gly Arg Ile Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Thr Thr Gly Trp Gly Trp Leu Gly Lys
 115 120 125

Pro Ile Gly Ala Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240

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

[0002]

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 260 265 270
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 290 295 300
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 385 390 395 400
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 405 410 415
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 435 440 445
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 450 455 460
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys
 465 470 475 480
 Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
 485 490 495
 Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val
 500 505 510
 Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val
 515 520 525
 Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Gln Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 530 535 540
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Lys Leu Ala
 545 550 555 560
 Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly
 565 570 575
 Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Val Ala Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 580 585 590
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
 595 600 605
 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Gln Ser Leu Ser Thr Phe

```

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

```

Gly Glu

```

<210> 2
<211> 768
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-P69 Ig的氨基酸序列

<400> 2

```

[0003]

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1          5          10          15
Thr His Ala Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Phe Leu
20          25          30
Arg Gly Val Gln Cys Gln Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
35          40          45
Gln Pro Gly Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp
50          55          60
Phe Ser Arg Gln Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
65          70          75          80
Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr His
85          90          95
Ala Asp Ser Val Trp Gly Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
100         105         110
Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala
115         120         125
Thr Tyr Phe Cys Val Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly
130         135         140
Tyr Asn Tyr Tyr Asp Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met
145         150         155         160
Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
165         170         175
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
180         185         190

```

[0004]

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 195 200 205
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 210 215 220
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 245 250 255
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 260 265 270
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 275 280 285
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 305 310 315 320
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 325 330 335
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 340 345 350
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 355 360 365
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 370 375 380
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 385 390 395 400
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 405 410 415
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450 455 460
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 465 470 475 480
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 485 490 495
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser
 500 505 510
 Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu
 515 520 525
 Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu Leu Thr
 530 535 540
 Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala

545 550 555 560
 Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly
 565 570 575
 Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 580 585 590
 His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg
 595 600 605
 Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr
 610 615 620
 Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr
 625 630 635 640
 Tyr Cys Lys Ser Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly
 645 650 655
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr
 660 665 670
 Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu
 675 680 685
 Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp
 690 695 700
 Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro
 705 710 715 720
 Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu
 725 730 735
 Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr
 740 745 750
 His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 755 760 765

[0005]

<210> 3
 <211> 792
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 编码HIV-1 Env Fab的重链(VH-CH1)的核酸序列

<400> 3
 angciltgccg ccacacatgga gactgataca ctgcctgcgt gggigtctgt gntgtgggltg 60
 ccagggtcaa ccggagatgg ggtcaggctc cctctggtcc ctagcggcgg ccagatggag 120
 aaaccggcgg cggagcatgg gatctccctg asagcatctg gatacagatt catgcactgt 180
 accctgaact gatttaggtt ggtctctgga agagaccag agtgatggg gtgcctgaaa 240
 ccacaggggg gaggagtga ttacgccgg cccctgcagg gacgagtac catgaccagg 300
 gactgtaca gcatatccgc ctctatggag ctgggtccc tgacagtga cgatactgt 360
 gtctacttct gcacacggg aaagaaactgt gactataatt gggattttga acactggggc 420
 cggggaacac ccgtgatctt cagctccccc agtactaagg gaccttcagt gtttccactg 480
 gccctctctc gtaaatccac ctctggggg acagccgtc tgggatgcct ggtgaaagt 540
 tatttcccg zacctgtgac cgtcagttgg aactcagggg ctctgacttc tggcgtgac 600
 accttctctg cagctctgca gtcaagcggg ctgtacagtc tgtctctgtt ggtcactgtg 660
 cctagttcaa gcttgggcaa tcagactctt atttgaacg tgaatcataa gcatccaat 720
 acaaaagtgg acaaaaaagg cgaacccaaa tctgttaacc ctatgatgt gcccgactac 780
 gccagactcg gg 792

<210> 4
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> HIV-1 Env. Fab的轻链(VL-CL)

 <400> 4
 aagcttgccg ccaccatgga aaccgataca ctgctgctgt gggctgtgt gctatgggtg 60
 ccaggaaata cgggggatgg ggtccaggtc cagattgtgc tgactcagtc ccttgggaac 120
 ctgtctctga gtccaggcga gacagctatc atttcatgcc gaactagcca gtacggcagc 180
 ctggcttggt atcagcagcg accaggacag gcaccacgac tggtcattta ctcaggcagc 240
 acaagggcgg ctggcatccc cgacaggttc tcgggcagca ggtggggggc tgattacaac 300
 ctgactatct ctaactctgga gagggggac ttggcgtgt actattgcca gcagtatgag 360
 ttcttcggcc aggggaactaa ggtgcaggtg gacatcaaaa gaaccgtggc agccccatcc 420
 gtcttcattt ttcccccttc tgaagagcag ctgaagtcag gcaccgcag cgtggtctgt 480
 ctgcgaana atttctaccc cgggaagcc aaggtgcagt ggaagtgga caacgctctg 540
 cagagtgga attcacagga gagcgtgacc gaacaggact ccaaggatte tacatatgt 600
 ctgagcagca ccttgacct gagaaagca gattacaga agcacaagt gtatgcctgt 660
 gaagtcacac atcaggacct gaggagcccc gtgactaaaa gtttcaaccg aggagagtgc 720
 tacctttatg atgtgccga ctacgctaa ctogag 756

<210> 5
 <211> 731
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VRC01 IgG

[0006]

<400> 5
 Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15
 His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro
 20 25 30
 Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile
 35 40 45
 Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu
 50 55 60
 Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg
 65 70 75 80
 Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr
 85 90 95
 Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His
 115 120 125
 Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Pro Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

[0007]

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 290 295 300
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 370 375 380
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg
 465 470 475 480
 Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp
 485 490 495
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu
 500 505 510
 Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
 515 520 525
 Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys
 530 535 540

Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
 545 550 555 560
 Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly
 565 570 575
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu
 580 585 590
 Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
 595 600 605
 Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys
 610 615 620
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 625 630 635 640
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 645 650 655
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 660 665 670
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 675 680 685
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 690 695 700
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser
 705 710 715 720

[0008]

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 725 730

<210> 6
 <211> 819
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 优化的编码IgG重链的核酸序列

<400> 6
 ggaiccgcca ccatggaaac cgacacictg ctgctgtggg tctctgtgct gigggisccc 60
 ggctcaacag gcgcaggggc tcaggtccag ctgggtccagt ctggagctg gatcaagacc 120
 cctggcagct ccgtcaaaat ttcttcagag gcaagtggt acaacttcog ggactatagc 180
 atcactggg tgcggctgat tctgataag ggaattgagt ggaicggctg gatcaagcca 240
 ctgtggggcg ctgtgtccta cgcaaggcag ctgcaggggc ggtctccat gacacgcacg 300
 ctgtctcagg acccagacga tcccgattgg ggggtggcct acatggagt cagtggactg 360
 acfctccag acacggcaga atattlllgt gtgcggagag gctccctgga ctactgiggg 420
 gatttcccat ggcagtatg gtgtcaggga acgtgtgtcg tggctctag tgcacccacc 480
 aagggcacca ggtgttttcc tctggcccca tcaagcaaaa gtacatcagg aggaactgca 540
 gctctgggat gtctggtgaa ggattacttc cccgagcctg tgaccgtcag ctgggaactcc 600
 ggagcactga cctccggagt gcacacattt cccgtgttcc tgcagtcctc taggctgtac 660
 tctctgagti cagtggtaac agtgccttagc tctctcttgg gcacccagac atatatctgc 720
 aacgtcaatc ataagccaaag taatactaaa gtggacaaga aagtgcaccc caaatcctgc 780
 tacccttatg aogtgcctga ttatgcttga taactcgag 819

<210> 7
 <211> 753
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 优化的编码IgG轻链的核酸序列

<400> 7

```

ggatccgccca ccaaggagac tgatacactg ctgctgtggg tgcctgtgct gtgggtgect      60
ggctcaaacg gcgaeggggc tcaggctccag attgtgcga ccagagccc tggcaicctg      120
tcactgagcc caggagagac cgcacacacg ttctgcaagg cctcccaggc cgggaacgct      180
aigacattgtt cccagaaacg gagaggacag gtgcccagac tgcctgatct tgacacttca      240
aggcagacaa gctggagtgct tgatcgatct gtcggcagcg gctctgggac agacttcttt      300
ctgactatata ctatgcctga cagagaggat ttgcctgtgt cctatigcca gactttgaa      360
ttctttggac tgggcagcga gctggaagtg cacaggaccg tcgcctgctc aagtgtgttc      420
atttttcccc ctatcgatga gcagctgaaa tcggggacag cctctgttgt ctgtctgtcg      480
aacaatttctt zccccccgca agcaaaaggc cgttggaagc tgcacaacgc cctgtagagt      540
ggcaattcac gggagagcgt gacgaacag gactcgaagg attctacata tagctcagc      600
tcactcttga cctgtctata agctgattac gagaagcaca aagtgtatgc atgcgaagtc      660
acatcagagg gctgtctatg tctgtgacc aagagcttta cccgagggga gtgttaccca      720
tatgacgtcc ccgattacgc ctgataactc gag      780

```

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VRC-1 IgG的IgE1信号肽

<400> 8

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1      5      10      15

```

His Ser

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VRC01 IgG的可变重链区

<400> 9

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly
100     105     110

```

```

Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Pro Ser Thr Lys Gly
115     120     125

```

[0009]

<210> 10
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VRC01 IgG的恒定重链区1 (CH1)

 <400> 10
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 1 5 10 15

 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 20 25 30

 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 35 40 45

 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 50 55 60

 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 65 70 75 80

 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys
 85 90 95

 Ser Cys

[0010]

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VRC01 IgG的铰链区

 <400> 11
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

 <210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VRC01 IgG的恒定重链区2 (CH2)

 <400> 12
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VRC01 IgG的恒定重链区3 (CH3)

<400> 13
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Tar Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

[0011]

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VRC01 IgG的弗林蛋白酶切割位点

<400> 14
Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

<210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VRC01 IgG的GSG接头和P2A肽

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

<210> 16
<211> 104
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VRC01 IgG的可变轻链区 (VL)

<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala
20 25 30
Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser
35 40 45

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
50 55 60

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

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr
85 90 95

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg
100

<210> 17
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VRC01 IgG的恒定轻链区(CL, κ)

<400> 17

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

[0012]

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的人IgG重链信号肽

<400> 18

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 19
<211> 154
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的可变重链区

<400> 19

Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Phe Leu Arg Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Gln Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
20 25 30

Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg
35 40 45

Gln Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
50 55 60

Val Ala Phe Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr His Ala Asp Ser
65 70 75 80

Val Trp Gly Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu
85 90 95

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

Cys Val Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr
115 120 125

Tyr Asp Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp
130 135 140

Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
145 150

<210> 20
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的恒定重链区I (CH1)

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Arg Val

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的铰链区

<400> 21

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

<210> 22
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0013]

<223> HIV-1 Env-PC9 Ig的恒定重链区2 (CH2)

<400> 22

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Tar Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-PC9 Ig的恒定重链区3 (CH3)

<400> 23

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Tyr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-PC9 Ig的弗林蛋白酶切割位点

<400> 24

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-PC9 Ig的GS6接头和P2A肽

[0014]

<400> 25

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的人λ轻链信号肽

<400> 26

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu Leu Thr Cys Cys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Asn Ser
20

<210> 27

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的可变轻链区(VL)

<400> 27

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Leu Thr Ser Thr
85 90 95

Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 Env-PG9 Ig的恒定轻链区(CL, λ)

<400> 28

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

[0015]

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的人IgG重链信号肽

<400> 29

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 30
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的可变重链区

<400> 30

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

[0016]

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的恒定重链区1 (CH1)

<400> 31

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Lys Val

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的铰链区
<400> 32

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

<210> 33
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的恒定重链区2 (CH2)
<400> 33

[0017]

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的恒定重链区3 (CH3)
<400> 34

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 Env-4E10 Ig的弗林蛋白酶切割位点

<400> 35

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

<210> 36
 <211> 22
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 Env-4E10 Ig的GSG接头和P3A肽

<400> 36

[0018]

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 37
 <211> 20
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 Env-4E10 Ig的人κ轻链信号肽

<400> 37

Met Val Leu Glu Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly
20

<210> 38
 <211> 106
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 Env-4E10 Ig的可变轻链区(VL)

<400> 38

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Gln Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn
20 25 30

Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Val Ala Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Gln Ser Leu
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
100 105

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIV-1 Env-4E10 Ig的恒定轻链区(CL, κ)

<400> 39

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
35 40 45

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
50 55 60

[0019]

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
65 70 75 80

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
85 90 95

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
100 105

<210> 40
<211> 744
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码抗-Her-2 Fab的VH-CH1的核酸序列

<400> 40

ggatcgtgca ccatggactg gatatggatt ctgtttctgg tcgcgcgcgc tacaagagig 60

cattccgaag tgcagctggg cgagagtggg gggggaactgg tgcagcccg eggatctctg 120

cgactgagtt ggcgcgttc aggttcacg tttaacagact acaccatgga ttgggtgaga 180

caggcaactg gcaagggaact ggagtggtg gctgatgtca acccaaatag tgggggtca 240

atttacaacc agaggttcaa gggcagggtc accctgagcg tggacaggtc caaaaacact 300

ctgtatctgc agatgaattc tetgcgggt gaagataccg cagctacta ttgcgcgcgc 360

aacttgggac caagcttcta cttgactat tgggggcagg gcacactggt gactgtcagc 420

tccgttcta caaagggaac aagctgttc ccactggcac cctctagtaa atccacctct 480

ggagggaacag cagccctggg ctgtctgtg aaagaactatt tccccgagcc tgtgactgtc 540

agctggaact ccgagcaact gacagcgga gtgcacacct ttccagcgt cctgcagtc 600

agcgccctgt actccctgtc ctctgtgtc acagtgccta gttaagcct gggaactcag 660

acctatattt gtaatgtga ccaaaacca agcaatacaa aggtggacaa gaaggtggaa 720

ccaaaatcct gctgataact cgag 744

<210> 41
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗-Her-2 Fab的VH-CH1的氨基酸序列

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 35 40 45

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln
 65 70 75 80

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

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

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

<210> 42
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码抗-Her-2 Fab的VL-CL的核酸序列

<400> 42

ggatccgcca caatggattg gacttggatt ctgttccctgg tcgcgcgcgc taccgcgcgtg 60
 catccgata ttcagatgac tcagagccccc tctctacgtg cagccagcgt ggscgaccga 120
 gtccacatca catgccaaagc ttctcaggat gtgagttattg gggtgccttg gtaccagcag 180
 aagccaggca aagcaccnaa gctgctgctc tattcgcct ctatcaggta taraggagtg 240
 cccagcagat tcatggctc aggaagcggg actgacttta ctctgacct cagctccctg 300
 cagcttgagg atttcgtac ctctatctgc cagcagtact atatctaccc atataccttt 360

[0020]

```

ggccaggga caaaagtga gatcaaggc accgiggccg ctccctccgt ctccatttt 420
ccccottctg acgaacagct gaagagcgga acagcaagcg tggctctgct gctgaacat 480
ttctaccctc scgaggccaa agtgcagtgg aaggctgata acgccttcca gcccgggaat 540
tctcaggaga gtgtgactga acaggactca aagatagca cctattccct gctctagta 600
ctgactctga gcaaggcaga ctacgaaaag cacaagigt atgcctgtga ggtaaccac 660
caggggctgt caagcccg cccaagtc ttcaatagag gcaatgtctg acaactcgag 720

```

<210> 43
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗-Her-2 Fab的VL-CL的氨基酸序列

<400> 43

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1      5      10     15

```

```

His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
20     25     30

```

```

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
35     40     45

```

```

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
50     55     60

```

```

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
65     70     75     80

```

```

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
85     90     95

```

```

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr
100    105    110

```

```

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
115    120    125

```

```

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130    135    140

```

```

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145    150    155    160

```

```

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165    170    175

```

```

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180    185    190

```

```

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195    200    205

```

```

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210    215    220

```

```

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225    230

```

<210> 44
 <211> 2241
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码抗-DENV 人IgG的核酸序列

[0021]

[0022]

```

<400> 44
ggatccgccca ccaaggactg gaattggagg attctgttcc tggtcgcgc cgtacggg 60
actcagcttc agggacatct ggtcgaatct ggaggaggag tggccagcc tggccgatcc 120
ctgcgactgt cttgcgcagc tagcgccctc aacttcagca ccaacgcaat gcactgggtg 180
cgacaggcac cagccaaggg actggagtgg gtgcgtgtga tcctatcga cggaagccat 240
aagtactaig cagattctgt gaaaggccgg ttaccattt ccagggacaa ttctaagaac 300
accctgtatc tgcagatgaa tagcctggcg gcagccgata ccgcagtgtc ctatggcgca 360
actgtcggcg tgcctgacct gccagtgaa gcggaaact ttccacctg gggacagggc 420
agtctgtctc cagtggactc gcgaagtact aagggacct cagtgttccc actggcacco 480
tcctagtaat ctactagtgg cgggaccgct gcactgggat gtctggtgaa ggactatctc 540
cccgagcccg tcacctgtag ctggaattcc ggagccctga ccaggcgct ccacactttt 600
cccgctgtgc tgcagtcagc aggactgtac tccctgtcct ctgtgttcc tgtgccagt 660
tcaggcttgg gcactagacg ctatatcttc atgtgaacc acaaggccctc taacaccaaa 720
gtgcacaaga aagtggaacc taagagctgt gataaaacac atactgtccc aectgtcca 780
gcaccagagc tgcctggagg acceagcgtg ttctgttcc ccccaagcc taagacaca 840
ctgaigtata gccggacacc tgaagtaact tgcgtggctg tggacgtgc ccacaggac 900
ccgaagtcga agtttaattg gtacgtggat ggcctcagg tgcataacgc caagaccaaa 960
ccccggaggg aacagtataa tagcacatac agagtctgt cctctctgac tgtgtgtcat 1020
caggatttgc tgaattggaa ggagtataag tgcgaagtgt ctacaaagc tctgccgca 1080
ccaatcgaga aaaccattag caaggtaaa ggcagacctc ggggaaccac ggtgtacaca 1140
ctgcctccaa gtgcgcagc gctgaccag aatcaggtct cctgacatg tctgttgaaa 1200
ggcttctatc catcgatat cgcctggag tgggaagca acggcagcc cgaatacaat 1260
tacaagacca caacctctgt gctggactct gctggcgtt tctttctga ttctaaagt 1320
accgtggaca aaagttagtg gcagcagggg aatgtctttt catgtagct gatgcagag 1380
gccctgcaca accattacac acagaagtc ctgtctctga gtcccgaaa gaggggccgc 1440
aaacggagat caggagagcg agctactaat ttacgctgc tgaacagge aggggaigtg 1500
ggggadanco ccgacctat ggttggacc ccactgttc tgtttctgt gacagtgt 1560
ccgggggcaa gaaattctca ggtgtcctg acacagcac catcagtga cggagacca 1620
ggacagggg tgaactctc ctgcacagc agcagcagc acattggcg cgggtacga 1680
gtctatttgt atcagagct gcccgcacg gtcttaagc tgcgtatct tggcaacaat 1740
aaccgcccat ctgggtgtcc cgtatcttc tccgctctc aaagtggac ttccgctcgc 1800
ctggtatata ccggctgca ggcagggac gaagctgatt actattgcca gactacgac 1860
tcaggctga ccggagctg gtctgggga ggaaccagc tgcagtcct gggacagct 1920
aaagctctc caagcgtgac actgtttctt ccatctctg aggaactgca ggtcaaacag 1980
gcaaccttgg ttgtctgat ttccgacttc taccctggg cgttcactgt ggttggag 2040
gcagatagt tccctgtcaa agccggagt gagactacca cccatcaaa gcagagcaat 2100
aacaataacg cagccagctc ctatctgtcc ctgaccttg agcagtggaa gtctacaaa 2160
tctattctt gccaggtcac tcacgaagga agcacttgg agaaaactgt cgcaccaacc 2220
gaatgtagt gataactcga g 2241

```

<210> 45
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗-DENV人IgG的氨基酸序列

<400> 45

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

[0023]

Thr His Ala Gln Ala His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asn Phe
 35 40 45
 Ser Thr Asn Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Gly Val Leu Thr Trp Pro Val Asn Ala Glu
 115 120 125
 Tyr Phe His His Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Ser Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380

Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 485 490 495
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu
 500 505 510
 Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln
 515 520 525
 Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys
 530 535 540
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr
 545 550 555 560
 Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Cys Gly Asn Asn
 565 570 575
 Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Thr Gly Val Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 675 680 685
 Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 690 695 700
 Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
 705 710 715 720
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 725 730 735
 Glu Cys Ser

[0024]

<210> 46
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG重链

<400> 46

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 20 25 30

Val Ile Lys Thr Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gly Tyr Asn Phe Arg Asp Tyr Ser Ile His Trp Val Arg Leu Ile Pro
 50 55 60

Asp Lys Gly Phe Glu Trp Ile Gly Trp Ile Lys Pro Leu Trp Gly Ala
 65 70 75 80

Val Ser Tyr Ala Arg Gln Leu Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Arg Gln
 85 90 95

Leu Ser Gln Asp Pro Asp Asp Pro Asp Trp Gly Val Ala Tyr Met Glu
 100 105 110

Phe Ser Gly Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Val Arg
 115 120 125

[0025]

Arg Gly Ser Cys Asp Tyr Cys Gly Asp Phe Pro Trp Gln Tyr Trp Cys
 130 135 140

Gln Gly Thr Val Val Val Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 145 150 155 160

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 165 170 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 180 185 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 195 200 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 210 215 220

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 225 230 235 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 245 250 255

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 260 265

<210> 47
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG轻链

<400> 47

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

1	5	10	15
Gly Ser Thr	Gly Asp Gly Ala Gln Val	Gln Ile Val	Leu Thr Gln Ser
	20	25	30
Pro Gly Ile	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr	Ala Thr	Leu Phe Cys
	35	40	45
Lys Ala Ser	Gln Gly Gly Asn Ala Met Thr Trp Tyr	Gln Lys Arg Arg	
	50	55	60
Gly Gln Val	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr	Ser Arg Arg Ala Ser	
	65	70	80
Gly Val Pro	Asp Arg Phe Val Gly Ser Gly Ser Gly Thr	Asp Phe Phe	
	85	90	95
Leu Thr Ile	Asn Lys Leu Asp Arg Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys		
	100	105	110
Gln Gln Phe	Glu Phe Phe Gly Leu Gly Ser Glu Leu Glu Val His Arg		
	115	120	125
Thr Val Ala	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
	130	135	140
Leu Lys Ser	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
	145	150	155
Pro Arg Glu	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
	165	170	175
Gly Asn Ser	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	180	185	190
Tyr Ser Leu	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	195	200	205
His Lys Val	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
	210	215	220
Val Thr Lys	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro		
	225	230	235
Asp Tyr Ala			

[0026]

<210> 48
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 Env Fab的重链(VH-CH1)的氨基酸序列

<400> 48

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

```

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

Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp
      100                    105                    110

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn
      115                    120                    125

Trp Asp Phe Glu His Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser
      130                    135                    140

Pro Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
      145                    150                    155                    160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      165                    170                    175

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      195                    200                    205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      210                    215                    220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      225                    230                    235                    240

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
      245                    250                    255

```

[0027]

```

<210> 49
<211> 244
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> HIV-1 Env Fab的轻链(VL-CL)的氨基酸序列

```

```

<400> 49

```

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1      5                      10                      15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ala Gln Val Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
      20                      25                      30

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys
      35                      40                      45

Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
      50                      55                      60

Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly
      65                      70                      75                      80

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu
      85                      90                      95

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
      100                    105                    110

Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys
      115                    120                    125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      130                    135                    140

```

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Tyr Pro Tyr Asp Val
225 230 235 240

Pro Asp Tyr Ala

<210> 50
<211> 1536
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码HIV-1 PG9 Fab的核酸序列

[0028]

<400> 50
ggatccgcca ccatggcaag accctgtgc accctgtgc tgcgtatggc aacctggcc 60
ggagccctgg cacagagcgc cctgacctag cccgcaagcg tctcggctc accaggccag 120
agcaicacta ttatgtgcaa cgggactagc aacgacgtgg gaggtatga gagtgicagc 180
tggtaccagc agcatcccg aaaagcacca aaagtgtca tctacgatgt cagtaaaagg 240
ccaagtgggg tctcaaatag gttctcaggg agtaaatctg ggaatacagc atctctgacc 300
atctccggac tgggcgcaga agaagaagg gactactatt gcaaaagcct gacctcaacc 360
agacggcgag tctttgggac aggcaccaag ctgacagtcn tgacagtgcg tgccccctcc 420
gtcttcattt ttccaccttc agaagagcag ctgaactctg gcaatgcac tggtgtctgc 480
ctgtgaaca actctatctc acgagaggcc aaggtgcagt ggaatgtgga taacgcactg 540
cagtcgggca atagtcagga aagcgtgact gagcaggett ccaaggacag tacctatagc 600
ctgtccagta cactgacctt gtccaaggct gactacgaaa aacataaggt gtaigcatgt 660
gaagtgactc accagggaat gaggtacca gtaactaagt cttttaacag gggagagtgc 720
ggcgggggag gatctggagg cggcggtctt ggagggggag gctcaggggg cggagggaagc 780
ggcggaggag ggtccggagg aggaggcagt cagagactgg tcgaaagcgg gggaggagtg 840
gtgcagcctg ggtcctcaat gagactgten tgcgctgcca gtggctttga tttttcaaga 900
cagggaatgc attgggtcag gcaggcaccc ggacagggcc tggaaagggt cgccttcatt 960
aagtiacagc gaagcgagaa gtaccatgcc gactcagigt ggggaaggct gagcaictca 1020
agggacaact caaaggacac ctgtacctg cagatgaata gcctgagagt ggaagatacc 1080
gctacttatt tctgcgtgc agaggccgga gggccagatt accggaacgg gtacaattac 1140
tatgatttct acgacggcta ctacaattac cattatatgg atgtctgggg caaaggaaact 1200
acagtcacgg tgagctccgc aagactaag ggaccttccg tgtttcctct ggctcccagt 1260
tccaaaagia catccggagg aacagccgtc ctgggatgtc tggtaaggga ctattttccc 1320
gagcccgiga ctgtctctg gaacagcggg gctctgacaa gcggggigca cacttttctc 1380
gccgtgctgc agtccagtgg gctgtacagt ctgtctagtg togtcactgt gccaagetca 1440
agtctgggga cccagacata catttgtaat gtgaaccata aacctcaaaa caccaaagtg 1500
gacaagaaag tggaaacctaa aagctgataa ctogag 1536

<210> 51
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 PG9 的氨基酸序列

<400> 51

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr Ser Asn Asp
 35 40 45

Val Gly Gly Tyr Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Val Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gly Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser
 100 105 110

Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr
 115 120 125

Val Leu Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

[0029]

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Val Glu Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 275 280 285

Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Gln Gly Met His Trp Val Arg Gln
 290 295 300

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Lys Tyr Asp Gly
 305 310 315 320

Ser Glu Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Trp Gly Arg Leu Ser Ile Ser

```

325          330          335
Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
340          345          350

Val Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Glu Ala Gly Gly Pro
355          360          365

Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr Tyr Asp Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr
370          375          380

Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
385          390          395          400

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
405          410          415

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
420          425          430

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
435          440          445

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
450          455          460

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
465          470          475          480

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
485          490          495

Asp Lys Lys Val Gln Pro Lys Ser
500

```

[0030]

```

<210> 52
<211> 1563
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 编码HIV-1 4E10 Fab的核酸序列

```

```

<400> 52
ggatccggcca ccatggcaag acctctgtgc acctctgtgc tgttgatggc taactcggcc 60
ggggtctctg ctgagattgt ccgaccacag tccctcgcca ctacgtcact gtcccccggc 120
gagcgcgcga ctctgtcctg cagagcaagg cagtcctcgc ggaacaacaa gtggcctgg 180
taaccagcgc gccacggaca ggcacccagg ctgcgacat acggagcaag ctcccgccct 240
agcggagtcg ctgatatatt ctccgggaag ggtccgggga ccgatttcac tatgaccatc 300
tcagagctcg aacctgagga ttttgcctg tatctctgt zgcagtacgg gcagagcctg 360
tcaactttcg gccagggaa ctaagtcgaa acagagaaac tggccgcacc aagcgtcttt 420
atttttcccc ctgcgataga acagcigaaa tccgggactg ctcccgtagt ctgcctcgtg 480
aataactctt ctccaagaga ggcacaggcg cagtggaag tggacacgcg cctgcagagc 540
ggaaactcac aggaatctgt gacagagcag gactccaagg atagcacata cagtcctgcc 600
tcactctga cctgttcgaa agctgactat gggagagata agtctacga atgtgaggtg 660
acctaccagg gactagagtc cccgtcact agtctctca atagaggcga gtccgggggc 720
ggggtcagtg gcggaggggg agtgggggc ggggggagtg gctggcggcg gagtggcggc 780
ggcggctcag gggcggggg ctcccaggcg cagctggccc zgagcggagc caggttcnaag 840
agaccagget ctacgtcac cgtgagctgc aaagccagcg gaggctcctt tagcacctac 900
gccctgtcat ggttgcggca ggcgccagcg ccaggcctgg agtgatggg cggcgtgata 960
ccctgtctga ccattactaa ctatgacctt agatttggag gccggatcac catcacagct 1020
gacagatcca catcacagc ttacctggag ctgaacagtc tgaggccgga ggacactgca 1080

```

```

gtctactact gtgcacgaga aggcaccact ggaatgggggt ggetgssssaa gcccatcggg 1140
gcctttgcac attggggcgg agggacactg gtgactgtga gctctgccag cactaaaggg 1200
ccacagtgtct tecttcggc cccaagtcc aagagtacat cagggggcac cgcgcactg 1260
gggtgtctgg tgaaggatta ctcccagag cccgtgacag tcagttggaa cagcggcgct 1320
ctgaaccagtg ggggtgcacac ttteccagcc gtgctgcaga gtteagggct gtactccctg 1380
tcttcagtgg tgaatg-gcc ctcaagcagt ctggggactc agacttacat ttgtaatgtg 1440
aaccataaac cctcaataac taaagtggac aaaaaagtgg aaccaagag ctgataactc 1500
gag 1503

```

<210> 53

<211> 493

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HIV-1 4E10 Fab的氨基酸序列

<400> 53

```

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Gln Ser
20           25           30

```

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35           40           45

```

```

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

```

[0031]

```

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Pro Ser Gly Val Ala
65           70           75           80

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85           90           95

```

```

Ser Arg Leu Glu Pro Gln Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100          105          110

```

```

Gly Gln Ser Leu Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Lys Arg
115          120          125

```

```

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130          135          140

```

```

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145          150          155          160

```

```

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165          170          175

```

```

Gly Asn Ser Glu Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180          185          190

```

```

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195          200          205

```

```

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

```

```

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
225          230          235          240

```

```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245          250          255

```

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 260 265 270
 Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala
 275 280 285
 Ser Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala
 290 295 300
 Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Ile Thr Asn Tyr Ala Pro Arg Phe Gly Gly Arg Ile Thr Ile Thr Ala
 325 330 335
 Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Thr Thr Gly Trp
 355 360 365
 Gly Trp Leu Gly Lys Pro Ile Gly Ala Phe Ala His Trp Gly Gly Gly
 370 375 380
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 385 390 395 400
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 405 410 415
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 420 425 430
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 435 440 445
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 450 455 460
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 465 470 475 480
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 485 490

[0032]

