



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년12월17일
(11) 등록번호 10-1001859
(24) 등록일자 2010년12월10일

- (51) Int. Cl.
C07K 14/155 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2004-7002585
(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년08월21일
심사청구일자 2007년08월09일
- (85) 번역문제출일자 2004년02월21일
(65) 공개번호 10-2004-0049841
(43) 공개일자 2004년06월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/026543
(87) 국제공개번호 WO 2003/016333
국제공개일자 2003년02월27일
- (30) 우선권주장
09/934,060 2001년08월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02001027294 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
유니버시티 오브 매릴랜드, 발티모어
미국 메릴랜드 21201 볼티모어 4 플로어 620 웨스트
렉싱턴 스트리트
- (72) 발명자
데비코, 안토니, 엘.
미국버지니아22304알렉산드리아피콕애비뉴4533
포우츠, 티모시, 알.
미국메릴랜드21405콜롬비아스완포인트웨이7523
투스칸, 로버트, 지.
미국메릴랜드21211
볼티모어롤랜드하이츠애비뉴1104
- (74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 16 항

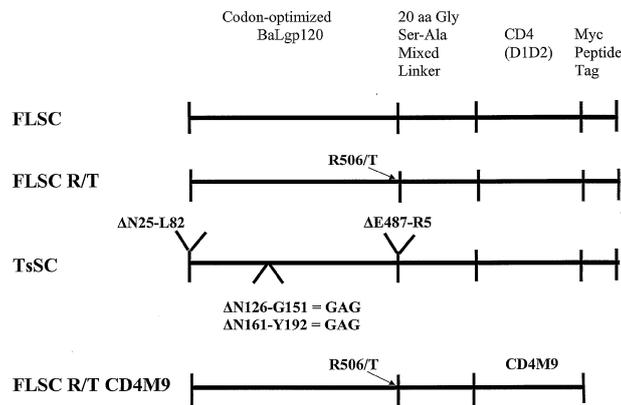
심사관 : 김지윤

(54) 바이러스 코트 단백질/수용체 키메라 및 이용방법

(57) 요약

본 발명은 상호반응에 의하여 복합체를 형성하고, 공동수용체와 결합하는 능력을 가진 바이러스 코트 서열과 수용체 서열로 구성된 키메라 분자에 관한 것이다. 상기 키메라 분자는 수용체-코트 단백질 복합체의 기능적 성질을 나타내며, 세포에 존재하는 공동 수용체와 결합하여 바이러스가 세포에 감염되는 것을 억제하는 물질로도 유용하다. 특히, 키메라 폴리펩티드는 HN, SN, FIV, FeL, V, FPV 및 헤르페스 바이러스의 외피 폴리펩타이드와 같은 면역결핍 바이러스의 외피 폴리펩티드를 포함한다. 키메라 폴리펩티드가 포함하는 수용체 서열로 사용하기 적당한 것을 예를 들면 CD4D1D2 및 CD4M9 서열이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

HIV 바이러스 코트 폴리펩티드(virus coat polypeptide) 서열; 및

바이러스 수용체 폴리펩티드 서열(viral receptor polypeptide)을 포함하되,

상기 바이러스 코트 폴리펩티드는 gp120의 C 말단 상에 돌연변이 된 푸린 절단 부위(furin cleavage site)를 포함하는 gp120이고, 상기 수용체 폴리펩티드는 CD4 의사체(mimetic)이고, 상기 CD4 의사체는 서열번호 20의 서열을 갖는 것을 특징으로 하며, 상기 바이러스 코트 폴리펩티드 서열 및 수용체 폴리펩티드 서열은 상기 코트 폴리펩티드 서열과 상기 바이러스 수용체 폴리펩티드 서열의 상호결합을 허용하기에 충분한 길이의 아미노산 스페이스(spacer)에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 키메라 폴리펩티드(chimeric polypeptide).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키메라 폴리펩티드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 키메라 폴리펩티드.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 이종의 도메인(heterologous domain)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키메라 폴리펩티드.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 이종의 도메인은 IgG1인 것을 특징으로 하는 키메라 폴리펩티드.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 이종의 도메인은 태그(tag), 어드헤신(adhesin) 및 면역강화제(immunopotentiating agent)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 키메라 폴리펩티드.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 이중의 도메인은 서열번호 32인 것을 특징으로 하는 키메릭 폴리펩티드.

청구항 15

제1, 2, 11, 12, 13 및 14항 중 어느 한 항에 기재된 키메릭 폴리펩티드와 제약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 HIV치료용 약학적 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항의 키메릭 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열번호 5인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 바이러스 코트 폴리펩티드에 대한 핵산 서열은 서열번호 29인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 수용체 폴리펩티드에 대한 핵산 서열은 서열번호 19인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 21

제18항의 서열을 포함하는 발현벡터를 함유하는 숙주세포.

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항의 키메릭 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 그 기능성 단편.

청구항 24

제2항의 키메릭 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 그 기능성 단편.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

제1, 2, 11, 12, 13 및 14항 중 어느 한 항에 기재된 키메릭 폴리펩티드를 유효성분으로 함유하는 HIV치료용 약학적 조성물.

청구항 35

제1, 2, 11, 12, 13 및 14항 중 어느 한 항에 기재된 키메릭 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 HIV치료용 약학적 조성물.

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 수용체와 리간드간의 상호작용에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상호간의 결합이 가능하며, 구조적으로 유사할 뿐 아니라, 생체내에서 바이러스 단백질과 수용체가 상호작용을 할 때 일어나는 기능적·면역적 특성이 비슷한, 바이러스의 외피 폴리펩티드와 세포의 수용체 펩티드의 서열을 가지고 있는 키메릭 폴리펩티드에 관한 것이다.

배경기술

[0002] HIV-1(HIV-1)의 1차 감염 후 나타나는 체액성 면역은 에이즈(AIDS)로의 진행을 방해하지는 않는다 (Koup, R. A. et al., *Nature*, 370:416 (1994); Koup, R. A. et al., *J. Virol.* 68:4650-5 (1994)). 그러나, 한 개인이 높은 적정 농도의 중화 항체를 가지고 있다면 체액성 면역은 감염을 막을 수 있다. 이 개념은 침팬지에 V3 모노클로날 항체를 중화시키는 항체를 수혈하거나, challenge에 높은 적정 농도의 중화 항혈청을 주입한 수동면역화

연구의 의해 뒷받침된다 (Emini, E. A. *et al.*, *Nature*: 355:728-30 (1992); Shibata, R. *et al.*, *Nat. Med.*, 5:204-10 (1999)). challenge의 시기나 그 직후에 적정한 항체가 충분한 적정농도로 존재할 경우 체액성 면역는 방어를 할 수 있다.

[0003] 또 다른 연구에서도 체액성 면역이 HIV-1에 대한 방어를 할 수 있다는 것을 보여준다. 예를 들면, SCID-hu 마우스 시스템을 이용한 수동 면역화는 gp120의 CD4 결합 부위에 특이적으로 결합하는 인간의 모노클로날 항체가 감염을 막을 있다는 것을 보여준다 (Gauduin, M. C. *et al.*, *Nat. Med.*, 3:1389-93 (1997); Parren, P. W. *et al.*, *AIDS*, 9:F1-6 (1995)). 더욱이 CD4와 인간 IgG2 중사슬의 키메라인 이가의 CD4-Ig "immunoadhesin"의 수동 전달은 HIV-1를 칩팬지에 주입한 체제에서 방어를 할 수 있다 (Eichberg, J. W. *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8: 1515-19 (1992); Ward, R.H. *et al.*, *Nature*, 352:434-6 (1991)). 그리고, 중화 항체는 SIV(simian immunodeficiency virus)에 대한 방어 면역과 관계가 크다 (Heeney, J.L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 10803-8 (1998)). 더욱이, 붉은털 원숭이(rhesus macaues)에서의 수동 전달 연구는, 충분한 농도의 항체가 사용되었을 경우 높은 적정 농도의 HIV-1_{DH12}에 대한 칩팬지 항체는 붉은털 원숭이에서 SHIV_{DH12}에 대한 면역력을 없앤다는 것을 보여주고 있다 (Shibata, R. *et al.*, *Nat. Med.*, 5:204-10 (1999)). 또한, HIVIg, 2G12, 및 2F5를 이용한 붉은털 원숭이에서 수동 전달 실험은 SHIV-89.6P로 감염시켰을 감수성이 없는 그룹에 비해 감수성이 있는 그룹이 50% 높은 방어력을 가진다는 것을 증명하였다 (Mascola *et al.*, *J. Virol.*, 73:4009-18 (1999)). 게다가, 이러한 연구들은 광범위하면서 지속적이며 고농도 (혹은, 고효율)의 중화 항체 반응을 유도하는 면역 방법이 방어할 법 있을 것이라는 생각을 뒷받침해주고 있다. 이러한 목적에 도달한 성공적인 방법은 정의하기 어렵다. 검증된 재조합 단량체 혹은 다량체의 HIV의 서브유닛 공식은 한정된 분리물에 대한 중화 반응을 유도한다 (Moore, J.P. *et al.*, *AIDS*, 9:S117-136 (1995); Sattentau, Q. J. *Curr. Opin. Immunol.*, 8:540-5 (1996); Wyatt, R. *et al.*, *Science*, 280:1884-8 (1998)).

발명의 상세한 설명

[0004] 본 발명은 코트 폴리펩티드 서열 및 수용체 폴리펩티드 서열이 스페이서에 의해 연결된 것을 특징으로 하는 바이러스 코트 폴리펩티드 서열 및 바이러스 수용체 폴리펩티드 서열을 함유하는 키메라 폴리펩티드에 관한 것이다. 코트 폴리펩티드와 키메라 폴리펩티드의 바이러스 수용체 폴리펩티드 서열은 서로 결합할 수 있다. 본 발명의 키메라 폴리펩티드는 면역 반응을 유도하고 항체를 생산하는데 유용하다. 나아가, 키메라 폴리펩티드는 바이러스 감염에 대한 수동적 보호(passive protection) 또는 특정 대상에게 투여함으로써 면역 반응(즉, 항체 또는 CTL 반응)을 생산하여 바이러스 감염을 방해, 저해 또는 개선하는데 유용하다.

[0005] 다양한 실시예에서, 키메라 폴리펩티드의 바이러스 코트 폴리펩티드 서열은 외피 폴리펩티드 서열(예를 들어, 전장(full-length) gp 120 또는 단편), 바이러스는 공동 수용체(Co-Receptor) 폴리펩티드와 결합하는 바이러스, HIV(예를 들어, HIV-1 또는 HIV-2), SIV, FIV, FeLV, FPV, 및 헤르페스 바이러스(herpes virus)를 포함하는 면역결핍 바이러스이다. 다양한 부가적인 실시예에서, 바이러스 수용체 폴리펩티드 서열은 CD4 폴리펩티드 서열, 전장(full-length) 또는 D1, D2 도메인 및 그 돌연변이와 같은 그 단편이다. 택일적인 공동 수용체를 이용하는 바이러스로부터 유래된 외피 유전자의 도입은 다른 공동 수용체들을 발현하는 다른 세포형의 바이러스 감염으로부터 보호하는 단일 사슬 분자로서의 잠재적인 후보로 보다 확대될 수 있다.

[0006] 이종의 도메인(heterologous domain)을 가지는 키메라 폴리펩티드 또한 제공된다. 상기 이종의 도메인은 독특한 기능을 부여하고 태그(tags), 어드헤신(adhesins) 및 면역강화제(immunopotentiating agents)를 포함한다. 예를들어, 이종의 도메인은 c-myc 폴리펩티드 서열과 같은 아미노산 서열 또는 이뮤노글로불린 폴리펩티드 서열(예를 들어, 중사슬(heavy chain) 폴리펩티드 서열)을 가진다.

[0007] 본 발명에 따르면, 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다. 폴리뉴클레오티드는 발현벡터에 포함될 수 있고 키메라 폴리펩티드 발현에 유용하다.

[0008] 본 발명에 따르면, 본 발명의 키메라 폴리펩티드에 결합하는 항체와 그 기능성 단편이 제공된다. 항체는 치료 방법 및 진단 방법에 유용하다. 상기 항체는 생체 내에서 또는 생체 밖에서 면역결핍 바이러스를 중화시킬 수 있고 면역결핍 바이러스 감염을 저해하는데 예를 들면 수동적 보호(passive protection)에 의해 유용하게 이용될 수 있다. 상기 항체들은 바이러스 코트 폴리펩티드 서열과 바이러스 수용체 폴리펩티드 서열의 결합에 의해

생산된 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어 상기 에피토프는 외피(envelope) 폴리펩티드 서열 위에 존재할 수 있다.

- [0009] 본 발명의 키메라 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 항체는 바이러스 감염을 치료하거나 면역 반응을 유도하는데 유용하다. 따라서, 본 발명에 따르면 키메라 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 항체가 제약학적으로 허용가능한 담체로 제공된다.
- [0010] 항체를 생산하는 방법은 키메라 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하기 위하여 본 발명의 키메라 폴리펩티드를 유효량 특정 대상에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 또한 예를 들면, 항체가 수령 대상(recipient subject)에 투여되었을 때, 특정대상에서 바이러스 감염을 저해하거나 개선하는데 유용하거나 수동적 보호에 유용할 수 있다.
- [0011] 특정 대상에서 바이러스 감염을 저해하는 방법은 세포의 바이러스 감염을 저해하기 위하여 본 발명에 따른 키메라 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효량 투여하는 단계를 포함한다. 투여된 키메라 폴리펩티드는 특정대상의 세포 표면의 바이러스 공동 수용체에 결합함에 의해 바이러스 감염을 방해하거나 보호 면역 반응(protective immune response)을 유도할 수 있다. 키메라 폴리펩티드는 특정 대상에서 바이러스 감염을 개선하기에 충분한 양이 투여될 수 있다.
- [0012] 면역 반응을 유도하는 방법은 항체 반응 또는 CTL 반응을 유도할 수 있다. 생산된 항체는 생체 밖에서 면역결핍 바이러스를 중화할 수 있다. 항체는 또한 키메라 폴리펩티드의 두 폴리펩티드 서열의 결합에 의해 노출되어 있는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0013] 바이러스와 바이러스 공동 수용체 사이의 결합 또는 상호작용, 및 바이러스와 바이러스 수용체의 결합 또는 상호작용을 조절하는 물질을 동정하는 방법이 제공된다. 일 실시예에서, 한 방법은 수용체에 결합하는 바이러스의 코트 단백질질을 가지는 키메라 폴리펩티드를 공동 수용체 폴리펩티드(예를 들면, CCR5 또는 CXCR4 폴리펩티드 서열)와 키메라 폴리펩티드와 공동 수용체 폴리펩티드가 결합하는 것을 가능하게 하는 조건 하에서, 접촉시키는 단계 및 테스트 물질의 존재 및 부존재 하에서의 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 테스트 물질의 존재하에서 감소된 결합은 바이러스와 바이러스 공동 수용체 폴리펩티드 사이의 결합을 저해하는 물질을 동정할 수 있게 한다.
- [0014] 다른 일 실시예에서, 한 방법은 키메라 폴리펩티드 내에서 분자내 (intramolecular) 결합을 가능하게 하는 조건 하에서, 키메라 폴리펩티드를 테스트 물질의 존재 및 부존재하에서 접촉시키는 단계 및 분자내 결합 또는 키메라 폴리펩티드 내의 상호작용을 검출하는 단계를 포함한다. 테스트 물질의 존재하에서 감소된 결합은 키메라(chimera)에서 바이러스와 바이러스 수용체 폴리펩티드 사이의 분자내 결합 또는 상호작용을 저해하는 물질을 동정할 수 있게 한다. 상기 물질은 키메라 폴리펩티드가 바이러스 공동 수용체 폴리펩티드와 접촉하기 전이나 후에 첨가될 수 있다. 바이러스 공동 수용체 또는 수용체 폴리펩티드는 손상되지 않은 세포의 표면에 존재할 수 있는데, 손상되지 않은 세포는 인간이 아닌 영장류와 같은 동물에 존재할 수 있다. 상기 방법은 HIV, SIV 등과 같은 면역결핍 바이러스를 이용하여 수행될 수 있다. 테스트 물질은 펩티드, 유기 분자, 항체와 그 단편, 항바이러스제, 바이러스 공동 수용체, 기능성 단편, 및 그 펩티드 미메틱스(peptide mimetics)과 같은 물질의 라이브러리를 포함한다.
- [0015] 세포의 바이러스 감염을 조절(저해 또는 자극)하는 키메라 폴리펩티드 서열을 동정하는 방법이 제공된다. 일 실시예에서, 한 방법은 바이러스에 감염되기 쉬운 세포를 본 발명의 키메라 폴리펩티드 서열의 존재 및 부존재하에서, 감염성 바이러스 입자에 접촉시키는 단계 및 키메라 폴리펩티드가 세포의 바이러스 감염(세포 내 또는 세포 밖)을 조절(저해 또는 자극)하는가를 결정하는 단계를 포함한다.