<210> 54
 <211> 1446
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 编码IIIV-1 VRC01 IgG1重链(VH/CH1/铰链/CH2/CH3)的核酸序列
 <400> 54
 ggatccgccca ccaiggaattg gacatggatt ctgttccctgg tcgccgccgc aactagagig 60
 caatcacagg tgcagcigtgt gcagtcaggo gggcagaiga agaaacccgg cgagagtatg 120
 cgaatctcat gccggggtag cgggtacgaa ttcatcgact gtacctgaa ctggattaga 180
 ctggcacctg ggaagaggcc agcgtggaig gcatggctga aacctagagg cggggcagtg 240
 aattacgcea gaccactgca ggtagggto actatgacce ggaagtgtta ttctgatacc 300
 gcattctcgg agctgcgaag tctgacagtc gacgatactg cegtgtactt ctgcacacgg 360
 ggcaagaact gtgactataa ttggga'tttt gaacactggg gaagggggac acctgtcatt 420
 gtgagctccc caagtaactaa ggaaccccca gtgtttcccc tggcccttc tagtaaaagt 480
 acctcaggag gcaacagccgc tctgggaige ctggigaagg attanttccc tgaaccagtc 540
 acctgagatt ggaactcagg cgcctgaca agcggggctc atacttttcc agctgtgctg 600
 cagtcgaagc ggcgtgaete cctgtcctct gtggtcacag tgcccagttc aagcctggga 660

```

acacagactt atatctgtaa cgtcaatcac aagcctagea atactaaagt ggacaagaaa    720
gccgagccta agagctgcga accaaagttc tgtgataaaa ccatacatg ccttccctgt    780
ccagctcctg aactgtcggg cggcccatcc gtgttccgtt ttccacccaa gcccaagac    840
acctgatga ttacgaggac tctgagggtc accgtcgtgg tegtggagc gtcccacgag    900
gaccccaag tcacglttaa ctggtacgtg gatggcgtcg aagtgcataa tgccaagaca    960
aaaccccagg aggaacagta caactctacc tatcgagtcg tgagtgtccc gacagtgtct    1020
caccaggact ggtcgaacgg gaaggagtat aagtgcaag tgtctaataa ggccctgcca    1080
gtcccatcg agaaaacaat ttccaaggca aaaggccagc caagggaacc ccagtgtag    1140
actctgcctc catcccgcca cgagctgact aagaaccagg tctctcigac ctgtctggig    1200
aaagattct atccaagcca tatgcctggt gagtgggaat ccaatggcca gcccgagAAC    1260
aatiaaaga ccacaccccc tgtgttggtt agcgttggtt ccttctttc gtattcaag    1320
ctgccgttgg ataaaaagcg ctgacagcag gaaacgtctt ttacgtgctc cgtgatgca    1380
gaagctctgc acaatcatta caccagaag tctctgagtc tgcacctgg caagtgtata    1440
ctcgag    1446

```

<210> 55
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 VRC01 IgG1重链(VH/CH1/CH2/CH3)的氨基酸序列

<400> 55

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

[0033]

His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro
20 25 30

Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile
35 40 45

Asp Cys Tar Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu
50 55 60

Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg
65 70 75 80

Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr
85 90 95

Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Phe Cys Tar Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His
115 120 125

Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Pro Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

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

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

[0034]

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 290 295 300
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 370 375 380
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 56
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码HIV-1 VRC01 IgG轻链(VL/CL)的核酸序列

<400> 56
 ggatcgcgcaaatcgattg gacttggatt ctgttctctg tggcagccgc taacagagtc 60
 cattccgaaa ttgtgtgtgac ccagtcctcc ggaacaactgt ctctgagtc tggcgagaca 120
 gccatcattt cctgtaggac ttctcagtao gggagtctgg catggtatca gcagcgacca 180
 ggacaggctc ctgcactggt catetactca ggaagcactc gggcagccgg cattcccgac 240
 cgattctccg gggtccgttg gggacccgat taacacctga ccaatcaca tctggaaagc 300
 ggagactttg scgtgtacta ttgccagcag taagattct ttgggcaggg aaccaagtc 360
 cagggtggaca tcaacgcgac agtcgtgcga ccaagcgtgt tcatctttcc accctcagat 420

gaacagctga agtccggcac cgcctctgtg gtgtgcctgc tgaacaatt ctaccccegg 480
 gaggcgaagg tccagtggaa agtggacaac gccctgcagt ctggcaatag tcaggagtca 540
 gtgactgaac aggacagcaa gaattccacc tattctctgt cctctactct gacctgagc 500
 aaagctgact acgagagaca caaagtgat gcaigtgagg tcacccacca gggactgcgg 560
 tcaccctgca ccaagagctt caatgcgga gagtgtgat aactcgag 708

<210> 57
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HIV-1 VRC01 IgG轻链(VL/CL)的氨基酸序列

<400> 57

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser
 35 40 45

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile
 50 55 60

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

Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser
 85 90 95

[0035]

Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 130 135 140

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 145 150 155 160

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 165 170 175

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 180 185 190

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 195 200 205

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 210 215 220

Arg Gly Glu Cys
 225

<210> 58
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码CHIKV-Env-Pas的重链(VH-CH1)的核酸序列

<400> 58

```

ggatcgcgcc ccaigggattg gacatggagg attctgtttc tggtagccgc cgtatstgga      60
actcaacgtc aggtgcagcti ggtgcagtcg gggtccgaac tgaagadacc aggggtatct      120
gtgaaggcca gtggcaaaagc ctacaggctac accctgacac ggtatgccat gaattgggtg      180
cgccaggctc ctggacaggc actggagttg atgggctggc tcaacactta caccggaaat      240
ccaacttaag tgcagggggti saccgccoga ttctgtttt ctctggacac ttctgtctct      300
accgccttc tgcacattac aagtcigaag gcagaggaca atgcctgtia cttctagct      360
agggaaagcg gagcaagagg ctitgattat tggggccagg gaaccttgtt gacagtccgc      420
ttcccgagca caaagggaac ctccgtgttc ccactggctc cctctagtaa aagtacatca      480
ggggccacig cugctciggc atgtctggc aaagattact tcccggaacc tggacacttc      540
acttggaaat ccgagctcti gaccagcggg gtgcatacat ttcccgagt cctgcagtca      600
agcggaacti actccctgtc ctctgtgttc acagtcctta gttaagcct ggggacacag      660
acttatctct gtaatgtgac ccataagcca agcaacacca aagtggacca asaagtggaa      720
cctaaggctt gcgctctact cgag

```

<210> 59
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CHIKV-Env-Fab的重链(VH-CH1)的氨基酸序列

<400> 59

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

[0036]

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu
 35 40 45

Thr Arg Tyr Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Val
 65 70 75 80

Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
 85 90 95

Thr Ala Phe Leu His Ile Thr Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Gly Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

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

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

<210> 60
<211> 738
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码CHIKV-Env-Fab的轻链(VL-CL)的核酸序列

<400> 60
ggatccgcca ccatggcatg gaccccactg ttccgttcc tgcctacttg ttgctctggc 60
ggagagcaatt cacagagcgt cctgaccacg cccctttctg tgtccggagc accaggacag 120
cgagtcacaa tctcttgac: tggagctcc tctaacattg gggccagcca cgacgtgcct 180
tggtaaccagc agctgccagg gacccctccc acactgtctg tctatgtgaa ctctaatagg 240
cctagtggcg tccagatag atttccaggg agcaagtcg gcacctctgc tagcttggca 300
attacaggac tgcaggtctg ggacgaagca gattectatt gccagagtta cgactcaaac 360
ctgtcaggca ggcagtggt cggaggagga actaagctga ccgtctcggg acagcccaaa 420
gcgcctcctt ctgtgacct gttccccct agttccaggg aactcaggc caacaaggct 480
actcgttgtt gtcigatctc cgacttctac cctggagcag tgaccgtgc atggaaggcc 540
gatagctccc cagtgaagc tggggtcag accacaactc ccagcagca gtccaacaac 600
aagtacgcag cctctagttc tctgtactg acacctgac agtgggaagag ccacaaatcc 660
tattcttgcc aagtgaacta tgagggcagt accgtggaaa agacagtcgc cccaactgag 720
tgttctgat aactcag 738

<210> 61
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CHIKV-Env-Fab的轻链(VL-CL)的氨基酸序列

<400> 61
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu Leu Thr Cys Cys Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly
20 25 30
Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn
35 40 45
Ile Gly Ala Ser His Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr
50 55 60
Ala Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Val Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
85 90 95
Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110
Tyr Asp Ser Asn Leu Ser Gly Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
130 135 140
Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160

[0037]

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
 165 170 175
 Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
 180 185 190
 Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
 195 200 205
 Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
 210 215 220
 Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 62
 <211> 2238
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码HIV-1 Env-4E10 Ig的核酸序列

[0038]

<400> 62
 ggatcgcgcc ccatggattg gacatggagg attctgtttc tggtcgcgcg cgtacagga 60
 actcacgcgc aggtgcagct ggtagcagca ggagccgaag tgaagcgacc aggcagctcc 120
 gtcaactgtgt ccgtcaaaagc atctggcgga tcattcagca cctacgccct gagctgggtg 180
 agacaggctc ctggacgagg actggaatgg atgggaggcg tcctcccact gctgacaatt 240
 actaacfaag ccccccgatt tcagggcagg atcaccatta cagcagaccg ctccacttct 300
 accgcctatc tggagctgaa tagcctgaga ccagaagata ccgcagtgtc ctattgcgcc 360
 cgggagggaa ccacagatg gggatggctg ggaangccca tcggggcttt cgcacactgg 420
 ggccagggaa cctctgtcac agtgtctagt gccagcacaaggccccctc cgtgtttccc 480
 ctggctccct caagcaaaag tacttcagga gggaccgcgc ctctgggatg tctgtgaag 540
 gactacttcc ctgagccagt caccgtgtcc tggaaactctg gcgtctgac ctccggagtg 600
 caacatttcc cgcagtcctt gcagtcctct gggtcttact ctctgagttc agtggtaact 660
 gtgcctagct cctctctggg cacacagact tatatctgca acgtgaatca caagccctcc 720
 aataccaaaag tgcacaagaa agtggaaact aagtcttggt afaaaacca tacatgccca 780
 cctgttcag caccagatg gctggcgga ccttcctgtt tctgtttcc acccaagcca 840
 aaagacacac tgatgattag ccggacacct gaagtgaatt gtatggtcgt ggaactcagc 900
 cagcaggacc ccgaagtgaa gtccaactgg tacgtggatg gcgtcgaggt gcataatgcc 960
 aagaccaaac ccaggagga acagtacaac tctacttata gggtctgag tgtctgacc 1020
 gtgtctgacc aggaactggc gaacgggaag gagtataagt gcaaatgtc caataaggcc 1080
 ctgcacagct ccttcagaaa aacaatttct aaggtctaaag gccagccacg cgaaccccag 1140
 gtgtacactc tgcctccag caggacagag ctgactaaga accaggtgag ctgacatgt 1200
 ctggcaaaag gcttctatcc aagcatatc gccgtggagt ggaatccaa tggacagccc 1260
 gaaaacaatt acaagactac cccccctg ctggacagtg atggatcatt cttctgtat 1320
 tccaagctga ccgtggacaa atctcgttgg cagcagggga acgtctttag ctgcctcgtg 1380
 atgcacgagg cctgcacaa tcattacaca cagaagtttc tgagtctgtc accaggcaag 1440
 cggggagcaa aaaggagaag cgggtcggc gctactaact ttagctgtgt gaacaggcca 1500
 ggggatgtgg aggaaaatcc tggcccaatg gtctgcaga cccaggtgtt tatctcactg 1560
 ctgtctggtg tttagcgggc ttatggogaa atcgtgtga ctacagccc cggaacccag 1620
 tctctgagtc ctggggagcg cgtacactg agctgtcag catcacagag cgtggggaa 1680
 aataagctgg catgtacca gcagagcct gccagggctc caagactgct gatctatgcc 1740
 gcaagttcac ggtctagcgg agtggcagac cgtctctccg gatctgggag tggcactgat 1800
 ttactctga ccatcagcag gctggagcca gaagacttgc ctgtgtacta ttgccagcag 1860

```

tacggccagt cactgagcac atttgacacg gggactaagg tcgaaaaaag aaccgtggca 1920
gccccaaagt tcttcatttt tccacctca gacgagcage tgaagagtgg aacagcccca 1980
gtcgtgtgtc tgcigaacaa ttctacccc agggaggcca aggtccagtg gaaagtggaa 2040
aacgtcttgc agagcggcaa ttccaggag tctgtgacag aacaggacag taaggattca 2100
acttatagcc tgagctccac actgactctg tccaaagcag attacgagaa gcacaacgtg 2160
tatgcctgcg aagtcaccca tcagggaactg tctagtcccg tgacaaagtc ttttaacaga 2220
ggggagtgat aactcgag 2238

```

<210> 63
 <211> 2328
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码HIV-1 Env-PG9 Ig的核酸序列

```

<400> 63
ggatccgcca ccaaggatcg gacilggagg attctgttcc tggctgcgc cgcnaactgga 60
actcacgtcg aatttggact gtcattgggc ttctctggcg cctttctcgc aggggtccag 120
tgccagaggg tggtagagtc cggaggagga gtggtccagc caggcagctc cctgcgactg 180
agttgtccg cttcagggtt cgacttttct agacaggcca tgcactgggt gcggcaggca 240
ccaggacagg gactggagtg ggtggcttcc atcaagtacg acggaagtga aaatatatca 300
gccgattcag tgtggggcgc gctgtcaatt agcgcgcaca actccaagga taccctgiac 360
ctgcagatga attctctgag ggtcgaggac acagctactt attctcgcg gagggagcca 420
ggcggacctg attacagaaa cgggtataat tactatgact ttacgatgg ctactataac 480
taaccataata tggacgtgtg gggcaaggga accacagtca cagtgtctag tgcattcaac 540
aaagcccaaa cgcgtgttcc cctggccctt tcaagcaagt ccacttctgg aggaaccgca 600
gcactgggat gtctgggtgaa ggattacttc cctgagccag tcacgtgtag ttggaactca 660
ggcgccttga ctacggagat ccataccitt cctgcctgac tgcagtcctc tgggtgttac 720
agcctgagtt cagtgttcaa agtgcacagg tctctcttgg gcacccagac atatatctgc 780
aacgtgaato acaagcctag caatactaaag gtgcacaaaa gagtggaacc aaagagctg 840
gatcaaacct atacctgccc acctgttcca gcacctgagc tctggggagg gccttccgtg 900
ttctgttctc caccacaagg aaaagacacc ctgatgatta gccggacacc agaagtcact 960
tgctgtgtcg tggacgtgag ccacaggagc ccggaagtca agtttaactg gtacgtggat 1020
ggctctcagg tgcataatgc taagacaaaa ccacggggag aacagtcaca ctccacata 1080
cgcctcgtgt ctgtccctgac tgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtataag 1140
tgcaaatgtt ccaalaaggt actgccagcc cccatcgaga aaaccatttc taagcccaaa 1200
ggccagccac gagaacccca ggtgtataca ctgcctccaa gtggggacga gctgactaag 1260
aaccaggtct ctctgacctg tctggtgaaa ggtctctatc cctctgata cgtctgtgag 1320
tgggaagata atgacagccc tgaacaacat tacaagacta cccccctg gctggacagc 1380
gatggcagct tcttccctga tagcaagctg accgtggaca aatccagatg gcagcagggg 1440
aacgtcttta gttgctcagt gatgcacgag gcatgcaca atcattacac ccagaaaagc 1500
ctgtccctgt ctcttgccaa gagggggaaga aaaaggagaa gtgggtcagg cgcacaacac 1560
ttcagcctgc tgaagcaggc cggagatgtg gaggaaaatc ctgggcaaat ggcttggacc 1620
ccccgttccc tgtttctcgt gacatgctgt cctggcggaa gcaactccca gtctgcactg 1680
acacagccag caagtgtgtc agggagccca ggacagagca tcaccatttc ctgtaacggc 1740
acaagcaatg acgtcggggg ctacagatcc gtgtcttggc atcagcagca tcttggeaag 1800
gccccaaaag tctgtatctc cgtatgcagc aaacgccctt ctgggtgag taaccgattc 1860
agtggatcaa agagcgggaa taccgcttct ctgacaattc gtggcctgca ggacagggac 1920
gaaggagatt actattgcaa atcactgaca agcactcggc gccagatctc cggaaacggg 1980

```

[0039]

acaaagctga ctgctgtggg aaagcccaaa gctgcacata gcgtgacctt gtttccaccc 2040
 agttcagagg aactgcaggg taataagcaa acactgggtg gtctgatctc cgaattctac 2100
 cctggcgttg tcaatgtggc ctggaaggct gatagctccc cagtcaaaagc aggagtgga 2160
 acaactaccc cctccnagca gtctacaaac acgtacggcg cttctagtta tctgtccatg 2220
 actcccgagg agtgggaagg ccacaaatcc tattcttggc aggtgaccca tgagggtctc 2280
 acgttcgaaa agaccgtggc cctacagag tgttttgat aactcgag 2328

<210> 64
 <211> 2217
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码VRC01 IgG的核酸序列

<400> 64
 ggaatcccca ccaaggattg gacatggatt ctgttccctg tcgcgcgcgc aactagatg 60
 caticcaagg tgcagctggt gcagtcaggg ggcagacaga agaaacccgg cagaggtatg 120
 cgaatctcat gccgggctag cgggtacgaa ttcatcgact gtaccctgaa ctggattaga 180
 ctggcactct ggaagaggcc azagtggatg gnatggcga aacctagagg cggggcagtg 240
 aattacgcca gacaaactga ggcagaggtc actatgccc gcgactgta ttctgatacc 300
 gtattccctg agctgggaag tctgacagtc gctgatactg ccgtgtactt ctgcatacgg 360
 ggcdaagact gtactataa ttgggatttt gcaactggg gcagggggac aactgtcatt 420
 gtgagctccc caagtactaa ggaacctca gtgttccccc tggcccttc tagtaaaagt 480
 acctcaggag gcacagccgc tctgggtgtc ctggtgaagg attacttccc tgagccagtc 540
 accgtgagtt ggaactcagg cgcctcgaca agcggggccc atactttccc agctgtgctg 600
 cagtcaagcg ggtgtactc cctgtcctct ggggtcacag tgcaccgttc aagccgggga 660
 acacagactt ctctctgtaa cgtcaatcac aagcctagca atactaaagt ggacaagaaa 720
 gccgagctta agagctcgca accaaaagtc tctgataaaa cccatacctg ccttccctgt 780
 ccagctctct aactgttggg cggccctccc gtgttccctg ttccacccaa gcccaagac 840
 accctgatga ttacgaggac tctgaggctc acctgcgtgg tcttggaagt gtccacagag 900
 gaccccgaa g tcaagttaa ctggtacgtg gctgggtcgc cagtgcaaa tgcgaagaca 960
 aaaccocggg aggaacagta caactctacc tatagagtcg tgagtgtont gacagtgctg 1020
 caccaggact ggctgaacgg gaaggagtat aagtgcgaag tctctaatat ggccttgcca 1080
 gctcccatcg agaaaacaa ttccaaggca aaagccagc caagggaacc ccagggtac 1140
 actctgcttc catcccgca cagctgact aagaaccagg tctctctgac ctgtctggtg 1200
 aaagattct atccaagcga tatcccggtg gcttggaat ccaatggcca gcccgagaac 1260
 aattacaaga ccaaccccc tctgttgac agcgtggt ccttctttct gtattcaag 1320
 ctgacgttgg ataaaaagtc ctggcagcag ggaacgtct ttactctgtc cgtatgcac 1380
 gaagctctgc ccaatcatta caccagaag tctctgagtc tgtcaccctg caagagggga 1440
 cgaacacgga gacagcgtag cggaggtaca accttcagcc tctgaaaca ggcaggcgac 1500
 gtggaggaac ctcttgggac attggaattg acttggatc tgttcttggt ggcagccgct 1560
 accagagtc attcgaaat tctgtgacc cagtctccc gaacactgtc tctgagctct 1620
 ggcagagcag ccatcatttc ctgtaggact tctcagtac gtagcttggc atggtatcag 1680
 cagcgaccag gacaggtctc tctactgttc atctactcag gaagcactcg ggcagccgga 1740
 attccagacc gattctccgg gtctcgttgg gacactgatt caaacctgac catctcaat 1800
 ctggaaagcg gacattttgg ctgtactat tgcagcagc ctgagttctt tgggcaggga 1860
 accaaggtcc aggtggaaat caaacgaca gtctgtgac caagcgtgt catctttcca 1920
 cctctagatg aacagctgaa gtccggcacc gctctgttgg tctgtctgct gaacaatttc 1980
 taccocccgg aggaagaggt ccagtggaaa gtggacaacg ccttcagtc tggcaatagt 2040
 caggagtcag tgactgaaca gacagcagc gattccactt ctctctgtc ctctactctg 2100

[0040]

accctgagca aagctgatta cgagaagcac aaagtgtatg catgtgaggt caccacaccag	2160
ggacttgagg caccctgcac caagagcttc aaacggcgag agtggtgate actcgag	2217
<210> 65	
<211> 2323	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CHIKV snapi的核酸序列	
<400> 65	
ggatccgcca ccattggatg gacttggatt ctgtttcttg tggccgcgcg taccagagtg	60
cattcacagg tgcagctgca gcagcctggg gccgccttgg tgaagccagg agctagcgca	120
atgaigtctt gcaaagcctc tggctacact ttcaactcct attggatcac ctgggtgaag	180
cagcgacctg gacagggaat ggagtggttc ggcgaatct acccaggcac cgggagaaca	240
atctaccagg aaaaattcaa gacaaaagcc acactgactg tggacaccag ctctcttaca	300
gcttttctgc agctgaacag cctgacttcc gaggatagcg cgtgtacttc ttgcgcaaga	360
ggatccgctt ctcttactta tgccttgagc tatggggggc aggggaactag cgtaccgtg	420
agttcagcat ctaccaaggg accaagcgtg ttccacttgg cacttagctc caaatccact	480
tcggcgagga ccgcgcctct gggatgtctg gtgaaggatt acttccctga gccagtcaca	540
gtgagtttga actcaggggc tctgaccagc ggagtcacac catttcttgc agtctgtcag	600
tctagtggac tgtactccct gtcaagcgtg gtcaatgtcc catctcttag tctggggaac	660
cagacataata tctgcaacgt gaatcaccaag ccattccaata ccaaagtcca taagaaagtg	720
gagcccaagi cttgtgacaa aactcaatcc tgccttccct gtccagcaac tgaactgtg	780
ggagggccaa gcgtgttctt gtttccacc cagcctaaag acacccctgat gattagcagg	840
acaccagagg tcaattgcgt ggtcgtggac gtgagccacg aagaccccg ggtcaagttc	900
aactgttacc tggatggggt cgaagtgcct aaagccaaag caaaaccccg ggaggaaacg	960
tacaactcaa cctatcggtt cgtgagcgtc ctgacagtgc tgcaccagga ctggtctgac	1020
ggaaaggagt acaagtgcac agtgtctcat aaggccttgc cagctcccat cgaaaaaacc	1080
attagcaagg cttaaggcca gccaaagagc cccaggtgt acacactgtc tccatcaagg	1140
gaagaaactg caaagaacca ggtcagcctg acgtgtcttg tgaaggctt ctatccagc	1200
gatatcgag tggaaatggc gtcaatggg cagcctgaga acaattacaa gaccacaccc	1260
ccgtgtctg acagcgatgg gtcttcttt ctgtattcca agctgacagt ggataaatct	1320
cgggtgcagc agggaaacgt ctttagttgc tcaagtgaic acaagccct gcacaatcat	1380
tacactcaga agagcctgtc cctgtctccc ggaagaggg gcgcgaacg gagaagtggc	1440
tcaggggcaa ccaacttctc tctgtgcaa caggcggcg atgtggagga aaatcctggg	1500
ccaatgact ggacatggat tctgttctg gtggcagctg ctacaagggt ccatccgac	1560
attgtgtga ctacgtctcc tgaagctg gccgtgtctc agggcagcg agcaaccatc	1620
agttgtcagg ctacccagtc cgtcgactac gaaggggaca gtacgtgaa ctggtatcag	1680
cagaagcctg gacagtcccc aaaaactgtg atctatgatg ctagtaatct ggagtcaggc	1740
attcccgcaa gattctctgg aagtgctca gggacagact tcacctgaa cattcacctt	1800
gtcagggagg aggcgttggc taacctat ttccaggaaa gcaatgagga ccccgact	1860
ttggggggag gcaccaagct ggagatcaaa cgaactgtcg cagccccag cgtgttcatc	1920
tttccacct cagacgaaca gctgaagcgc ggaacgcct cctgtgtgt cctgtgaa	1980
aactctaac cccgcaggc caaggtccag tggaaagtgg ataacgtct gcagtcaggc	2040
aatagccagg aatccgtgac tgagcaggat tcaaggaca gtacctatc actgtcaagc	2100
acactgactc tgagcaagc agactacga aagcataaag tgtatgctg cgaagtacac	2160
cacaggggag tgaggtctcc agtcactcag tcttcaaca gagggaatg ctgataactc	2220
gag	2223

[0041]

<210> 66
 <211> 733
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CHIKV-snapi的氨基酸序列

<400> 66

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Gly Ala Ser Ala Met Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 35 40 45

Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr
 85 90 95

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp
 115 120 125

[0042]

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

[0043]

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr
 465 470 475 480
 Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 485 490 495
 Pro Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg
 500 505 510
 Val His Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val
 515 520 525
 Ser Gln Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
 530 535 540
 Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 545 550 555 560
 Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
 565 570 575
 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 580 585 590
 Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 595 600 605
 Glu Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 610 615 620
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 625 630 635 640
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 645 650 655
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 660 665 670
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Trp Glu Gln Asp Ser Lys
 675 680 685

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
690 695 700

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
705 710 715 720

Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
725 730

<210> 67
<211> 2241
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DVSP-1 WI的核酸序列

<400> 67
ggatccgccca cnaaggactg gaattggagg aatcgtttc tggtcgcgcg cgetactggg 60
acccacgctc aggcacatct ggtcgaatct ggaggaggag tggtcacgc tggccgateg 120
ctgcgaactgt ctggcgacgc tagcgcttc aaattcagca caaacgcaat gcactgggtg 180
cgacaggcac caggcaaggg actggagigg gtgcgttga tctcatacga cggaagccat 240
aagtactatg cagattctgt gaagggcggg ttaccattt ccaggacaa ttctaagaac 300
acctgtatc tgcagatga tagcctgcgc gcagccgata ccgcagtga ctattgcgca 360
actgtcggcg tgcagactg gccagtgaa gccgaatact ttaccattg gggacagggc 420
agcttggtct cagtagctc cgcaagtaac aagggaacct cagtgttccc actggcacc 480
tcctagtaaa ctactagtg cgggaacctg gcactgggat gtctggtaga ggaattttc 540
cccgagcctg taacagtgag ctggaattcc gtagccctga caagcggcgt ccacacttt 600
cccgctgtgc tgcagtaag cggactgac tccctgicct ctgtggtcac tgtgcctagt 660
tcaagcctgg gtactcagac ctatatctgc aatgtgaacc acaagccctc taacacaaa 720
gtcgacaaga aagtgaacc taagagctgt gataaaacac atactgccc acctgtcca 780
gcaccagagc tgcaggagg accaagcgtg ttccgtttc caeccnagcc taagacaca 840
cigtgaila gcgggaacc tgaagtcact tgcgagtcg tggacgtgc ccacgagac 900
cccgagtcac agtttaatt gtactggat ggcgtcagg tgcataacgc caagacaaa 960
ccccggagg aacagtacaa tagcacatat agagtcgtgt ccgtccagc tgtgtcgtat 1020
caggattggc tgaatgggaa ggcgttaag tgcgaagtgt ctaacaagcc tctgcctgca 1080
ccaatcgaga aaacatttag caagcctaaa ggcagccta ggaaccaca ggtgtacaca 1140
ctgcctccaa gtgcgacga gctgaccaag aatcagttct cctgacatg tctggtgaaa 1200
ggcttctate catcagatat cgcctggag tgggaagca acgggcagcc cgaacaacat 1260
tacaagacca caccctctgt gctggactct gatggcagtt tctttctgta tcttaagctg 1320
acctggaca aaatagatg gcgcagggg aatgtcttt catgtagct gatgcacag 1380
gcccgcaca accaataac accgaagtc ctgtcttga gtcccgaaa gagggccgc 1440
aaacggagat caggagcgg agctactaat ttacagctgc tgaacagcc aggggagtg 1500
gaggaaaacc ccggacctat ggcctggacc ccactgtcc tgtttctgt gacatgctgt 1560
cccggggca gcaattctca gactgtctg acacagccac catcagttag cggagacca 1620
ggacagaggg tgaccatctc ctgcacagcc agcagcagca acattggcgc cgggtacga 1680
gtgcattgtt atcagcagct gcccgccacc gctcctaagc tgcgtatctg tggcaacaat 1740
aaccccccat ctggggtgcc cgtcgattc tccgctcta aaagtggac ttacagcagc 1800
ctggctatta ccggcctgca ggcggaggac gaagtgatt actattgcca gagctacga 1860
tcaagcctga ccggagctgt gtccggagga ggaaccaagc tgacagtcct gggacagcct 1920
aaagccgctc caagcgtgac actgttctc ccatctctg aggaactgca ggaacaacag 1980
gcacacctgg ttgctctgat ttccgacttc taacccgggg cagtcactgt ggttggag 2040
gcagatagtt caccgtcaa agccggagt ggaactacca caccatcaa gcagagcaat 2100

[0044]

aacaaataacg cagctagctc ctctctgtcc ctgacccctg agcagtggag gcttcacaaa 2160
 tcttattctt gccaggtcac tccgaagga agcactgtgg agaaaactgt cgcaccancc 2220
 gaatgtagtt gataactcga g 2241

<210> 68
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSP-1 WT的氨基酸序列

<400> 68

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Thr His Ala Gln Ala His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asn Phe
 35 40 45

Ser Thr Asn Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

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

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

[0045]

Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Gly Val Leu Thr Trp Pro Val Asn Ala Glu
 115 120 125

Tyr Phe His His Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Ser Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240

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

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

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

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

290	295	300
Val Asp Gly Val Glu 305	Val His Asn Ala Lys Thr 310	Lys Pro Arg Glu Glu 315 320
Gln Tyr Asn Ser Thr 325	Tyr Arg Val Val Ser Val 330	Leu Thr Val Leu His 335
Gln Asp Trp Leu Asn 340	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 345	Lys Val Ser Asn Lys 350
Ala Leu Pro Ala Pro 355	Ile Glu Lys Thr Ile Ser 360	Lys Ala Lys Gly Gln 365
Pro Arg Glu Pro Gln 370	Val Tyr Thr Leu Pro Pro 375	Ser Arg Asp Glu Leu 380
Thr Lys Asn Gln Val 385	Ser Leu Thr Cys Leu Val 390 395	Lys Gly Phe Tyr Pro 400
Ser Asp Ile Ala Val 405	Glu Trp Glu Ser Asn Gly 410	Gln Pro Glu Asn Asn 415
Tyr Lys Thr Thr Pro 420	Pro Val Leu Asp Ser Asp 425	Gly Ser Phe Phe Leu 430
Tyr Ser Lys Leu Thr 435	Val Asp Lys Ser Arg Trp 440	Gln Gln Gly Asn Val 445
Phe Ser Cys Ser Val 450	Met His Glu Ala Leu His 455	Asn His Tyr Thr Gln 460
Lys Ser Leu Ser Leu 465	Ser Pro Gly Lys Arg Gly 470 475	Arg Lys Arg Arg Ser 480
Gly Ser Gly Ala Thr 485	Asn Phe Ser Leu Leu Lys 490	Gln Ala Gly Asp Val 495
Glu Glu Asn Pro Gly 500	Pro Met Ala Trp Thr 505	Pro Leu Phe Leu Phe Leu 510
Leu Thr Cys Cys Pro 515	Gly Gly Ser Asn Ser Gln 520	Ser Val Leu Thr Gln 525
Pro Pro Ser Val Ser 530	Gly Ala Pro Gly Gln Arg 535	Val Thr Ile Ser Cys 540
Thr Gly Ser Ser Ser 545	Asn Ile Gly Ala Gly Tyr 550 555	Asp Val His Trp Tyr 560
Gln Gln Leu Pro Gly 565	Thr Ala Pro Lys Leu Leu 570	Ile Cys Gly Asn Asn 575
Asn Arg Pro Ser Gly 580	Val Pro Asp Arg Phe Ser 585	Gly Ser Lys Ser Gly 590
Thr Ser Ala Ser Leu 595	Ala Ile Thr Gly Leu Gln 600	Ala Glu Asp Glu Ala 605
Asp Tyr Tyr Cys Gln 610	Ser Tyr Asp Ser Ser Leu 615	Thr Gly Val Val Phe 620
Gly Gly Gly Thr Lys 625	Leu Thr Val Leu Gly Gln 630 635	Pro Lys Ala Ala Pro 640
Ser Val Thr Leu Phe 645	Pro Pro Ser Ser Glu Glu 650	Leu Gln Ala Asn Lys 655

[0046]

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
660 665 670

Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
675 680 685

Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
690 695 700

Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
705 710 715 720

Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
725 730 735

Glu Cys Ser

<210> 69
<211> 2241
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DVSF-1 LALA的核酸序列