실시예

- [0037] 본 발명은 HIV 외피(envelope) 폴리펩티드 및 CD4 수용체를 포함하는 키메라 폴리펩티드가 공동 수용체에 결합할 수 있는 상호작용하는 복합체를 형성한다는 사실의 발견에 기초를 둔다. 본 발명의 키메라 폴리펩티드에서, CD4에 결합하는 HIV gp120은 HIV가 세포에 존재하는 CD4에 결합할 때 일어나는 외피 단백질-CD4 전이 상태(transition state)를 모방(mimic)한다; gp120은 공동 수용체, CCR5와 직접 상호작용하는 복합체의 형성에 노출된 보존되어 있는(conserved) 에피토프를 나타낸다. 외피-CD4 전이 상태의 형성 및 이후의 세포 공동 수용체와의 결합은 세포의 HIV 감염에 있어 중요한 단계이다. 따라서, 항체 또는 gp120-CD4의 공동 수용체와의 결합을

방해하거나 저해하는 다른 물질은 예를 들어, gp120-CD4 복합체 형성에 노출된 에피토프와 결합함에 의해 공동 수용체와의 바이러스 상호작용을 저해하여 HIV 감염으로부터의 보호를 매개할 수 있었다.

[0038] 그에 따라서, 키메라릭 폴리펩티드 또는 본 발명의 키메라릭 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 바이러스 감염의 치료, 저해, 방해 또는 개선에 치료상 로(therapeutically) 예를 들어, 바이러스 코트 단백질의 수용체 폴리펩티드와의 결합에 의해 형성되는 전이 상태 복합체에 대한 면역반응을 유도함에 의해 이용될 수 있다. 또한 이하에서 "단일 사슬(single chain)" 분자로 나타낸, 상기 키메라릭 폴리펩티드는 키메라릭 서열 내에서 코트 폴리펩티드 서열과 폴리펩티드 수용체 서열의 결합 또는 키메라의 공동 수용체 폴리펩티드 서열과의 결합을 저해, 방해 또는 파괴하는 물질을 스크린하여 대응하는 바이러스 감염을 치료하기 위한 잠재적인 치료법(therapeutics)을 동정하기 위해 이용될 수 있다. 예를들어, 면역결핍 바이러스 외피 폴리펩티드 CD4 복합체의 CCR5과의 결합을 저해, 방해 또는 파괴하는 물질이 HIV를 가지거나 HIV을 가질 위험에 있는 특정대상을 치료하는 치료 물질(therapeutic agent)로 이용될 수 있다.

[0039] 키메라릭 폴리펩티드는 상호작용하는 코트 단백질-수용체 복합체에 특이적인 항체를 생산하는데 또한 유용하다. 상기 특이적인 항체는 바이러스 감염 또는 증식에 대한 수동적 보호, 진단 목적 및 복합체 형성에 노출된 에피토프(예를 들어, 숨은 에피토프(cryptic epitope))의 동정과 특성화(characterizing)를 위해 이용될 수 있다. 바이러스 코트 단백질 및 수용체 사이의 분자내 결합의 부존재 하에서, 키메라릭 폴리펩티드는 바이러스 코트 폴리펩티드 서열 단독에 비해 면역 반응의 유도(elicit)에 보다 효과적일 수 있다. 따라서, 상기 비상호작용(non-interacting) 키메라릭 폴리펩티드는 역시 중요하고 이하에 포함된다.

[0040] 수용체와 공동 수용체를 결합시키는 바이러스 코트 폴리펩티드를 함유하는 키메라릭 폴리펩티드는 세포 내에서 세포 공동 수용체에 바이러스가 접근하는 것을 저해함으로써 바이러스 감염에 대하여 수동적으로 보호하는 부가적인 이점을 가진다. 게다가, 상기 키메라릭 폴리펩티드는 키메라릭 폴리펩티드가 공동 수용체와의 결합하는 것을 저해, 방해 또는 파괴하는 물질을 동정함으로써 치료법을 위한 스크린에 이용될 수 있다. 예를 들어, 면역결핍 바이러스 외피 폴리펩티드-CD4 복합체의 CCR5와의 결합을 저해, 방해 또는 파괴하는 물질은 HIV를 가지거나 HIV을 가질 위험에 있는 특정대상을 치료하는 치료 물질(therapeutic agent)로 이용될 수 있다. 바이러스의 어떤 세포 수용체로의 결합이 그 세포의 바이러스 감염에 요구되기 때문에, 어떤 바이러스 코트 단백질 및 그 대응하는 수용체를 포함하는 키메라릭 폴리펩티드가 본 발명의 조성물 및 발명에 포함된다.

[0041] 본 발명에 따르면, 스페이서에 의해 연결된 바이러스 코트 폴리펩티드 서열 및 바이러스 수용체 폴리펩티드 서열을 포함하는 키메라릭 폴리펩티드가 제공된다. 키메라릭 폴리펩티드의 코트 폴리펩티드 서열 및 수용체 폴리펩티드 서열은 키메라릭 폴리펩티드의 두 폴리펩티드 서열이 바람직하게 결합하거나 상호작용 하기에 충분한 길이의 아미노산을 가지는 스페이서에 의해 연결되어 있다. 일 실시예에서, 코트 폴리펩티드 서열은 면역결핍 바이러스의 외피 폴리펩티드 서열. 다른 실시예에서, 코트 폴리펩티드 서열은 공동 수용체 폴리펩티드와 결합하는 바이러스로부터 유래한다. 다양한 다른 실시예에서, 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 폴리펩티드 서열은 대응하는 전장(full-length) 그대로의 서열의 활성있는 단편이다.

[0042] 여기에서 사용된 "코트(coat)"는 세포에 결합할 수 있는 바이러스 기원의 폴리펩티드 서열을 의미한다. 일반적으로 바이러스의 외피 단백질은 바이러스 미립자의 외부 표면 가까이에 존재하여 세포막으로의 결합과 그 이후 일어나는 침투를 가능하게 한다. 그러나, 외피 폴리펩티드 서열은 수용체 폴리펩티드에 결합하거나 수용체 폴리펩티드와 상호작용할 수 있는 어떤 바이러스 단백질을 포함한다. 본 발명에서 정의된 외피 폴리펩티드 서열은 탄수화물, 지방산, 지질 및 이와 유사한 것들과 같은 다른 분자적 물질과 공유결합 또는 비공유결합으로 회합할 수 있다. 외피 폴리펩티드 서열은 복합적인 바이러스 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, gag 폴리펩티드 서열은 수용체 폴리펩티드 서열에 결합하는 구조에서 외피 폴리펩티드 서열을 유지하기 위해 키메라릭 폴리펩티드에서의 외피 폴리펩티드 서열에 포함될 수 있다.

[0043] 예를 들어, 본 발명에서 사용된 바이러스의 외피 폴리펩티드 서열은 세포 수용체에 해당하는 것이 알려져 있거나 확인된다면, 박테리아, 식물 그리고 동물 바이러스를 포함한 어느 유래의 것이나 사용될 수 있다. 특정 바이러스는 다음과 같은 바이러스를 포함한다: 레트로비리대(Retroviridae: 예를 들어, HIV와 같은 인간 면역결핍 바이러스); 피코르나비리대(Picornaviridae: 예를 들어, 폴리오 바이러스(polio viruses), 헤파티티스 A 바이러스(hepatitis A viruses), 엔테로바이러스(enteroviruses), 인간 콕사키 바이러스(human coxsackie viruses), 리노바이러스(rhinoviruses), 에코바이러스(ecoviruses)); 칼시비리대(Calciviridae: 예를 들어, 위장염(gastroenteritis)을 일으키는 계통); 토가비라대(Togaviridae: 예를 들어, 말의 뇌염 바이러스(equine encephalitis viruses), 풍진 바이러스(rubella viruses)); 플라비리대(Flaviridae: 예를 들어, 뎅기열 바이러

스(dengue viruses), 뇌염 바이러스(encephalitis viruses), 황열병 바이러스(yellow fever viruses)); 코로나 바이러스(Coronaviridae: 예를 들어, 코로나바이러스(coronaviruses)); 라브도리리대(Rhabdoviridae: 예를 들어, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis viruses), 광견병 바이러스(rabies viruses)); 필로비리대(Filoviridae: 예를 들어, 에볼라 바이러스(ebolavirus)); 파라미소비리대(Paramyxoviridae: 예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza viruses), 뎀프스 바이러스(mumps viruses), 홍역 바이러스(measles virus), 호흡기세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)); 올쏘미소비리대(Orthomyxoviridae: 예를 들어, 인플루엔자 바이러스(influenza viruses)); 번가비리대(Bungaviridae: 예를 들어, 한탄 바이러스(Hantaan viruses), 번가 바이러스(Bunga viruses), 플레보바이러스(phleboviruses), 나이로 바이러스(Nairo viruses)); 아레나 비리대(Arena viridae: 예를 들어, 출혈열 바이러스(hemorrhagic fever viruses)); 레오비리대(Reoviridae: 레오바이러스(reoviruses), 오비바이러스(orbiviruses), 로타바이러스(rotaviruses)); 버나비리대(Brinaviridae); 헤파드나비리대(Hepadnaviridae: B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)); 파르보비리대(Parvoviridae: 파르보바이러스(Parvoviruses)); 파포바비리대(Papovaviridae: 유두종 바이러스(papilloma viruses), 폴리오마 바이러스(polyoma viruses)); 아데노비리대(Adenoviridae: 아데노바이러스(adenoviruses)); 헤르페스비리대(Herpesviridae: 단순포진바이러스(herpes simplex virus: HSV) 2와 2, 수두대상포진 바이러스(varicella zoster virus), 사이토메가로바이러스(cytomegalovirus: CMV), 헤르페스 바이러스(herpes viruses)); 폭스비리대(Poxviridae: 마마 바이러스(variola viruses), 우두 바이러스(vaccinia viruses), 폭스 바이러스(pox viruses)); 그리고 이리도비리대(Iridoviridae: 예를 들어, 아프리카 스윈열 바이러스(African swine fever virus)); 그리고 분류되지 않은 바이러스(예를 들어, 해면뇌병증(spongiform encephalopathies)의 원인체(etiological agent), D형 간염원(B형 간염 바이러스에 결합이 있는 위성체로 추측됨.), A형- 및 B형 간염이 아닌 간염의 원인체(계층 1 = 내부로 관통하는 것, 계층 2 = 장관외로 관통하는 것(즉, C형 간염); 노르워크(Norwalk)와 그에 연관된 바이러스, 아스트로바이러스(astroviruses)); 표 1 참조)

표 1

[0044]

수용체 (결합 서브유닛)	바이러스 (family)	참고문헌
이뮤글로블린 유사 분자 (Immunoglobulin like Molecules)		
VCAM-1	EMC-D(Picorviridae)	Huber (1994)
[CAM-1] (1차 도메인)	주 그룹 HRVs, CAV 13, 18 and 21(Picorviridae)	Colonno et al. (1986) Greve et al. (1989) Staunton et al (1989) Tomassini et al. (1989)
PVR (1차 도메인)	Polioviruses (Picorviridae) (1989)	Koike et al. (1984) Mendelsohn et al. (1989)
CD4 (1차 도메인)	HIV-1, 2; SIV (Lentiviridae) Human Herpesvirus 7	Daigleish et al. (1984) Klatzmam et al. (1984) Lusso et al. (1994)
CEA, 수개 (1차 도메인)	Mouse hepatitis virus (Coronaviridae)	Williams et al. (1978)
MHC 1	Semliki Forest virus (Togaviridae) Factate dehydrogenase virus Mouse cytomwgatovirus (Herpesviridae) SV-40	Hetenius et al. (1978) Otdstone et al. (1980) Inada and Mims (1984) Wykes et al. (1993) Breau et al. (1992)
MHC II	Visna virus (Lentiviridae)	Dalziel et al. (1991)
인테그린 (Integrins)		
VLA-2 (α-chain)	ECHO virus 1, 8 (Picorviridae)	Bergelson et al. (1992, 1993)
(RGD-결합 단백질)	FMDV (Picorviridae)	Fox et al. (1989) Mason et al. (1994)

α v β 3 (vibronectin)	CAV 9, ECHO virus 1, 8 (Picorviridae)	Roivainen et al. (1994)
수송단백질 (Transport proteins)		
포스페이트 수송 아날로겐(analogen)	Gibbon ape leukemia virus (Retroviridae) Amphotropic murine (Retroviridae)	Johann et al. (1992) Miller et al. (1994)
양극성(cationic) 아미노산 수송 자(transpoter)	Ecotropic murine leukemia virus Retroviridae)	Albritton et al. (1989)
신호 수용체(Signaling Receptors)		
LDL 수용체 단백질 페밀리	소그룹 HRVs (Picorviridae) 서브그룹 A avian leucosis Sarcoma virus (family?)	Hofer et al. (1994) Bates et al. (1993) Connolly et al. (1994)
아세틸콜린 수용체 (α-1) EGF 수용체	Rabies virus (Rhabdoviridae) Vaccinia virus (Poxviridae)	Leniz (1990) Marsh and Eppstein (1987)
Leukocyte differentiation untigen [CD9]	Feline immunodeficiency virus (lentiviridae)	Willett et al. (1994)

[0045]

기타 (Others)		
아미노펩티다제 A	인간 코로나바이러스 229E (Coronaviridae) TGEV(Coronaviridae)	Yeager et al. (1992) Delmas et al (1992)
상보 수용체 CR2	EBV (Herpesviridae)	McClure (1992)
고친화성 라미닌(laminin) 수용체	Sindbis virus (Togaviridae)	Wang et al. (1992)
Decay-accelerating factor [CD55]	ECHO viruses 7 (6, 11, 12, 20, 21)	Bergelson et al. (1994)
막(membrane) 코펙터 단백질	Measles virus (Morbilliviridae)	Dorig et al. (1993)
Moesin	Measles virus (Morbilliviridae)	Dunster at al. (1994)
Glycophorin A	EMCV (Picoronaviridae) Reovirus (Reoviridae)	Allaway and Barness (1986) Paul and Lee (1987)
Galactosylceramide	HIV-1 (Lentiviridae)	Bhat et al. (1991)
Erythrocyte P 항원	파보바이러스 B19 (Parvoviridae)	Brown et al. (1993)
BLV Rcp. 1	Bovine leukemia virus (Retroviridae)	Ban et al. (1993)
Sialoglycoprotein GP-2	Sendai virus (Paramyxoviridae)	Suzuki et al. (1985)
Sialic acid	Influenza virus (Orthomysoviridae) Reovirus (Reoviridae) 그룹 A porcine rotavirus (Rotaviridae) 인간 코로나바이러스 OC43, 보바인 코로나바이러스 (Coronaviridae)	Herrler et al. (1985) Femandes et al. (1994) Roisma et al. (1994) Vlasak et al. (1988)

Heparan sulfate	인간 cytomegalovirus (Herpesviridae) HSV	Vompton et al. (1993) WuDunn and Spear (1989)
-----------------	--	---