<400> 69
ggatccgcc ccattgactg gacttgagg attctgttgc tggtcgcgc cgtactgag 60
actcacgctc aggcacatct ggtcgactct ggaggaggag tggccagcc tggccgatat 120
ctggcactgt ctggcgagc tagcgcttgc aacttcagca caaacgcaat gcaatgggtg 180
cgacaggcac caggcaagg actggagtgg gtcgtctgga tctcatcga cggaaagccat 240
aagtactatg cagctcctgt gtcaggctgg ttcaatatt ccaggacaa ttctaaagac 300
acctgtatc tgcagatgaa tagcctgcgc gcagccgata ccgcagtga ctattgcga 360
actgtgggg tgcgacctg gccagtgaac gccgaatact ttccaccattg gggacagggc 420
agctcgtct cagtgaactc ccgaagact aagggaacat cagtctccc actggcaccc 480
tcctagtaai ctactatgg cgggaccgct gcactgggat gctcgtgaa ggaatattc 540
cccgagctg tcacctggag ctggaaatcc ggagccctga caagcggcgt ccacacttt 600
ccctgtgtg tgcagtaag cggactgtac tccctgtct ctgttgtaac tgtgctagt 660
tcaagcttg gccctcagac ctctatctgc atgtgaacc caagccctc taacaccaa 720
gtcgacaaga aagtgaacc taagagctgt gataaacac atacttgcc acctgtcca 780
gcaccagagg cagctggagg accaagctgt ttctgttgc caccacagcc taaagacaca 840
ctgatgatta gtcggacac tgaagtact tgcgtggtcg tggactgtc ccacaggac 900
cccgaaatc agtttaattg gtactgtgat ggctcagagg tgcataacgc caagacaaa 960
cccgaggagg aacagtacaa tagcacatat agagtctgt ccttctgac tgtgctgat 1020
caggattggt tgaatggaa ggggtataag tgcgaagtgt ctaacaaggt tctgctgca 1080
ccaatcaga aaactattag caaggctaaa ggcacgctc ggaaccaca ggtatcaca 1140
ctgctccaa gtgcgaaga gctgaccaag aatcaggctt cctgacatg tctggtgaa 1200
ggcttctatc catcagatat cgcctggag tgggaagca acggcgagcc cgaataaat 1260
tacaagacca caccccctgt gctggactct gatggcagtt tctttctga tctaaagtg 1320
acctggaca aaagtatg gcgcagggg aatgttttt catgtagct gatgcagag 1380
gacctgcaca acaattacac acagaagtc ctgtctctga gtcccgaaa gaggggcgc 1440
aaacggagat cagggaagg agctacaaat ttccagctgc tgaacaggt aggggatgtg 1500
gaggaacac ccggacctat ggttggacc caactgttc tgtttctgt gacatgctgt 1560
cccggggca gcaattctc gagtgtctg acacagcac catcagtgg cggagacca 1620
ggacagagg tgaacatct ctgcacagg agcagcagca acattgggc cgggtacgac 1680
gtcatttgt atcagcagc gcccgcac gccttaagc tgcctgctg tggcaacaat 1740

[0047]

```

aacccgcacat ctgggggtgcc agatcgattc tccggctctc aangtgggac ttccagccagc 1800
ctggctattc ccggcctgac gcccgaggac gaagctgatt actattgcca gagctacgac 1860
tcagccctga ccggagtcgt gtccggagga ggaaccaage tgacagtcct gggacagcct 1920
aaagccgctc caagcgtgac actgtttect ccatctctcg aggaactgca ggcacaacag 1980
gccacccctg tg-gcctgat ttccgactc taaccgggg cagtcactgt ggcitggaag 2040
gcagatagtt caccgtgcaa agccggagtg gagactacca caccatcaaa gcagagcaat 2100
accasatacg cagccagctc ctatctgtcc ctgacccctg agcagtggca gtctacaaa 2160
tcctattctt gccaggtcac tcaggaagga agcactgttg agaaaactgt cgcaccaccc 2220
gaatgtagtt gataactcga g 2241

```

<210> 70
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSP-1 LALA的氨基酸序列

<400> 70

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr His Ala Gln Ala His Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Asn Phe
35 40 45

Ser Thr Asn Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

[0048]

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Gly Val Leu Thr Trp Pro Val Asn Ala Glu
115 120 125

Tyr Phe His His Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Ser Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
210 215 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
225 230 235 240

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

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 485 490 495
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Leu Phe Leu
 500 505 510
 Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln
 515 520 525
 Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys
 530 535 540
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr
 545 550 555 560
 Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Cys Gly Asn Asn
 565 570 575
 Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 580 585 590
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 595 600 605
 Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Thr Gly Val Val Phe

[0049]

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

<210> 71
 <211> 2241
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSF-2 WT的核酸序列

[0050]

<400> 71
 ggaaccgaca caatggactg gacatggaga atcctgttcc tggtcgcgcg cgcdaaccggg 60
 acacacgcgc aagtcagact ggtggaatct ggaaggggat gsgtgcagcc aggaaggctcc 120
 ctgcgactgt cttgcgcgcg tagtggcttc accttttcca gatacgacat gcactgggic 180
 aggcaggtag ccgcgaaggc cctggactgg gtgcagcaca tccccacgcg cggagccaca 240
 tactatcccg attcgtgaa gggccgggtc accattagtc gggagaaagc caaaagctcc 300
 ctgtatctgc agatgaacaa tctgagagct ggcgaaacgc cactgtacta ttgcgctagg 360
 ggcccccta cagattgctc tagtggacga tgcctggag tggagtgagg actggaccga 420
 tggggcagag gaaccctggt cactgtgtca agcccttcca caagggaac cctctgttcc 480
 cctctggctc cctctcttaa aagtacttca ggaggaacgc cagcactggg atgtctggtg 540
 aaggattact tcccagagcc cgtacccttg agctggaacl ccggagctct gactagcggc 600
 gtccataact ttcttcagct gctgcagagt tcaggcctgt acagcctgag ctccgtggtc 660
 accgtgccat ctactttact ggggacccag acatatactt gcaacgtgac tcacagacca 720
 tcataataca aagtcgacaa gaaagtggaa cccaagattt gtgataaac tcataacctgc 780
 ccaccatgct ctgcctcaga gctgctggga ggaccatccg tgttcctgtt tcttccaaag 840
 cccaagaca cactgatgat tagcaggaca ccgaagtc cttgcgttgt cgtggccgtg 900
 agccacgagg acccccgaat caagtttaac tggtaactgg atggcgtcga ggtgcataat 960
 gccaaagaca aaccccgagg ggaacagtac aacagtacct atagagtcgt gtcagtcctg 1020
 acagtgcctc accaggactg gctgaacggg aaagagtata agtgcaaat gtccataaag 1080
 gcactgcctc cccctataga gaaaaccatt tcgaagcca aaggacgcgc ccagacacct 1140
 cagggtgaca cactgcctcc tagcccgagc gagctgacaa agcaccaggt ctccctgact 1200
 tgtctgttga aagggttcta tcttccagat atgcctgttg agtgggaaag caatggacag 1260
 ccagaaacaa attacaagac taaccacccc gtgctggact ctgatggcag ttcttttttg 1320
 tatagcaagc tgaccgttga caaatccccc tggcagcagg ggaacgtctt tagctgctcc 1380
 gtatgcaatg agggcttcca caatcaaac acacagaagt ctctgagctc gtcaccttga 1440

```

aagcggggac gaaaacgaag aagcggctcc ggagcaacca acttcagcct gctgaaccag 1500
gccggggatg tggaggaaaa tccaggaccc atggcatgga ctctctgtg cctgtttctg 1560
ctgacctgct gtccaggcgg gagcaccagg tctacagagg tgacccagcc tccctctgtc 1620
agtggtgtac ccgccagac cgttcaate acaigttagc gggacaagct gggaaagaaa 1680
taccacaatt ggtatcagca gaaccaggga cagtcacccc tctggtoa ctaecaggac 1740
actcagcgcc ctaggggcat tccagaacgg ttcagcggct ccaactctgg gaatacagct 1800
actctgacca tctccggcac ccaggccatg gacgagctg attactatg ccaggccatg 1860
gallctacaa ctccgical tticggagge gggaccacag tgcagctgc ggggcagccc 1920
aaagtcgac ctagggtcac cctgtttccc ccttctagt aggaactgca ggctaataag 1980
gcaecactgg tctgtctgat ttccgaette taccagag cagtcactgt ggcctggaag 2040
gctgattcaa gccccgtcaa agccggagtg gaaaccacaa ctcttcaaa gcagagcaac 2100
aacaagtagc ccgttctctc ttatctgttc ctgactccc agcagtgaaa gtctcacaaa 2160
agttattcat gccaggtag ccattggggc tccactgtcg aaaagaccg ggcacctaca 2220
gagtggtctt gataactcga g 2241

```

<210> 72
 <211> 739
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSP-2 WT的氨基酸序列

<400> 72

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1           5           10          15

```

[0051]

```

Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln
20           25           30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45

```

```

Ser Arg Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Val Thr Gly Lys Gly Leu
50           55           60

```

```

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp
65           70           75           80

```

```

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

```

```

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

```

```

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Pro Thr Asp Cys Ser Ser Gly Arg Cys Leu
115          120          125

```

```

Gly Val Gly Val Gly Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
130          135          140

```

```

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145          150          155          160

```

```

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
165          170          175

```

```

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
180          185          190

```

```

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
195          200          205

```

[0052]

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260 265 270
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325 330 335
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 355 360 365
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 370 375 380
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 385 390 395 400
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 405 410 415
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 420 425 430
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 435 440 445
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 450 455 460
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg
 465 470 475 480
 Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 485 490 495
 Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Leu Leu Thr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 515 520 525
 Glu Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
 530 535 540
 Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys Lys Tyr Thr Ser Trp
 545 550 555 560
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp
 565 570 575

Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 580 585 590
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu
 595 600 605
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Thr Thr His Val Ile Phe
 610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 675 680 685
 Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 690 695 700
 Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
 705 710 715 720
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 725 730 735
 Glu Cys Ser

[0053]

<210> 73
 <211> 2241
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> DVSF-2 LALA的核酸序列
 <400> 73
 ggatccgcc aatcgagctg gacatggaga atcctgttcc tggtcgtccg cgtactctgg 60
 actcacgccc aagtcagctt ggtcgagagt ggagggggat gggtcagacc cgtcgccagc 120
 ctgaggctgt cttgcgcgc tagtggcttc actttttcta gatacgacat gcaactgggc 180
 cggcaggatg aagggaagg actggaatgg gtgagcgcca tcaccacagc aggggacaca 240
 tactatcccg attctgtgaa gggcaggctc accattagta gggagaacgc aaaaagctcc 300
 ctgtatctgc agatgaacca tctgagagcc ggccacaccg ctctgtacta ttgcgccagg 360
 ggccctccca cagattgctc tagtggcgcg tgtctggagc tcggagtggg actggaccca 420
 tggggacacg ggcacactgg caacctgagc agccctcca ctaagggacc aagcgtgttc 480
 ccctggcac catctctaa aagtaettca gggggcaccg cagccctggg atgtctggtg 540
 aaggattact tcccagagcc cgtcacagt agctggaact ccggggccct gacttcggga 600
 gtccacacct ttctgtctat gctgcagagt tcaggcctgt actctctgag ctccgtggtc 660
 acagtgcctt ctagtctact gggaacccag acatatactt gcaacgtgaa tcacaagcca 720
 agtaatacta aagtcgacca gaaagtggaa cccaagtctt gtgataaac tcatacctgc 780
 ccacctgttc ctgcaccaga ggtgcagga gggccatccg tgttctgttt tcctccaaag 840
 cccaagata cctgtatgat tagccggaca cccgaagta cttgcgtgtt cgtggacgtg 900
 tcccacaggg accccgaagt caagtttaac tggtaactgg atggcgtcga ggtgcataat 960
 gccaagacaa aaccagggga ggaacagtac aacagtacct atagagtcgt gtcagtcctg 1020
 acagtgtctc accaggactg gctgaacgga aaggagtata agtgcaaatg gtctataaag 1080

```

gtctctgcccg caccctatcga gaaaaccatt agcaaggcca aagggcagcc cggagaacc 1140
cagggtgtaca cactgcccc ttcccgcgac gagctgacaa agaaccagg ctctctgac 1200
tgtctgtga aaggattcta tccttcagat atcgccgtgg agtgggaaag caatgggcag 1260
ccaganaaca attacaagac taccacccc gtgtggact ctgatggcag tttctttctg 1320
tatcgcaagc tgaccgigga caaatccgcg tggcagcagg gaaacgtctc tagctgtcc 1380
gigatgcattg agggccctgca caatcattac acccagaagt ctctgagtc gtcacctggg 1440
aagcgaggga gaaaaaggag aagcggctcc ggagctacaa acttctccc gctgaacacag 1500
gcaggagata tggaggaaaa tccaggccc atggcctgga ctctctgtc cctgtttctg 1560
ctgacctgtc gtccaggcgg aagcaacgc tcctacgagg tgacctgcc tccaagcgtg 1620
agcgtgagcc caggccagac cgttcaate acatgtagcg gagacaagc ggggaagaaa 1680
taccatagtt ggtatcagca gaaccaggg cagtcacccc tctgtgtcat ctaccaggat 1740
accagcgccc ctacggcctc tccagaacga ttacggcct ccaactctgg aaatacagcc 1800
actctgacca tcagcgctac ccaggcaatg gacgggccc attactattg ccagccttgg 1860
gatttcacaa ctacgtcat ttccggggc ggaaccaagc tgacagtgc gggacagccc 1920
aaagcgcctc ctccgctac cctgttccc ccttctagt aggaactgca ggccaataag 1980
gcccccctgg tgtccctgat tagcgacitc taccocggag ctgtcactg ggcattggaag 2040
ggcattcaaa gccccgcaa agcagggtg gaaaccacaa ctcttcaaa gcagagcaac 2100
aaccagtacg cagcctctc ttatctgtcc ctgacctgt agcagtgaa gtctcataaa 2160
agttattcat gtcaggctac ccatgagggc agcacagtgg aaaaaaccg ggcaccaaca 2220
gaatgtagct gataactcga g 2241

```

[0054]

<210> 74
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSP-2 LALA的氨基酸序列

<400> 74

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Arg Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Val Thr Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp
65 70 75 80

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Pro Thr Asp Cys Ser Ser Gly Arg Cys Leu
115 120 125

Gly Val Gly Val Gly Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145 150 155 160

[0055]

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260 265 270
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325 330 335
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 355 360 365
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 370 375 380
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 385 390 395 400
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 405 410 415
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 420 425 430
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 435 440 445
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 450 455 460
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg
 465 470 475 480
 Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 485 490 495
 Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Trp Thr Pro Leu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Leu Leu Tyr Cys Cys Pro Gly Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 515 520 525

Glu Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
 530 535 540
 Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Lys Lys Tyr Thr Ser Trp
 545 550 555 560
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp
 565 570 575
 Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 580 585 590
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu
 595 600 605
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Thr Thr His Val Ile Phe
 610 615 620
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 645 650 655
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 660 665 670
 Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 675 680 685
 Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 690 695 700
 [0056] Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys
 705 710 715 720
 Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 725 730 735

Glu Cys Ser

<210> 75
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSP-3 WT的核酸序列

<400> 75
 ggatccgcc ccatggactg gacatggaga atcctgttcc tggtcgcgc cgcacccggg 60
 acacacgctg aagtcagct ggtggaatca ggggagggc tggtcagcc tggaaaggt 120
 ctgaggtgt catgcgcgc tagcggcttc acctttgacg attacgccat gttctgggig 180
 aggcaggctc caggcaagg actggaatgg atcagcggca ttctctggaa ctctgcaact 240
 atcgggtatg ccgactccgt gacaggacgg ttaccattt caagagacaa cgcacagaaa 300
 agcctggatc tgcagatgaa ttccctgcgg ccgacgata ccctctgta ctattggca 360
 aaggzaggac ctaggagctt gcgcctgctg agctctggg tggactactg gggacagggc 420
 accttggtca ccgtgtctag tgccttcaca aagggaacct ctgtgttccc actggcaccc 480
 tcagcnaat caacaaagg aggaacgca gcactgggat gtcgggtgaa ggattattc 540
 ccagagcctg tcacactgag ttggaactca ggagactga ctccggagt ccacacctt 600
 ccagcagtc tgcagcttc tggactgac agccagatt cagtggcac agtgcctagc 660
 tctctcttgg gcacacagac ttatatctgc aacgtgaatc acaagcctag caatactaaa 720
 gtgcacaga aagtggaaac aagtcctgt gataaaacc atcatgcc accctgtcca 780

[0057]

```

gcaccagagc tgcggggggg accaagcgtg ttccgtttc cacccaagcc caaagacaca      840
ctgaigattt cteggacccc tgcagtcaca tgtgtggtcg tggacgtgag ccacgaggac      900
cccgaagtcg agttcaactg gtcggtggat ggcgtcgagg tgcataatgc taagaccaaa      960
ccccagaggg aacagtagaa cagcaactat cgggtcgtgt ccgtccctgac cgtgctgcac     1020
caggaciggc tgcaggggaa ggagtaaaag tgcacaagtgt ccaataaggc cctgcctgct     1080
ccaatcgaga aaacaatttc taacgcaaaa ggacagcctc gcgaaccaca ggtgtacact     1140
ctgcctccat cccgagacga gctgaccaag aactaggctct ctctgacatg tctggtgaaa     1200
ggctttctat caagtcatat cgtctggagc tgggaaagca atgggcagcc cgaatacaat     1260
tacaagacca caccctctgt gctggacagc gaiggtctct tctttctgta ttctaaagctg     1320
accgtggata aaagttagat gcagcagggg aacgtctttt cctgctctgt gatgcatgag     1380
gcccctgcac atcattacac acagaagagt ctgtcaetga gccacgggaa gcgaggacgg     1440
aaacggagat ccgggtctgg agcaaccaac ttctccctgc tgaaccaggc aggcgacgtg     1500
gaggaataat caggacctat ggtccctgag aoccagggtt ttatctctct gctgctgtgg     1560
attagtgagg cctacgggga tatccagatg acacagctcc ccagttcact gagtgcctca     1620
gtcggcgaca gggtagctat caccgtcgcg gctagccagg atattaggag ctacctgaac     1680
tggtatcage agcgaccagg acgagtgctt cagctgttga tctacactac ctccacctg     1740
cagcttgagg tcccaagtat gttcagcggc tccgggtctg tgacagactt tacactgaat     1800
attagctccc tgcagccoga agatttcggc acttactatt gccagcagag ttattcacca     1860
ccccacacat ttgacaggg cactaagctg gaaatcaaaa ctgtcgtcgc accctcagtg     1920
ttcatttttc ctccatctga cggcagctg aagtcaggca cggccagcgt cgtgtgtctg     1980
ctgaacattt ctaccctcg cgggctaaag gtccagtggc aagtggttaa cgcactgcag     2040
tcgggaata gtcaggagtc agtgacagaa caggacagca aggaltccac ttaltctctg     2100
tcagtagccc tgacactgag caagagcgac taagagaagc acaaaagcta tgcctgcgaa     2160
gtgaaccata aggggtctgag aagtcctgtg acaagagctt tcaacagggg agagtgttga     2220
taactcgag

```

<210> 76
 <211> 735
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<230>
 <232> DVSF-3 WT的氨基酸序列

<400> 76

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys
85 90 95

Ser Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Pro Arg Gly Leu Gln Leu Leu Ser Ser

	115	120	125
	Trp Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 130 135 140		
	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser 145 150 155 160		
	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe 165 170 175		
	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly 180 185 190		
	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu 195 200 205		
	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr 210 215 220		
	Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 225 230 235 240		
	Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 245 250 255		
	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 260 265 270		
	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 275 280 285		
[0058]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 290 295 300		
	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 305 310 315 320		
	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 325 330 335		
	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 340 345 350		
	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 355 360 365		
	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 370 375 380		
	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 385 390 395 400		
	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 405 410 415		
	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 420 425 430		
	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 435 440 445		
	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 450 455 460		
	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser 465 470 475 480		

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
485 490 495

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser
500 505 510

Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln
515 520 525

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
530 535 540

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
545 550 555 560

Arg Pro Gly Arg Val Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Thr Leu
565 570 575

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp
580 585 590

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr
595 600 605

Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
610 615 620

Lys Leu Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
625 630 635 640

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
645 650 655

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
660 665 670

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
675 680 685

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
690 695 700

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
705 710 715 720

Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
725 730 735

[0059]

<210> 77
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DVSF-3 LALA的核酸序列

<400> 77
 ggatccgcca ccatggactg gactiggaga atcctgtttc tggtcgccgc cgcaactgga 60
 acccacgccg aggtgcagct ggtcgaatca gggggaggcc tggtcagccc tgggagaagi 120
 ctgcggctgt caigccgccg tagcggcttc acctttgacg attacgcaat gtcttgggtg 180
 aggcaggcac caggcaaggc actggaatgg atcagcggca ttctctggaa cctgcctacc 240
 atcgatattg cagacagcgt gaaaggaggg ttatcaattt ctagagacaa cgccaagaaa 300
 agtcaggatc tgcagatgaa ttcactgcgc ccgacgata ccgccctgta ctattgcgt 360
 aaggcgggac ccaggggcct gcagtgctg agctcttggg tggattactg ggggcagggc 420
 acctggatca ctgtgtctag tgcttcacaa aaggccctta gctgtttccc actggatccc 480
 tcaagcaaat caacaagcgg gggcac-gca gccctgggat gtctggigaa ggattatttc 540

[0060]