- [0046] 여기에서 사용된 "수용체(receptor)"는 바이러스가 결합할 수 있는 세포에서 발견되는 어떠한 폴리펩티드를 의미한다. 일반적으로 그러한 수용체들은 자역적으로 세포의 표면에 존재하며, 가공될 수 없다. 수용체 폴리펩티드는 비공유적 혹은 공유적으로 탄수화물, 지방산, 지질 및 이와 유사한 것들과 같은 다른 분자적 물질과 연관되어 있을 것이다. 수용체 폴리펩티드는 공유적 혹은 비공유적으로 붙어있으면서 하나 혹은 여러개의 인접하는 폴리펩티드 부분을 포함하고 있을 것이다. 예를 들어, 그런 분자적 물질 혹은 다른 폴리펩티드 서열은 외피 폴리펩티드 서열에 결합하기 위한 수용체의 구조에 중요할 것이다. 그래서, 수용체의 구조에 중용한 물질을 포함한 추가적인 요소들은 본 발명의 키메릭 폴리펩티드에 포함될 수 있다. 수용체 폴리펩티드 서열은 기원이 원핵생물이거나 진핵생물일 수 있다.
- [0047] 진핵생물인 경우, 식물과 동물 모두의 수용체는 생각해 볼 수 있다. 예를 들어, 우선되는 동물의 수용체는 인간, 영장동물, 침팬지, 유인원, 짧은꼬리원숭이, 긴팔원숭이, 오랑우탄 그리고 그와 대등한 동물들 뿐 아니라 가축을 포함한 다른 동물종들의 것이다. 인간 수용체의 예는 CD4이다. 수용체의 다른 예는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan), CD2 그리고 CR1이다. 추가의 수용체는 본발명의 구성 및 방법에 명시되어 있으며 응용할 수 있다(표 1, "도물성 바이러스에 대한 세포의 수용체들" Eckard Wimmer, Cold Spring Harbor Press(1994) 참조).
- [0048] 여기에서 사용된 "공동 수용체(co-receptor)"는 수용체에 바이러스에 결합한 때 혹은 그 이후에 결합하는 어떠한 수용체를 의미한다. 그래서, 공동 수용체는 바이러스 폴리펩티드-수용체 복합체에 결합함으로써 직접적 혹은 간접적인 바이러스의 침입을 촉진하는 세포에 존재하는 어떠한 폴리펩티드나 분자적 물질을 포함한다. 세포로의 바이러스의 침입을 촉진하는 공동 수용체는, 직접적 혹은 간접적인 바이러스의 침입을 촉진시키지 않고 세포의 접착이나 친화성을 중재하는 공동 수용체도 포함한다. 공동 수용체의 특별한 예는 면역결핍 바이러스에 결합할 수 있는 CCR5와 CXCR4와 같은 7번 막을 관통하는 도메인을 가진 케모카인(chemokine) 수용체이다. 추가적으로 공동 수용체는 CCR02b, CCR3, CCR8, V28/CXCR1, US28, STRL 33.BOB/TYMSTR, GPR15/Bonzo 그리고 GPR1을 포함한다.
- [0049] 여기에서 사용된 "폴리펩티드(polypeptide)", "단백질(protein)" 그리고 "펩티드(peptide)"는 길이나 번역후의(post-translational) 변형(당화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation), 미리스틸레이션(myristilation), 유비퀴티네이션(ubiquitination) 등)에 상관없이, 아마이드 결합(amide-bond)에 의해 공유적으로 연결된 적어도 두개의 아미노산들의 서열 복합체를 지칭할 때 사용된다. D-아미노산, L-아미노산, 그리고 D-와 L-아미노산의 혼합물들도 포함된다.
- [0050] 키메릭 폴리펩티드는 자역적인 아미노산 서열에서는 일반적으로 같이 발견되지 않는 둘이나 그 이상의 부분을 가진 아미노산 서열을 언급한다.
- [0051] 상기 언급된 바와 같이, CD4 폴리펩티드 서열과 CD4에 결합할 수 있는 HIV 외피 gp120 폴리펩티드 서열키메릭 폴리펩티드를 가진 키메릭 폴리펩티드는, 아미노산 스페이서 서열에 따라 분리될 때, 키메라내에서 서로 결합할 수 있다. gp120-CD4 키메라는 CCR5와 같은 공동 수용체에 결합할 수 있다. 그래서, 다른 구체에에서, 키메릭 폴리펩티드는 공동 수용체에 결합할 수 있는 코트 폴리펩티드 서열을 가진다.
- [0052] CD4는 면역결핍과 관련된 다양한 바이러스의 침입에 대한 목표인 것으로 보인다. 예를 들면, 림프구나 대식세포와 같은 면역 체계의 세포들은 CD4를 발현하고, HIV, SIV, 헤르페스 바이러스 7, 그리고 많은 다른 바이러스에 의해 감염되기 쉽다. 여기에서 명시된 바와 같이, "면역결핍(immunodeficiency)"은, 바이러스와 연관지어 사용될 때, 면역성의 근원인 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스나 면역 반응에 관여하는 세포를 언급한다. 그리고 일반적으로 그러한 감염은 감염된 숙주의 면역적 기능을 손상시킬 수 있다. 그래서, 본 발명은 어떠한 바이러스의 코트 펩티드나 CD4에 결합할 수 있는 virus 계통에 이용할 수 있다.
- [0053] 본 발명에 따르면, 면역결핍 바이러스의 외피 폴리펩티드 서열을 가진 키메릭 폴리펩티드가 제공된다. 다양한 관점에서, 외피 폴리펩티드 서열은 HIV, HTLV, SIV, FeLV, FPV 그리고 헤르페스 바이러스의 폴리펩티드 서열이다. 다른 관점에서, 바이러스는 HIV에 친화적인 대식세포나 림프구이다. 또 다른 관점에서, HIV는 HIV-1이나 HIV-2이다. 다양한 다른 관점에서, 외피 폴리펩티드 서열은 gp120, gp160 또는 gp41이다.

- [0054] 예를 들어, 본 발명의 키메릭 폴리펩티드의 수용체와 바이러스의 코트 폴리펩티드는 두 폴리펩티드 사이에서 상호작용하는 복합체를 형성하기 위해, 그들 사이에 스페이서 부분을 필요로 한다. 이론대로 결합하지 않기를 바란다 하더라도, 스페이서는 상호작용하는 복합체를 형성하기 위해 바이러스의 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 사이에 유용성 또는 유동성을 부여하는 것으로 추측된다.
- [0055] 여기에서 사용된 "스페이서(spacer)"는, 상호작용하는 복합체를 형성하기 위해 필요한 유연성이나 유동성을 제공하는 동안, 물리적 혹은 화학적 부분, 또는 바이러스 코트 폴리펩티드 서열을 수용체 폴리펩티드 서열에 연결하는 어떤 크기나 특성의 공유적 혹은 비공유적 결합을 언급한다. 본 발명에서, 스페이서는 "말단에서 말단(end to end)"으로의 방향성을 가지고 두 폴리펩티드 서열을 우선적으로 연결한다. "말단에서 말단(end to end)"은 코트 폴리펩티드의 아미노 혹은 카르복실 말단의 아미노산이 수용체의 폴리펩티드 서열에 연결되는 것을 의미한다. 여기에서 gp120과 CD4로 예를 들었듯이, 스페이서는 코트 폴리펩티드 서열의 카르복실 말단의 아미노산을 수용체 폴리펩티드 서열의 아미노 말단의 아미노산에 연결시킬 수 있다. 스페이서는 코트 폴리펩티드의 아미노 말단의 아미노산을 수용체 폴리펩티드의 카르복실 말단의 아미노산이나 폴리펩티드 서열의 카르복실 말단의 아미노산, 혹은 폴리펩티드 서열의 두 아미노말단의 아미노산에 연결시킬 수 있다.
- [0056] 수용체의 특정한 예는 한개 혹은 그 이상의 아미노산이나 펩티도미메틱(peptidomimetic)을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 스페이서는 필수적으로 5개 혹은 200개나 그 이상의 아미노산 길이를 가질 수 있다. 그래서 아미노산 스페이서는 약 10개에서 100개의 아미노산을 가질 수 있거나, 약 15개에서 50개의 아미노산을 가진다. 보편적으로, 스페이서는 약 20개에서 40개의 아미노산으로 구성된다. 스페이서의 다른 예는 폴리펩티드 서열의 말단간의 이황화물 연결(disulfide linkage)을 포함한다. 해당 분야에서 이 기술은, 바이러스 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 폴리펩티드 서열사이에서 상호작용하는 복합체의 형성을 가능하게 하는 기능을 가진 다른 경첩부위를 알게 하거나 쉽게 확인할 수 있다.
- [0057] 수용체와 코트 폴리펩티드 서열은 아미노산을 어떠한 길이로도 가질 수 있다. 무엇보다도, 이것들은 키메릭 폴리펩티드내에 있을 때, 폴리펩티드 서열이 서로 결합할 수 있는 길이를 가진다. 그래서 수용체와 코트 폴리펩티드 서열은 폴리펩티드 서열의 부분뿐 아니라, 본래 지닌 전장의 수용체와 코트 폴리펩티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 절단, 내부의 결실 혹은 수용체의 서브유닛(subunit), 그리고 코트 폴리펩티드 서열을 포함한다. 더구나, 잘리거나 삭제된 코트 폴리펩티드 서열은 수용체 폴리펩티드 서열과 우선적으로 상호작용할 수 있다. 잘려진 수용체 폴리펩티드 서열의 예로는, HIV 외피 폴리펩티드 서열과 상호작용할 수 있는 CD4 D1 도메인과 C2 도메인을 들 수 있다(도면 9). 잘려진 코트 폴리펩티드 서열의 예로는, 아미노 말단의 아미노산 60개와 카르복실 말단의 아미노산 20개가 없는 잘려진 HIV gp120(즉, TcSC)을 들 수 있다.
- [0058] 그래서, 본 발명에서는 잘려진 혹은 내부가 결실된 서열을 포함하는 키메릭 폴리펩티드가 제공된다. 한 실시예에서, 바이러스의 코트 폴리펩티드 서열이나 수용체 폴리펩티드 서열은, 전장의 폴리펩티드 서열과 비교했을 때 한 개 혹은 그 이상의 제거된 아미노산을 가지고 있다. 어떤 관점에서는, 잘려진 바이러스의 폴리펩티드 서열은 HIV 외피 폴리펩티드 서열이고, 다른 관점에서는 잘려진 수용체 폴리펩티드 서열은 CD4 서열이다. 여기에서 예로 든 바와 같이, 잘려진 HIV 외피 폴리펩티드 서열은 아미노 말단의 아미노산 60개 또는 카르복실 말단의 아미노산 20개가 없고 D1과 D2 도메인으로 구성된 잘려진 CD4 폴리펩티드가 없는 gp120이다. 다양한 다른 관점에서, 키메릭 폴리펩티드는 내부가 결실된 바이러스의 코트 폴리펩티드 서열이나 내부가 결실된 CD4 폴리펩티드 서열로 이루어져 있다. 잘려지고, 내부가 결실되었으며 서브유닛인 폴리펩티드 서열외에, 추가의 폴리펩티드 서열의 변형이 포함된다. 변형된 키메릭 폴리펩티드가 변형되지 않은 키메릭 폴리펩티드와 실질적으로 같은 활성 또는 기능을 가지고 있다면, 그러한 변형에는 최소한의 치환, 변이(variations), 또는 키메릭 폴리펩티드를 구성하는 폴리펩티드 서열의 하나 혹은 모두의 아미노산 서열의 디리비티제이션(derivitization)이 포함된다. 예를 들어, 바이러스의 코트 혹은 수용체의 폴리펩티드 서열은 탄수화물, 지방산(팔미트산염(palmitate), 미리스틱산염(myristate)), 지질을 가질 수 있고, 인산화되거나 전형적으로 폴리펩티드 서열과 연관있는 다른 번역후 변형을 겪을 수도 있다.
- [0059] 변형의 다른 예는, 두 폴리펩티드나 키메릭 폴리펩티드에 다른 기능을 부여하는 이종 조직의(heterologous) 도메인이 첨가되는 것이다. 이종 조직의 도메인은, 그것이 추가의 기능을 부여한다면, 어떠한 작은 유기적 혹은 비유기적 분자 또는 고분자일 수 있다. 이종 조직의 도메인은 바이러스의 코트 폴리펩티드와 수용체 폴리펩티드 간의 상호작용이나 친화력에 영향을 줄 수도 있고, 아닐 수도 있다. 다른 기능을 부여하는 이종 조직의 도메인의 특정한 예는, 약물 표적화(targeting: 예를 들어, 수용체, 리간드, 항체, 등), 면역강화(immunopotentiating) 기능(예를 들어, 면역글로블린(immunoglobulin), 약물 보조제(adjuvant))을 부여하고, 정제, 분리 및 검출을 가능하게 하는 아미노산 서열(예를 들어, myc, T7 꼬리표(tag), 폴리히스티딘

(polyhistidine), 아비딘(avidin), 비오틴(viotin), 렉틴(lectin), 등)을 포함한다.

- [0060] 특정한 이중 조직의 도메인은 c-myc 폴리펩티드 서열 및/또는 IgG1 중사슬 폴리펩티드 서열을 포함한다. 이중 조직의 도메인은 다양한 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, IgG1은 정제되거나 분리되거나 혹은 검출될 수 있는 부착 분자(adhesion molecule)로 작용할 뿐 아니라(즉, 양고추냉이(horseradish)의 과산화효소(peroxidase) 혹은 알칼리성 인산분해 효소(alkaline phosphatase)와 같은 효소의 활성을 지닌 2차의 항체와 반응함으로써), 생체내에서 면역강화제(immunopotentiator)로서 작용할 수 있다. 숙련된 자는 다른 이중 조직의 도메인을 알것이고, 바라는 응용과 기능에 따라 적절하게 선택할 수 있다.
- [0061] 그래서, 본 발명은 하나 혹은 그 이상의 이중 조직의 도메인들을 가지고 있는 키메라 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시예에서, 이중 조직의 도메인은 c-myc 폴리펩티드 서열 glu-gln-lys-leu-ile-ser-glu-glu-asp-leu(서열번호 14)이다. 다른 실시예에서, 이중 조직의 도메인은 중사슬을 구성하는 면역글로블린 폴리펩티드의 서열(서열번호 32)이다.
- [0062] 수용체와 코트 코리펩티드 서열은 어떠한 아미노산 길이도 될 수 있다. 우선적으로, 이들은 키메라 폴리펩티드의 내에 있을 때, 서로 결합할 수 있는 길이의 폴리펩티드 서열을 가진다. 그래서, 수용체와 코트 폴리펩티드 서열은 폴리펩티드 서열의 일부분뿐 아니라, 본래 지닌 전장의 수용체와 전장의 코트 폴리펩티드 서열 을 포함한다.
- [0063] 어느 한 관점에서, 본 발명은, 전장의 단일 사슬과 HIV gp120(BaL 계통)를 포함하는 키메라 폴리펩티드, 아미노산 스페이스 폴리펩티드, D1 및 D2 도메인과 myc 펩티드 꼬리표 혹은 키메라 폴리펩티드를 암호화하고 있는 서열번호 2에 대해 적어도 95%의 서열 유사성을 가지고 있는 CD4 폴리펩티드 서열로 구성된다.
- [0064] 다른 관점에서, 본 발명은 FLSC 폴리펩티드의 퓨린 절단 부위에 단 하나의 돌연변이를 가지고 있는 FLSC 폴리펩티드를 포함한다. 여기에서의 돌연변이는 키메라 폴리펩티드를 암호화 하고 있는 서열번호 2와 서열 유사성이 최소한 95%이거나 gp120(FLSC-R/T)의 C-말단 부위에서 R이 T로 바뀐 것이다. 특히, FLSC-R/T는 506번째 아미노산에서 아르기닌(arginine)이 트레오닌(threonine)으로 돌연변이 된 것(서열번호 4)을 포함한다.
- [0065] 여기에서 예시한 바와 같이, 변형된 키메라 폴리펩티드가 변형되지 않은 키메라 폴리펩티드와 실질적으로 같은 활성 또는 기능을 가지고 있다면, 폴리펩티드 서열은 치환, 변이(variations), 또는 키메라 폴리펩티드를 구성하는 폴리펩티드 서열의 하나 혹은 모두의 아미노산 서열의 디리비티제이션(derivitization)을 포함한다. 예를 들어, 바이러스의 코트 혹은 수용체 폴리펩티드 서열은 탄수화물, 지방산(팔미트산염, 미리스틱산염), 지질을 가질 수 있고, 인산화되거나 전형적으로 폴리펩티드 서열과 연관있는 다른 번역후 변형을 겪을 수도 있다.
- [0066] 아직 다른 관점에서는, 바이러스의 코트 폴리펩티드 서열 혹은 수용체 폴리펩티드 서열은 변형되지 않은 폴리펩티드 서열과 비교했을 때, 하나 혹은 그 이상의 아미노산 치환을 가지고 있다. 예를 들어, 뉴클로티드 서열(서열번호 5)는, 개선된 면역 반응이나 같은 활성을 충분히 가진 CD4를 본뜬 수용체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하고 있는 것으로 제공된다. 특히, 키메라 폴리펩티드 FLSV-R/T(서열번호 4)의 CD4 D1 및 D2 도메인에서 KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKS IQFHW의 아미노산 서열을 암호화하고 있는 유전자 서열은, 이후부터 FLSC-R/T CD4M9(서열번호 6)으로 언급되는 CNLARCQLRCKSLGLLGKAGSFCACGP(아미노산 528-556(서열번호 20))의 서열로 치환된다.
- [0067] 여기에서 사용된 "실질적으로 같은 활성 혹은 기능(substantially the same activity or function)"은, 변형된 키메라 폴리펩티드와 관련되어 사용될 때, 해당 분야에서 알려지거나 여기에서 언급된 바와 같이, 변형되지 않은 폴리펩티드와 연관된 모든 혹은 대부분의 활성을 지닌 폴리펩티드를 의미한다. 유사하게, 공동 수용체와 상호작용하는 키메라 폴리펩티드의 활성에 영향을 주지 않는 변형은 여기에 포함된다. 마찬가지로, 바이러스의 코트 단백질 단독 투여보다 더욱 강력한 면역 반응을 유발하는 능력에 영향을 주지 않는 키메라 폴리펩티드 변형도 포함된다.
- [0068] 여기에 포함되는 "활동하는(alive) 또는 기능성의(functional)"이면서 변형된 키메라 폴리펩티드는 일상적인 기능성 분석법으로 확인될 수 있다. 예를 들어 항체 결합 분석법이나 공동 수용체 결합 분석법을 사용하거나, 두 폴리펩티드 서열이 결합하지 않을 때 정상적으로 숨겨진 전이상태의 복합체에 노출된 에피토프의 유발을 결정함으로써, 변형된 키메라 폴리펩티드가 활성을 가졌는지 판단할 수 있다.
- [0069] 예를 들어, 더욱 강력한 면역 반응을 유발하는 키메라 폴리펩티드는, 특정 대상에게 키메라를 투여한 뒤, 항체의 적정 농도를 측정함으로써 확인할 수 있다. 바이러스의 코트 폴리펩티드 서열과 수용체의 폴리펩티드 서열간의 상호작용을 파괴할 수 있는 변형이나, 더욱 강력한 면역 반응을 유발하기 위해 상호작용하지 않는 바이러스