```

cccagacttg teacagttag tiggaaacta gggcctctga ctacggcgtt ccacaccttt. 600
cccgaagtgc tgcagtcctc tggcctgtac agcctgagtt cagtggctac tgtccctagc 660
tctctcttgg gaacacagac ttatatctgc aacgtgaate acacgcttc caataccaaa 720
gtgcacaaga aagtggaaac aaagtcttgt gataaaaccc atacatgccc tccctgtcca 780
gcaccagagg ctgcaggagg gccaaagctg ttcctgttcc caccacaagcc caaagacaca 840
ctgaigtatta gccggacccc tgaagtcaca tgcgtggtcg tggacgtgag ccacgaggac 900
cccgaagtcg agtttactg gtacgtgat ggcgtcagc tgcataatgc taagaccaaa 960
cccggagagg aacagtagac cagtacttat agggctgtgt agtctctgag cgtgctgcac 1020
caggactggc tgaacgggaa ggagtataag tgcaaatgtt ccaataagcc acgtcctgcc 1080
ccactcgaga aaactatttc taaggtaaa gccacgcta gagaaccaca ggtgtacacc 1140
ctgcctccaa gccgggacgc gtgaccaag aaccagttc gccgacatg tctgtgaaa 1200
ggattctatc caaccatac gcagtgtag tggcaatctc atgggcagcc cgaacacat 1260
tacaagacca caccctctgt gtgacacgc gatggcagct tcttctgtta tagcaagctg 1320
accgtggata aatccctctg gcagcagggg aacgtctttt cctgctctgt gtgcatgag 1380
gcccgtcaca atcattacac acagaagagt ctgtaactga gcccaggaaa gcaggaggag 1440
aaaaggagat ccggaactga ggtactaac tcttctctgc tgaagcagcc aggcagctg 1500
gggaaaatc ccggaactat ggtctctgag acacagttgt ttatcagcct cctgctctg 1560
atttcgggct ctacaggaga tatccagatg aetccgtccc ccagttcact gattgctcca 1620
gtcggcagcc ggttgactat caccgtctgc gccctctcag atatttcggc ctacctgaat 1680
tggtatcagc agcaccagag acgagtgctt cagctgctga tctacactac ctccacctg 1740
cagctcggcg tcccaagtag gttcagcgcc tccggatctg tgactgactt tacactgaat 1800
attagctccc tgcaccocga ggatttcgga acctactatt gccagcagag ttattccaca 1860
cccacacat ttgggcaggc cactaagctg gaaatcaaaa ctgtcggccc tcccagctg 1920
ttcatcttcc ctccaagtag cagcagctg aagtcaggac cagccagcgt ggtgtgctg 1980
ctgaacaatt tccacctag agaacccag gtccagtgga sagtgatcaa cgtctctcag 2040
tctgggaata gtccaggatc agtacagaa caggacagca aggtatcac ttattctctg 2100
tctagtaacc tgacactgag caaagcagac tacgagaagc ataaagtgtg tgcctcagaa 2160
gtcaaccacc aggggctgct gtaccagtc acaaaatctt ttacagagg cgaatgtgta 2220
taactcag 2229

```

<210> 78
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DSVF-3 LALA的氨基酸序列

<400> 78

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Thr His Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys
85 90 95

[0061]

Ser Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Pro Arg Gly Leu Gln Leu Leu Ser Ser
 115 120 125
 Trp Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

[0062]

450	455	460
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser		
465	470	475
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val		
485	490	495
Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser		
500	505	510
Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln		
515	520	525
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
530	535	540
Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln		
545	550	555
Arg Pro Gly Arg Val Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Thr Leu		
565	570	575
Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp		
580	585	590
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr		
595	600	605
Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr		
610	615	620
Lys Leu Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
625	630	635
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
Gly Leu Arg Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
725	730	735

编码 IgG 重链的优化核苷酸序列

GGATCCGCCACCAATGGAAACCGACACTCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGGGTGCTCCGGCTCAACAGGCTGACGGC
 GCTCAGGTCCAGCTGGTCCAGTCTGGAGCTGGGATCAAGACCTCTGGCAGCTCCGTCAAAATTTCTTGCAGAGCAAGTG
 GCTACAACTTCGGGCACTATAGCAATCCACTGGGTGGCTGATTCCTGATAAGGGATTTCAGTGGATCGGCTGGATCAA
 GGCACCTGTGGGGCGCTGTGTCCTAGCGCAAGGCAAGCTGCAAGGGGCGCTCTCCATGACACGACAGCTGTCTCAGGACCC
 AGACGATCCCGATTGGGGGTGGCTTACATGGAGTTCACTGGAGTCACTGACAGACCTCCGACAGACCTGCGGAAATATTTTGGGTG
 CCGAGAGGCTCTCTGGCACTACTGTGGGGATTTCCTATGGCAGTATTTGGTGTCAAGGAACTGTGGTCTGGGCTCTTAGTG
 CATCAAGCAAGGGCCCAAGCGTGTCTCTCTGGGCCCATCAACCAAAAGTACATCAGGAGGAAGTGGAGCTCTGGGAT
 GTCGTGTGAAGGATTACTTCCCGAGCTGTGACGGTCAAGCTGGAACCTCCGAGCACTGACCTCCGAGAGTCAACACATT
 TCCCGCTGTGCTGCACTCTCTGGGCTGTACTCTGTGAGTTCAGTGGTCAAGTGGCTAGCTCTCTCTGGGCAAGCCAGA
 CATATATCTGCCAACGTCAATCATAGGCCAGTAACTACTAAAGTGGGACAAAGAAAGTGGAAAGCCCAATCATGTTACCTT
 ATGACCTGCTTGATTATGCTTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:6)

图1

编码 IgG 轻链的优化核苷酸序列

GGATCCCGCCACCATGGAGACTGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGCTGCTCAACCGGGACCGG
 GCTCAGGTCCAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCATCTGTGCTACTGAGCCCAAGGAGAGACCGCAACACTGTTCTGCA
 AGCCCTCCAGGGCGGCAACGGCTATGACATGGTACCAGAAACCGGAGGAGCAGGTGGCCCGGACTGCTGATCTATGACA
 CTTCAGGGGAGCAAGCGGAGTGGCTGATGATTGTTCGGCAGCGGCTCTGGGACAGACTTCTTTCTGACTATTATATTA
 GCTGGACAGAGAGGATTTGGCTGTGTGTAATAATGCCAGCTTGAATTTCTTTGGACTGGGCAAGGAGCTGGAAGTGGCAC
 AGGACCGTGGCCCTCCAGTGTGTGTCAATTTTCCCTTAGCGATGAGCAGCTGAAATCCGGGACAGCCCTCTGTGGTCT
 GTCTGCTGAAACAATTCTACCTCCGGGAAGCAANGGTGCAGTGGAAAGTGGACAAACGCCCTGCGAGAGTGGCAATTCAC
 AGGAGAGCGGTGACCGAAGCAGACTCCAAAGGATTCTACATATAGTGTGACTCCACTCTGACCCCTGCTAAAGCTGATT
 CGAGAAAGCACAAAGTGTATGGATGGCAGTCACTCATCAGGGCTGTCTAGTCTCTGTGACCAAGAGCTTTAACCGGAGG
 GCAGTGTACCCATATGACGTTCTCCGATTACGCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:7)

图2

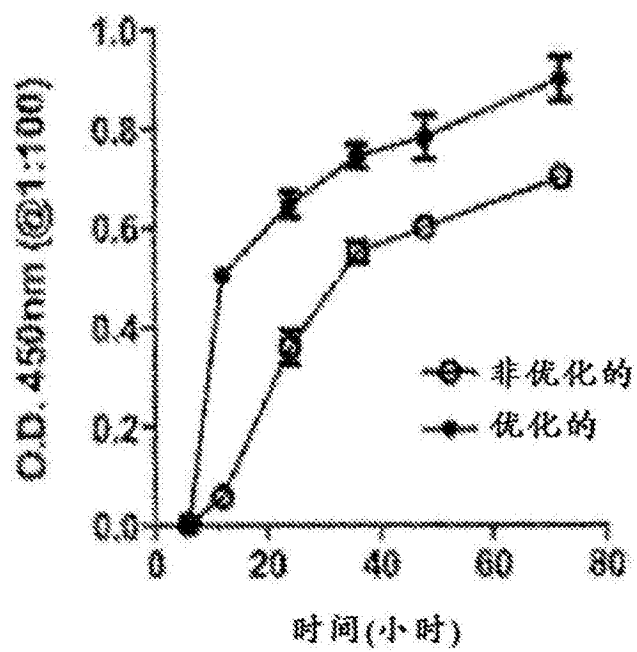


图3

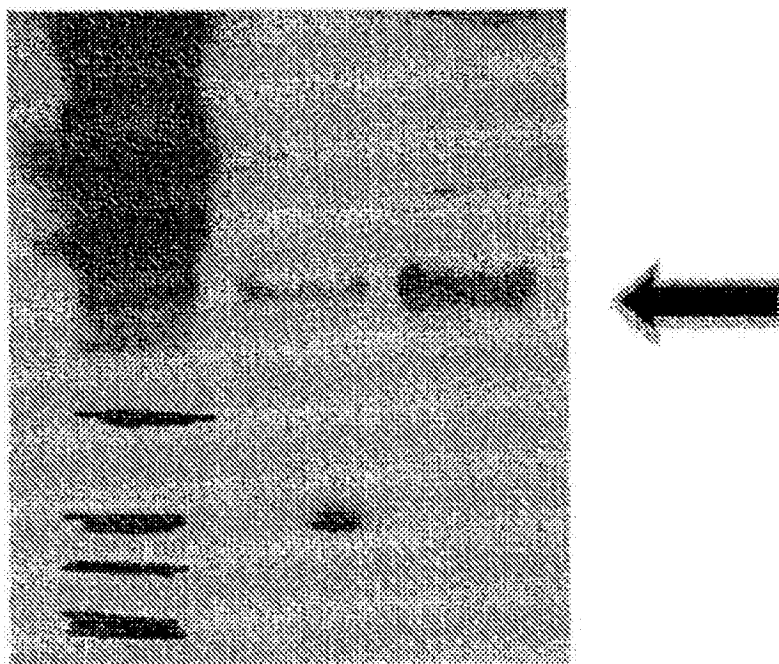


图4

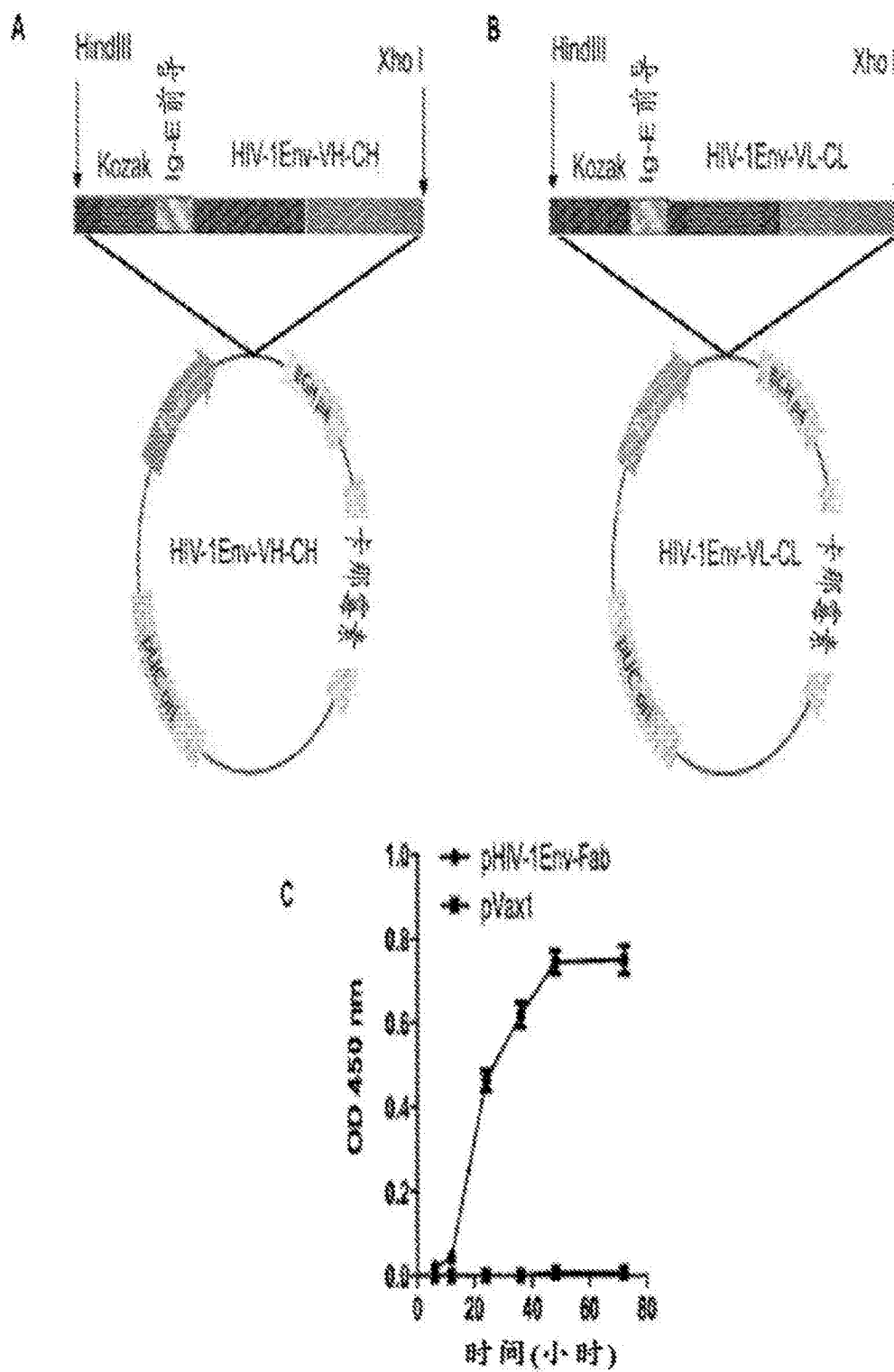


图5

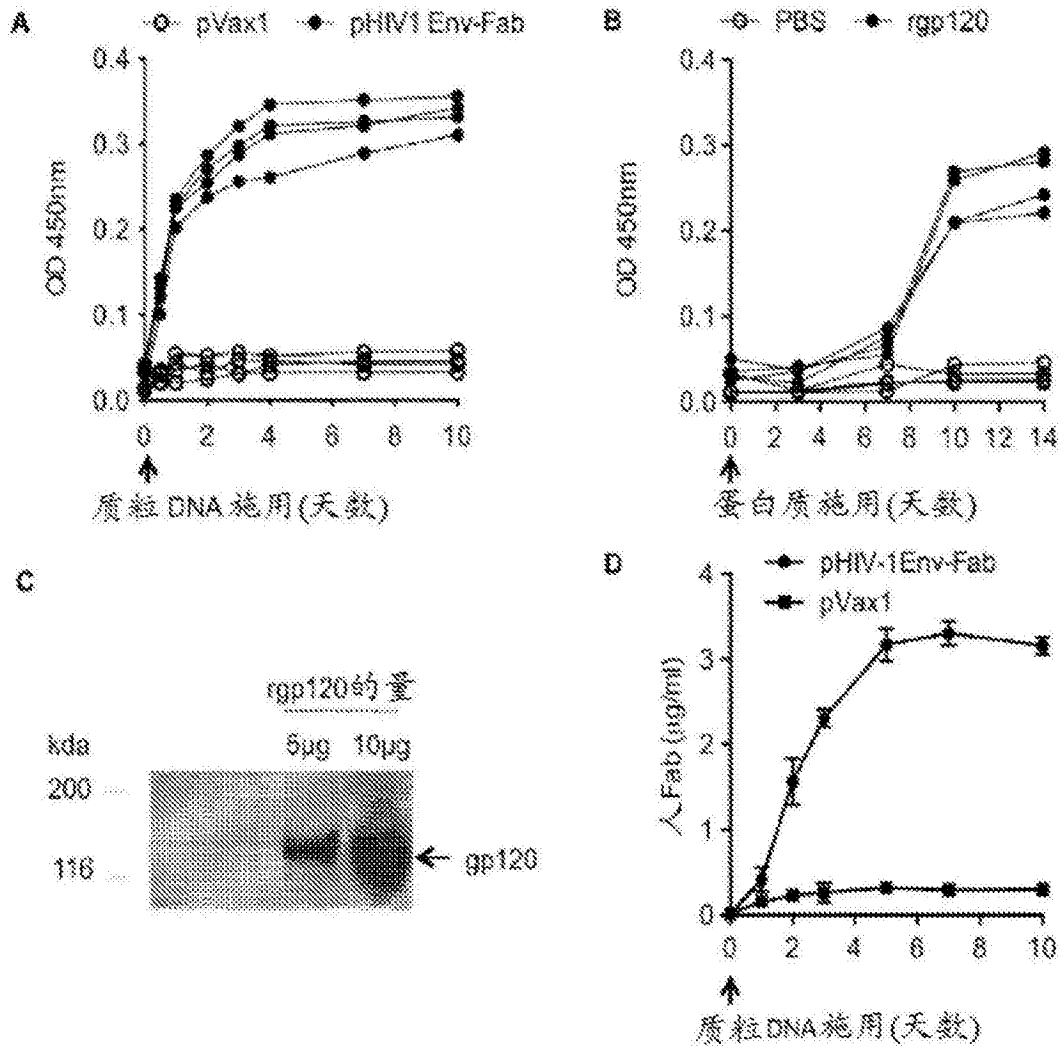


图6

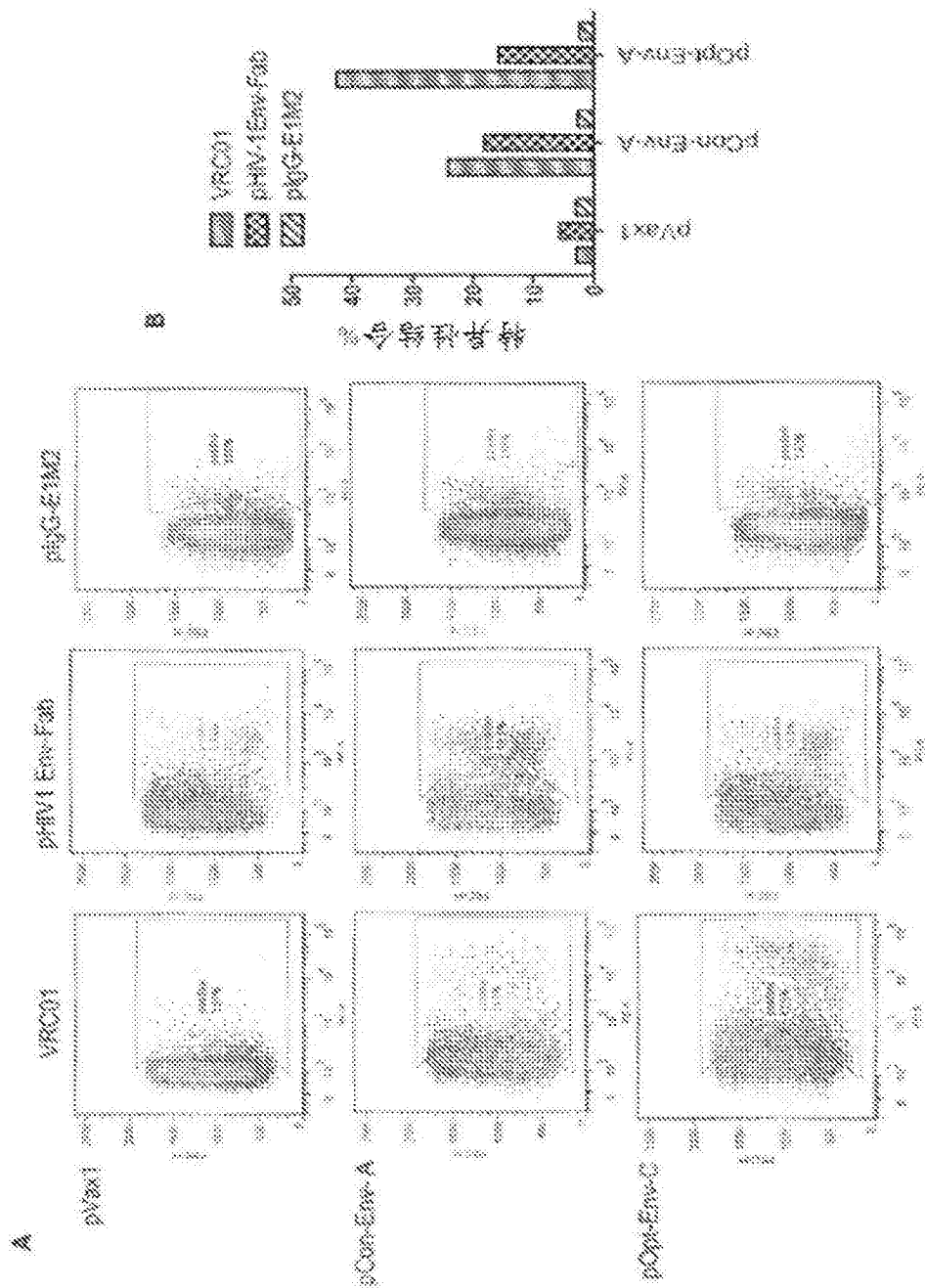


图7

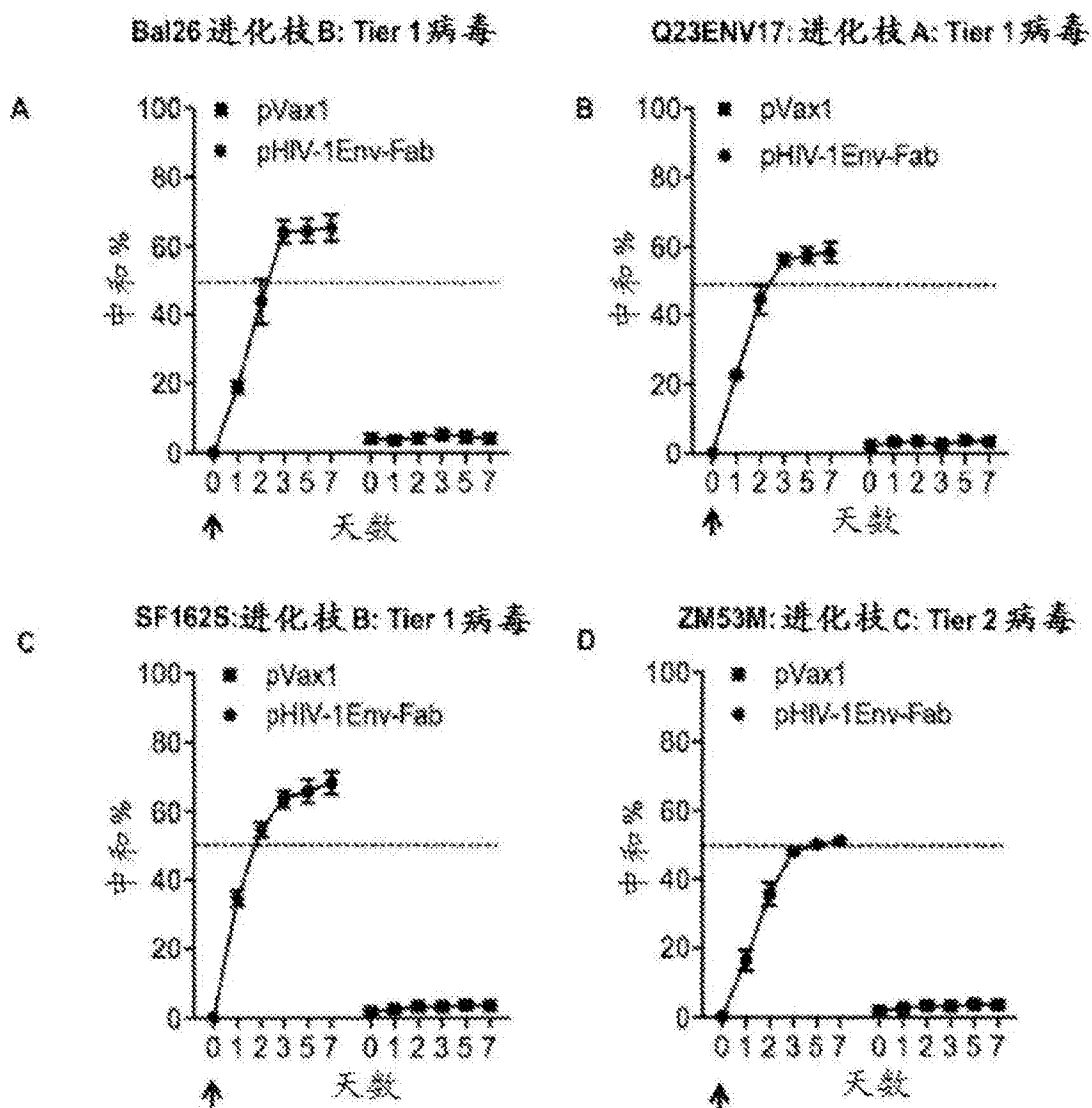


图8

编码 HIV-1 Env Fab 的重链 (VH-CH1) 的核酸序列

AAGCTTGCCGCCACCATGGAGACTGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG
 GTGCCAGGGTCAACCGGAGATGGGGCTCAGGTCCAGCTGGTCCAGAGCGGCGGACA
 GATGAAGAAACCCGGCGAGAGCATGAGGATCTCCTGCAGAGCATCTGGATACGAGT