의 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 서열의 활성은, 상응하며 변형되지 않는 키메릭 폴리펩티드와 그러한 것만큼 실질적으로 동일한 활성 및 기능을 가지고 있지는 않다.

[0070] 여기에서 사용된 "유사성(homology)" 또는 "상동인(homologous)"는 폴리펩티드를 언급할 때 사용되며, 두 폴리펩티드간의 아미노산 서열이 유사성을 언급한다. 양쪽의 폴리펩티드에서의 아미노산의 위치에 동일한 아미노산이 존재하면, 그들은 그 위치에서 상동이다. 그래서, "실질적으로 상동인(substantially homologous)"은 완전하지 않지만 대부분 상동이며, 상동에 해당하는 서열이 활성의 대부분 혹은 전부 가지고 있는 아미노산 서열을 의미한다.

[0071] 변형된 키메릭 폴리펩티드가 변형되지 않은 키메릭 폴리펩티드와 관련된 활성 혹은 기능을 가지게 됨에 따라, 변형된 키메릭 폴리펩티드는 일반적으로 변형되지 않은 폴리펩티드의 아미노산 서열로 구성된 "실질적으로 동일한(substantially identical)" 혹은 "실질적으로 상동인(substantially identical)" 아미노산 서열을 가지게 된다. 여기에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 동일한(substantially identical)" 혹은 "실질적으로 상동인(substantially identical)"이란 개념은, 폴리펩티드 서열과 관련지어 사용될 때, 폴리펩티드의 서열은 대조 서열에 대해 적어도 50%의 유사성을 가지고 있음을 의미한다. 변형된 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 폴리펩티드는 일반적으로 대조 폴리펩티드에 대해 적어도 70%, 아니면 85%, 더욱 많게는 90%, 가장 많게는 95%의 유사성을 가지게 될 것이다. 폴리펩티드의 경우 상기 언급한 서열간의 백분율 유사성을 얻기 위해 비교한 길이는 적어도 25개의 아미노산이며, 아니면 적어도 50개의 아미노산, 더욱 좋게는 최소한 100개의 아미노산, 가장 좋게는 200개 혹은 그 이상의 아미노산이다.

[0072] 여기에서 진술한 바와 같이, 실질적으로 동일하거나 상동인 폴리펩티드는 첨가(additions), 절단(truncation), 내부의 결실 혹은 삽입, 보존적인(conservative) 혹은 비보존적인(non-conservative) 치환, 또는 키메릭 폴리펩티드의 기능을 파괴하지 않는 아미노산 서열의 자리에 위치한 다른 변형(즉, 여기에서 언급된 바와 같이, 기능성 분석에 의해 결정)을 포함한다. 치환의 특정한 예는 하나 혹은 그 이상의 아미노산이 화학적으로 또는 생물학적으로 유사한 다른 잔기로 바뀌는 것이다. 여기에서 사용된 바와 같이, "보존적인 치환(conservative substitution)"은 하나의 잔기가 화학적으로 또는 생물학적으로 유사한 잔기로 치환되는 것을 의미한다. 보존적인 치환에는 이소류신(isoleucine), 발린(valine), 류신(leucine), 혹은 메티오닌(methionine)과 같은 다른 것이 친수성 잔기로 교체되는 것과 라이신(lysine)이 알지닌(arginine)으로, 아스파르트산(aspartic acid)이 글루탐산(glutamic)으로 혹은 아스파라긴(asparagine)이 글루타민(glutamine)으로 바뀌는 것과 같은 극성 잔기로 교체되는 것이 포함된다. 해당 분야에서 이러한 기술은 실질적으로 활성을 바꾸지 않고, 화학적으로 유사한 다른 잔기로 치환되거나 변형될 수 있는 수많은 아미노산을 인식하게 한다.

[0073] 실질적으로 동일하거나 상동인 폴리펩티드는 추가적인 기능이나 활성을 부여하거나 개선하는 변형을 가진 것들도 포함한다. 예를 들어, FLSC R/T는 변형된 FLSC의 안정성을 증가시키는 돌연변이된 퓨린 자리를 가지고 있다(도 13).

[0074] 또한, 변형된 폴리펩티드는, "화학적 유도체(chemically derivatives)"를 포함하는데, 그 가운데 하나 혹은 그 이상의 아미노산은 화학적으로 변형되거나 과생된 측쇄(side chain)을 가지고 있다. 예를 들어, 그렇게 과생된 폴리펩티드는 아미노산을 포함하는데, 이 아미노산은 아민 염산염(amine hydrochlorides), p-톨루엔 설포닐 그룹(p-toluene sulfony groups), 카르보벤조시 그룹(carobenzoxo groups)을 이루는 자유로운 아민 그룹(free amino groups), 염(salts), 메틸(methyl) 그리고 에틸 에스테르(ether ester)를 이루는 자유로운 카르복시 그룹(free carboxygroups), 그리고 O-아실(O-acyl) 또는 O-알킬(O-alkyl) 유도체뿐만 아니라 프롤린(proline)이 4-하이드록시프롤린(4-hydroxyproline)으로, 라이신(lysine)이 5-하이드록시라이신(5-hydroxylysine)으로, 세린(serine)이 호모세린(homoserine)으로, 라이신(lysine)이 올니친(ornithine)으로 치환되는 것과 같은 자연적으로 발생하는 아미노산 유도체를 이루는 자유로운 히드록실 그룹(hydroxyl groups)을 포함한다. 또한, D-아미노산과, 순환되는 폴리펩티드를 만드는 두개의 시스테인 잔기(cystein residues)사이에서 형성되는 이화합물 연결인 공유적 결합을 변형시키는 아미노산 유도체도 포함된다.

[0075] 여기에서 사용된 바와 같이 "분리된(isolated)" 혹은 "실질적으로 순수한(substantially pure)"은, 발명의 키메릭 폴리펩티드, 그것의 서열 절편, 그리고 폴리뉴클레오티드의 변형자로서 사용될 때, 그것들이 인간의 간섭에 의해 생겨났으며 본래의 생체내 세포속 환경에서 분리되었음을 의미한다. 일반적으로, 그렇게 분리된 폴리펩티드와 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 다른 단백질, 핵산, 지질, 단수화물 또는 자연적으로 연관된 다른 물질들과 섞여있지 않다.

[0076] 전형적으로, 폴리펩티드는 중량이 적어도 60%일 때 실질적으로 순수하며, 단백질이나 자연적으로 연관된 다른

물질들과 섞여있지 않다. 제조는 적어도 75%, 더 좋은 것은 최소 90%, 가장 좋은 것은 최소95%이상일 때 증량적으로 순수할 것이다. 예를 들어, 실질적으로 순수한 키메라 폴리펩티드는 폴리펩티드를 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드를 세포내에서 발현시키고 생성된 폴리펩티드를 분리해냄으로써 얻을 수 있다. 예시에서 진술한 바와 같이, gp120-CD4를 암호화하고 있는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포유류의 세포에서 발현시키면 면역친화 컬럼 (immunoaffinity column)을 사용하여 배양 배지에서 키메라 폴리펩티드를 분리할 수 있다. 키메라 폴리펩티드는 화학적으로 합성될 수 있다. 순도는 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)와 같은 다른 적절한 방법과 젤을 즉시 염색(예를 들어, 은염색(silver stain)) 또는 HPLC 분석을 통해 측정할 수 있다.

[0077] 본 발명의 키메라 폴리펩티드와 그에 따른 변형은 해당 분야에서 알려진 다양한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 핵산말단분해효소(exonuclease)에 의한 삭제, 화학적 변형, 혹은 이중 조직의 도메인을 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 융합에 의한 위치가 규제된(site-directed: PCR 기본의) 혹은 임의의 돌연변이유발(mutagenesis: 예를 들어 EMS)을 통해 폴리펩티드 변형은 유발될 수 있다. 키메라 폴리펩티드는, 박테리아나, 효모 혹은 포유동물 세포와 같은 숙주에서 폴리펩티드를 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드를 발현시키고, 전형적인 생화학적 방법(예를 들어, 면역친화 분리(immunoaffinity purification), 젤 분리(gel purification), 발현 스크리닝(expression screening), 등)으로 분리함으로써 얻을 수 있다. 달리 잘 알려진 방법은 Deutscher 등에 의해 잘 소개되어 있다(단백질 정제에 대한 안내: 효소학에서의 방법들(Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology), 제 182권, 아카데미 출판사(1990), 여기에서 참고문헌으로 포함되어 있다).

[0078] 또한 본 발명은, 키메라 폴리펩티드와 그에 해당하는 단편들, 그리고 상보적인 서열을 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 한 실시예에서, 핵산은 여기에서 예로 든 키메라 gp120-CD4 폴리펩티드를 암호화하고 있다. 예를 들어 서열번호 1은, gp120을 암호화하고 있는 뉴클레오티드 서열(서열번호 23)로 구성된, 상기 명시된, FLSC를 암호화하고 있는 서열로 정의된다. 서열번호 3은 FLSC를 암호화하고 있는 서열로 정의되는데, 여기에서 알지닌 아미노산은, gp120에서 퓨린 절단 부위로 추정되는 gp120의 C-말단에서 트레오닌 대신에 치환됨으로써, FLSC-R/T의 안정성을 FLSC 이상으로 개선시킨다. FLSC-R/T의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 29와 CD4D1D2(서열번호 25)에 의해 암호화 되어 있는 변형된 gp120을 포함한다. 또한, 본 발명은, 치환된 퓨린 절단 부위를 포함하고 있는 키메라 폴리펩티드 FLSC-R/T CD4M9을 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드 서열(서열번호 5)를 제공할 뿐 아니라, CD4 수용체를 모방한 아미노산 서열을 암호화하는 서열을 가진 CD4D1D2 부위를 암호화한 유전자 서열의 대체품을 제공함으로써, FLSC 혹은 FLSC-R/T에 비해 부가적인 안정성과 개선된 면역 반응을 제공한다. FLSC-R/T CD4M9는, 변형된 gp120을 암호화하고 있는 서열번호 29와 CD4M9을 암호화하고 있는 서열번호 19를 포함하고 있는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되어 있다. FLSC-R/T CD4M9 키메라 폴리펩티드는 추가로 서열번호 23과 서열번호 19를 포함하고 있다.

[0079] 다른 실시예에서, TsSC(서열번호 12)는 gp120-CD4 폴리펩티드(서열번호 13)을 암호화하고 있는데, gp120은 아미노 및 카복실 말단으로부터 잘린 아미노산 서열을 가지고 있다. TsSC의 뉴클레오티드 서열은 잘려진 gp120과 CD4D1D2(서열번호 25)를 암호화하는 서열(서열번호 27)을 포함하고 있다. 다른 실시예에서, 키메라 폴리펩티드 gp120-CD4-IgG1은 추가의 꼬리표(서열번호 31)를 가진 뉴클레오티드 서열번호 1에 의해 암호화되어 있다.

[0080] 여기에서 사용된 바와 같이, "핵산(nucleic acid)", "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)", 그리고 프라이머(primer)는 이중- 이거나 단일-나선인, 혹은 선형의 또는 원형의, 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid: DNA) 또는 리보핵산(ribonucleic acid: RNA)을 언급할 때 사용된다. 리보핵산은 이어지거나(spliced) 또는 이어지지 않은(unspliced) 미토콘드리아 리보핵산(mRNA), 리보솜 리보핵산(rRNA), 전달 리보핵산(tRNA), 게놈 디옥시리보핵산(genomic DNA)또는 안티센스 RNAi(antisense RNAi)일 수 있다. 특히, 핵산분해효소(nuclease)의 분해에 대해 저항성을 가지고 있으면서 발명의 키메라 폴리펩티드를 암호화하는 기능을 가질 수 있는 뉴클레오티드 유사체와 유도체도 포함된다. 핵산분해효소에 대해 저항성을 가진 올리고뉴클레오티드와 폴리뉴클레오티드는 여기에서 설명한 현재의 핵산 백신에 사용된다.

[0081] "분리된(isolated)" 또는 "본질적으로 순수한(substantially pure)"은 핵산이, 유래된 생체체의 자연발생적인 게놈에 바로 인접한 5' 말단이나 3' 말단을 가진 암호 서열에 바로 인접해 있지 않음을 의미한다. 그러므로, 예를 들어, 이 개념은 벡터에 들어간 재조합 DNA, 자발적으로 복제하는 플라스미드나 바이러스, 또는 원핵생물이나 진핵생물의 게놈 DNA 뿐만 아니라, 재조합 DNA(예를 들어,PCR 또는 클로닝동안 제한적핵속핵산분해효소에 의해 생성된 cDNA 또는 게놈 DNA 절편)을 포함한다. 이것은 키메라 또는 융합체의 재조합 DNA 부분도 포함한다. 그래서 이 개념은 핵산을 포함하는 것이 아니며, 게놈 혹은 cDNA 라이브러리나 젤상에서 절편화된 라이브러리의

수백만 서열중에서 특정지어지지 않는다.

- [0082] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 유전적 암호화의 결과로 변질된 핵산도 포함하고 있다. 자연에는 20개의 아미노산이 존재하는데, 이중 대부분은 하나 이상의 코돈에 의해 표시된다. 변질된 모든 폴리뉴클레오티드 서열에는 본 발명의 키메릭 폴리펩티드를 암호화하고 있는 것도 포함된다.
- [0083] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 해당 분야에서 알려진 표준의 기술(예를 들어, 분자에 의한 클로닝(molecular cloning:, 화학적 합성)을 사용하여 얻을 수 있고, 순도는 폴리아크릴아마이드 또는 젤 전기영동, 염기서열분석(sequencing analysis)등과 같은 방법에 의해 결정될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 하이브리다이제이션(hybridization) 또는 이 분야에서 잘 알려진 컴퓨터에 기초한 기술을 사용하여 분리할 수 있다. 그러한 기술들은 다음을 포함하며, 그것에 제한을 두지 않는다: (1) 상보성의 뉴클레오티드 서열을 검출하기 위한 게놈 DNA 혹은 cDNA 라이브러리와 탐색자(probe)의 하이브리다이제이션; (2) DNA서열에 의해 발견되는 폴리펩티드를 스크리닝하는 항체(예를 들면, 발현 라이브러리의 사용); (3) 목적된 핵산 서열에 붙을 수 있는 프라이머를 사용한 게놈 DNA 혹은 cDNA의 증합효소 연쇄 반응(PCR); (4) 관련된 서열에 대해 나열된 데이터베이스를 컴퓨터로 조사; 및 (5) 공제된 핵산 라이브러리의 다양한 스크리닝. 그래서 CD4를 암호화하고 있는 것과 같이, 폴리뉴클레오티드를 암호화하고 있는 다른 수용체를 얻기 위해, 라이브러리는 상동인 서열로 스크리닝된다.
- [0084] 본 발명은 또한, 실질적으로 상동인 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 여기에서 사용된 바와 같이, "상동(homologous)"이란 개념은, 핵산분자와 관련지어 사용할 때, 두 뉴클레오티드 서열간의 유사성을 언급한다. 두 분자에서 뉴클레오티드의 자리에 동일한 뉴클레오티드가 위치한 경우, 그들은 그 자리에서 상동이다. "실질적으로 상동(substantially homologous)" 핵산 서열은 최소한 50%의 유사성, 더욱 좋게는 최소한 75%의 유사성, 가장 좋게는 90% 혹은 그 이상의 유사성을 가지고 있다. 실질적으로 상동인 본 발명의 키메릭 폴리펩티드의 경우, 키메릭 폴리펩티드를 암호화하고 있는 발명의 폴리펩티드에 대해 상동인 폴리펩티드는, 상동인 서열과 관련된 기능이나 활성의 대부분 혹은 전부를 가지고 있는 폴리펩티드를 암호화하고 있다. 폴리펩티드의 경우 서열간의 비교하는 길이는 적어도 30개의 뉴클레오티드이고, 좋게는 최소 50개의 뉴클레오티드, 더욱 좋은 것은 최소 75개의 뉴클레오티드, 가장 좋게는 110개 혹은 그 이상의 뉴클레오티드이다. 폴리뉴클레오티드 서열간의 차이와 부적당한 올리고뉴클레오티드를 설명하기 위해 상동인 서열을 확인하는 연산은 BLAST(Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 15:403-10(1990))와 같은 것이 해당 분야에서 잘 알려져있다.
- [0085] 또한, 폴리뉴클레오티드는 키메릭 폴리펩티드나 mRNA를 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드의 양이나 존재여부를 확인하기 위한 하이브리다이제이션 탐침자(hybridization probe)로 유용하다(Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)). 일반적으로 상기 탐침자는 관련이 없는 서열에 하이브리다이제이션될 가능성을 줄이기 위해 희망하는 서열에 특이적으로 결합할 수 있도록 고안된다. 상기 탐침자는 방사성핵종(radionuclide) 이나 발광성 부분(luminescent moiety)을 이용하여 검출될 수 있도록 변형된다. 예를 들어, 적당하게 알맞은 하이브리다이제이션 조건은 다음과 같은 것을 포함한다: 37°C 또는 42°C에서 2X SSC/0.1% SDS(하이브리다이제이션 조건); 실온에서 0.5X SSC/0.1% SDS(낮은 강도의 세척); 42°C에서 0.5X SSC/0.1% SDS(적당한 강도의 세척). 적당하게 높은 강도의 하이브리다이제이션 조건의 예는 다음과 같다: 52°C에서 0.1X SSC/0.1% SDS(적당한 고강도의 세척). 고강도 하이브리다이제이션 조건의 예는 다음과 같다: 65°C에서 0.1X SSC/0.1% SDS(고강도의 세척).
- [0086] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 바란다면: 노출되거나 세포막을 통과하기에 적당한 담체(예를 들면, 폴리뉴클레오티드-리포솜 복합체(polynucleotide-liposome complex) 또는 콜로이드성의 분산 체계(colloidal dispersion system))에 있고, 벡터(예를 들면, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 등)안에 포함될 수 있고, 다른 이종 조직의 도메인(예를 들면, 항체, 리간드, 비오틴, 스트렙타비딘, 락틴, 등)이나 자동력이 없는 비즈(inert beads)에 연결될 수 있거나, 해당 분야에서 알려지거나 여기에서 명시된 다른 적당한 조성물일수 있다. 그래서, 폴리뉴클레오티드의 전달에 있어 바이러스에 의한 또는 바이러스에 의하지 않은 수단은 달성되거나 계획될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 여기에서 나타난 다양한 이종 조직의 도메인과 같은 다른 기능을 가진 폴리펩티드를 포함하고, 그것에 연결된 추가의 핵산 서열을 포함할 수도 있다.
- [0087] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 약학적 조성물에서도 자신의 안정성을 증가시키기 위해 핵산분해효소에 대한 저항성을 가지도록 변형될수 있다. 기술된 폴리뉴클레오티드는, 특히 폴리뉴클레오티드가 여기에서 명시되거나 해당 분야에서 알려진 발현 체계로 들어갈 때, 본 발명의 키메릭 폴리펩티드를 암호화하는데 유용하다. 따라서, 발현 벡터를 가진 폴리뉴클레오티드도 포함된다.
- [0088] 세포내에서의 번식 및 발현을 위해, 여기에서 명시된 폴리뉴클레오티드는 벡터로 삽입될 수 있다. "벡터

(vector)"란 개념은, 핵산의 삽입 및 결합에 의해 조작될 수 있으며, 해당 분야에서 알려진 플라스미드, 바이러스 또는 다른 전달 수단을 언급한다. 그러한 벡터는 유전적인 조작(예를 들면, 클로닝 벡터)에 사용될 수 있거나, 삽입된 폴리뉴클레오티드를 전사하거나 번역하는데(예를 들면, 발현 벡터) 사용할 수 있다. 일반적으로 벡터는 번식을 위해 적어도 하나의 복제 원점과 프로모터를 가지고 있다. 발현 벡터에 존재하는 프로모터를 포함한 조절 인자는 적절한 전사와 번역을 촉진하는데 포함된다(예를 들면, 인트론에 대한 가공 신호, mRNA와 종결 코돈의 구조에 맞는 번역을 가능하게 하기 위한 유전자의 적당한 해독틀 유지). 여기에서 명시된 세포내 혹은 세포밖에서의 폴리뉴클레오티드의 발현은 핵산에 연결된 프로모터에 의해 가능하다. "프로모터(promoter)"는 프로모터에 연결된 핵산의 전사가 바로 일어나기에 충분한 최소한의 염기서열을 지칭한다(Bitter *et al.*, *Methods in Enzymology*, 153:516-544 (1987)). 프로모터는 지속적으로 직접 전사를 일으킬 수 있고, 조직-특이적이며, 유발성 혹은 억제성 전사를 일으킬 수 있다; 그러한 요소는 일반적으로 조절되는 유전자의 5' 또는 3' 지역에 위치하고 있다.

[0089] 본 발명에서, 공동 수용체에 결합하는 바이러스의 경우, 키메라 펩티드를 바이러스의 감염에 민감한 세포(예를 들면, 공동 수용체를 발현하는 세포) 안으로 유도하여 발현시키는 것이 유리하다. 이런 방식으로, 발현된 키메라릭 폴리펩티드는 감염되기 쉽게 형질 전환된 세포에 의해 공동 수용체의 근처에 분비됨으로써, 세포가 바이러스의 감염을 억제하거나 방해하는 공동 수용체로 바이러스가 접근하는 것을 억제하거나 방해한다. 이 때문에, 조직-특이적 프로모터는 적당한 목적 세포에서 키메라릭 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 폴리뉴클레오티드 서열에 연결되어야 한다.

[0090] 여기에서 사용한 바와 같이, "조직-특이적 프로모터(tissue-specific promoter)"는 간세포, 조혈세포(hematopoietic cell), 또는 동물에서 조직-특이적 세포와 같은 특정 세포에서 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 가능하게 하는 특정 세포나 조직에서 활동하는 프로모터를 언급한다. 이 개념은 한 조직에서 선택된 DNA의 발현을 조절할 수는 있지만 하나나 그 이상의 조직에서 발현을 일으키는, 소위 새기 쉬운 프로모터(leaky promoter)도 포함한다.

[0091] 유발할 수 있는 프로모터는 세포내에서의 발현을 조절하기 위해 사용될 수 있다. "유발할 수 있는 프로모터(inducible promoter)"는 외부의 자극이나 약물의 처리에 반응하여 자신의 활성을 증가시키는 프로모터를 의미한다(예를 들면, 메탈로치오닌 IIA 프로모터(metallothionein IIA promoter), 열충격 프로모터(heat shock promoter)). "억제하는 프로모터(repressible promoter)" 또는 "조건부의 프로모터(conditional promoter)"는 억제자 또는 그에 동등한 화합물에 반응하여 활성 수준이 감소되는 프로모터를 의미한다. 억제자가 더 이상 존재하지 않을 때, 전사는 활성화되거나 감소한다. 그러한 프로모터는 복합으로 사용될 수도 있고, 인트론이나 촉진자(enhancer) 서열과 같은 전사 및 발현에 필요한 부수적인 DNA 서열을 포함할 수도 있다.

[0092] 여기에서 사용된, "실시 가능하게 연결된(operably linked)"은 적당한 물질(예를 들면, 전사 촉진자(transcriptional activator protein))이 조절 서열에 결합할 때, 전사가 일어날 수 있도록 선택된 폴리뉴클레오티드(예를 들면, 키메라릭 폴리펩티드를 암호화하고 있는)와 조절 서열이 연결되어있는 것을 의미한다. 특히, 프로모터는 폴리뉴클레오티드의 5' 말단에 위치하고 있으며, 프로모터가 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절하도록 하기 위해, 전사 시작 부위에 가까운 곳에 위치하고 있을 것이다. 그러나, 첫번째 벡터에 있는 프로모터가 단백질의 발현을 조절하거나, 역으로, 두번째 벡터의 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절하는 프로모터를 조절할 수 있을 때, 비간접적으로 실시 가능한 연결이 가능하다.

[0093] 박테리아 체계에서 클로닝을 할 때, 박테리오파지 감마의 pL, plac, ptrp, ptac과 같은 유발할 수 있는 프로모터 뿐만 아니라, T7과 그와 유사한 지속적인 프로모터 역시 사용될 수 있다. 포유동물 세포 체계로 클로닝을 할 때, SV40, RSV, 그리고 그와 유사한 것과 같은 지속적인 프로모터들이나, 포유동물 세포의 계놈(예를 들면, 메탈로치오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들면, 마우스 유방암바이러스의 프로모터, 아데노바이러스의 마지막에 있는 프로모터)에서 유래한 유발성 프로모터들도 사용될 수 있다. 재조합 DNA 또는 합성 기술에 의해 생성된 프로모터는 본 발명의 핵산 서열의 전사를 일으키는데 사용될 수 있다.

[0094] 직접적인 발현을 위해 재조합 바이러스나 바이러스의 요소를 사용하는 포유동물의 발현 체계는 가공될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스의 발현 벡터를 사용할 때, 핵산 서열은 아데노바이러스의 전사 및/또는 번역 조절 복합체(예를 들어, 마지막 프로모터와 삼부의 주도 서열)에 연결될 수 있다. 백신 바이러스의 7.5K 프로모터도 사용될 수 있다(Mackett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7415-7419 (1982); Mackett *et al.*, *J. Virol.*, 49:857-864 (1984); Panicali *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4927-4931 (1982)).

[0095] 더욱이, 포유동물의 발현 체계는 아데노바이러스(U.S. Patent Nos. 5,700,470과 5,731,172), 아데노-관련 벡터

(U.S. Patent No. 5,604,090), 단순포진바이러스(U.S. Patent No.5,501,979), 및 레트로바이러스 벡터(U.S. Patent Nos. 5,624,820, 5,693,508, 및 5,674,703 그리고 WIPO publication W092/05266 그리고 W092/14829)를 포함하는, "유전자 치료(gene therapy)"를 위해 특별히 고안된 벡터를 포함한다. 유전자를 암호화하는 키메릭 폴리펩티드는, gp120 및 CD4와 같은 수용체 서열과 폴딩된 바이러스의 코트 단백질의 발현에 효율적이고 믿을 수 있는 방법을 제공하기 위해, 약화된 우두(Girard, M. *et al.*, *C R Acad Sci III.*, 322:959-66 (1999); Moss, B. *et al.*, *AIDS*, 2 Suppl 1:S103-5 (1988)), 세미리키포레스트 바이러스(semilikiforest virus)(Girard, M. *et al.*, *C R Acad Sci III.*, 322:959-66 (1999); Mossman, S.P. *et al.*, *J. Virol.*, 70: 19.53-60 (1996)) 및 샬모넬라(Powell, R. *et al.*, In: *Molecular Approaches to the contro of infectious disease*, pp. 183-187, Bran, F., Norrby, E., Burton, D., alc Mecalanos, J.(eds), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1996); Shata, M.T. *et al.*, *Mol Med Today*, 6:66-71 (2000))와 같은 백신 전달 미립자 안으로 유도될 수 있다. 소유투종 바이러스(bovine papilloma virus)를 기초로 한 벡터는 염색체외의 요소만큼 복제할 수 있는 능력을 가지고 있다(Sarver *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1:486 (1981)). 쥐 세포로 염색체외의 벡터가 들어간 직후, 벡터는 복제를 시작하여 세포마다 약 100에서 200개의 복사본이 존재한다. 삽입된 cDNA의 전사는 플라스미드가 숙주의 염색체로 삽입되는 것을 필요로 하지 않기 때문에, 다량의 발현이 일어난다. 벡터는 또한 유전자 치료에도 이용될 수 있다 (U.S. Patent No. 5,719,054). CMV-기초의 벡터도 포함된다(U.S. Patent No. 5,561,063).

[0096] 효모 발현의 경우, 지속적이거나 유발성의 프로모터를 가진 다양한 벡터가 사용될 수 있다(Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience (1988); Grant *et al.*, "Expression and Secretion Vectors for Yeast", in Method in Enzymology, Vol. 153, pp. 516-544m eds. Wu & Grossman, 3 1987, Acad. Press, N.Y. (1987); Glover, DNA Cloning, Vol. II, Ch. 3, IRL Press, Wash., D.C. (1986); Bitter, "Heterologous Gene Expression in Yeast", Methods in Enzymology, Vol. 152, pp. 673-684, eds. erger & Kimmel, Acad. Press, N.Y. (1987); 및 The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, eds. Strathem *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Vols. I 및 II (1982)). ADH 또는 LEU2와 같은 지속적인 효모 프로모터, 또는, GAL과 같은 유발성 프로모터도 사용할 수 있다 ("Cloning in Yeast", Rothstein, R., In: *DNA Cloning, A Practical Approach*, Vol. 11, Ch. 3, ed. D.M. Glover, IRL Press, Vols. I 및 II (1986)). 이중 조직의 재조합을 통해, 효모의 염색체로의 외부의 핵산 서열 삽입을 촉진시키는 벡터는 해당 분야에서 잘 알려져 있으며, 사용되고 있다. 효모의 인공적인 염색체(YAC)는, 삽입된 폴리뉴클레오티드가 더욱 상업적인 효모 발현 벡터로 사용되기엔 너무 클 때만(12kD 이상) 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 세포외에서 발현을 위해 발현 벡터에 삽입되거나(상업적으로 통용되는 세포외의 전사 및/또는 번역 키트를 사용하여), 세포내에서 적당한 세포, 기관, 조직, 생물체로 적당한 핵산을 전달함으로써, 원핵생물이나 진핵생물에서의 발현을 촉진시키는 프로모터 서열을 가지고 있는 발현 벡터로 삽입될 수 있다.