 TCATCGACTGTACCCTGAACTGGATTAGGCTGGCTCCTGGAAAGAGACCAGAGTGG
 ATGGGGTGGCTGAAACACGAGGGGGAGCAGTGAATTACGCCCCGGCCCCCTGCAGGG
 ACGAGTGACCATGACCAGGGACGTGTACAGCGATACCGCCTTCCTGGAGCTGCGGT
 CCCTGACAGTGGACGATACTGCTGTCTACTTCTGCACACGCGGAAAGAACTGTGACT
 ATAATTGGGATTTTGAACACTGGGGCGGGGAACACCCGTGATCGTCAGCTCCCCCA
 GTACTAAGGGACCTTCAGTGTTCCTACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAG
 GGACAGCCGCTCTGGGATGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTGACCGTCA
 GTTGGAATCAGGGGCTCTGACTTCTGGCGTGACACCTTCTCTGCAGTCCTGCAGT
 CAAGCGGGCTGTACAGTCTGTCTCTGTGGTCACTGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCA
 CTCAGACCTATATTTGTAAAGTGAATCATAAGCCATCCAATACAAAAGTGGACAAA
 AAAGCCGAACCCAAATCCTGTTACCCTTATGATGTGCCCGACTACGCTGACTCGAG
 (SEQ ID NO:3)

图9

HIV-1 Env Fab 的轻链 (VL-CL)

AAGCTTGCCGCCACCATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG
 GTGCCAGGAAGTACCGGGGATGGGGCTCAGGTCCAGATTGTGCTGACTCAGTCCCT
 GGGACCTGTCTCTGAGTCCAGGCGAGACAGCTATCATTTCATGCCGAAGTAGCCAG
 TACGGCAGCCTGGCTTGGTATCAGCAGCGACCAGGACAGGCACCACGACTGGTCAT
 CTACTCAGGCAGCACAAAGGGCCGCTGGCATCCCCGACAGGTTCTCCGGCAGCAGGT
 GGGGGCCTGATTACAACCTGACTATCTCTAATCTGGAGAGTGGGGACTTTGGCGTGT
 ACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCTTCGGCCAGGGAAGTAAGGTGCAGGTGGACATC
 AAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCCGCTTCATTTTCCCCCTTCTGATGAGCAGCTG
 AAGTCAGGCACCGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTCTACCCCCGGGAAGCC
 AAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCTCTGCAGAGTGGAAATTCACAGGAGAGCGT
 GACCGAACAGGACTCCAAGGATTCTACATATAGTCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA
 GTAAAGCAGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAAGTCACACATCAGGGC
 CTGAAGAGCCCCGTGACTAAAAGTTTCAACCGAGGAGAGTGCTACCCTTATGATGTG
 CCGGACTACGCCTAACTCGAG (SEQ ID NO:4)

图10



图11

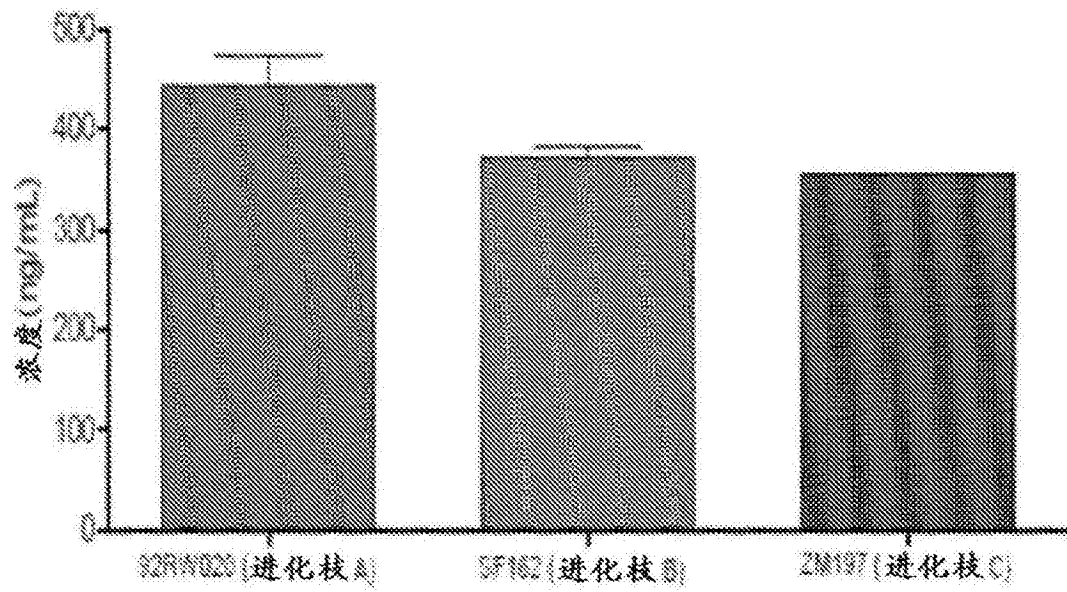


图12

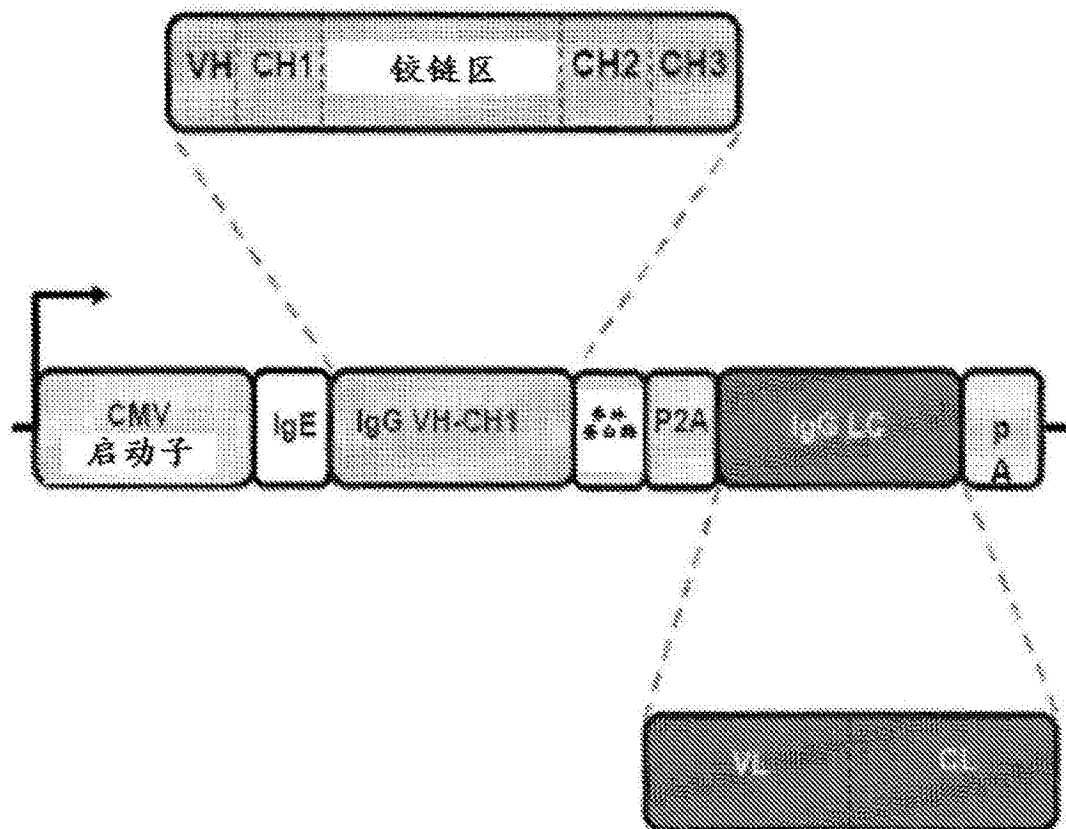


图13

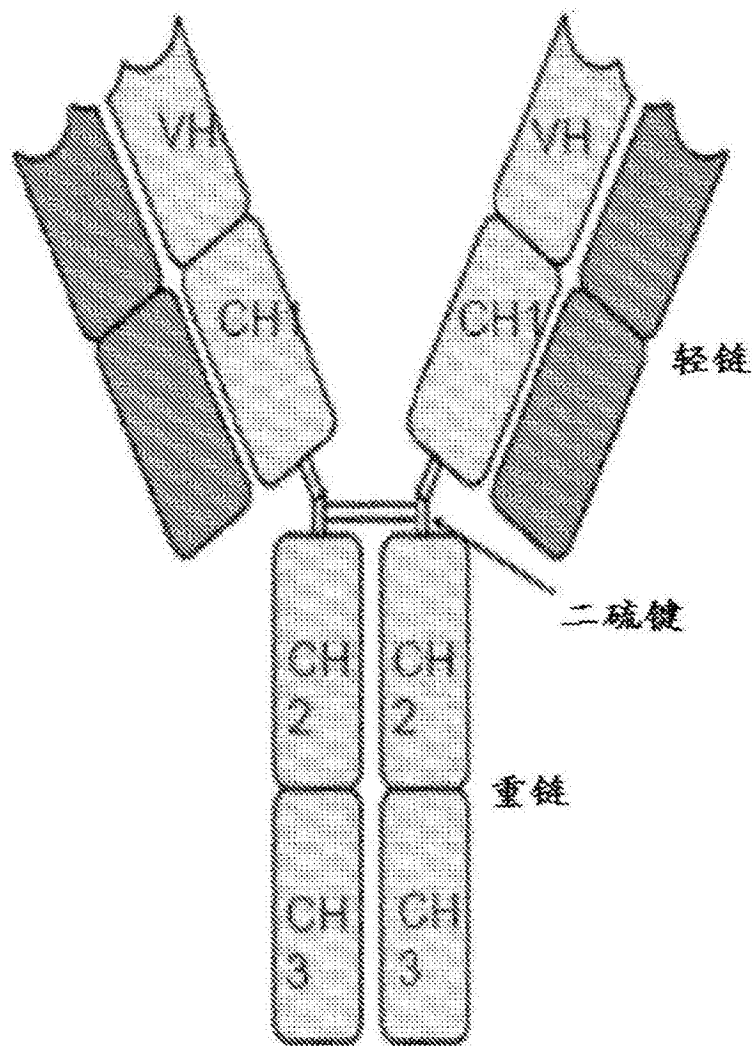


图14

VRC01 IgG

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLA
 PGKRPEWMGWLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCT
 RGKNC DYNWDFEHWGRGTPVIVSSPSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KKAEPKSCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDQVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSEIVLTQ
 SPGTLSPGETAHSRTSQQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGP
 DYNLTISNLESGDFGVVYCQQYEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH
 KVVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:5)

图15

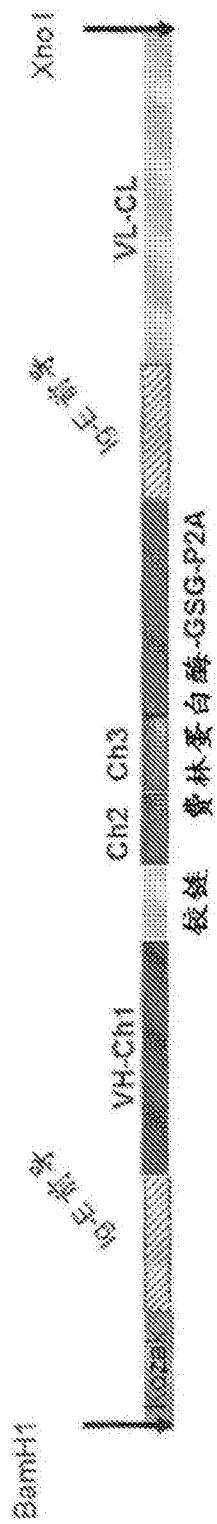


图16A

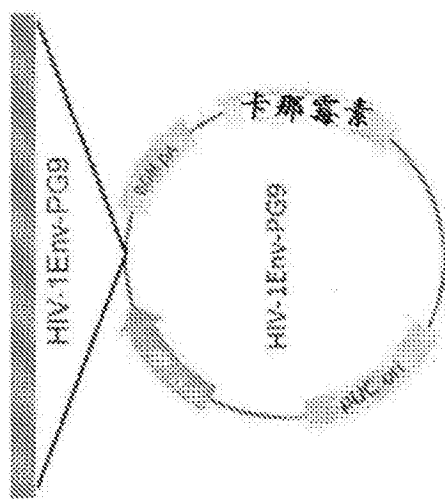


图16B

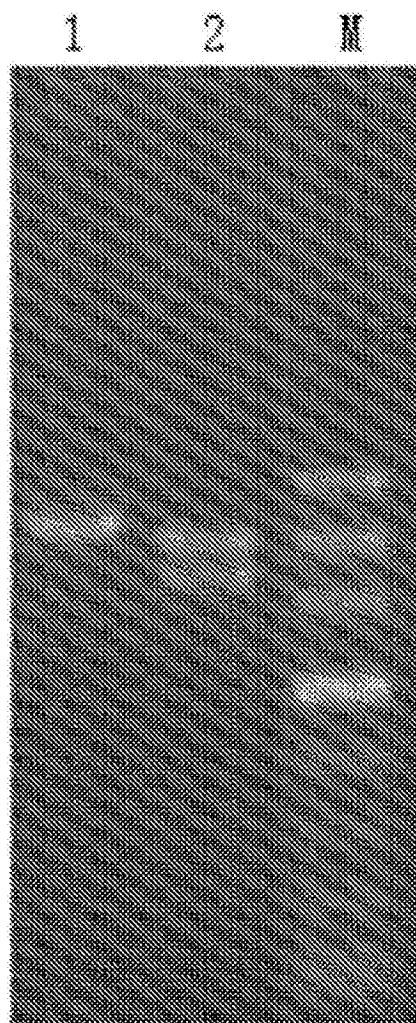


图16C

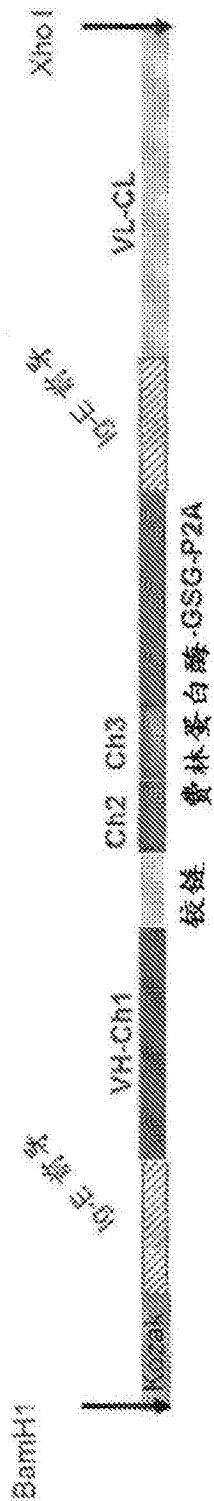


图17A

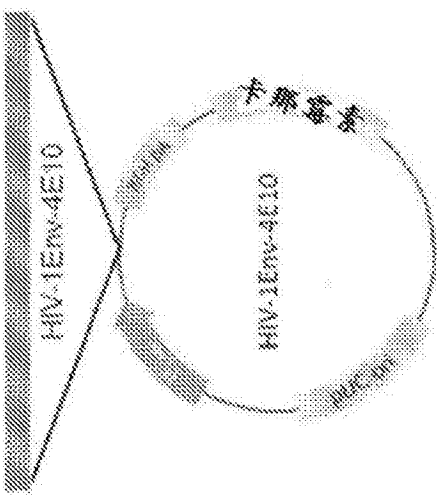


图17B

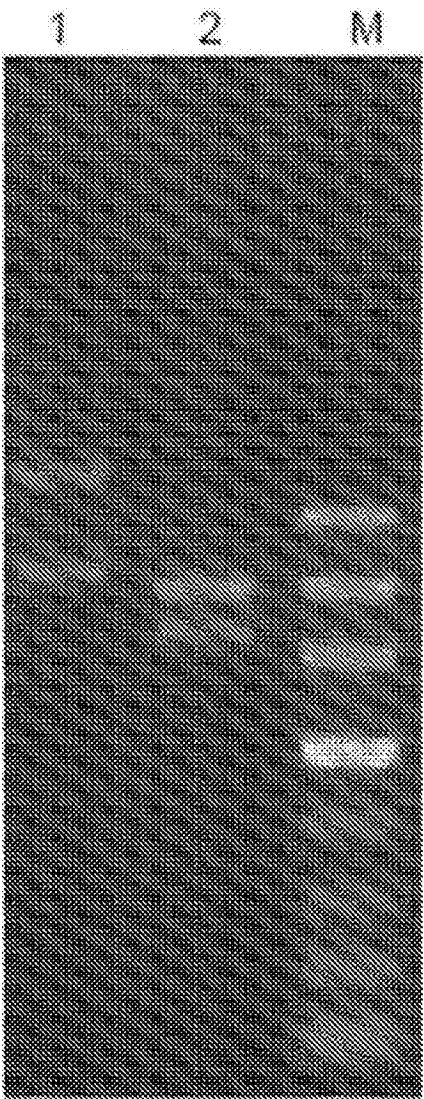


图17C

HIV-1 Env-PG9 Ig的氨基酸序列(在蛋白酶切割之前)

MDWTWRILFLVAAATGTHAEFGLSWVFLVAFLRGVQCQRLVESGGGVVQPGSSLRISC
AASGFDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEKYHADSVWGRLSISRDNKDTL
YLQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFYDGYNYHYMDVWGKGTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMAWTPFLFLLTCCPGGSNSQSALTQPASVSGSPGQSITISCNSTNDVGGYE
SVSWYQQHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSNNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEGDYCKS
LTSTRRRVFGTGTCLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW
KADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS (SEQ ID NO:2)

图18

HIV-1 Env-4E10 Ig的氨基酸序列(在蛋白酶切割之前)

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVR
QAPGRGLEWMGGVPIPLTTITNYAPRFQGRITITADRSTSTAYLELNSLRPEDTAVYYCAR
EGTTGWGWLGPPIGAFAHWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVLQTQVFISLLWISGAYGEIVL
TQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWEYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVADRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGQSLSTFGQGTKEKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE (SEQ ID NO:1)

图19

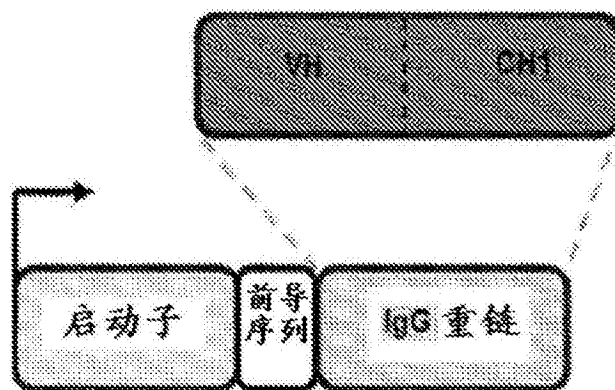


图20A

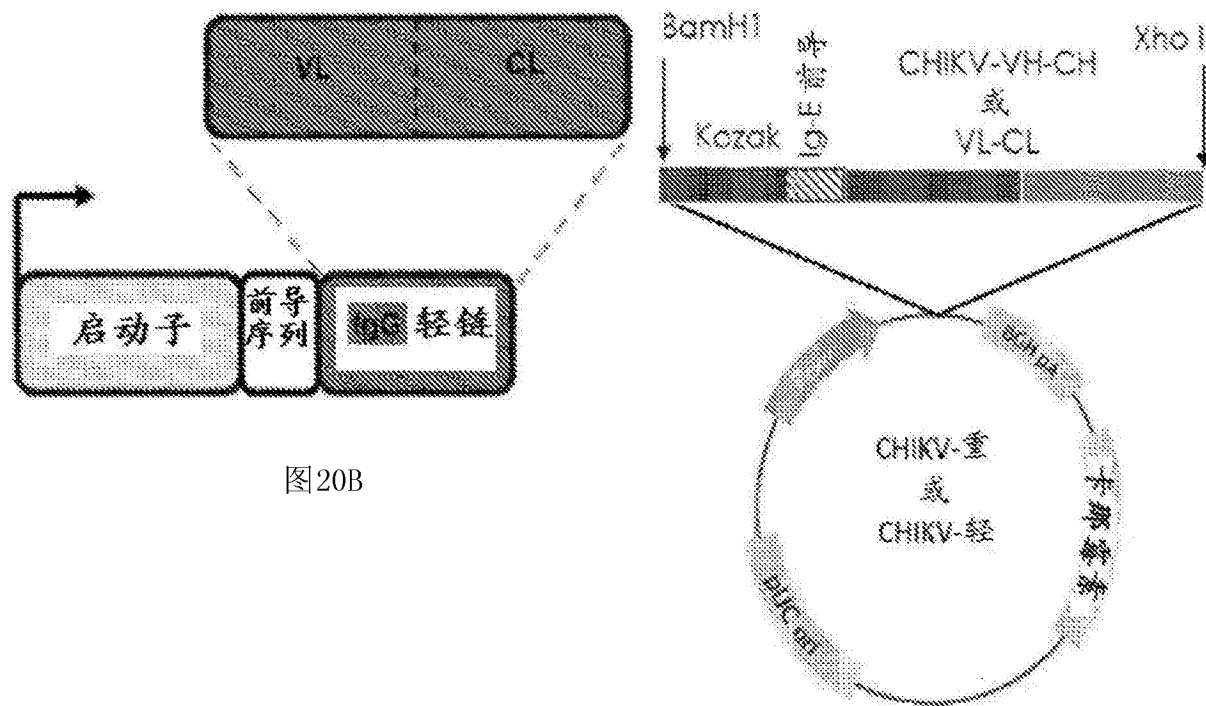


图20B

图21

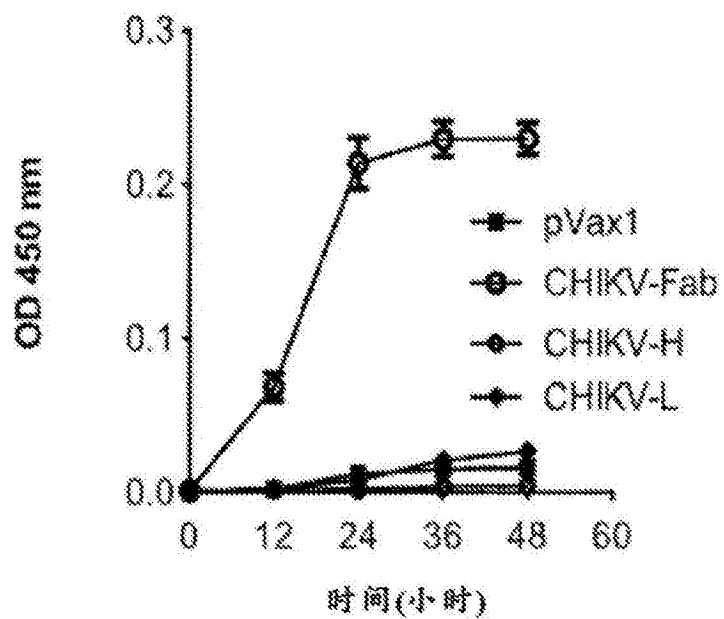


图22

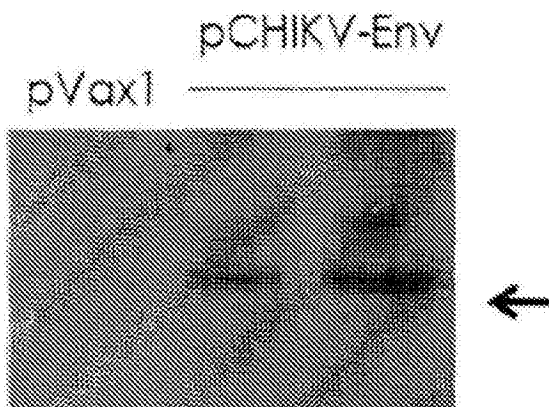


图23

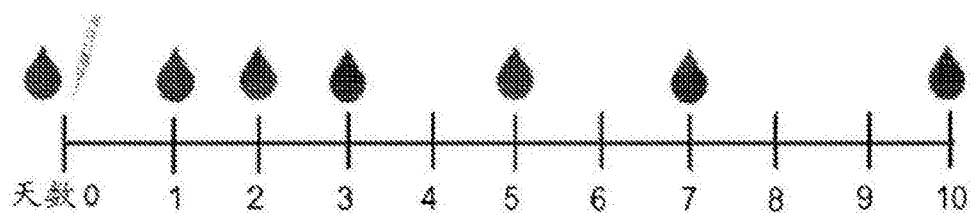


图24

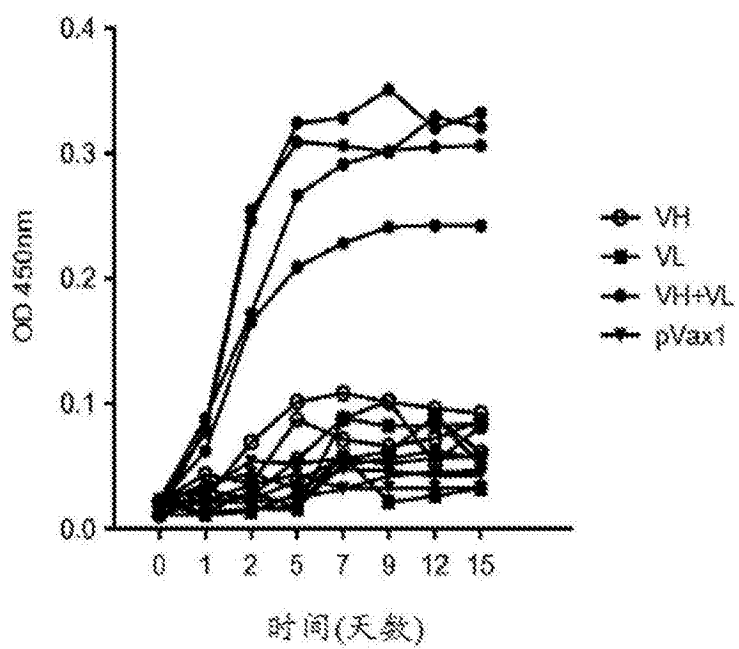


图25

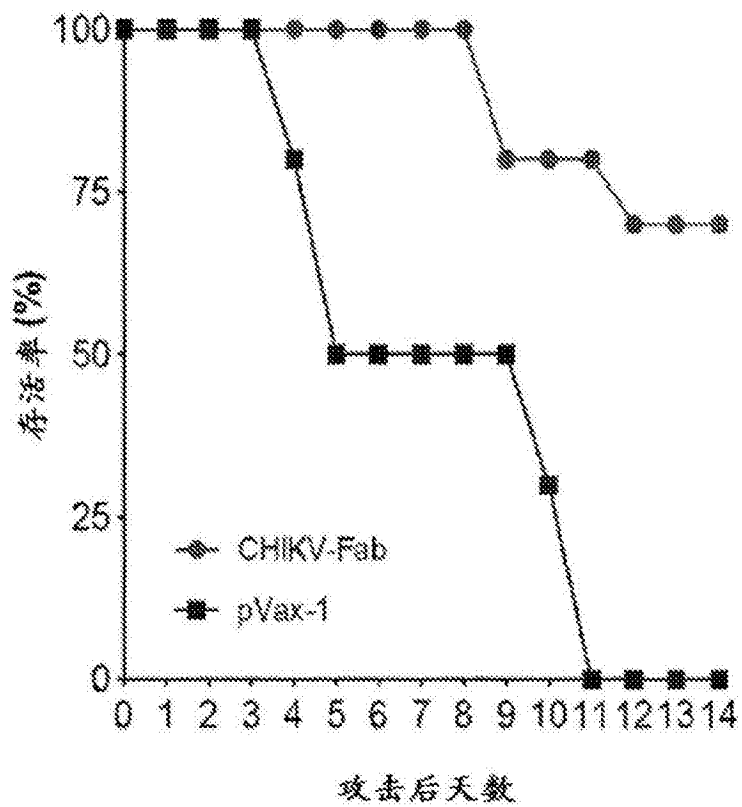


图26

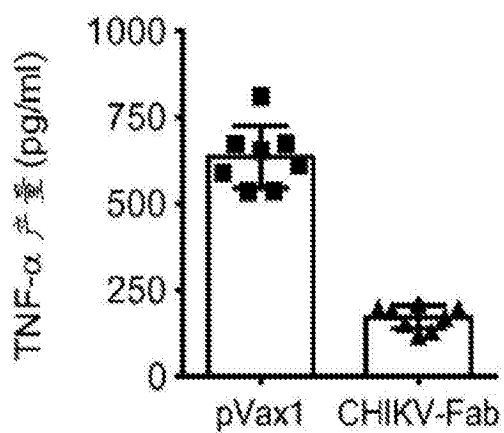


图27

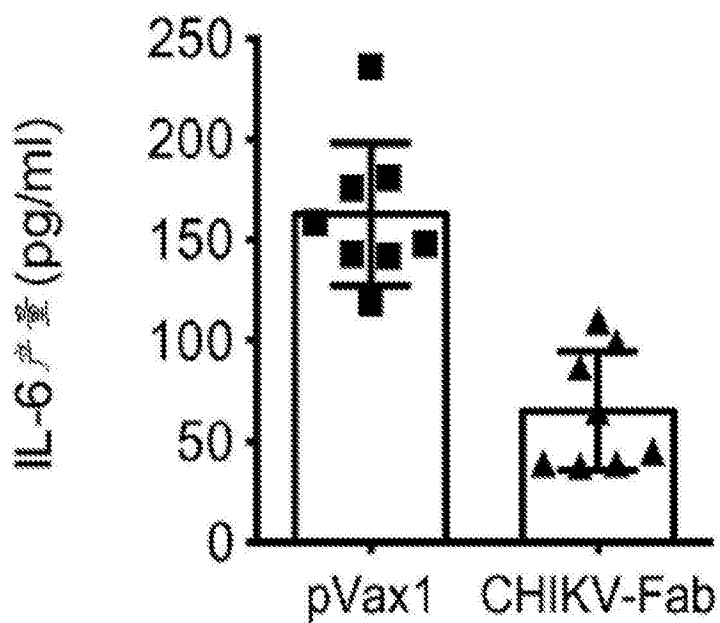


图28

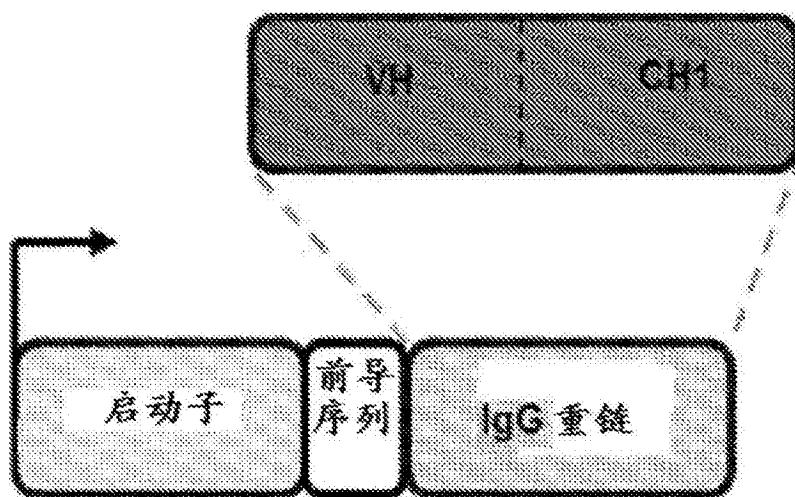


图29

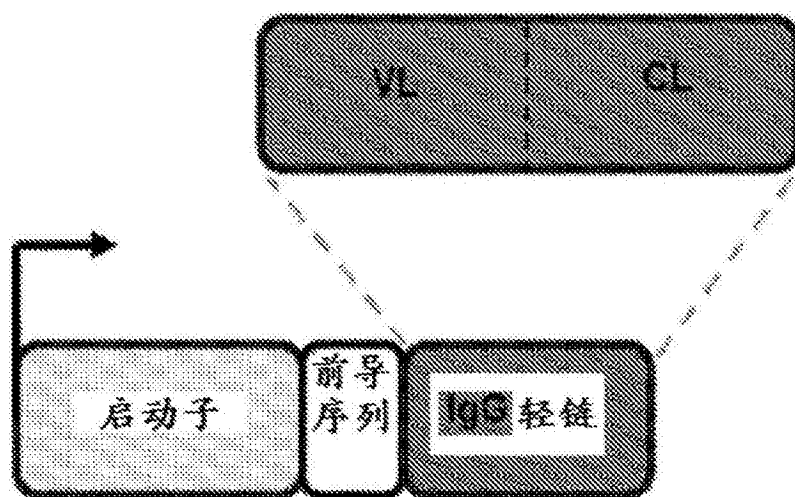


图30

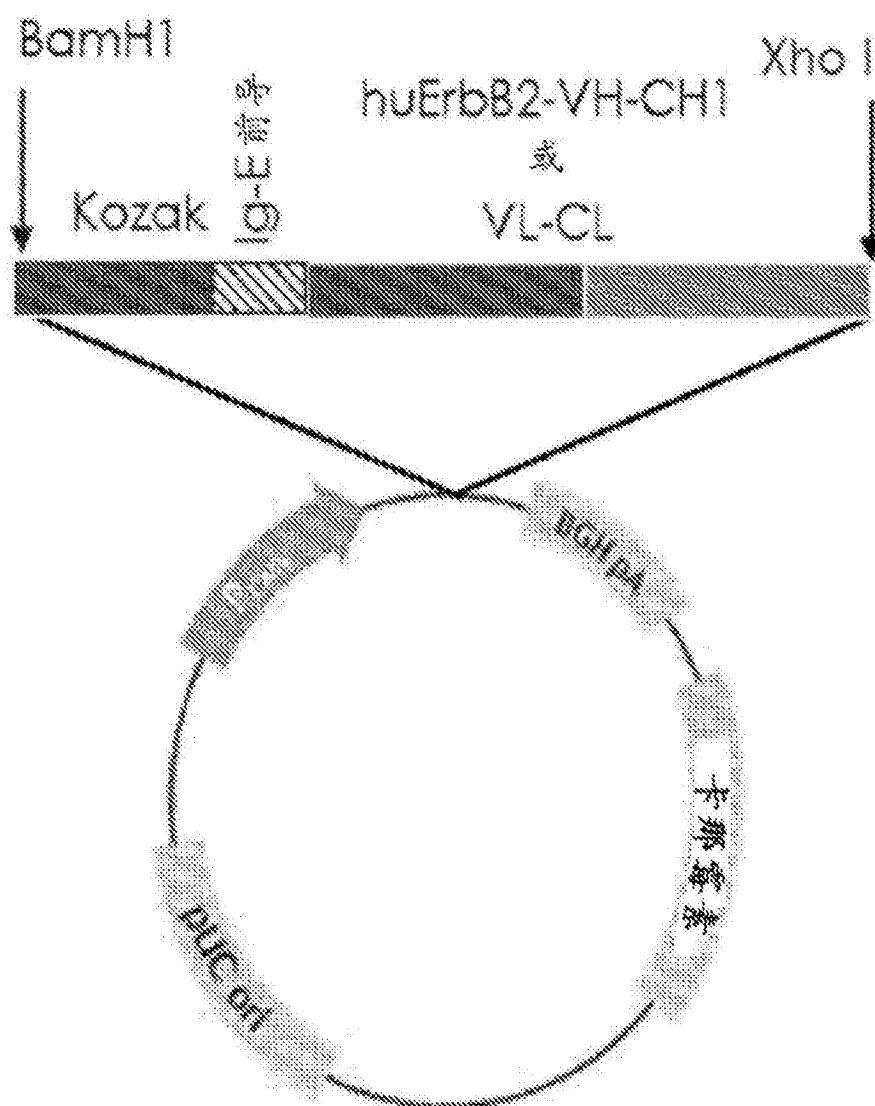


图31

编码抗-Her-2 Fab 的 VH-CHI 的核酸序列

GGATCCGCCACATGGACTGGACATGGATTCTGTTTGGTCCCGCCCTACAAAGAGTGCATTCCGAAGTGCAGCTGG
TGGAGAGTGGAGCGGACTGGTGCAGCCCGCGGATCTCTGGACTGAGTTGGCCGCTTCAGGCTTCACCTTTACAGA
CTACACCAATGGATTGGGTGAGACAGGCACTGGCAAGGACTGGAGTGGTGGCTGATGTCACCCAAATAGTGGGG
CTCAATCTACAAACCAGAGGTTCAGGGCAGGTTCACCTGAGGGTGGACAGGTCCAAAACACTCTGTATCTGCAGAT
GAATTCCTGCGGCTGAAGATACCGAGTCTACTATTGGCCCGCAATCTGGGCCCAAGCTTCTACTTTGACTATTGG
GGCAGGGCACACTGGTGACTGTTCAGCTCCGCTTCTACAAAGGACCAAGCGTGTTCCTCACTGGCACCTCTAGTAAT
CCACTCTGGAGGACAGCAGCTCTGGCTGTCTGGTGAAGACTATTTCCTCCGAGCTGTGACTGTGAGTGGAACTC
CGGAGCACTGACTAGCGGAGTGCACACTTTCAGCCGCTCTGCGAGTCAAGCGGCTGTACTCCCTGCTCTCTGTGTC
ACAGTGCCTAGTTCAAGCTTGGGAACTCAGACTATATATTGTATGTGANCCTATAACCAAGCAATACAAAGTTGGAC
AAGAAGGTGGAAACCAAAATCTCTGTGATAACTTCGAG (SEQ ID NO:40)

图32

抗-Her-2 Fab 的 VII-CHI 氨基酸序列

MDWTWILFLVAAATRVHSEVOLVESGGCLVQPGSLRLSCAASGFTTTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVVPNSGGSIYN
QREKGRFTLSVDISKNTLYLQMNSLRLEDTA VYYCARNLGPSFYIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVATVPSSSLGTQTYVICNVNHRPSNTKVDKKVLPKSC
(SEQ ID NO:41)

图33

编码抗-Her-2 Fab 的 VL-CL 的核酸序列

GGATCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATTCTGTCTCTGGTCCCGCCCTACCCGGTGCATTCCGATATTCAGATGA
CTCAGAGCCCTCTCTCACTGTTCAGCCAGCGTGGCGACCGAGTCACCATCATGCAAGCTTCTCAGGATGTGAGTAT
TGGGGTGGCATGGTACCAGCAGAGCCAGGCAAGCACCCCAAGCTGCTGATCTATTCCGGCTCTTACAGGTATACAGG
ACTGCCCAGCAGATTCAGTGGCTCAGGANGCGGACTGACTTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTC
GCTACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACTCATATACCTTTGGCCAGGGAACAAGTGGAGATCAAGCGGACCG
TGGCCGCTCCCTCTCTCATTTTCTCTGACGACAGCTGAAGAGCGGAACAGCAAGCTGTGCTGTCTGCTGCT
GAACAATTCTACCTCCGAGGCCAAAGTGCAGTGAAGGTGATACCTCTGCGAGTCCGGGAATTCCTCAGGAGAG
TGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGAGCAAGGCAAGCTACGAA
GCACAAAGTGTATGCTGTGAGGTCAACCCACAGGGGCTGTCAAGTCCCGTCACCAAGTCTTCANTAGAGCGCAATG
CTGATAAATTCGAG (SEQ ID NO:42)

图34

抗-Her-2 Fab 的 VL-CL 的氨基酸序列

MDWTWILFLVANAATRVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIQVAWYQKPGKAPKLLIYSASVRYTGVPSRFSQ
SGSGTDFTLTISSIQPEDFATYYCQYYIYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLINNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

图35

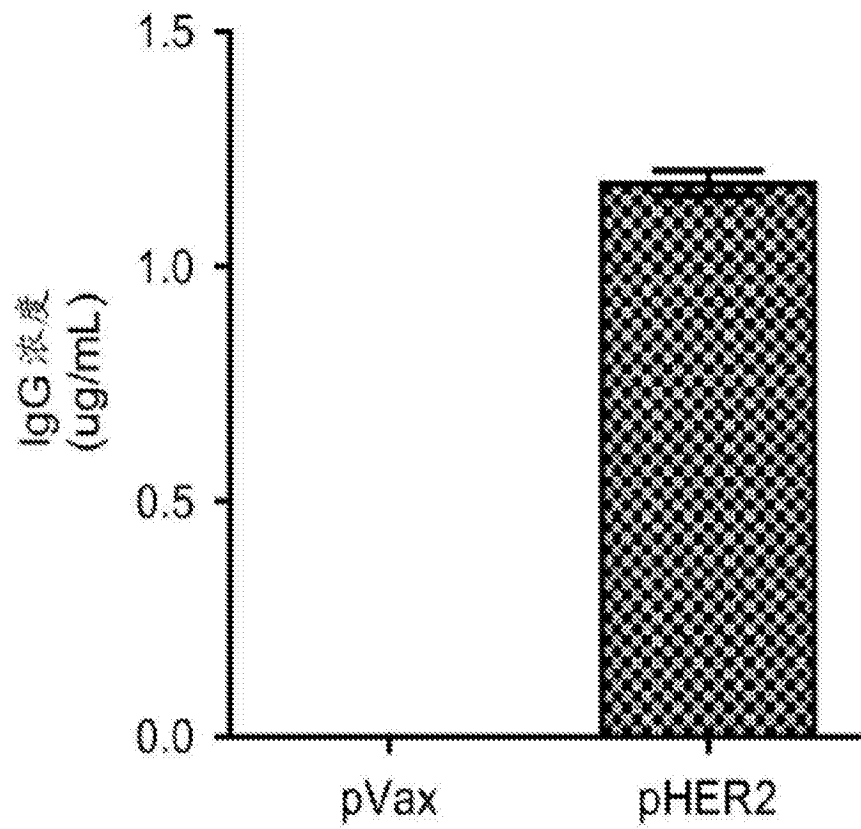


图36

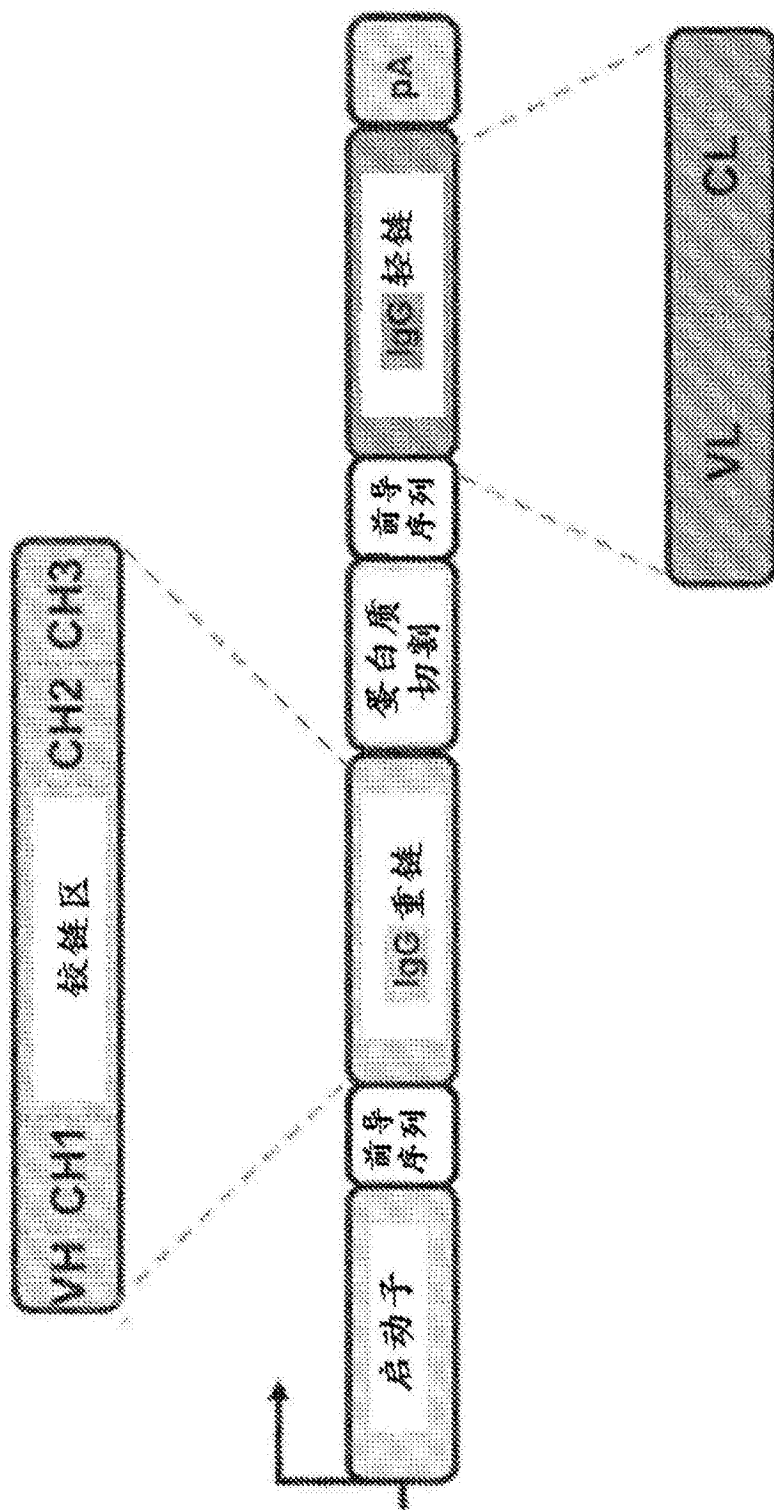


图37

抗-DENV人IgG的氨基酸序列(在蛋白酶切割以分离开重链与轻链多肽之前)

MDWTWRILFLVAAATGTHAQAHLYESGGGVVQPGRLRLSCAASAFNFSTNAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSHKYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQMNSLR AADTA VYCATVGVLTPVNAEYFHHWQGSLSVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHITCPPCPAPELIGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVYVDGVEVHNAAKTKEPREEOYNS
TYRAVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFTSCSVMIHEALHNHYTQKSLSPCKRGRRRRSGSGATNF
SLIKQAGDVEENPGPMAWTFLFLITCCPGGNSQSVLTOPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNICAGYDVHWYQQQLPGTAPK
ILICGNNRPSGVPRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLTGVPFGGTEKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL
QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETITPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHIKSYSCQVTHIEGSTVEKTV
APTECS (SEQ ID NO:45)

图39

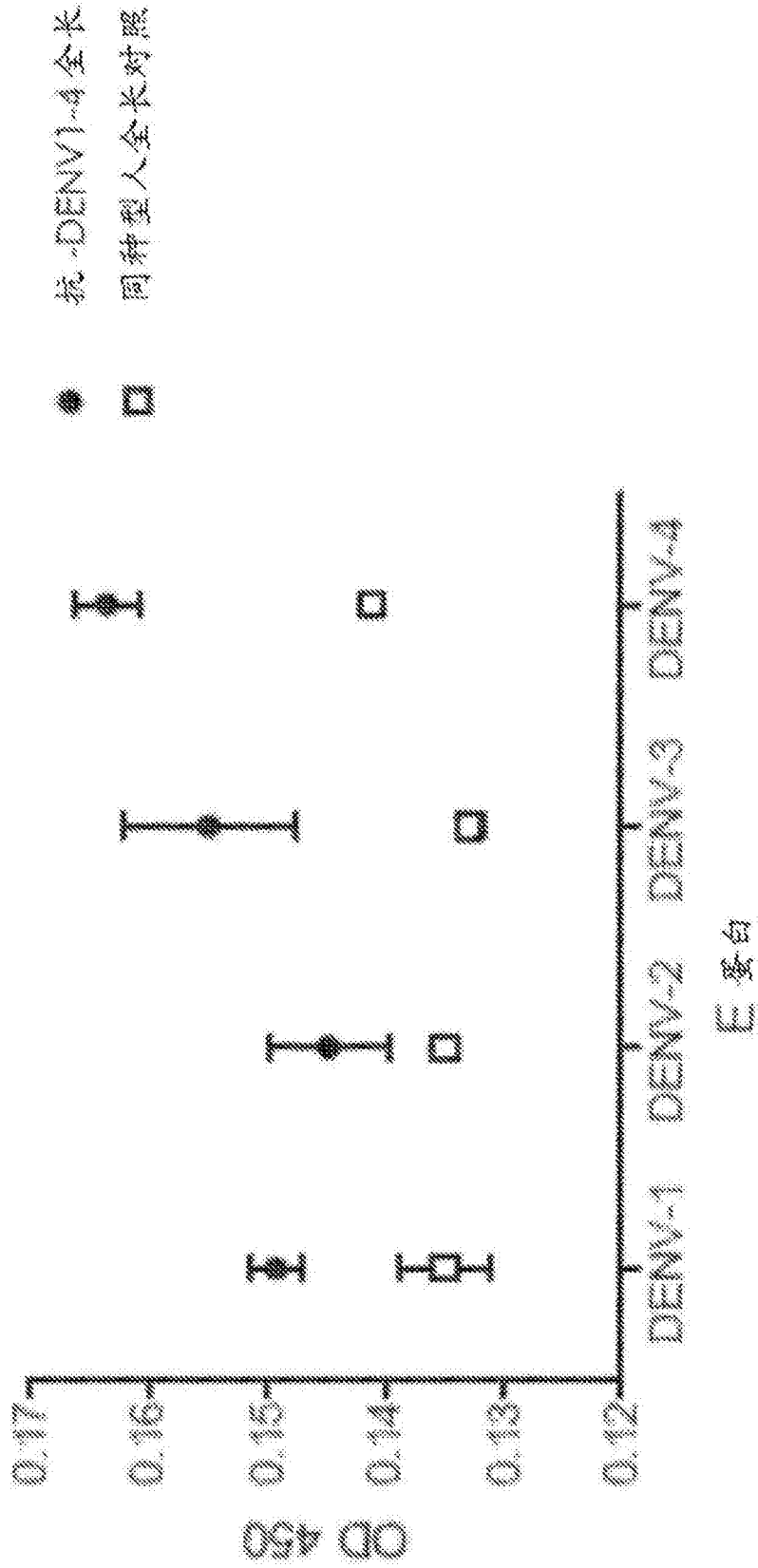


图40

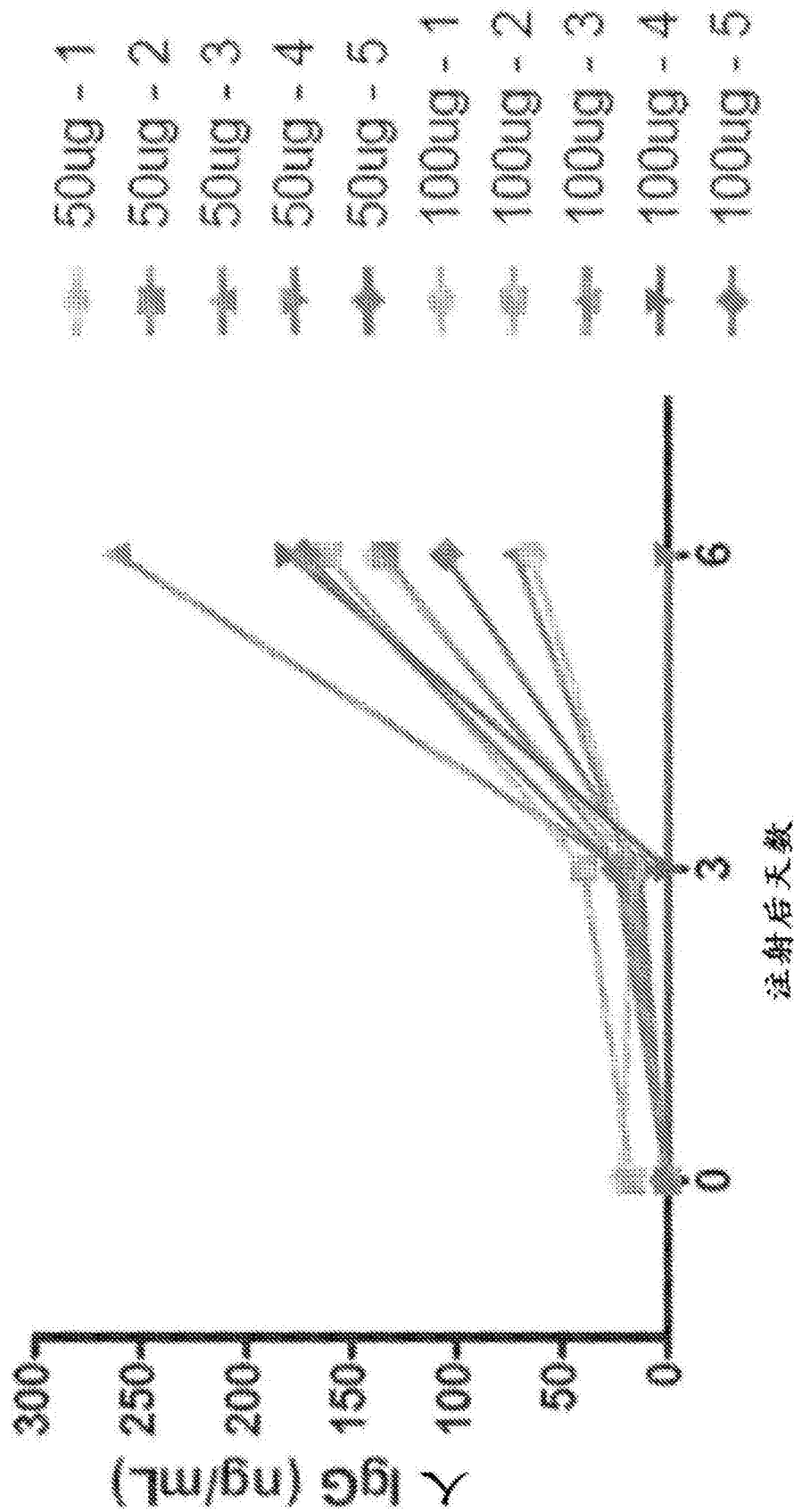


图41

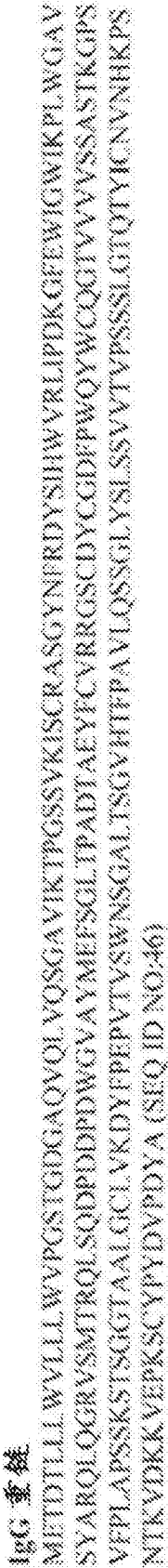


图42

IgG 轻链

MEIDTLLLVVLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGILSLSPGETATLFCKASQGGNMTWYQKRRGQVPRLLIYDTSRRASG
 VPRFVGSQSGTDFFLTINKLDRDFAVYYCQQEFFGLGSELEVHRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREA
 KQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECYPYDVDPDYA
 (SEQ ID NO:47)

图43

HIV-1 Env Fab的重链 (VH-CH1) 的氨基酸序列

MEIDTLLLVVLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMCWNLKPRGG
 AVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELSLTVDDTAVYICTRGKNCIDYNWDFHHWGRGTPVIVSSPSTKGPSTVPLAPSSK
 STSGGTALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKKA
 EPKSCYPYDVDPDYA (SEQ ID NO:48)

图44

HIV-1 Env Fab的轻链 (VL-CL) 的氨基酸序列

MEIDTLLLVVLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGTLSPGETAHSCTRSTQVCSLAWYQRRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPD
 RFSGSRWGPDPYNLTISNLESGRFGVYYCQYEFFGQGTIKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGECYPYDVDPDYA
 (SEQ ID NO:49)

图45

编码 HIV-1 PG9 Fab 的核酸序列

GCAICCCACCATGGCAAGACCCCTGTGCACCCCTGCTGATGGCAACCTGGCCGGAGCCCTGGCCACAGAGC
 GCCCTGACCCAGCCCCCAAGCGTCTCCGGCTACACAGCCAGAGCATCACTATTAGTTGCANCGGACTAGCAACGAC
 GTGGAGGCTATGAGAGTGTACGCTGGTACAGCAGCATCCCGGAAAGCACCAAAAGTGGTCACTACGATGTCACT
 AAAGGCTCAAGTGGGCTCTCAATAAGGTTCTCAGGGAGTAATCTGGGAATACAGCACTCTGTGACCATCTCCGGACTG
 GCGCAGAAAGATGAAGCGACTACTATTGCCAANGCCTGACCTCAACAGACGGCGAGTCTTTGGGACAGGCACCA
 GETGACAGTCTGACAGTCCGTGCCCCCTCCGCTTCAATTTTCCACCTTCAGATGAGCAGTGAATCTGGCAGCTGCAT
 CTGTGCTCTGCTCTGACACAATTCTATCCAGGAGGCCAAGGTGCGAGTGAAGTGGATAACGCCACTGCGAGTCCG
 GCATAGTCAGGAANGCCTGACTGACAGGATTCGAAGGACAGTACCTATAGCTGTCTCAGTACACTGACCTCTGTCCA
 AGGCTGACTAGCAAAACATAGGCTGATGGATGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGA
 TTACAGGGGAGAGTGGCGCGGGGAGGATCTGGAGCGCGGCTCTGGAGGGGAGGCTAGGGGGCGGAGGAAG
 CCGCGAGGAGGCTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 CACTGAGACTGTGCTGCCAGTGGCTTTGATTTTTCACGACAGGGAATGCAATTGGGTACAGGCAAGCAGCCGAC
 GGCCCTGGAAATGGTGGCTTCAATTAAGTACGACGGAAGCGAGAAGTACATGCCGACTCAGTGTGGGAAGGCTGAG
 CATCTAAGGGACAACTCAAGGACACCTGTGACTGGAGATGAATAGCTTGAGAGTGGAGATACCGCTACTTATTT
 CTGCTGGAGAGCGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 CCATTATATGGATGCTGGGCAAGGAACTACAGTACCGGAGCTCCGCAAGTACTAAGGAGCTTCCGTTTCTCT
 CTGGCTCCCACTTCCAAAGTACATCCGGAGGACAGCCGCTCTGGGATGCTGTGTCAGGACTATTTTCCCGAGCCCG
 TGACTGTCTCTGGAACAGCGGGGCTCTGACAAGCGGGGTGACACCTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 CAGTCTGTCTAGTGTCTCAGTGTGCTCAGTGTGCTCAGTGTGCTCAGTGTGCTCAGTGTGCTCAGTGTGCTCAGTGT
 TCAAACACCAAAAGTGGACAAAGAAAGTGGAACTCAAAAGCTTGATACCTGGAG (SEQ ID NO:50)

图46

HIV-1 PG9 Fab 的氨基酸序列

MARPLCTULLMATLAGALAQSAITQPASVSGSPGQSHISCTNSNDVGGYESVSWYQHPGKAPKVVVYDVSKRPSQVSN
 RFSGSKSGNTASLTISGLGAEDGDNYCKSLTSTRRRVFGTGKLTVLTVAAPSVTHFPSPDEQLKSGTASVCLNNFYPREA
 KYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSLTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFENRCECGGSGGGGS
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGRLVSEGGGVVQPGSSRLSCAASGTFDSRQGMHWRQAPQGLEWVAFPKYDGESEKYH
 ADSVWGRLSISRDNSKDTLYIQMNSLRVEDIATYFCVREAGGPDYRNQYNVYDFYDGYNYHYMDVWCKGTITVTSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVRDYTFPEPTVSWNSGALTSGVHTEPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NIIRPSNTKIVDKKVEPKS (SEQ ID NO:51)

图47

编码 HIV-1 4E10 Fab 的核酸序列

GGATCCGCCACCATATGGCAAGACCTCTGTGCACTCTGCTGCTGCTGATGGCTACTCTGGCCGGGCTCTGGCTGAGATTG
 TCCTGACCCAGTCCCTGGCACTCAGTCACTGTCCCGGGGAGCGGCAACTCTGTCTTGCAGAGCAAGCCAGTCCGT
 CCGGAACAACAAGCTGGCATGGTACCAGCAGCGCTCCAGGACAGCACCCAGCTGCTGATCTACGGAGCAAGCTCCC
 GGCCTAGCGGAGTGGCTGATAGATTCTCCCGAAGCGGCTCCGGGACCGATTCACTCTGACCATCTCCAGGCTGGAACT
 TGAGGATTTGGCGGTATTAATCTGTGACAGTACGGGACAGAGCTGTCAACTTTCCGCCAGGGAACTAAAGTGGAAA