[0097] 여기에서 언급한 대로, "형질전환된(transgenic)"은 숙주로 폴리뉴클레오티드를 삽입하는 기술이며, 세포에서 발전한 생명체의 부분이 되는 것이다. 트랜스유전자(transgene)는, 선택된 DNA의 발현에 필요한 인트론과 같은 다른 DNA와 하나 또는 그 이상의 프로모터 및 촉진자 서열을 포함할 수 있다. 트랜스유전자는 형질전환된 생물체에 대해 전체적 혹은 부분적으로 이중 조직인 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 생명체의 내인성 유전자와 유사한 유전자를 나타낸다. 트랜스유전자는 숙주 세포의 게놈에 삽입될 수 있고, 자가-복제 플라스미드로 유지될 수도 있다.

[0098] 여기에서 사용된, "숙주세포(host cell)"는 번식되고, 전사하거나 혹은 발현된 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 유도된 세포이다. 이 개념은 특정 숙주세포의 자손을 포함한다. 복제동안 돌연변이가 생기므로, 모든 자손은 모세포와 동일하지 않다. 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 재조합 박테리오파지, 플라스미드 핵산, 또는 코스미드 핵산 발현 벡터로 형질전환시킨 박테리아; 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환 시킨 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터(꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus), CaMV; 담배 모자이크병 바이러스(tobacco mosaic virus)) 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(Ti 플라스미드)로 감염시킨 식물 세포 체계; 재조합 플라스미드 발현 벡터(배큐로바이러스(baculovirus))로 감염시킨 곤충 세포 체계 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(레트로바이러스, 아데노바이러스, 백시니아바이러스)로 감염시킨 동물 세포 체계, 또는 안정된 발현을 위해 가공된 형질전환 동물 세포 체계.

[0099] 발명의 폴리펩티드를 장기간 발현시키기 위해, 안정된 발현이 우선된다. 그래서, 바이러스의 복제 기원을 가진 발현 벡터를 사용하여, 세포를 적당한 조절 요소(프로모터/촉진자 서열, 전사 종결자, 다폴리아데닌 결합 위치

(polyadenylation), 등)에 의해 조절되는 핵산으로 형질전환하였다. 특정 이론에 따라 결합하거나 제한되길 바라지 않더라도, 포유동물 세포에서 발현 벡터의 안정된 유지는 숙주 세포의 염색체로 벡터가 삽입됨으로써 일어나는 것으로 추정된다. 부가적으로, 발현벡터는 선택적인 압력에 대해 저항을 주는 선별된 표시(selectable marker)나, 어느 유전자가 유도될지 세포에 알려줌으로써 확인되고, 자라며, 확장될 수 있게하는 벡터를 세포가 가지게하는 리포터를 암호화하고 있는 유전자를 가지고 있다. 여기에서 명시한 바와 같이, "리포터 유전자(reporter gene)"은 유전자의 발현이 분석될 수 있다는 것을 의미한다; 제한없이 그러한 유전자는 lacZ, 효모의 LEI2 유전자와 같은 아미노산 생합성 유전자, 루시페레이즈(luciferase), 또는 포유동물의 클로로암페니콜 트랜스퍼레이즈(chloramphenicol transacetylase) 유전자를 포함한다. 리포터 유전자는 염색체에 삽입되거나 자동적으로 복제하는 플라스미드(효모의 2 마이크로 플라스미드)에 옮겨질 수도 있다. 선별된 표시는 발명의 폴리뉴클레오티드를 가진 첫번째 벡터와 함께 숙주 세포에 감염되는 두번째 벡터에 있을 수 있다.

[0100] 아미노글리코시드 G418에 대한 내성을 지닌 네오마이신 유전자(*neomycine gene*) (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1981)) 및 하이그로마이신(hygromycin)에 대한 내성을 가진 하이그로마이신(*hygromycin*)(Santerre *et al.*, *Gene*, 30: 147 (1984))을 포함한 다양한 선별 체계가 사용될 수 있지만, 그것에 의해 제한을 받지 않는다. 최근, 추가된 선별 유전자는 소위, 세포가 트립토판이 있는 곳에서 인돌을 사용할 수 있게 하는 *trpB*,; 히스티딘이 있는 곳에서 히스티놀을 사용할 수 있게 하는 *hisD*(hartman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8047 (1998)); 및 올니틴 디카르복시레이즈 억제제(ornithine decarboxylase inhibitor), 제초제(2-(difluoromethyl)-DL-ornithine), DFMO에 대한 내성을 주는 ODC(ornithine decarboxylase)(McConlogue, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. (1987)).

[0101] 여기에서 사용된, "형질전환(transformation)"은 외부의 폴리뉴클레오티드가 세포로 주입됨에 따라 나타나는 유전적 변화를 언급한다. 그래서, "형질전환된 세포(transformed cell)"은 재조합의 기술에 의해 주입된 폴리뉴클레오티드를 가진 세포나 그 자손을 가르킨다. 형질전환된 세포는 전체 인류를 포함하지는 않는다. 숙주 세포의 형질전환은 해당 분야에서 잘 알려진 상용적인 기술에 의해 이루어진다. 숙주 세포가 진핵생물인 경우, DNA 형질전환 방법은 인산칼슘(calcium phosphate), 현미주사(microinjection), 전기적 주입(electroporation), 리포솜(liposome), 및 바이러스 벡터를 포함한다. 원핵세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 및 그의 단편들과 여기에서 명시하거나 해당 분야에서 잘 알려진 선별된 표시를 암호화하고 있는 2차의 DNA 분자로 공동형질전환함으로써 가능하다. 다른 예는 일시적으로 감염시키거나 진핵 세포를 형질전환하여 단백질을 발현시키기 위해 원숭이바이러스(simian virus)나 소유두종바이러스(bovine papilloma virus)와 같은 진핵 바이러스 벡터를 사용한 것이다.(Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed. (1982)). 숙주가 원핵(대장균)인 경우, 기하급수적인 성장을 지나 모여진 뒤, 해당 분야에서 잘 알려진 절차에 따라 염화칼슘방법으로 재빨리 처리하여, DNA를 받아들일 수 있는 컴피던트 세포(competent cell)를 제조한다. 원핵세포의 형질전환은 숙주가 원생생물과 융합됨으로 수행될 수도 있다.

[0102] 키메라릭 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 발명과 같은 물질을 가진 발현 벡터는 보통의 방법을 통해 리포솜 안으로 들어가, 세포나 생물체에 들어가게 된다. 양이온을 지닌 리포솜은 폴리뉴클레오티드를 전달할 때 유용하다. 세포내 혹은 세포밖에서 단백질과 폴리뉴클레오티드를 포함한 다양한 조성물을 유도하는데 리포솜을 사용하는 것은 해당 분야의 기술을 가진 사람들에게는 잘 알려져 있다(예를 들어, U.S. Patent Nos. 4,844,904, 5,000,959, 4,863,740 및 4,975,282).

[0103] 리포솜은, 세포의 수용체에 해당하는 것으로 밝혀진 폴리펩티드같은 리간드의 리포솜 제조할 때 추가하여 목적된 조직이나 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, CD4+ 세포에 감염되는 바이러스의 경우, CD4+ 세포는 적절한 목표이며, HIV gp120은 여기서 언급한 폴리펩티드 서열 및 키메라릭 폴리펩티드를 포함하는 리포솜의 세포내로의 유입에 적당한 리간드이다. 모노클로날 항체는 약물 표적화에도 사용될 수 있다; 다양한 세포 표면 단백질에 특이적인 많은 항체들은 해당 분야의 기술을 가진 사람들에게는 잘 알려져 있으며, 이용될 수 있다. 선별된 리간드는 준비된 리포솜의 지질에 공유적으로 결합하거나 리포솜 제조중에 유입될 수 있다(Lee & Low, *J. Bio. Chem.*, 269:3 198 (1994); Lee & Low *Biochem. Biophys. Acta*, 1233: 134 (1995)).

[0104] 본 발명에 의한 등가물을 암호화 하고 있는 키메라릭 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 모든 생물체에 유입될 수 있다. 특히, 공동 수용체에 결합하는 바이러스의 코트 폴리펩티드를 포함하는 키메라릭 폴리펩티드의 경우, 본 발명의 키메라릭 폴리펩티드를 발현하는 형질전환 동물은 발현된 키메라릭 폴리펩티드가 그에 해당하는 바이러스의 감염을 억제하거나 방지하는지를 알게 할 뿐 아니라, 키메라의 장기적 발현의 효과를 연구하는데 유용하다.

- [0105] 그래서, 다른 실시예에서, 본 발명은 키메라 폴리펩티드를 발현하는 비인간적 형질전환 동물을 제공한다. 우선된 동물은 그에 해당하는 수용체 폴리펩티드의 서열이 알려져 있으므로 바이러스의 감염에 민감하다. 인간이 아닌 영장류(침팬지, 유인원, 긴팔원숭이, 오랑우탄, 등), 가축, 등 여기에서 기술된 포유류를 포함하여 우선된 동물은 면역결핍 바이러스에 감염되기 쉬운 것들이다.
- [0106] "형질전환 동물(transgenic mice)"은 세포이하의 단계에서 재조합 바이러스를 현미주사하거나 감염시켜 유전적 조작을 유발함으로써, 체세포 또는 배선 세포가 직·간접적으로 받은 유전적 정보를 가지고 있는 동물을 언급한다. "형질전환된(transgenic)"은 유전적으로 조작된 형질전환 동물로부터 얻은 세포나 조직("transgenic cell", "transgenic tissue")도 포함한다. 본 문맥에서, 형질전환 동물은 전통적인 하이브리다이제이션나 세포외 수정을 통해 생산된 동물은 포함하지 않으며, 오히려, 하나나 둘이상의 세포가 재조합 DNA 분자를 받은 동물을 지칭한다. 형질전환 동물은 트랜스유전자를 지닌 이형접합체이거나 동형복합체일 수 있다. 형질전환 동물을 만드는 방법은 해당 분야에서 잘 알려져 있다(예를 들어, U.S. Patent Nos. 5,721,367, 5,965,977, 5,650,977, 5,650,298 및 5,614,396).
- [0107] 이하에서 설명되는 키메라 폴리펩티드는 항체와 같은 추가적인 시약을 만들어 내기 위해 이용될 수 있다. 발명의 항체는 이하에서 기술된 다양한 치료법에 유용하다. 예를 들어, 면역성이 생긴 특정대상(subject)에서 생산된 항체는 그 특정대상을 바이러스 감염에 대하여 보호할 수 있거나 또는, 택일적으로, 수령 대상(recipient subject)에 옮겨질 수 있고, 이를 통해 수동적으로 이차 특정대상을 감염으로부터 보호할 수 있다. 바이러스 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 폴리펩티드 서열 사이의 복합체 형성에 노출된 에피토프와 결합하는 항체가 또한 만들어질 수 있다. 또한, 발명의 항체는 진단 방법(diagnostic method), 정제 방법(purification method), 및 스크리닝 방법(예를 들어, 숨은 에피토프, 공동 수용체 등)에 이하에서 개시되는 바와 같이 유용하다.
- [0108] 따라서, 본 발명에 따르면, 이하에서 개시되는 바와 같이 복합체 형성에 노출된 숨은 에피토프에 특이적인 항체를 포함하는, 키메라 폴리펩티드와 결합하는 항체가 제공된다. 일 실시예에서, 항체는 생체 밖에서 다수의 바이러스 단리체(isolate) 및 다른 지리학적인 계통(geographic clade)("폭넓은 중화(broadly neutralizing)"로 명명함)으로부터 유래한 바이러스들을 중화시킨다. 다른 실시예에서, 항체는 생체 밖에서 또는 생체 내에서 바이러스 감염을 저해, 방해 또는 저지한다. 상기 실시예들의 다양한 견지에서, 중화된(neutralized) 바이러스는 이하에서 개시되는 HIV-1 및 HIV-2 면역결핍 바이러스를 포함하는 면역결핍 바이러스이다. 폴리클로날 항체, 다른 에피토프 특이체(specificities)들의 뭉쳐진(pooled) 모노클로날 항체를 포함하는 항체와 독특한 모노클로날 항체 제조 또한 제공된다.
- [0109] 키메라 폴리펩티드에 대한 항체가 동물에 키메라 폴리펩티드를 투여하는 방법에 의해 생산된다. 항체는 종래의 알려진 기술에 따른 방법을 이용해 생산되고, 분리되고 또한 정제될 수 있다. 그리하여, 다른 일 실시예에서, 발명은 키메라 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 키메라 폴리펩티드를 특정대상에 투여하는 단계 및 키메라 폴리펩티드에 결합하는 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 생산된 항체는 바이러스 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 폴리펩티드 서열 사이의 결합에 노출된 숨은 에피토프와 결합한다.
- [0110] 바람직하게, 항체는 바이러스 코트 폴리펩티드 서열(예를 들어, 외피 폴리펩티드 서열)과 수용체 폴리펩티드 서열이 서로 결합할 때, 노출된 숨은 에피토프에 결합한다. 예를 들어, HIV 외피 폴리펩티드 서열 gp120은 CD4 수용체 폴리펩티드 서열에 결합하는 숨은 에피토프를 노출하고, 노출된 에피토프에 대한 항체가 HIV의 폭넓은 중화를 일으킨다. 상기 에피토프들은 다른 바이러스 분리체 및 상기 에피토프를 향하는 항체들의 폭넓은 스펙트럼의 중화 활성을 위한 지리학적인 계통 어카운팅(accounting) 사이에서 분배될 수 있다.
- [0111] 이론적으로 기초하지 않더라도, CD4 결합의 부존재 하에서, 숨은 에피토프가 노출되지 않거나 항원성이 아닌 것으로 나타난다. 이하에서 이용되는 바와 같이, "에피토프(epitope)"는 항원에서 항체의 파라토프(paratope)에 결합하는 항원성 결정체(determinant)를 가리킨다. 에피토프의 결정체는 대개 아미노산 또는 탄수화물 곁사슬(side chain)과 같은 분자들의 화학적으로 활성이 있는 표면 그룹들로 구성되고, 대개 전하 특이성 뿐만 아니라 삼차원 구조 특이성을 가진다. 이하에서 사용되는 바와 같이, "숨은(cryptic)"은 식별가능하게 되기 위한 특색 또는 성질을 위해 구조적이거나 형태학적인 변화를 필요로 하는 성질 또는 특색(feature)을 가리킨다; 변화의 부존재하에서, 특색 또는 성질은 "감춰져(hidden)" 있다. 숨은 에피토프는 바이러스 코트 단백질 또는 수용체 폴리펩티드 서열에 존재할 수 있다.
- [0112] "항체(antibody)" 는 그 단편 뿐만 아니라 손상되지 않은 분자를 포함한다. 예를 들면, 이하에서 설명되는 키메라 폴리펩티드에 존재하는 에피토프 결정체에 결합할 수 있는 Fab, F(ab'), 및 Fv가 포함되는 것이다. 다른 항

체 단편들이 단편이 선택적으로 그 항원에 결합하는 능력을 보유하는한 포함된다. 본 발명의 항체 단편(예를 들어, Fab, F(ab'), 및 Fv)은 전체 항체의 펩신 분해(pepsin digestion)와 같은 항체의 단백질을 분해하는 가수 분해(proteolytic hydrolysis)에 의해 제조된다. 개시된 키메릭 폴리펩티드에 결합하는 항체는 손상되지 않은 키메릭 폴리펩티드 또는 그 단편을 면역화하는 항원(immunizing antigen)으로서 이용하여 준비될 수 있다. 키메릭 폴리펩티드 단편의 경우에, 바이러스 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 폴리펩티드 시퀀스가 서로 결합하여 존재하는 숨은 에피토프가 노출되도록 하는 능력을 보유하는 것이 바람직하다. 동물을 면역시키기 위해 이용되는 키메릭 폴리펩티드는 번역된(translated) 폴리뉴클레오티드로부터 유래하거나 화학적으로 합성된다. 또한, 바람직하게는 담체와 결합(conjugate)하여 사용될 수 있다. 상기의 통상 이용되고, 면역화시키는 펩티드에 화학적으로 결합하는 담체는 예를 들어, KLH(keyhole limpet hemocyanin), 타이로글로불린(thyroglobulin), BSA(bovine serum albumin), 및 파상풍 독소이드(tetanus toxoid)를 포함한다.