 GAGAACCGTGGCGCACCAAGGTCTTTATTTTCCCTTAGCGATGAACAGCTGAAATCCGGGACTGCTTCCGTGTC
 TCCCTGCTGAATAACTTCTATCCAAAGAGAGCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGAAACTCA
 CAGCAATCTGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACATACAGTCTGTCTCAACTCTGACCTTGTCACAAGCTGAC
 TATGAGAAAGCATAAAGTCTACGCACTGAGGTGACCCACCAGGACTGAGGTCCCGCTCAGTAAGTCTTCAATAGA
 GCGAGTGGGGGGGGGCACTGGCGGAGGGGAAGTGGGGGGGAGGAGTGGCGGCGGCGGAGTGGCGGCGG
 GCGGCTCAGGGGGGCGCGGCTCCAGGTCAGTGGTCCAGAGCGGAGCCAGGTCAAGAGACCAAGCTCTTCAGTCA
 CCGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGAGGCTCTTTAGCACTTACGCTCTGTCAATGGGTGGGCAAGGCCCAAGGCTGAGGCC
 TCGAGTGGATGGCGGCGGTGATCCCTCTGCTGACCATTAACCTAAGCTTGGAGGCGGATCAACCAATCAG
 AGCTGACAGATCCACAGCTTACCTGAGCTGAACAGTCTGAGGCGGAGGACACTGACAGTCTACTACTGTGC
 AGGAGAGGCCACTGCTGATGGGGTGGCTGGGAAGCCCATCGGGCTTTTGCACATTGGGCGGAGGAGACACTGGT
 GACTGTGAGCTCTGCACGACTAAAGGGCCAGTGTCTTCCCTCTGGCCCCANGTCCAAAGAGTACATCAGGGGCACT
 GCGCACTGGGGTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAGCCCGGTGACAGTCAAGTTGGAACAGCGGCGCTCTGACCACT
 GCGGTGCACACTTTCAGGCCGTGCTGCAGAGTTCAGGGCTGTACTCCCTGTCTCAGTGGTACTGTGCCCCCTCAAGCA
 GTCTGGGGACTCAGACTTACATTGTAAATGTGAACCATAAACCTCTCAATACTAAAGTGGACAAATAAGTGGAAACCAA
 AGACTGATAACTTCGAG (SEQ ID NO:52)

图48

HIV-1 4E10 Fab 的氨基酸序列

MARPLCTLLLMATLAGALAEIVLTQSPGTQSLSPGERATLSRASQSVGNKKLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVADR
 FSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYQCQYQSLSTPGQGTKVEKRTVAAPSFIIPSPDEQLASGTASVVCLLNIFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFENRGECCGGGSGGSGG
 GCGSGGGSGGGGSGGQVOLVQSGAEVFRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVRQAPGRGLEWMGGVPIPLLTITNYAP
 RFGGRITTTADRSTSTAYLELNSLRPEDTAVVYCARCTTGWGLGKPIGAFAHWGGGTLVTVSSASTKGPSVTEPLAPSSKST
 SGTAAALGCLYKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSQLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKYDKKVEP
 KS (SEQ ID NO:53)

图49

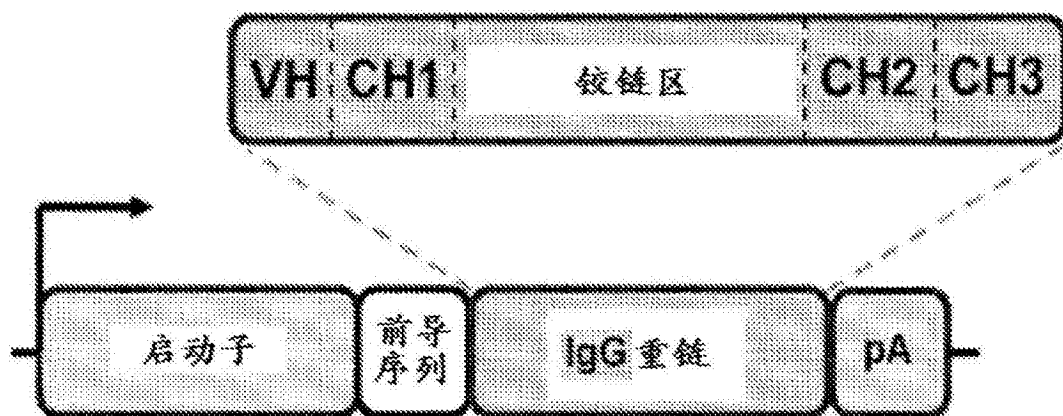


图50

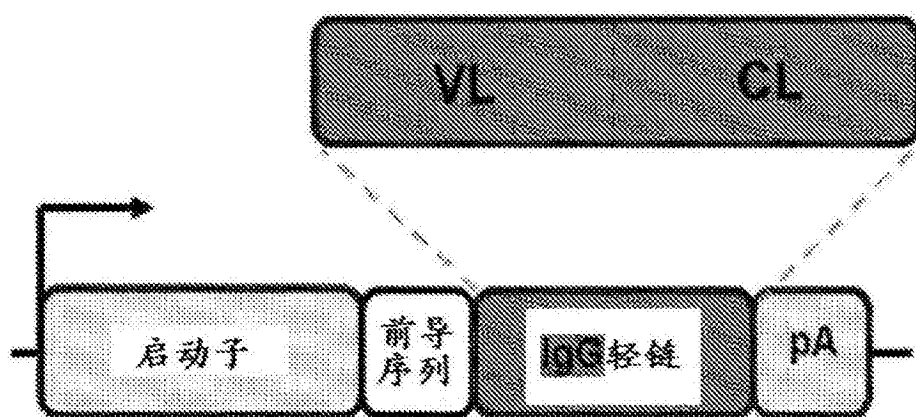


图51

編碼 HX-1 VR01 鏈 (VR01/鏈) 的核酸序列

GGATGCGCCACCATGGGATTGGACATGGATTCTGTTCTGTGGTGGCGCGCAACTAGAGTGCATTCACAGGTGCAGCTGG
TGCAGTCAAGCGCGGCAGATGAAGAACCCTGGGAGAGTATGCGAATCTCATGCCGGCTAGCGGGTACGAATTCATACCG
ACTGTACCTTGAACATGGATTAGACTGGCACTGGGAAGAGGCCAGAGTGGATGGGATGGCTGAACCTAGAGGCGGG
GCAGTGAATTACGCCAGACCACTGCAGCGCAGGTCACTATGACCCCGGACGTGTATTCTGATACCTGCCATTCCTGGGAG
CTGGGAAGTCTGACAGTCTGACGATACTGCGGTGTACTTCTCCACACGGGGCANGAACCTGTGACTATATAATTGGGATTTTG
AACACTGGGGCAGGGGACACCTGTCTATTTGTGAGCTCTCCCAAGTACTAAGGGACCCCTCAGTGTTTTCCCTGGCCCCCTTC
TTAGTAAAGTACTCAGGAGGCAACAGCCGCTCTGGGATGCCCTGGTGANAGDATTACTTCCCTGAGGCCAGTCAACGGTGAG
TTTGGAACTCAGGCGCCTGACAAGCGGGTCTATACTTTCCAGCTGTGTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCC
TCTGTGTGCACAGTGTCCAGTTCAAGCTTGGGAACACAGACTTATACTGTACAGTCAATCACAGGCTAGCAATACTA
AAGTGGACAAGAAGCCGAGCCTAAGAGCTGGCAACCAAGTCTCTGTGATAAAGCTCATACATGCTCTCTCTCTCCAG
CTCTCTGAACCTCTGGCGGCCCATCTCGTGTCTCTGTCTCCACCCAAAGCCCAANGACACCTCTGATGATTAGCAGGACTCC
TGAGGTCACTGCGTGGTGTGGACGTGTCTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTAACTGTACGTGGATGGCGTGA
AGTTCATATATCCAAAGACAACCCCGGGAGGAACAGTACAACTCTACCTATAGAGTCTGTGAGTGTCTTGACAGTGT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGTCTATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAAC
AATTTCCAAGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAAACCCCAAGTGTGTACACTGTGCTCCATCTCTGGGACGAGGTGACTAAGAA
CCAGGTCTCTGTGACCTGTCTGTGTGAAGGATTTCTATCCAAAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAAATGGCCAGCCC
GAGAACAAATTACAAAGACCACACCCCTGTGTGTGGACAGCGATGGCTCTTCTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATA
AAAGCCCTGGCAGCAGGGGAACGTCTTTAGCTGTCTCCGTGATGCCAGCAAGCTCTGCACAATCATACACCCAGAAAT
CTCTGAGTCTGTCACTTGGCAAGTGATAACCTGAG (SEQ ID NO:54)

www.wrcan.gc.ca 重鏈 (VHCH1CH2C3) 的氨基酸序列

MDWWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWGMWLKPRGGAVNVA
RPLQGRVMTIRDVYSDTAFLEIRSLTVDDTAVYFCTRGKNCNDYNWDFEHWGRGTPVIVVSSPSIKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVATVPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTKVDKKAEPKSCE
PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVLEPPPKKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDPEVKENWWYVDGVGEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVAVSALTIVLHQDWLNGKEYCKVAKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPTPLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSISPGK (SEQ ID NO:33)

图52

图53

编码 HIV-1 VRC01 IgG 轻链 (VL/CL) 的核酸序列

GGATCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATTCTGTTCTTGGTGGCAGCCGCTACCAGAGTCCATTCCGAAATTGTGCTGA
CCCAGTCTCCCGGAACACTGTCTCTGAGTCTCTGGCGAGACAGCCCAICATTTCTGTAGGACTTCTCAGTACCGGAGTCT
GGCATGGTATCAGCAGCGACACAGGCTCTCTGACTGGTCTACTCAGGAAGCACTCGGGCAGCCGCGCATCC
CGACCGATTCTCCGGGTCTCGGTGGGACCTGATTACAACTGACCATCTCAAATCTGGAAAGCGGAGACTTTGGCGGTG
TACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCCTTTGGCAGGGAAACCAAGGTCCAGGTGGACATCAACCCACAGTCCGCTGCACCA
AGCGTGTCACTTTTCCACCTCAGATGANCAGCTGAAGTCCGGACCGCTCTGTGGTGTCCCTGCTGACACAATTCTTA
CCCCGGGAGGCAAGGTCCAGTGGNAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCACTGACTGAAC
AGGACAGCAAGGATTCACCTATTCTTGCTCTACTCTGACCTTGAGCAAGCTGATTACGAGAAAGCACAAAGTGTGA
TGCATGTGAAGTTCACCCAGGGACTGGGTACCCGTGACCAAGAGCTTCAATCGCGGAGAGTGTGATAACTCGA
G (SEQ ID NO:56)

图54

HIV-1 VRC01 IgG 轻链 (VL/CL) 的氨基酸序列

MDWTWILFLVAAATRVHSEIVLTQSPGTHLSFPGETAHSCTRISQVYGSIAWYQDRPGQAPRLVIYSNSTRAAGIPDRFSNRW
 GPDYNI TISNLESGDFGVYVYQQVYEFHQGTQVQVDIKRTVAAPSVFHPPSDEQLKSGTASVVCLINNFYPRKAVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKIDSYSLNSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSENREGC (SEQ ID NO:57)

图55

编码 CHIKV-Env-Fab 的重链 (VH-CH1) 的核酸序列

GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGAGGATTCTGTTCTGGTGGCCGCCCTACTGGAACTCAGGCTCAGGTGCAGC
TGGTGCAGTCAGGCTCCGAACCTGAAGAACCAGGGCACTCTGTGAAGGTCACTGTGCAAGCTCAGGCTACACCTTGA
CACGGTATGCCATGACTTGGGTGGCCAGGCTCTCTGGACAGGACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACTTACACCG
GAAATCCAACTTATGTGCAGGGGTTCACCGCGGATTCGTGTTCTCTGGACACTTCCGTCTCTACCGCTTCTTGCAC
ATTACAAGTCTGANAGGCAGAGGACACTGCGGTGACTTCTCGCTAGGGAAGCGGAGCAAGAGGCTTTTGATTATTGG
GGCCAGGGAACCTTGGTGACAGTCACTCCGCCAGCACAAAGGACCTCCGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAA
AGTACATCAGGGGCACTGGCGCTCTGGGATGCTGTGGTCAAGATTACTTCCCGAACTGTGACCGTACGCTGGAACT
CCGGAGCTCTGACCAAGCGGGTGACATACATTTCCCGAGTCTGACAGCAAGCGACTGTACTCCGTGCTCTGTGGT
CACAGTGCCTAGTTCAAGCTTGGGACACAGACTTATACTCTAATGTGAACCATAGGCCAAGCAACACCAAGTGGGA
CAAAAAGTGGAAACCTAAGAGCTGCTGATAACTTGAG (SEQ ID NO:58)

图56

CHIKV-Env-Fab 的重链 (VH-CH1) 的氨基酸序列

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGSELKRTGASVKSASGYTLIRYAMTWVRQAPCGQGLEFWMGWINTYTNPT
 YVQGTGRFVPSLDTSVSTAFLLHTSLKAEDTAVYFCAREGGARGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFTLAPSSKSISSGTA
 ALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTTPAVLQSSGLYSLSVSVTPVPSSSLGTQTYICNVNHRPSNTKVDKKVEPKSC
 (SEQ ID NO:59)

图57

编码 CHIKV-Env-Fab 的轻链 (VL-CL) 的核酸序列

GGATCCGCCACCAATGGCATGGACCCCACTGTTCTCTGTTCTCTGCTGACTTGTGTCTGCGGGAGCAATTACAGAGCG
TCTGACCCAGCCCTTCTGTGTCTCGGAGCACAGGACAGCGAGTCACAATCTCTTGCCTGCACTGGGAAGCTCTCTAACAT
TGGGCCAGCCACGACGTGGCAATTGGTACAGCAGCTGCTCAGGGACCGCTCCACACTGCTGATCTATGTGAATCTTAAT
AGGCTTAGTGGCTCCAGATAGATTTCAGGAGCAAGTCCGGCACTCTGCTAGTCTGGCAATTACAGGACTGCAAG
GCTGAGGACGAACAGATTACTATTGCCAGATTACGACTCAAGCTGTCAAGCAAGCTGTGAGGAGGAACT
AAGCTGACCGTCTGGGACAGCCCAAGCGCTGCTTCTGTGACCTGTGTTCCCTTAGTTTCAGAGGAACTGCAAGGCCA
ACAAAGGCTACTCTGGTGTGCTGATCTCCGACTTCTAGCCTGGAGCAGTGACCTGTCGCAATGGAAAGGCCGATAGCTCCCC
AGTGAAAGCTGGGTTGAGACCCACAACCTCCAGCAAGCAGAGTCCCAACAAGTACGAGCTCTAGTTAATCTGTCACCT
GACACCTGAACAGTGGAGAGAGCCACAATACTTATCTTGCCAAAGTGACTCAATGAGGGCAGTACCGTGGAAAGAAGACAT
CGCCCCAACATGACTGTTCTCTGATAACTTCGAG (SEQ ID NO:60)

图58

CHIKV-Env-Fab 的轻链 (VL-CL) 的氨基酸序列

MAWTPLELLTCCPGGNSQSVLTOPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGASHDVHVVYQQLPGTAPTLIVVNSNRPSGVPR
FSGSKSGTSAIALTGLQAFDEADPYQCQSYDSNLSGSAVFGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY
PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHFGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID
NO:61)

图59

编码 VRCW IgG 的核酸序列

GGATCCGCCACCAATGGATTGGACATGGATTCTGTTCTCTGGTCTCCCGCCGCAACTAGAGTGCATTACAGGTGCAGCTGG
 TGCAGTCAGGCGGCGCAGATGAAGAACCCTGGGAGAGATATGGGANTCTCATGCCCGGGCTAGCGGTACGAAATTCATGG
 ACTGTACCTCTGAACCTGGATTAGACTGGCACTGGGAAGAGGCCAGAGTGGATGGGATGGCTGAACCTAGAGCGCGG
 GCAGTGAATTACGCCAGACCACTGTCAGGGCAGGGTCACTATGACCTCCGGACGGTGTATTGATACCTGCATTCCTGGAG
 CTGGGAAGTCTGACAGTGCAGATATGCTGGTACTTCTGACACACGGGCAAGAACTGTGACTATAATTGGGATTTTG
 AACACTGGGGCAGGGGACACCTGTGATTTGGAGTCTCCCAAGTAGTAAGGACCTCAGTGTTCGCCGTGGCTCTTC
 TAGTAAAGTACCTCAGGAGGCACAGCCGCTCTGGGATGCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTCACTGAG
 TTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTTCAGCTGTGCTGCAATCAAGCGGGTGTACTCCTCTGTC
 TCTGTGCTACAGTCCCAAGTCAAGGCTGGGAACACAGACCTTATATCTGTAACTGCAATCAAGGCTTAGCAAFACATA
 AAGTGGACAAAGAAGCCGAGCCTAAGAGCTGGGAACCAAGTCTCTGTGATAAACCCTATACATGCTCTCTCTGTCCAG
 CTCCTGAACCTGCTGGCGGCCCAATCCGCTGTCTCTGTTTCCACCCAGGCCAAGACACCTCTGATGATTAAACAGACTCC
 TGAGTCACTTCTGCTGTGGACCTGTGCTCCAGGAGACCCGAAAGTCAAGTTAACTGGTACCTGGATGGGCTGCA
 AGTTCATAATGCCAAGACAACAACCCCGGGAGGACACAGTACAACTCTACCTATAGAGTCTGTAGTGTCTTGACAGTGTCT
 GCACAGGACTGGTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGGAAAGTGTCTAATAAGGCTCTGCCAGCTCCATGGAGAAAAC
 AATTTCCAAAGGCAAAAGGCCAGCCAAGGGAACCCAGGTGTACACTGTGCTTCCATCTCTGGACGAGAGCTGACTAAGAA
 CCAGGCTCTCTTGACCTGTCTGGTGAAGAGATTTCTATCCAAAGTGATAACGCTGTGGTGGAGATTCCTGTTCTGTTGTTTCAAGTGGAGTGGGAAATCCAAATGGCCAGCCCC
 GAGAACAAATTACAAAGACCAACCCCTGTGCTGGACAGGUAATGCTCTCTTCTTCTGTATTCAAAAGTGGACCTGGGATA
 AAAGCTGCTGGCAGCAGGGGAAGCTTTAGCTGCTCCGTGATGCAAGCAAGCTCTGGACAAATCATACACCCAGAAAGT
 CTCCTGAATGTGTACCTTGGCAAGAGGGGACGAAACCGGAGAAAGGCGCAGCGGAGCTACAAACTCAGGCTCTGTGAAA
 CAGCCAGGGCAGTGGAGGAAATCTCTGGGCAATGGATTGGACTTGGATTCCTGCTGGGAGACAGCCATCATTTCTGTGA
 GTCCATTCGGAATTTGTCTGACCCAGTCTCCGGACACCTGTCTGTAGTCTCTGGGAGACAGCCATCATTTCTGTGA
 GGACTTCTCAGTACGGGAGCTTGGCATGGTATCAGCAGGACCCAGGACAGGCTCTCGACTGTGTCACTTCTACTCAGGAA
 GCACCTCGGCAGCTGGCAATCCGACCTGATTCCTCCGCTCTCGGTGGGACCTGTATTACAACCTGACCACTCAAACTCT
 GGAAAGCGGAGACTTTGGCGGTACTATTTGGCAGCAGTATGAGTTCTTTGGGCAAGGAAACCAAGTCCAGGTGGACAT
 CAACCGCACAGTCTGCTGCACCAAGCTGTGTATCTTTCCACCTCAGATGAACAGCTGAGTCCCGCACCCCTCTGTG
 GTGTGCTGTGTGAACAATTTCTATCTCCCGGAGGCCAAGGTCAGTGGAAAGTGGACACAGCCCTGTGAGTCTGTGGCAAT
 AGTCAGGAGTCACTGACTGAACAGGACAGCAAGGATTCACCTATCTCTGCTCTACTCTGACCCCTGAGCAAGCTG
 ATTACGAGAAAGCAAAAGTGTATGCAATGTGAGGTACCCACCAGGGACTGGGGTACCTCGGTACCAAGAGGCTTCAATC
 GCGGAGAGTGTGTGATAACCTGGAG (SEQ ID NO:64)

图62

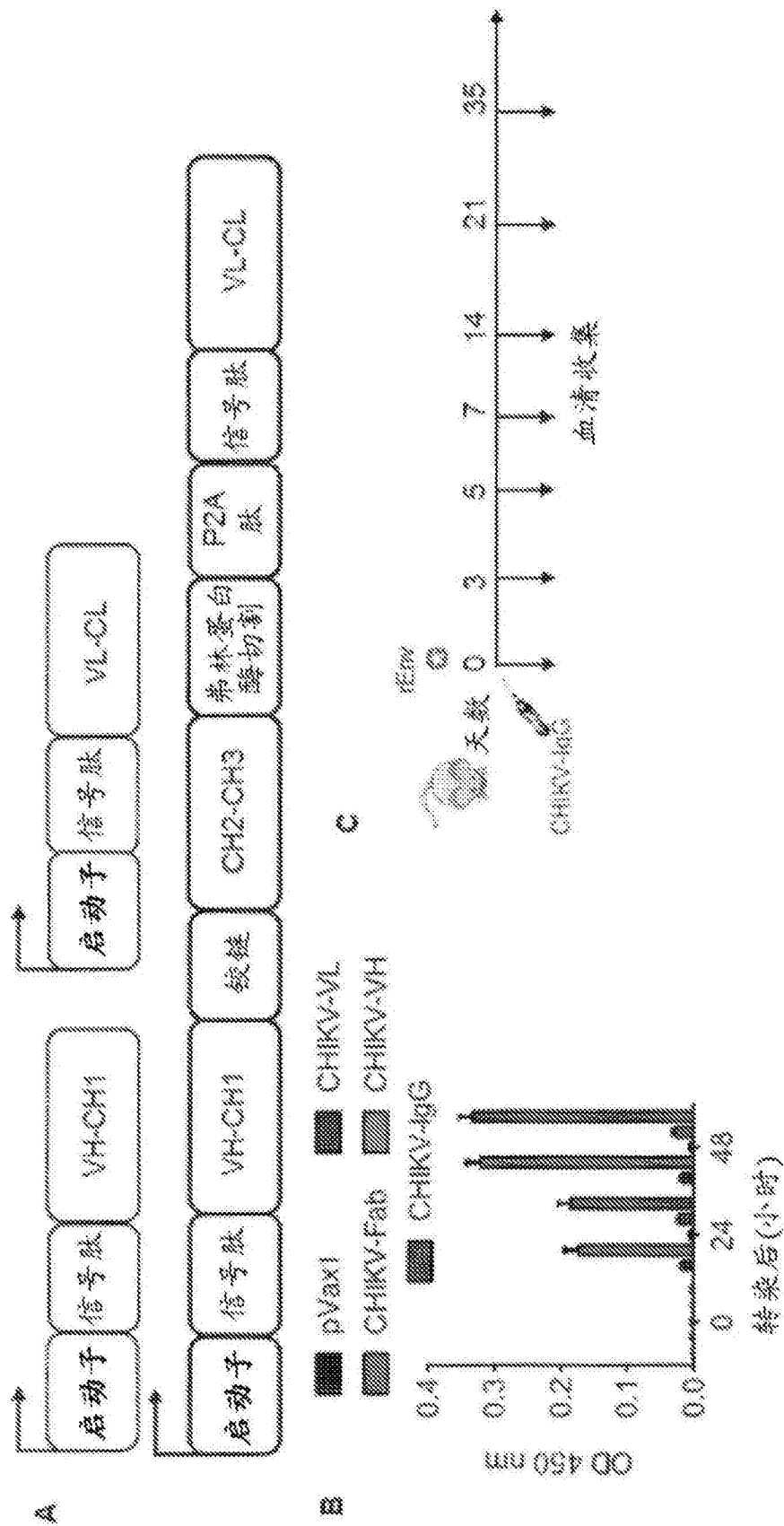


图63

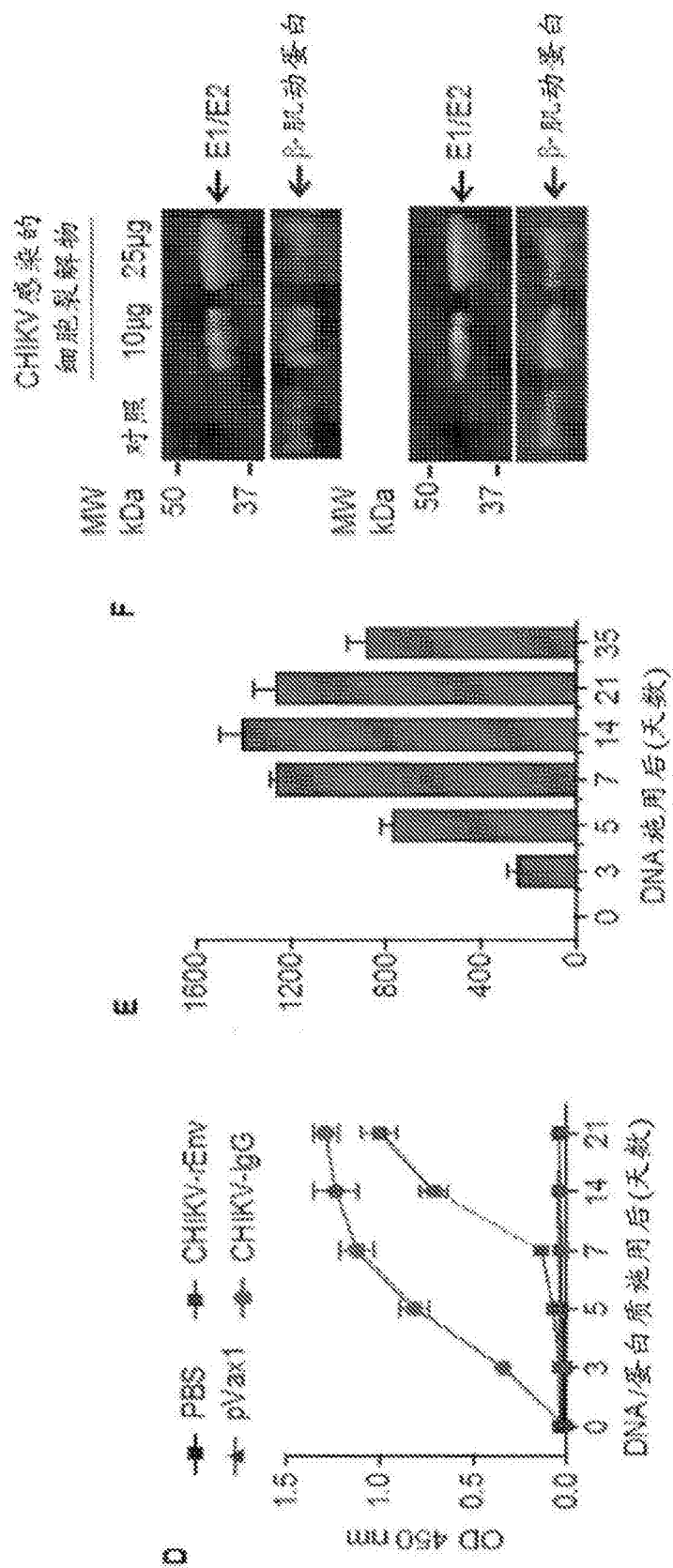


图63(续)

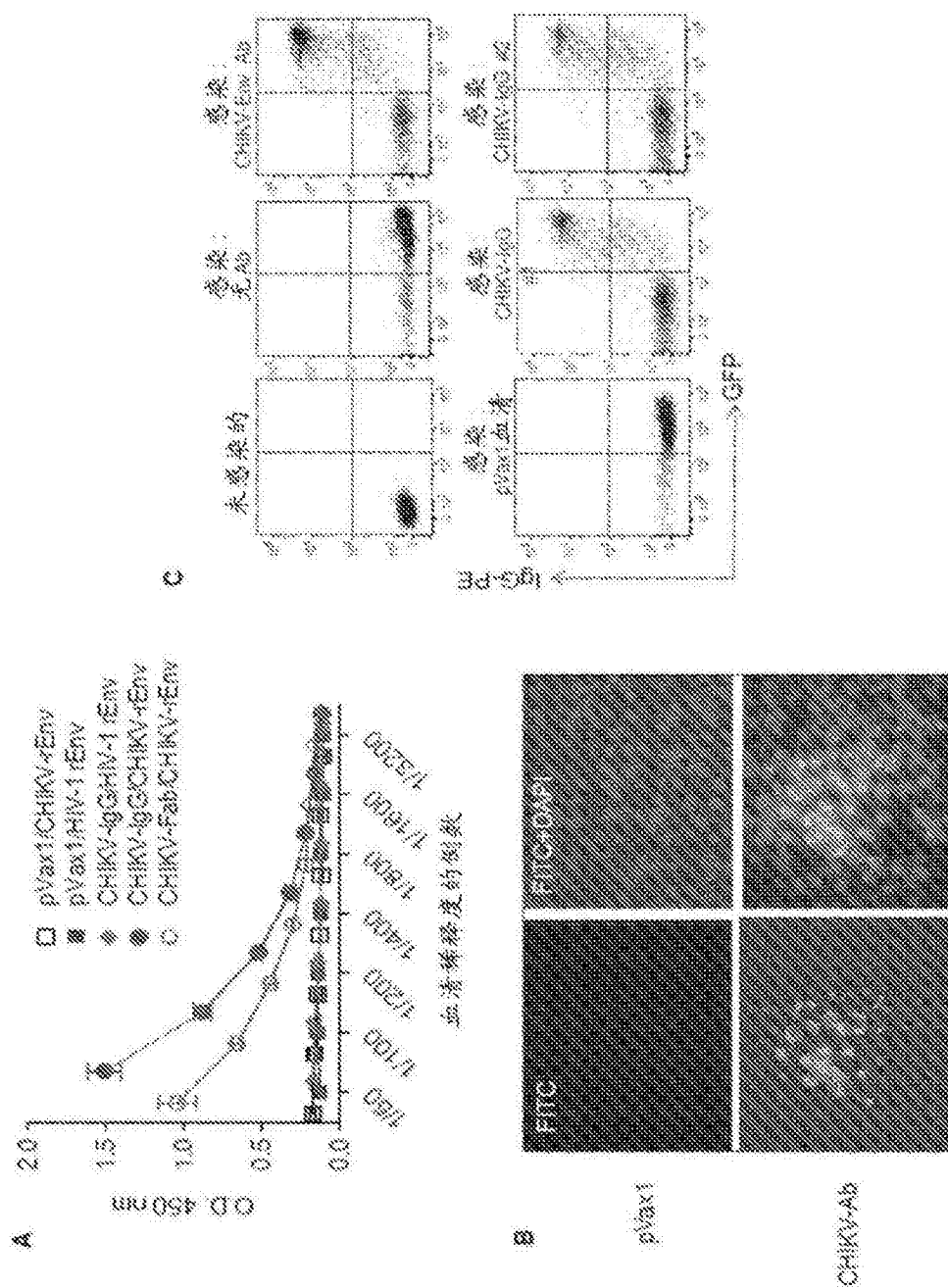


图64

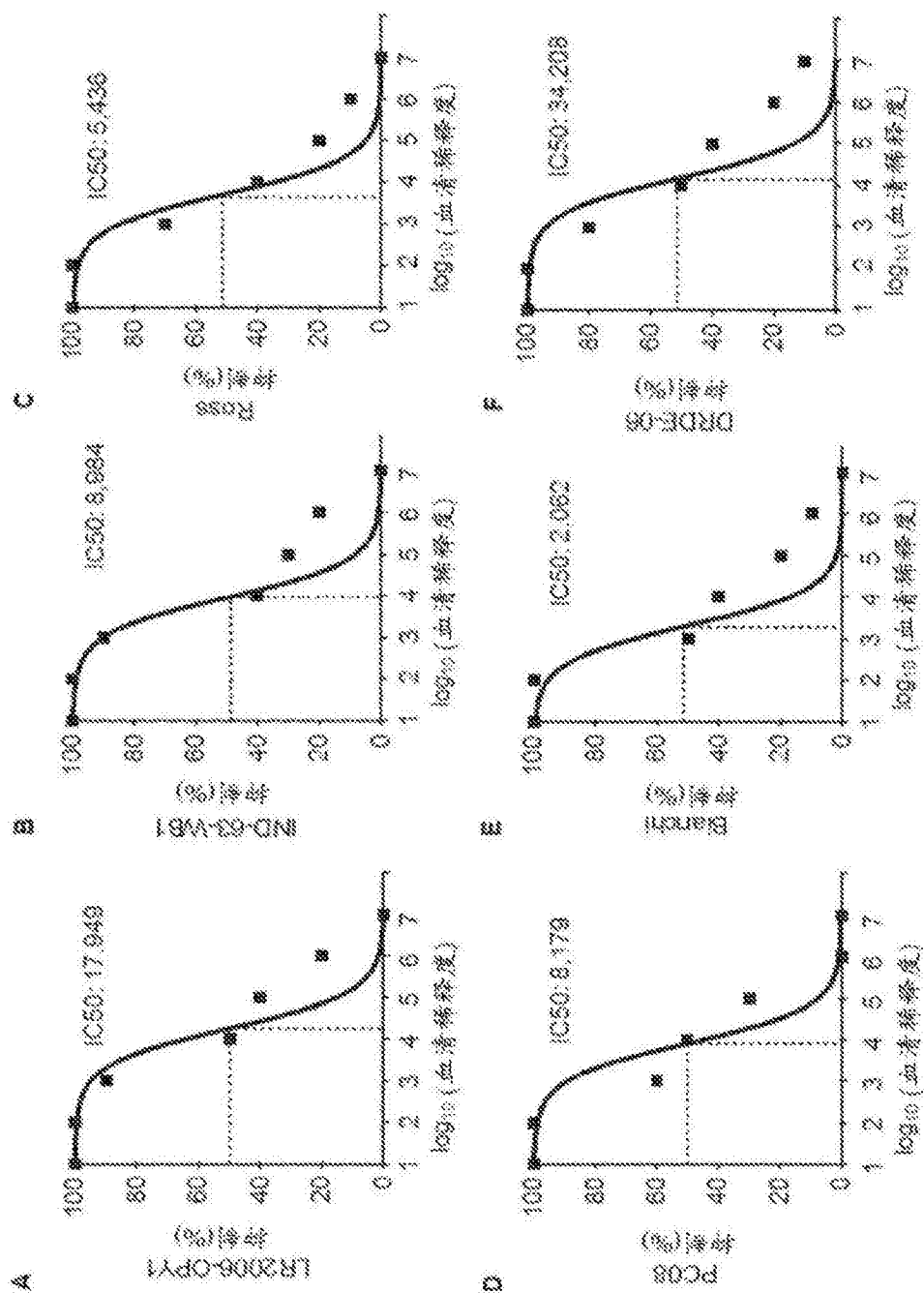


图65

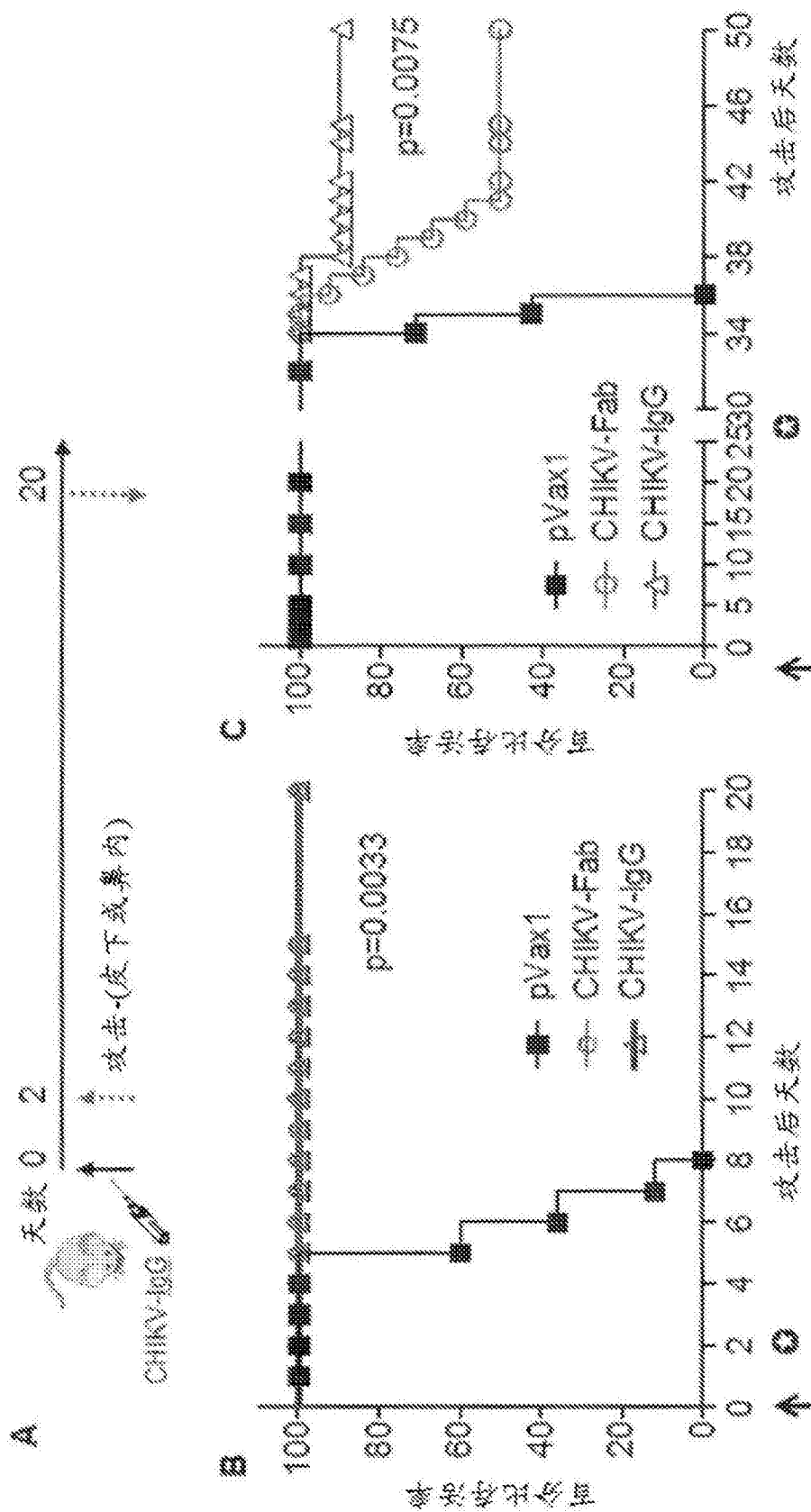


图66

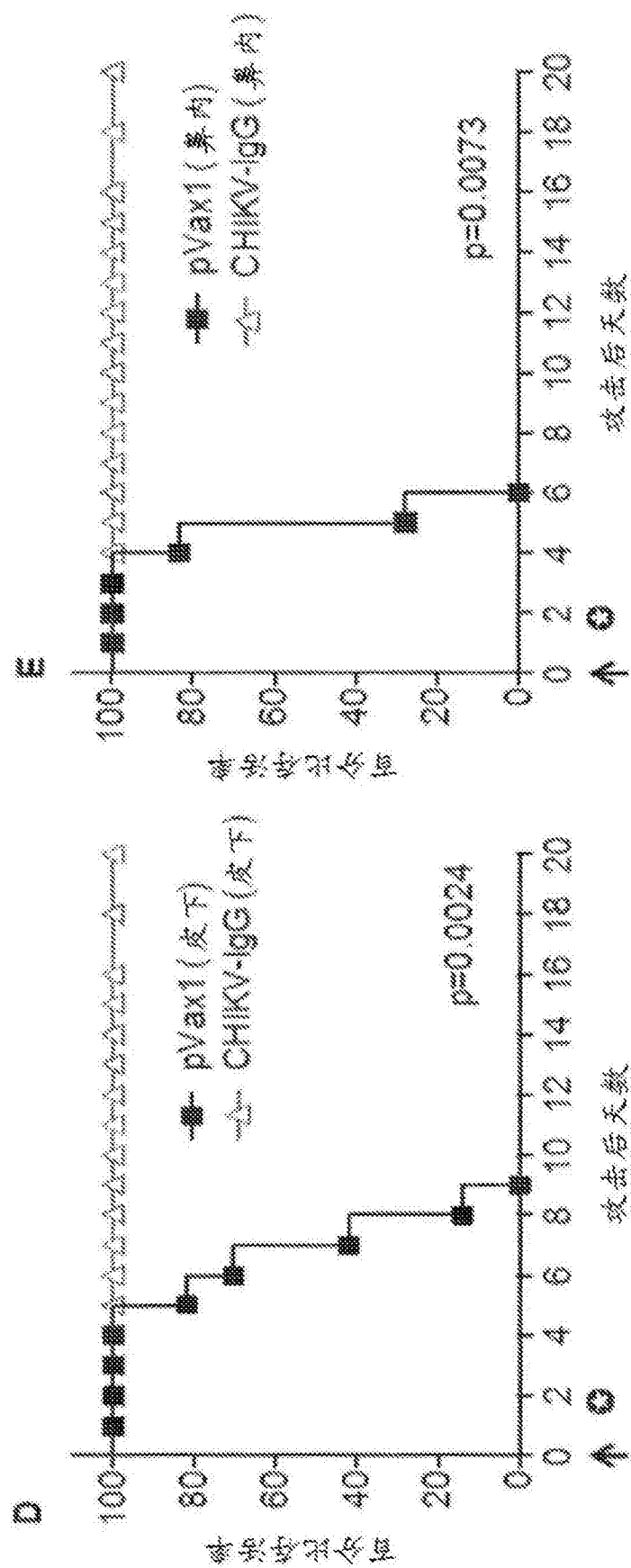


图66(续)

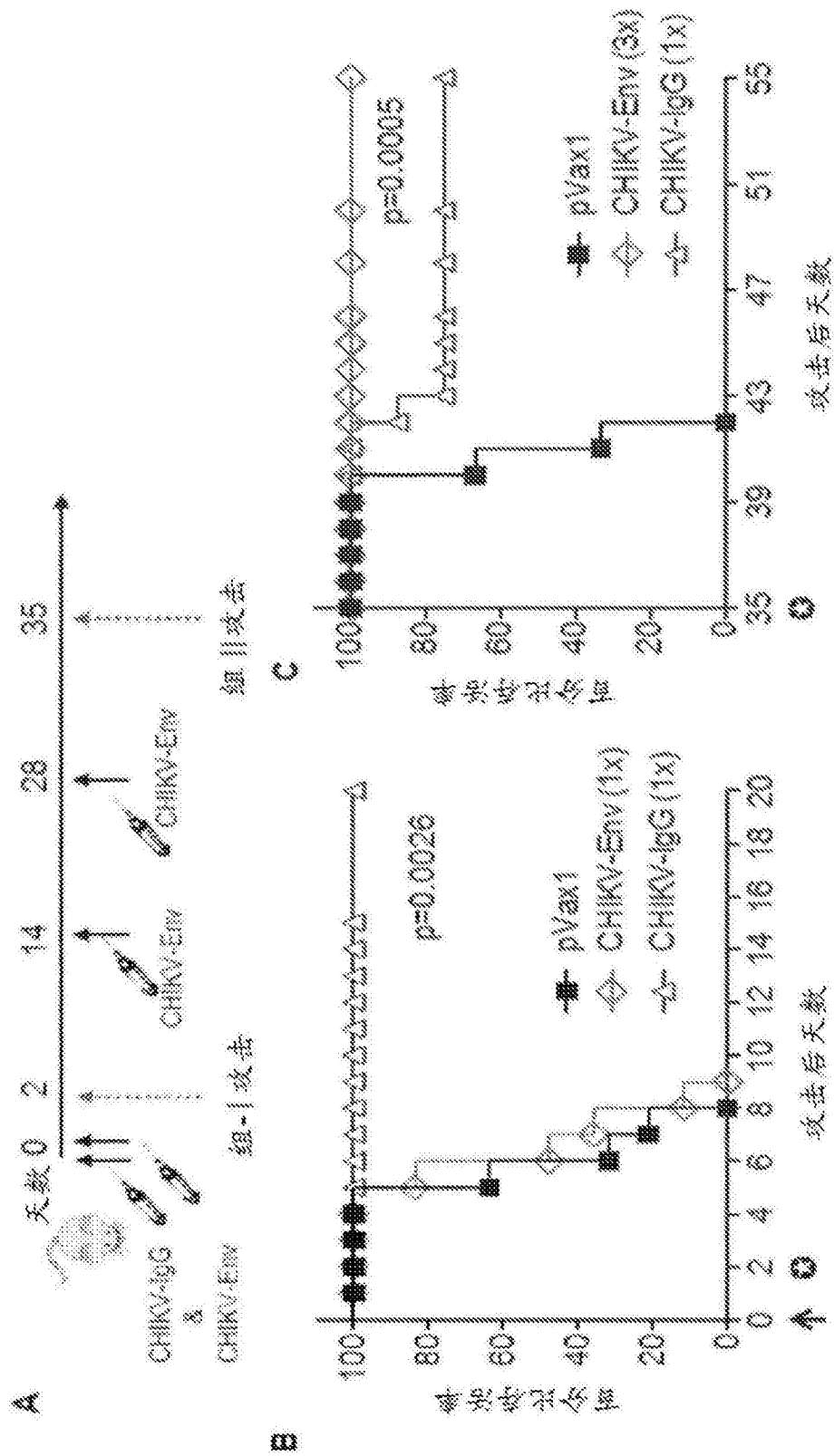


图67

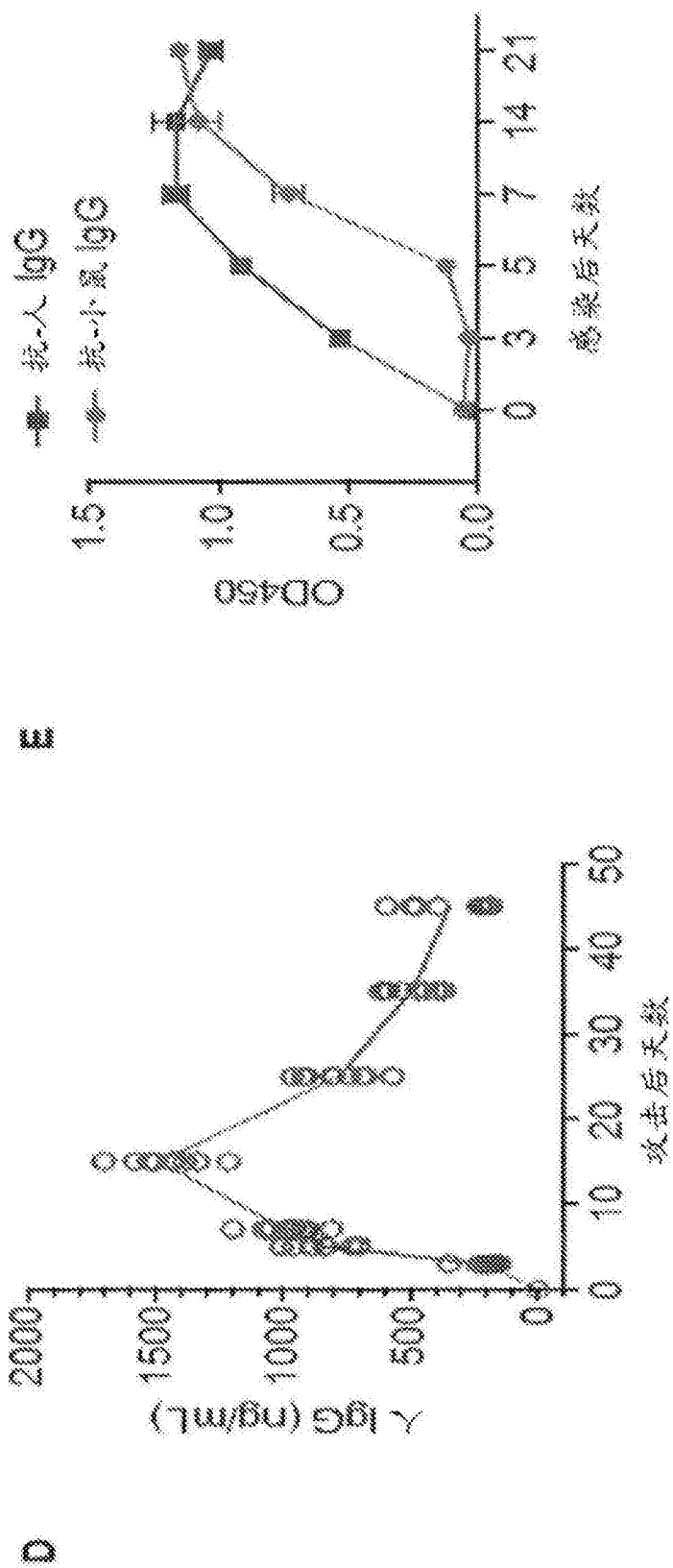


图67(续)

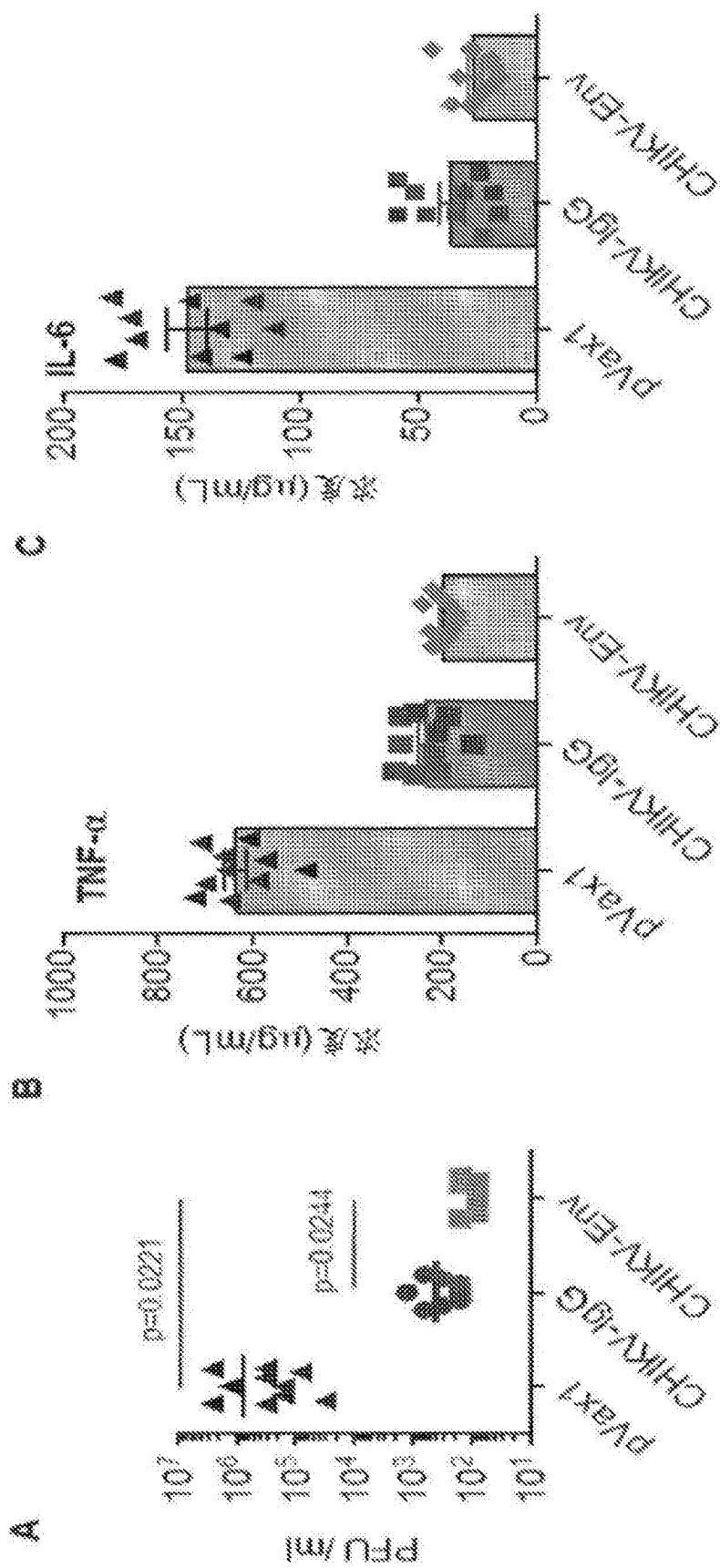


图68

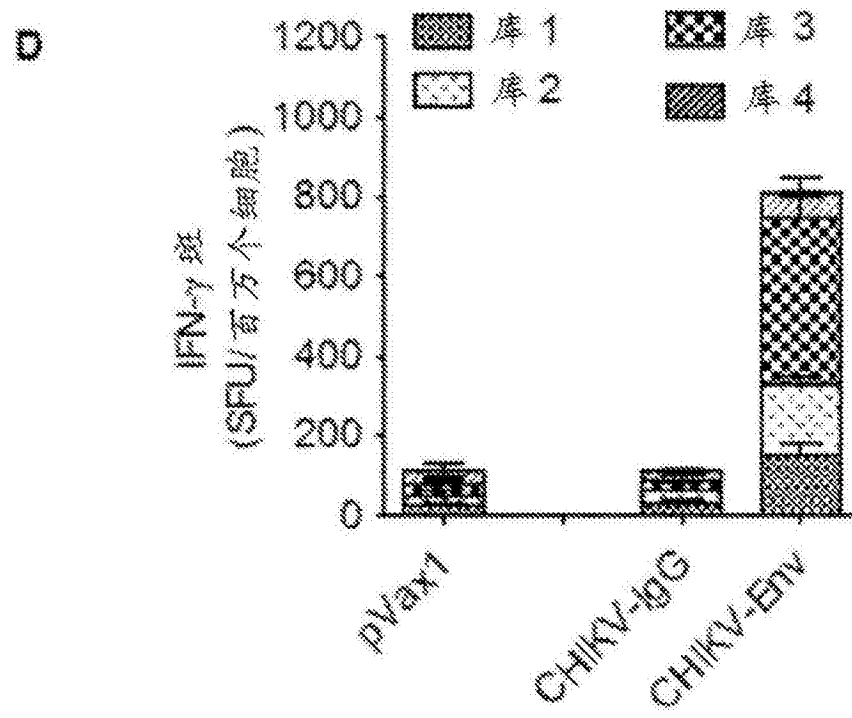


图68(续)

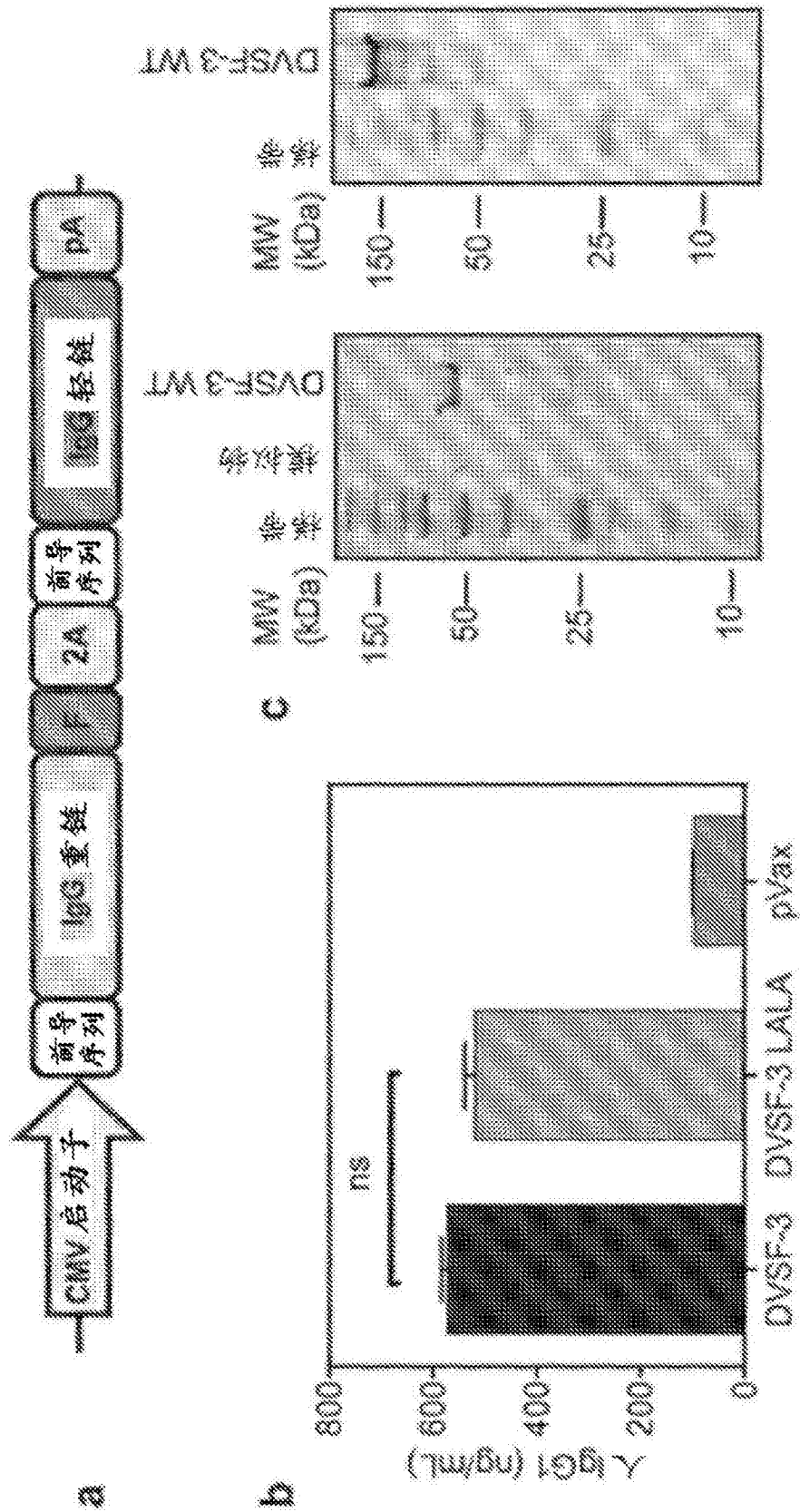


图69

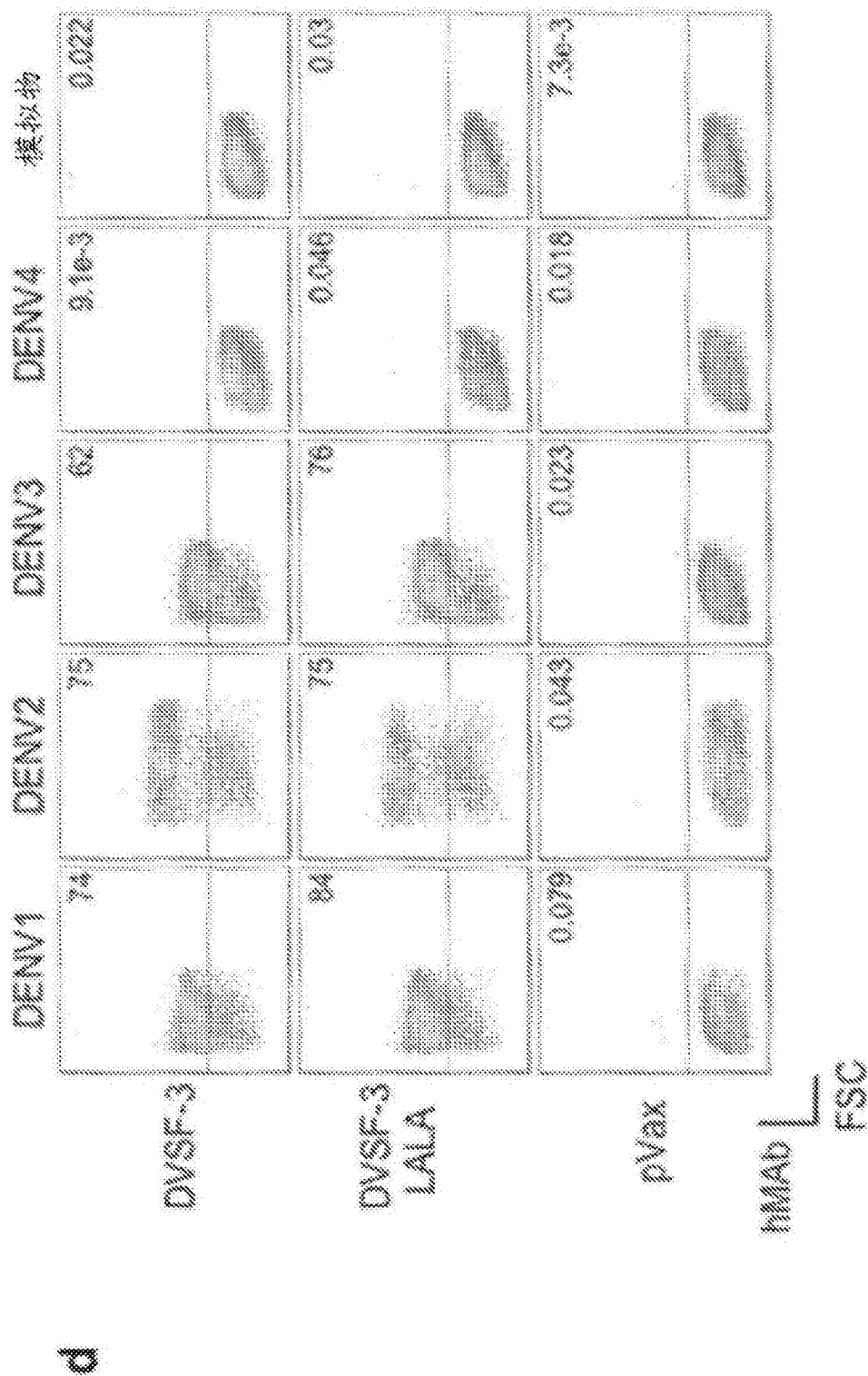


图69(续)

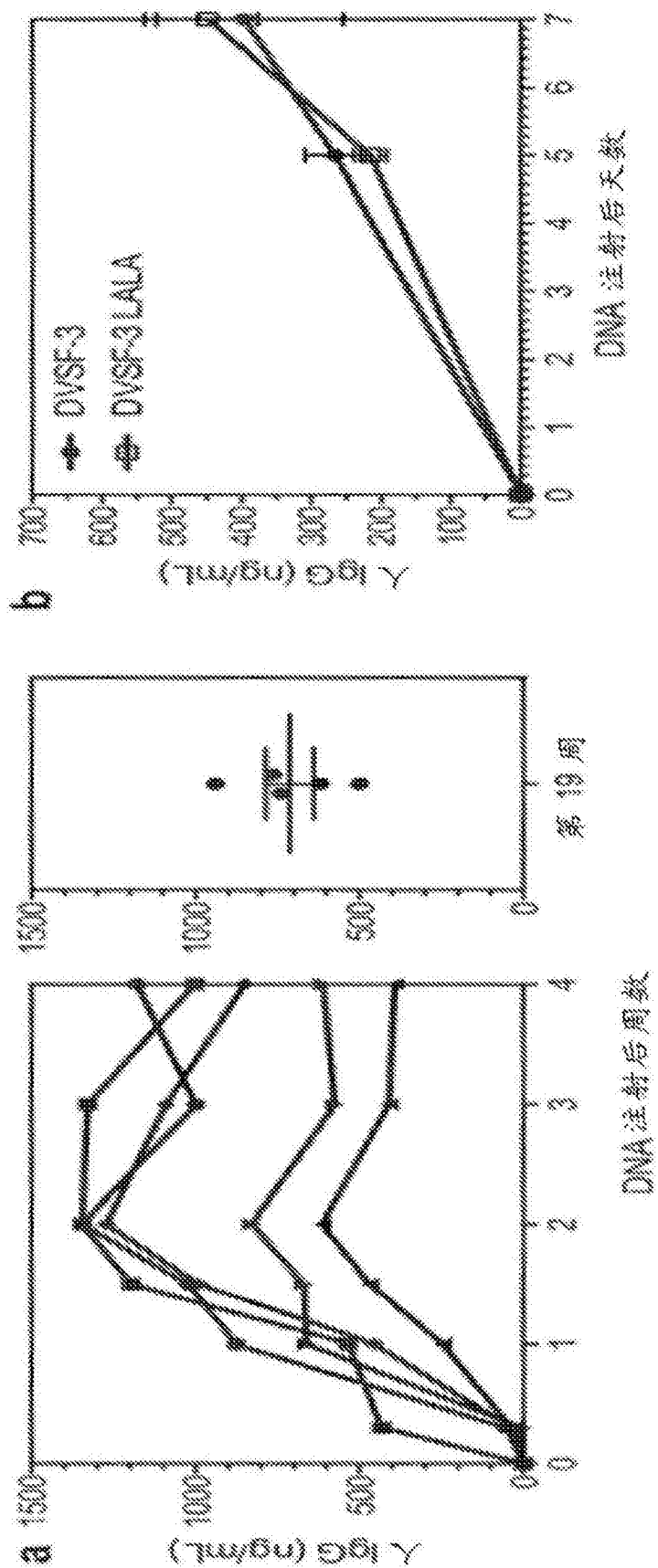


图70

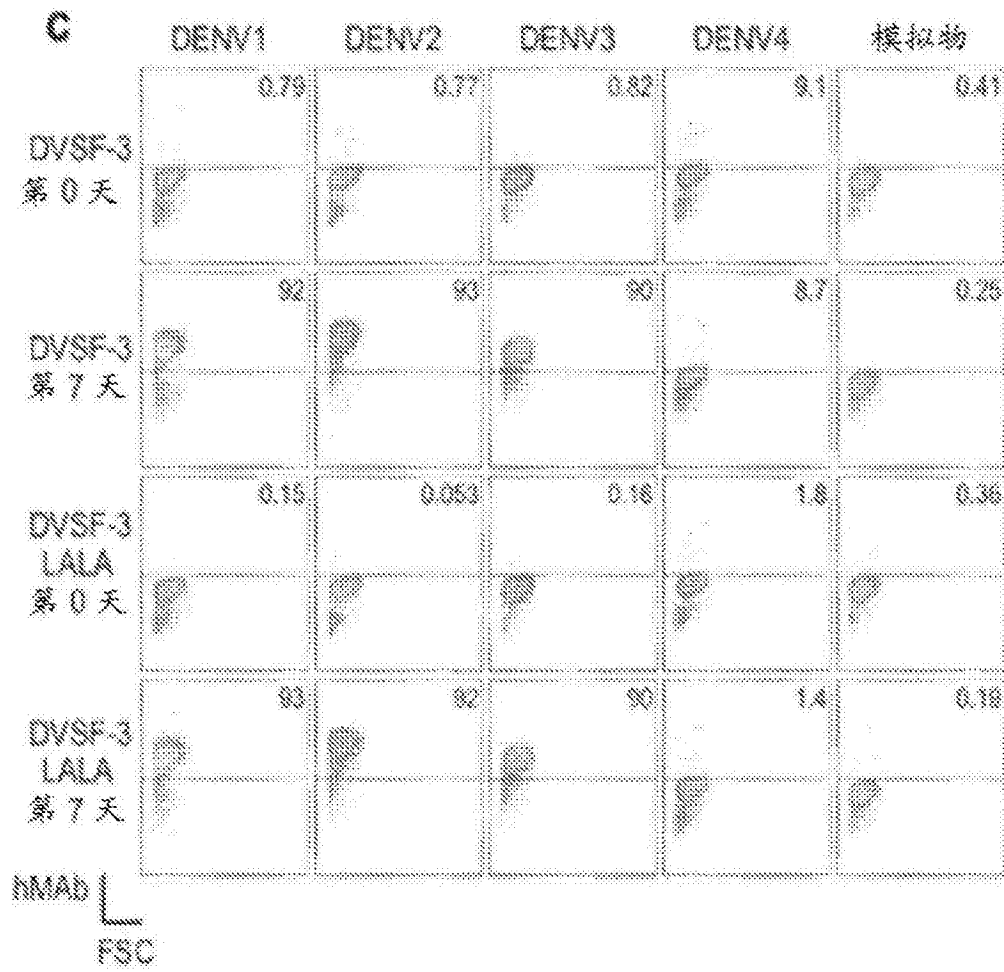


图70(续)

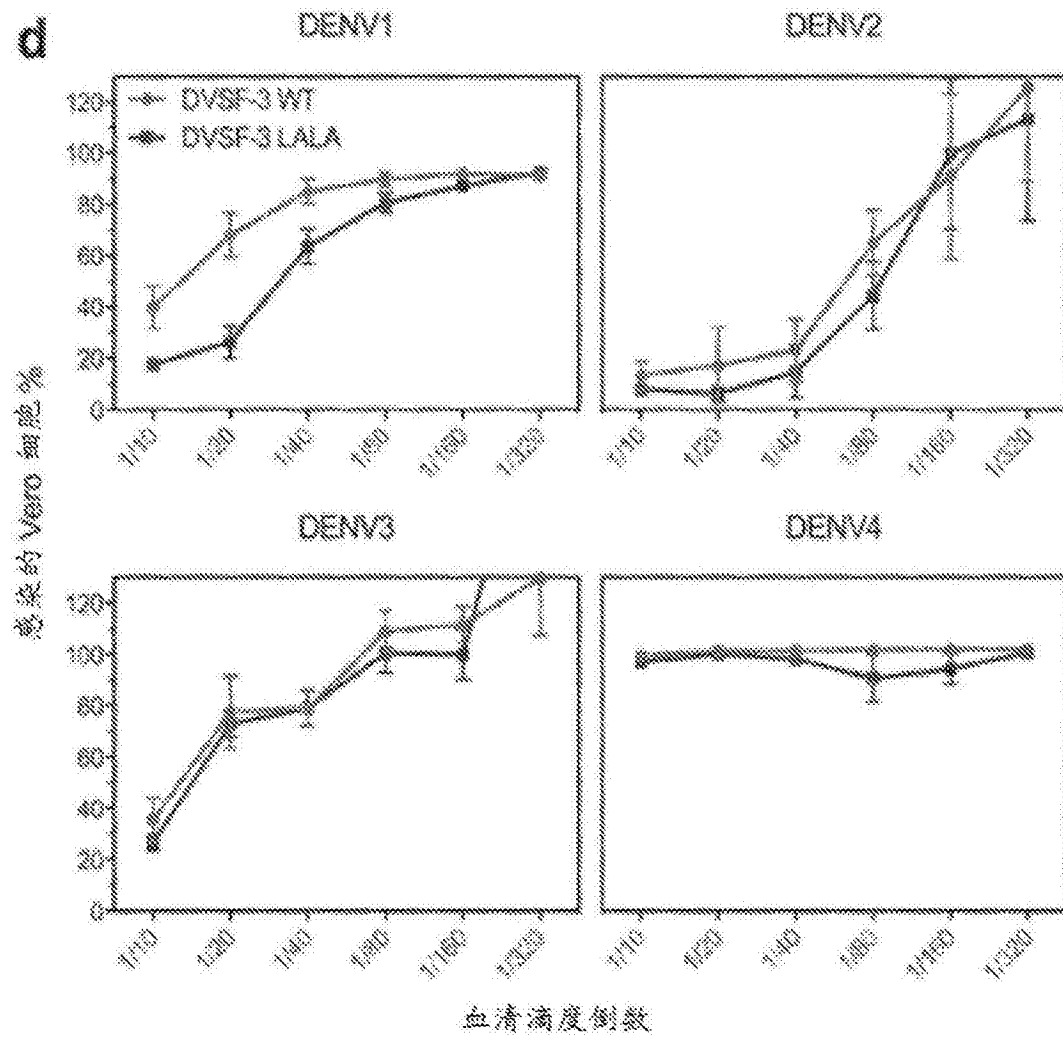


图70(续)

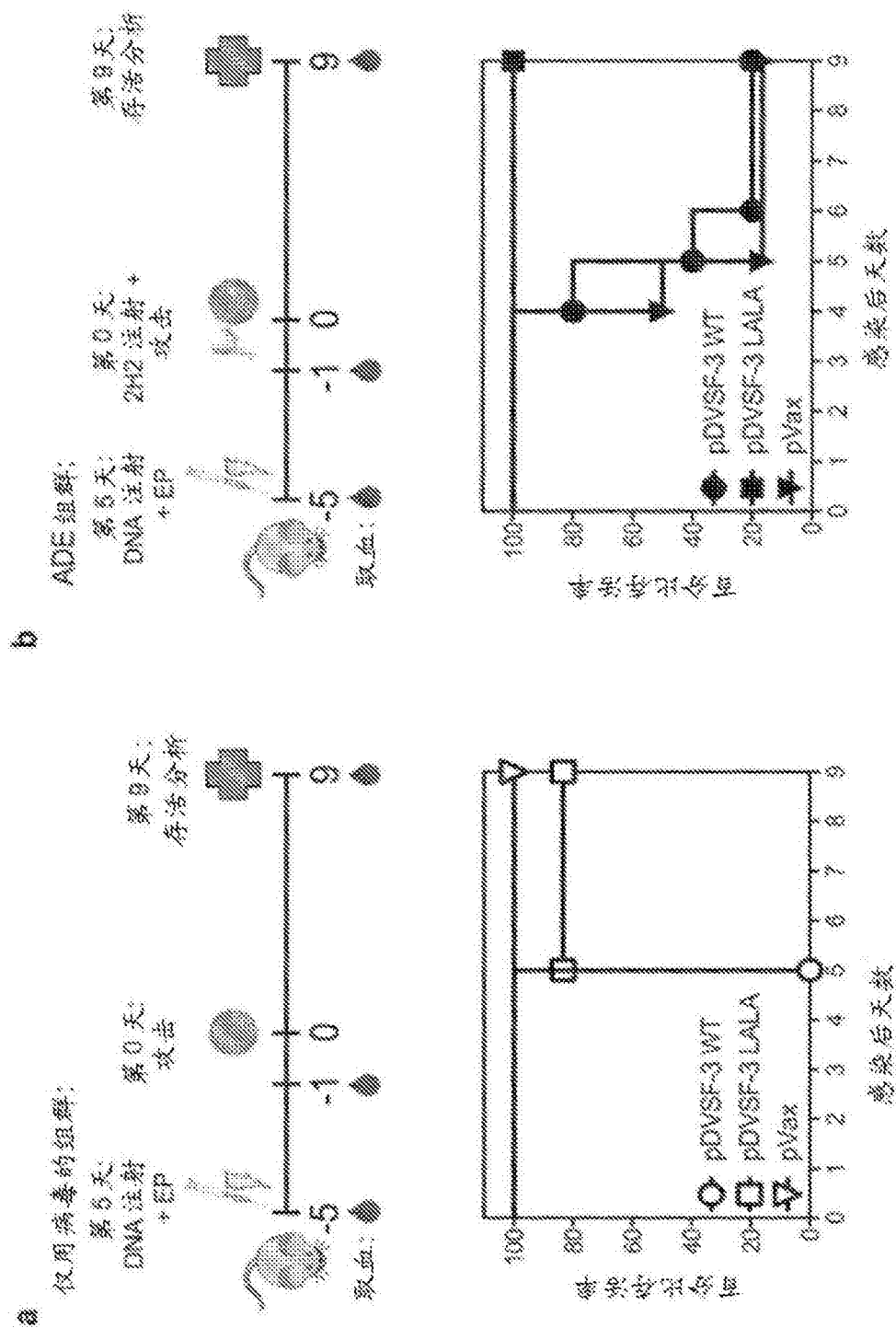


图71

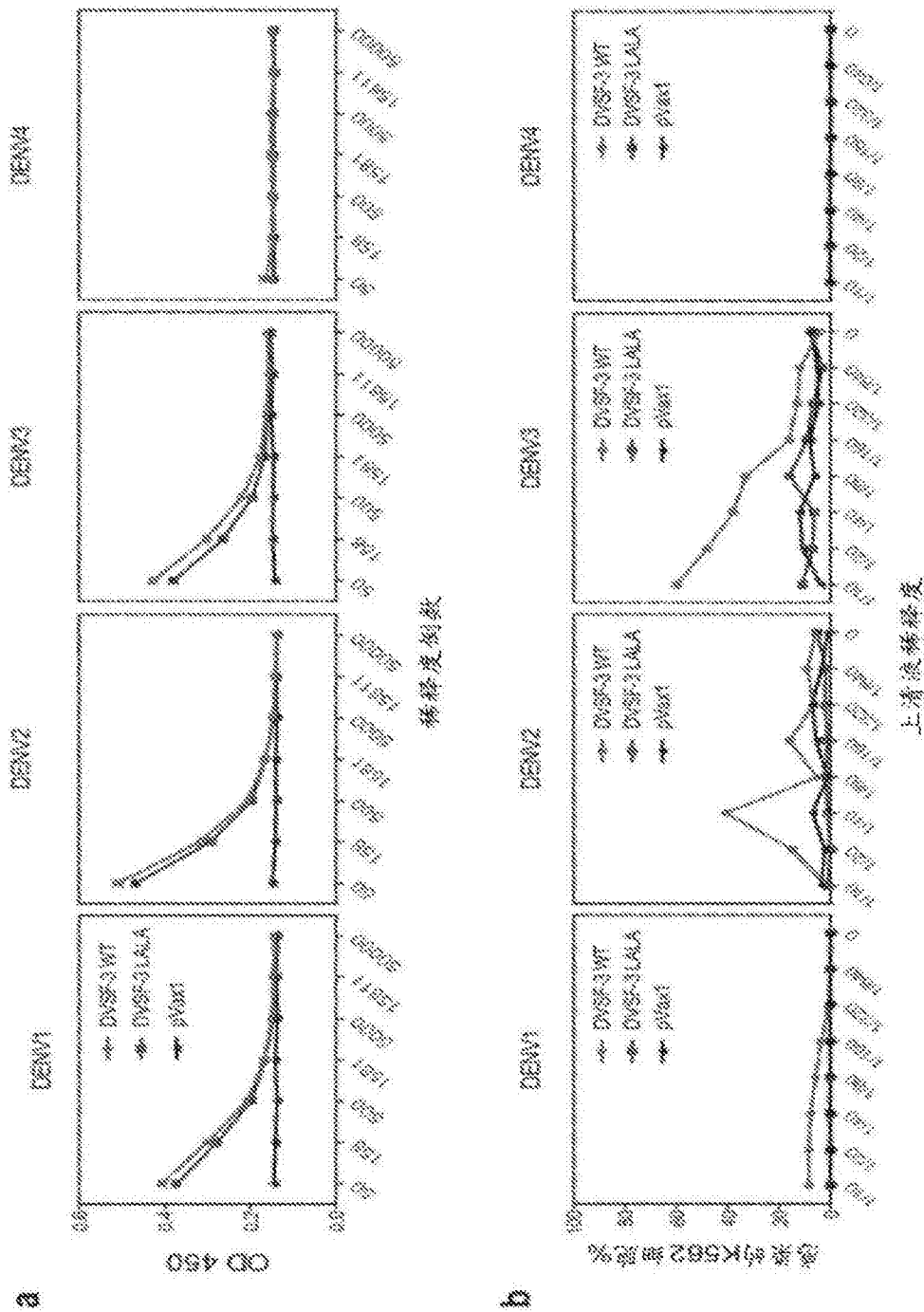


图72

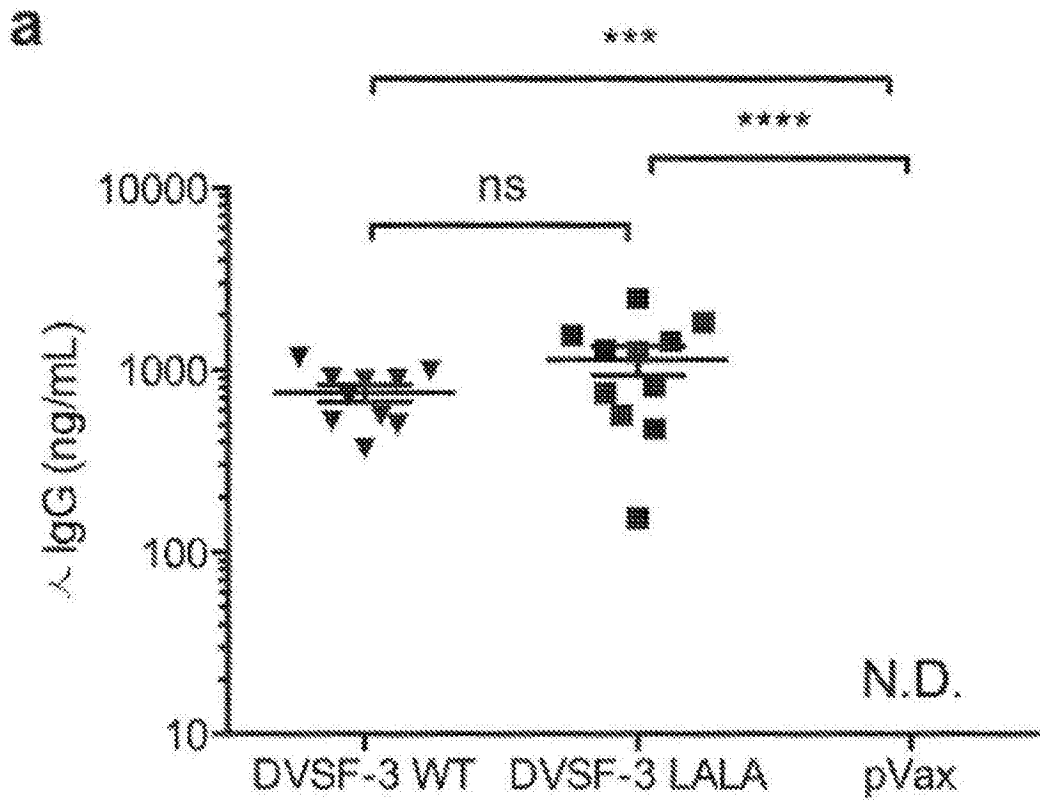


图73

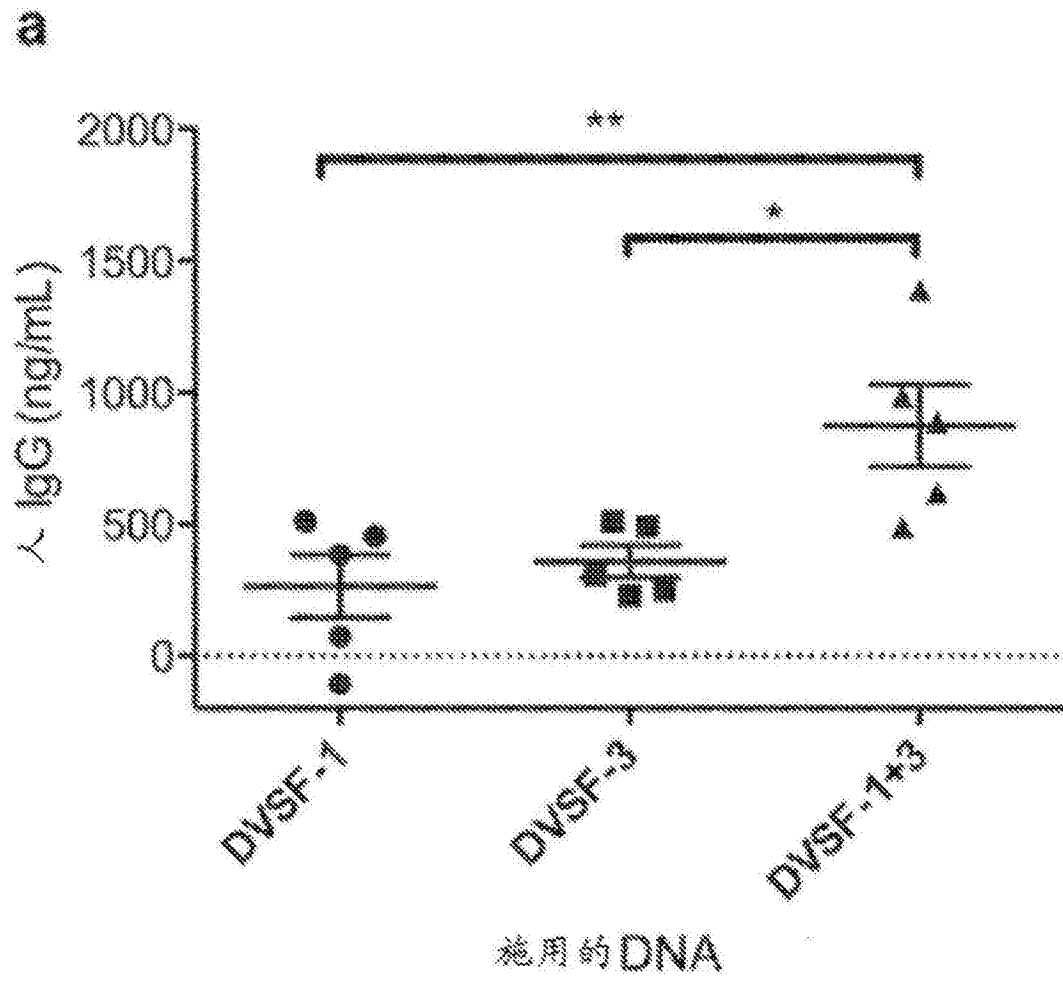


图74

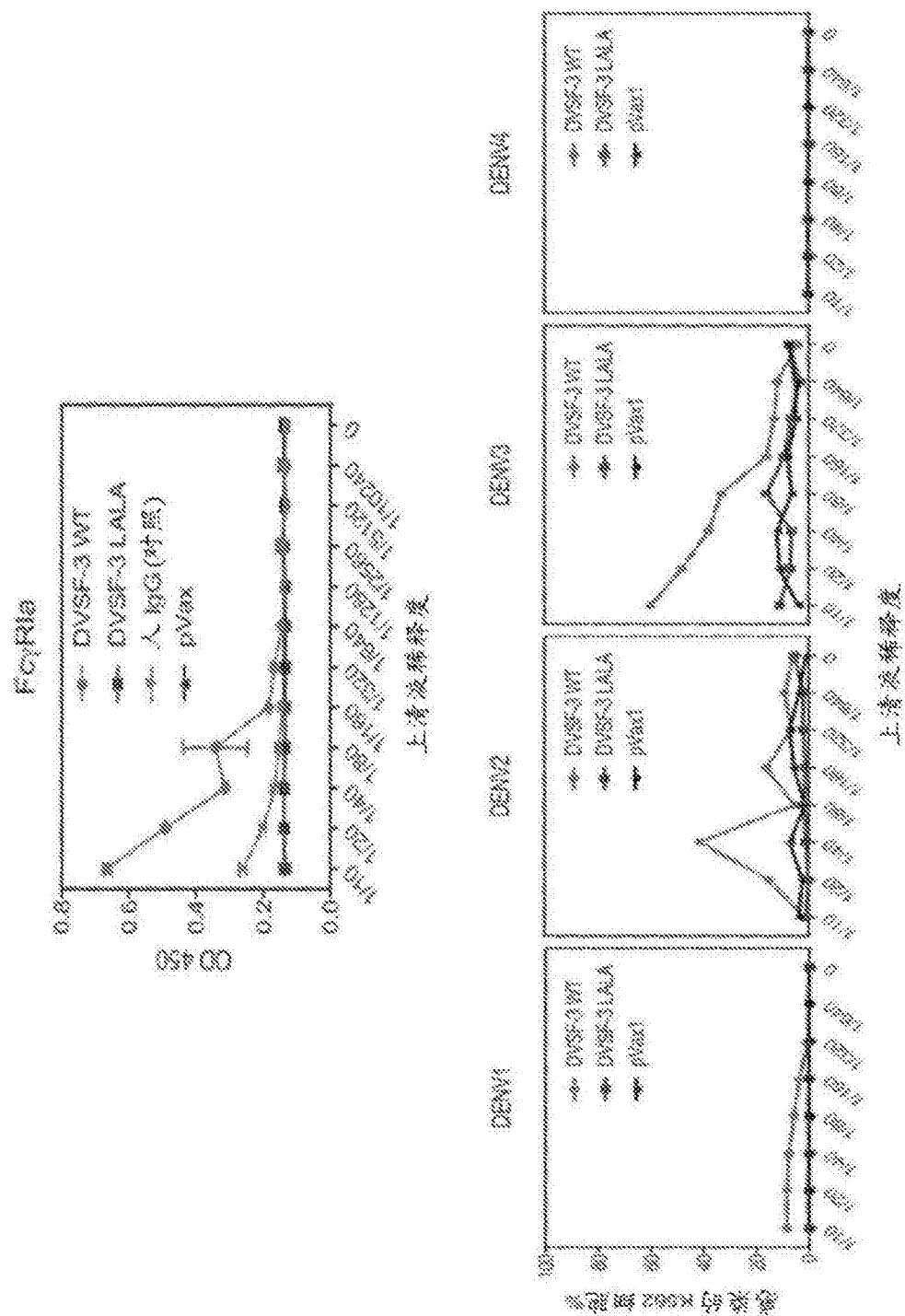


图75