[0113] 모노클로날 항체들은 본 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려진 방법에 의해 만들어진 다(Kohler et al., *Nature*, 256:495(1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, P. 726, eds. Cold Spring Harbor Pub.(1988)). 간략히 말하면, 모노클로날 항체는 항체를 포함하는 조성물을 쥐(mice)에 주사하고, 혈청(serum) 샘플을 분석함에 의해 항체 생산의 존재를 확인하고, B 림프구를 얻기 위하여 비장(spleen)을 제거하고, B 림프구를 미엘로마 세포(myeloma cell)와 접합시켜 하이브리도마(hybridoma)를 생산하고, 하이브리도마를 클론하고, 항원에 대한 항체를 생산하는 양성의 클론을 선택하고, 하이브리도마 배양액으로부터 항체를 분리함으로써 얻어질 수 있다. 모노클로날 항체는 예를 들면 단백질-A-세파로스(Protein A Sepharose)를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography), 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography), 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)(Coligan et al., "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters," In: *Current Protocols in Immunology*, §§ 2.7.1-2.7.12 and §§ 2.9.1-2.9.3; and Barns et al., "Purification of Immunoglobulin G(IgG)," In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, p. 79-104, Humana Press(1992)참조)와 같은, 다양한 정립된 기술에 의해 하이브리도마 배양액으로부터 분리되고 정제될 수 있다. 폴리클로날 항체의 제조는 당업자에게 잘 알려져 있다(Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," In: *Immunochemical Protocols*, pp. 1-5, Manson, ed., Humana Press(1992); Harlow et al.(1988), *supra*; and Coligan et al.(1992), *supra* § 2.4.1 참조).

[0114] 치료학적인 목적을 위해, 하나의 종에서 생산된 키메릭 폴리펩티드에 대한 항체는 예를 들어, 수동면역을 위해 숙주에 투여되었을 때, 항체가 면역 반응을 유도하지 않도록 인체에 적응시킬 수 있다. 일반적으로, 인체에 적응시킨 항체들은 비-인간 불변 부위(constant region)를 인간 불변 부위로 대체함으로써 생산된다. 상기 항체 인간화 방법은 본 발명의 기술분야에 알려져 있고, 특히 본 발명에 유용하다(Morrison et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 685 1(1984); Takeda et al., *Nature*, 314:452(1985); Singer et al., *J. Immunol.*, 150:2844(1993)).

[0115] 키메릭 폴리펩티드에 결합하는 항체, 특히 숨은 에피토프에 결합하는 항체는 바이러스를 생체 밖 또는 생체 내(즉, 특정대상내에서)에서 중화시킬 수 있다. 상기 항체는 그리하여 생체 밖 또는 생체 내에서 바이러스 감염을 방해하거나 저해할 수 있는 것이고, 감염과 연관된 일부 또는 모든 증상을 개선할 수 있는 것이다. 상기 항체는 한 특정 대상에서 생산되고 수동적 면역치료를 위해 다른 대상으로 도입될 수 있다. 선택적으로, 특정 대상에서 생산될 때, 키메릭 폴리펩티드에 결합하는 그 특정대상을 감염으로부터 보호하거나 감염과 연관된 일부 또는 모든 증상을 개선시켜준다.

[0116] 따라서, 본 발명에 따르면, 특정 대상에서의 바이러스 감염을 저해, 방해 및 개선하는 방법이 제공된다. 일 실시예에서, 본 발명의 방법은 키메릭 폴리펩티드에 결합하는 항체를 특정대상에 유효량 투여하여, 특정 대상에서 바이러스 감염을 방해하거나 저해하는 단계를 포함한다. 다른 일 실시예에서, 본 발명의 방법은 키메릭 폴리펩티드를 특정 대상에 유효량 투여하여, 특정 대상에서 바이러스 감염을 방해하거나 저해하기에 충분한 면역 반응을 생산하는 단계를 포함한다. 또 다른 일 실시예에서, 본 발명의 방법은 특정 대상에 본 발명의 키메릭 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 유효량 투여하는 단계를 포함한다. 다양한 견지에서, 키메릭 폴리펩티드는 이하에서 개시되는 바와 같이, 면역결핍 바이러스 외피 폴리펩티드를 함유한다.

[0117] 키메릭 폴리펩티드 또는 키메릭 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 투여된 특정 대상에서 바이러스 감염을 저해하고, 방해하고, 개선하는 방법에서, 면역 반응은 또한 생산될 수 있다. 면역 반응은 키메릭 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 투여가 CTL 반응을 유도할 것이라도, 자연적으로 체액성이 되기 쉽다. 또한

본 발명의 방법은 적당하게 다른 바이러스 치료와 함께 이용될 수도 있다.

- [0118] "유효량(effective amount)"은 특정 대상에서 바이러스 감염을 저해, 방해 또는 개선하기에 충분하거나 또는 특정 대상에서 면역 반응을 유도하기에 충분한 것을 가리킨다. 따라서, 유효량의 키메릭 폴리펩티드는 폴리펩티드 또는 코트 단백질이 있는 바이러스에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 이미 바이러스에 감염된 특정 대상에 투여된 유효량은 또한 바이러스 부하(viral load)를 감소시키거나 CD4 세포의 수를 증가시킬 수도 있다. 유효량은 감염된 특정 대상에서 다른 대상(미감염된 또는 감염된)으로의 이동을 저해할 수도 있다.
- [0119] 키메릭 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 특정 대상에 투여되는 본 발명의 방법에서, 키메릭 폴리펩티드에 대한 CTL 반응이 대응 코트 폴리펩티드 서열을 함유하는 바이러스에 대하여 유도될 수 있다.
- [0120] 본 발명의 키메릭 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 항체가 인간을 포함하는 특정 대상에 투여되는 것과 함께, 본 발명은 또한 개시된 키메릭 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 항체를 포함하는 제약학적 공식을 제공한다. 특정대상에 투여되는 조성물은 따라서 "제약학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)" 또는 "생리적으로 허용가능한(physiologically acceptable)" 공식화가 될 것이다.
- [0121] 이하에서 이용되는 바와 같이, "제약학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)" 및 "생리적으로 허용가능한(physiologically acceptable)"은 바람직하게는 과도한 부작용(메스꺼움(nausea), 두통 등)없이, 특정 대상에 투여되는 담체(carrier), 희석제(diluents), 첨가제(excipients) 등을 가리킨다. 투여를 위한 상기 제제는 무균의 수용성 또는 비수용성 용액, 현탁액(suspension), 및 에멀전(emulsion)을 포함한다. 비수용성 용매의 예는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸 올레이트(ethyl oleate)와 같은 주사가능한 유기 에스테르가 있다. 수용성 담체는 물, 알콜성/수용성 용액, 에멀전, 또는 현탁액을 포함하고, 이는 염류(saline) 및 완충매체(buffered media)를 포함한다. 운반체(vehicle)는 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로스(Ringer's dextrose), 덱스트로스 및 염화나트륨, 유산염 링거 (lactated Ringer's) 또는 고정된 오일(fixed oil)을 포함한다. 정맥 주사(intravenous)의 운반체는 유동체(fluid) 및 영양 보충제(nutrient replenishers), 전해질 보충제(electrolyte replenishers) 등을 포함한다. 또한 예를 들어, 항균제, 항-산화제, 킬레이팅제, 및 불활성 가스 등과 같은 보존제 (preservatives) 및 다른 첨가제(additive)가 존재할 수 있다. 당업자에게 알려진 다양한 제약학적 공식화는 특정 대상으로서의 투여에 적당하도록 본 발명의 방법에 적용가능하다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1990); and The Merck Index, 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ(1996)).
- [0122] 작용 기간의 조절 또는 투여된 조성물의 통제된 운반(delivery)은 입자(particle) 또는 폴리에스테르(polyester), 폴리아민산(polyamine acids), 하이드로겔(hydrogel), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 에틸렌-비닐아세테이트(ethylene-vinylacetate), 메틸셀룰로스(methylcellulose), 카르복실메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose), 프로타민 설페이트(protamine sulfate) 또는 락타이드/글리콜라이드 코폴리머(lactide/glycolide copolymers), 폴리락타이드/글리콜라이드 코폴리머(poly lactide/glycolide copolymers), 또는 에틸렌비닐아세테이트 코폴리머(ethylene-vinylacetate copolymers)와 같은 중합체(polymeric substance)로의 조성물의 삽입으로써 달성될 수 있다. 조성물의 방출률(rate of release)는 상기 거대분자의 농도 또는 조성을 변경함으로써 조절될 수 있다. 콜로이드 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노-캡슐, 마이크로스피어(microspheres), 비드(bead) 및 오일-인-워터(oil-in-water) 에멀전, 미셀(micelles), 혼합미셀, 및 리포솜(liposome)을 포함하는 지질 기반 시스템을 포함한다.
- [0123] 본 발명의 방법에 따른 투여되는 조성물은 비경구적으로(parenterally) 주사에 의해, 시간에 따른 점차적인 확산에 의해, 또는 환약(bolous)에 의한 투여(예를 들어, 바늘로 찔려 초래된 HIV감염에 대한 수동적 보호의 경우) 또는 미세이식장치(microfabricated implantable device)에 의해 투여될 수 있다. 조성물은 흡입(inhalation), 정맥주사로, 복막내로(intraperitoneally), 근육내로(intramuscularly), 피하로(subcutaneously), 체내(intracavity)(예를 들면, 질(vaginal) 또는 항문(anal))로, 피부를 통하여(transdermally), 국부적으로(topically), 또는 혈관내로(intravascularly) 투여될 수 있다. 조성물은 많은 양이 투여될 수 있다. 바이러스 감염 또는 전이를 치료, 저해, 방해하기 위하여, 또는 면역 반응을 유도하기 위하여 필요한 분량(dose) 또는 "유효량"은, 감염의 진행 또는 악화를 방해하는 것이 HIV를 포함하는 많은 바이러스 감염에 만족스러운 결과를 가져오지만, 바람직하게 감염 증상의 일부 또는 전부를 개선하기에 충분한 것이다. 유효량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다(예를 들면, Ansel et al., Pharmaceutical Drug Delivery System, 5th ed.(Lea nd Febiger(1990), Gennaro ed.))

- [0124] 본 발명의 키메릭 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 항체는 또한 진단 목적을 위해 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 감염에 대한 공동 수용체를 이용하는 바이러스로부터 유래된 바이러스 코트 폴리펩티드 서열을 가지는 키메릭 폴리펩티드는 키메릭 폴리펩티드에 대한 감소된 결합 친화도를 가지는 공동 수용체를 발현하는 특정 대상을 동정하는데 이용될 수 있다. 감소된 결합 친화도를 가지는 특정대상은 바이러스에 의해 감염되는 위험이 감소될 것이다. 택일적으로, 키메릭 폴리펩티드에 증가된 결합 친화도를 가지는 공동 수용체를 발현하는 특정대상은 바이러스 감염에 대한 위험도가 증가될 것이다. 이러한 방법으로, 감소되거나 증가된 바이러스에 감염의 위험을 가지는 특정 대상은 동정될 수 있다. 예를 들면, HIV gp120-CD4를 포함하는 키메릭 폴리펩티드에 대한 증가되거나 감소된 친화도를 가지는 CCR5 또는 CXCR4 공동 수용체를 발현하는 특정 대상은 HIV 감염의 위험이 각각 증가되거나 감소될 것이다. 따라서, 상기 방법은 또한 예측(prognosis); 낮은 예측도를 가지는 공동 수용체에 높은 친화도로 결합하는 특정대상에 또한 유용하다.
- [0125] 공동 수용체를 이용하는 바이러스의 바이러스 코트 폴리펩티드 서열을 가지는 본 발명에서 개시된 키메릭 폴리펩티드의 경우, 상기 키메릭 폴리펩티드는 공동 수용체로의 바이러스의 결합을 조절하는 물질을 동정하는데 유용하다. 상기 키메릭 폴리펩티드는 또한 키메릭 폴리펩티드 내에서, 분자내 상호작용/바이러스 코트 폴리펩티드 서열의 수용체 서열과의 결합을 조절하는 물질의 동정에 유용하다. 따라서, 공동 수용체를 이용하지 않는 바이러스의 코트 폴리펩티드를 함유하는 본 발명의 키메릭 폴리펩티드는 키메릭 분자 내에서, 코트 서열의 수용체 서열과의 결합을 조절하는 물질을 동정하는데 이용될 수 있다.
- [0126] 따라서, 본 발명에 따르면, 바이러스와 바이러스 공동 수용체와의 결합을 조절하는 물질을 동정하는 방법 및 바이러스와 바이러스 수용체와의 결합을 조절하는 물질을 동정하는 방법을 제공한다.
- [0127] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 방법은 키메릭 폴리펩티드를 키메릭 폴리펩티드와 공동 수용체 폴리펩티드가 테스트 물질의 존재 및 부존재하에서 결합할 수 있도록 하는 조건하에서, 공동 수용체 폴리펩티드와 접촉시키는 단계, 및 테스트 물질의 존재 및 부존재하에서 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 다른 일실시예에서, 본 발명의 방법은 분자내 복합체를 형성하는 키메릭 폴리펩티드를 테스트 물질과 접촉시키는 단계, 및 키메라 내에서 바이러스 코트 폴리펩티드 서열과 수용체 폴리펩티드 서열 사이의 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 테스트 물질의 존재하에서, 결합의 감소는 바이러스와 바이러스 공동 수용체 또는 수용체 사이의 상호작용/결합을 저해하는 물질을 동정할 수 있게 한다. 테스트 물질의 존재하에서 증가된 결합은 바이러스와 바이러스 공동 수용체 또는 수용체 사이의 상호작용/결합을 자극하는 물질을 동정할 수 있게 한다.
- [0128] 상기 접촉은 용액, 고체상, 손상되지 않은 세포, 또는 인간이 아닌 영장류와 같은 생물체 내에서 일어날 수 있다. 다양한 실시예에서, 바이러스는 HIV와 같은 면역결핍 바이러스이고, 공동 수용체는 CCR5 또는 CXCR4와 같은 케모카인(chemokine)이다. 세포 침투(penetration)에 필요한 공동 수용체를 이용하는 바이러스들의 결합은 이후의 감염, 바이러스 증식, 및 그로부터 초래되는 궁극적인 병리학상(pathological) 증상의 유발에 중요한 단계이다. 따라서, 다른 실시예에서, 바이러스 감염과 연관된 증상을 개선하는 물질 뿐만아니라, 바이러스 세포 침투, 감염, 및 증식을 저해하는 물질을 동정하는 방법이 제공된다. 그러한 물질을 동정하는 본 발명의 방법에서, 테스트 물질은 키메릭 폴리펩티드를 공동 수용체 폴리펩티드와 접촉시킨 후, 또는 택일적으로, 키메릭 폴리펩티드를 공동 수용체 폴리펩티드에 접촉시키기 전에 첨가될 수 있다.
- [0129] 후보 물질은 항체, 항바이러스제, 공동 수용체 폴리펩티드 서열(예를 들면, CCR5 또는 CXCR4로부터), 펩티도미메틱제(peptidomimetics) 또는 그 활성있는 단편을 포함한다. 후보물질은 또한 50 이상, 25,000 달톤(dalton) 이하의 분자량을 가진 작은 유기 화합물과 같은 유기 분자를 포함하는 많은 화학 군(class)을 포함한다. 후보 물질은 단백질과의 구조적인 상호관계, 구체적으로는 수소결합을 위해 필수적인 작용기(functional group)를 포함하고, 전형적으로 적어도 아민(amine), 카르보닐(carbonyl), 히드록실(hydroxyl) 또는 카르복실기(carboxyl), 바람직하게는 적어도 작용화학기 중의 둘을 포함한다. 후보 물질은 종종 상기 작용기와 하나 또는 그 이상이 치환된 고리모양의 탄소 또는 이종고리 구조, 및/또는 아로마틱(aromatic) 또는 폴리아로마틱(polyaromatic) 구조를 포함한다. 후보물질은 또한 펩티드, 당류(saccharides), 지방산 스테로이드, 퓨린, 피리미딘, 유도체, 구조적인 유사체, 또는 그 결합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는 생분자(biomolecule) 중에서 발견된다.
- [0130] 후보 물질은 합성 또는 자연 화합물이 라이브러리를 포함하는, 폭넓은 다양성의 출처(source)로부터 얻어진다. 예를 들어, 무작위적인 수많은 수단이 가능하고 폭넓은 다양성 유기 화합물 및 생분자의 합성을 지시하는데, 무작위적인 올리고뉴클레오타이드 및 올리고펩티드의 발현을 포함한다. 택일적으로, 박테리아, 균류의 (fungal), 식물, 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리는 이용할 수 있고 쉽게 생산된다. 부가적으로, 천연의 또는 합성된 라이브러리 및 화합물은 종래의 화학적, 물리적, 및 생화학적 방법에 의해 쉽게 변형되고, 결합하여

만든 라이브러리를 생산하는데 이용될 수 있다. 알려진 약제(pharmacological agent)는 아실레이션(acylation), 알킬레이션(alkylation), 에스터레이션(esteration), 아마디피케이션(amidification), 등의 무작위적인 화학적 변형을 지시하여 구조적인 유사체를 생산한다. 결합을 검출하는 방법에서, 하나 또는 그 이상의 분자가 표지(label)와 결합할 수 있는데, 표지는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 제공한다. 다양한 표지는 방사성 동위원소(radioisotopes), 형광물질(fluorescers), 화학발광물질(chemilumescers), 효소, 특이적 결합 물질, 입자, 예를들어 자기 입자,등을 포함한다. 특이적 결합 물질은 비오틴(biotin)과 스트렙타비딘(streptavidin), 디작신(digoxin)과 안티디작신(antidigoxin), 등의 쌍을 포함한다. 특이적인 결합 구성물에는, 검출을 위해 보완적인(complementary) 구성원이 보통 검출을 위해 알려진 방법에 따라 제공되는 분자로 표지되어 있다.

[0131] 다양한 다른 시약 분석에 포함될 수 있다. 여기에는 적정 단백질-단백질 결합을 촉진하기 위해 그리고/또는 비 특이적이거나 배경인 상호작용을 감소시키는데 사용되는 염(salts), 중화 단백질(neutral protein), 예로, 알부민, 세제, 등이 포함될 수 있다. 분석의 효율을 개선하는, 단백질 분해효소(protease) 저해제, 뉴클레아제 저해제(nuclease inhibitor), 항균제(anti-microbial agent), 등과 같은 시약이 이용될 수 있다. 성분(component s)의 혼합물이 결합에 필요한 순서대로 첨가되었다. 인큐베이션 시간은 최적의 활성을 위해 선택되었으나 신속하고 높은처리량(throughput)의 스크리닝을 촉진하기 위해 최적화되었다. 바람직하게는 0.1 내지 1 시간이 충분하다.

[0132] 다양한 실시예에서, 바이러스는 이하에서 설명하는 바와 같이, HIV, HTLV, SIV, FeLV, FPV, 또는 헤르페스 바이러스(herpes virus)와 같은 면역결핍 바이러스이다. 부가적인 실시예에서, 공동 수용체는 CCR5, CXCR4, CCR-2b, CCR3, CCR8, V28/CX3CR1, US28(수용체와 같은 케모카인(chemokine)를 코딩하는 바이러스), STRL33/BOB/TYMSTR, GPR1 5/Bonzo, 또는 GPR1 폴리펩티드 서열이다.

[0133] 본 발명에 명시된 방법에 따라 확인된 물질은 생체내 또는 생체밖에서 세포의 감염이나 바이러스의 결합을 방해하는 활성을 검사할 수 있다. 그래서, 본 발명은, 세포에 바이러스가 감염하는 것을 억제하는 물질을 확인하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은, 검사 물질의 존재 유무에 따라, 바이러스에 감염되기 쉬운 세포에 감염 바이러스의 미립자를 붙이고, 검사 물질이 바이러스의 결합 또는 세포의 감염을 억제하는지 결정함으로써, 바이러스의 감염을 억제하는 물질을 확인하는 것을 포함한다. 다양한 실시예에서, 검사 물질은 세포와 감염 바이러스의 미립자를 붙이기 전후에 첨가한다. 또한, 이 방법은 인간을 제외한 영장류와 같은 적당한 동물에서 수행될 수 있다.

[0134] 본 발명에서 설명하는 키메릭 폴리 펩티드는 새로운 공동수용체를 확인하거나 공동수용체로서의 단백질의 특성을 알아보는 데도 유용하다. 이런식으로 바이러스 감염과 그 후 수반되는 바이러스의 병원성에 관해서도 더욱 잘 이해할 수 있고, 감염의 향상된 처리를 가능하게한다. 예를 들어, 새로운 공동수용체를 확인하거나 또는 공동수용체 기능을 특징짓는 방법은 두개의 하이브리드 시스템으로, 이것은 폴리펩티드의 상호작용에 의해 발현이 유도되는 리포터의 활성화를 통한 단백질-단백질 상호작용을 검출할 수 있다. 그러므로, 적절한 키메릭 폴리펩티드를 효모나 포유류의 두개의 하이브리드 시스템에서 미끼 서열로 사용하여 새로운 공동 수용체를 포함하는 상호작용하는 단백질을 확인하기 위하여 라이브러리를 검색할 수 있다. 단백질-단백질 상호반응을 검색할 수 있는 잘 확립된 생화학적 방법(예를 들면, 칼럼 크로마토그래피, 농도경사에 의한 원심분리, 공동면역침전 분석법 등) 또한 새로운 공동수용체를 확인하거나 또는 공동수용체 기능을 특징짓는 데 사용할 수 있다.

[0135] 예를 들어, 공동 수용체 폴리펩티드 절편을 제조하여 적절한 키메릭 폴리펩티드와 절편을 붙여서, 공동 수용체에 결합하는 키메릭 폴리펩티드는 공동 수용체 결합 부위를 확인하는 것에도 유용하다. 이 접촉은 수용액상(공동 침전), 고체면(친화 컬럼), 혹은 본연의 세포(세포의 표면에 있는 공동 수용체의 절편과 접촉하고 공동 수용체 절편이 키메릭 폴리펩티드와 세포간의 결합을 방해하는지 결정)에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 한번 확인된 공동 수용체 결합 자리는 감염을 치료하기위한 항바이러스제로 사용될 수 있다.

[0136] 다르게 정의되지 않으면, 이하에서 사용된 모든 기술적 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 이하에서 서술된 것과 같거나 비슷한 방법 및 재료는 본 발명의 실행 또는 테스트에 이용될 수 있으나, 적절한 방법과 재료는 하기에 서술된다. 모든 출판물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고문헌들은 참고로서 완전히 삽입된다. 모순이 생기는 경우, 본 명세서에 정의를 내려서 조절할 것이다. 또한, 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예로서 사용될 것이고 이로 제한하려는 의도는 아니다. 본 발명에 따른 다른 특색과 장점들은 하기의 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백할 것이다. 이하의 실시예에서는 발명이 보다 자세히 서술되나, 이는 청구범위에 기술된 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

[0137] 실시예 1

[0138] 본 실시예에서는 gp120-CD4 키메라 폴리펩타이드인 FLSC, TsSC, FLSC-R/T 및 RLSC-R/T CD4M9 단일 사슬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 제조방법을 설명한다. 단일사슬복합체를 만드는 기본적인 원리는 gp120의 C-말단과 CD4의 N-말단 사이에 20 내지 30개의 아미노산 연결서열을 배치하는 것이다. Swiss PDB 뷰어를 사용하여 수용성 CD4와 17bFab(Dwong, P.D. *et al.*, 1998, *Nature*, 393:648-59)가 결합되어 변형된 gp120의 결정구조를 분석한 결과, 키메라 분자는 분자간 상호작용을 가능하게 하여 gp120-CD4 복합체를 형성하는 것으로 나타났다. gp120-CD4의 키메라 폴리펩타이드를 코딩하는 단일사슬 뉴클레오티드는 다음 순서에 따라 각각의 유전자서열을 배열함으로써 제조되었다: (1) 5' 말단의 마크로파지-트로픽 HIVs, BaL의 gp120을 코딩하는 합성 코돈; (2) 글라이신, 알라닌 및 세린으로 구성된 20개의 아미노산 연결기를 코딩하는 염기서열; (3) 수용성 CD4 도메인 1과 도메인 2(D1D2)의 염기서열; (4) 3' 말단의 FLSC의 *c-myc* oncogene 유래의 짧은 폴리펩타이드를 코딩하는 서열. FLSC-R/T 염기서열(서열번호: 3)은 gp120의 C-말단에 있는 아르기닌이 트레오닌으로 치환된 단백질(서열번호: 4)을 코딩한다. FLSC-R/T CD4M9(서열번호: 5)는 키메라 폴리펩타이드(서열번호: 6)의 염기서열에서 CD4D1D2 구역이 CD4D1D2 구역과 유사한 기능을 가지는 펩타이드를 코딩하는 CD4M9 서열과 치환된 염기서열을 갖는다. 코돈이 최적화된 gp120 서열은 rev-독립적 형태로 높은 수준으로 발현된다(Hass, J., *et al.*, 1996, *Curr. Biol.*, 6:3 15-24). 인간 CD4 서열은 T4-pMV7으로부터 유래된 것을 사용하였다(Maddon, P.J. *et al.*, 1986, *Cell*, 47:333-48; NIH AIDS Reagent Repository, Bethesda, MD). *myc* 폴리펩타이드 서열은 간편한 분석과 정제 및 키메라 폴리펩타이드와 같은 조작을 수행하였다.

[0139] 상기 각기 다른 서열들로 구성된 완전한 폴리뉴클레오티드는 PCR로 제작되어 강력한 신장 인자 프로모터(EF 1: elongation factor 1)가진 발현벡터인 pEF6(Introgen co., USA)에 삽입하였다. 다른 면역결핍 바이러스의 유전자들과 삽입 유전자를 간편하게 교환하기 위한 제한효소부위들을 상기 플라스미드(pEF6-SCBa1로 명명)에 삽입하였다.

[0140] 요약하면, FLSC분자는 플라스미드 pMR1W1-9과 T4-pMV7을 주형으로하여 PCR을 통하여 제조하였다. gp120에 대한 forward 프라이머는 GGG-GGT-ACC-ATG-CC-ATG-GGG-TCT-CTG-CAA-CCG-CTG-GCC(서열번호: 7)이며, reverse 프라이머는 GGG-TCC-GGA-GCC-CGA-GCC-ACC-GCC-ACC-AGA-GGA-TCC-ACG-CTT-CTC-GCG-CTG-CAC-GCG-GCG-CTT(서열번호: 8)이었다. CD4에 대한 forward 프라이머는 GGG-TCC-GGA-GGA-GGT-GGG-TCG-GGT-GGC-GGC-GCC-GCT-AAG-AAA-GTG-GTG-CTG-GGC-AAA-AAA-GGG-GAT(서열번호: 9)이며, reverse 프라이머는 GGG-GTT-TAA-ACT-TAT-TAC-AGA-TCC-TCT-TCT-GAG-ATG-AGT-TTT-GTT-CAG-CTA-GCA-CCA-CGA-TGT-CTA-TTT-TGA-GCT-C(서열번호: 10)이었다. 상기 PCR 산물은 *KpnI* 및 *PmeI* 절단부위를 이용하여 pEF6(Introgen Co., USA)에 서브클로닝하였다.

[0141] pEF6-TcSC 플라스미드를 제조하기 위하여, pEF6-FLSC의 gp120 발현 서열의 전체를 불필요한 부분을 없앤 gp120 서열(truncated gp120: DC1DC5DVIV2)로 치환하였다. 상기 truncated gp120은 forward 프라이머 GGG-GGT-ACC-ATG-CCC-ATG-GGG-TCT-CTG-DCC-CCG-CTG-GCC-ACC-TTG-TAC-CTA-CTG-GGG-ATG-CTG-GTC-GCT-TCC-TGC-CTC-GGA-AAG-AAC-GRG-ACC-GAG-AAC-TTC-AAC-ATG-TGG(서열번호: 15)와 reverse 프라이머 GGG-GGA-TCC-GAT-CTT-CAC-CAC-CTT-GAT-CTT-GTA-CAG-CTC(서열번호: 16)을 사용하여 제작하였다. V1구역과 V2구역은 forward 프라이머 GTG-TGC-GTG-ACC-CTG-GGC-GCC-GAG-ATG-AAG-AAC-TGC-AGC-TTC-AAC-ATC-GGC-GCG-GGC-GGC-GGC-CGC-CTG-ATC-AGC-TGC(서열번호 17)와 reverse 프라이머(GCA-GCT-GAT-CAG-GCG-GCC-CGC-GCC-GAT-GTT-GAA-GCT-GCA-GTT-CTT-CAT-CTC-GCC-CGC-GCC-CGC-GCC-CAG-GGT-CAC-GCA-CAG(서열번호: 18)을 사용하여 삭제하였다.

[0142] 상기의 방법으로 제조된 재조합체들을 도 1에 나타내었다. 스페이서 부위(서열번호: 11)를 포함한 BaLgp120(서열번호: 24) 및 CD4D1D2 부위로 구성된 키메라 재조합체를 전신대의 단일 사슬(FLSC)로 나타내었다. 두번째 제작물은 gp120 결정구조를 풀기위하여 사용할 분자와 좀더 유사하게 제작된 복합체이다. 이 제작물은 truncated 단일사슬(TcSC)을 나타내며, $\Delta C1\Delta C5\Delta V1V2$ gp120을 코딩하는 서열이 전신대 서열(full length coding sequence)대신 사용된 것을 제외하고는 FLSC와 같은 구성으로 되어있다(서열번호: 28). BaL gp120의 아미노산 506번이 변이된 FLSC-R/T(서열번호: 30)와 서열번호: 30과 서열번호: 20의 서열로 구성된 FLSC R/T CD4M9 또한 도 1에 나타내었다. 본 실시예에서 사용한 스페이서 부위의 아미노산 서열은 GSSGGGGSGGGSGGGAAA(서열번호: 11)이다.

[0143] 실시예 2

- [0144] 본 실시예에서는 gp120-CD4 키메라릭 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 세포를 감염시키는 방법과 상기 세포에서 발현된 수용성 폴리 펩타이드의 성질 설명하였다. 제조합 pEF6-FLSC 또는 pEF6-TcSC를 Fugene(Boehringer-Manheim, Germany)을 사용하여 293세포에 감염시켰다. 5 μ g/ml의 블라스티시딘(blasticidin)을 선택마커로 사용하여 안정한 감염체를 획득하였다. 획득된 안정한 세포주(293-SC)는 여러 조건에서 배양하였으며, 키메라릭 폴리펩타이드의 생산은 항-gp120 모노클로날항체 또는 항-인간 CD4 폴리클로날 혈청을 사용한 면역블롯을 통하여 확인하였다(Abacioglu Y.H. *et al.*, 1994, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 10:371-81; Deen, K.C. *et al.*, 1998, *Nature*, 331:82-4, Willey, R.L. *et al.*, 1992, *J. Viral.*, 66:226-34; NIH AIDS Reagent Repository).
- [0145] 요약하면, 세포의 키메라릭 폴리펩타이드를 포함하고 있는 배양상층액을 획득하여 SDS-PAGE 로딩버퍼(75mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue, pH 8.3)에서 끓였다. 상기 시료를 4-20% SDS-폴리아크릴아마이드 그라디언트(gradient) 젤을 사용하여 전기영동을 수행하고, 상기 젤을 니트로셀룰로스 막에 트랜스퍼하였다. 니트로셀룰로스 막상의 비특이적 반응은 블러킹 용액(pH7의 tris 버퍼에 2% non-fat milk를 첨가한 용액)으로 30분간 블러킹하였다. 그후 상기 니트로셀룰로스 막은 항-CD4 폴리클로날 토끼 혈청(T4-4; NIH AIDS Reagent Repository, USA) 또는 HIV gp120에 쥐의 모노클로날 항체로 블로팅하였다. 도 2에서 나타난 바와 같이, 상기 감염된 세포는 150kD의 예상 사이즈에서 단백질을 발현하였다. 이 폴리펩타이드는 항-gp120 및 항-CD4 항체에 모두 반응하여, 키메라릭 폴리펩타이드임을 나타낸다.
- [0146] 다른 연구에서, 항 myc항체와의 반응성을 확인하여 상기 150kD의 폴리펩타이드가 키메라릭 폴리펩타이드인 것이 다시 한 번 확인되었다. 게다가 gp120과 CD4DID2/myc tag의 예상 사이즈와 폴리펩타이드의 밴드 일치하였고, 이것은 키메라릭 폴리펩타이드가 스페이스부위에서 절단된다는 것을 나타낸다. 경쟁적 프로테이즈 저해제(Pefabloc; Boehringer-Mannheim, Germany)를 첨가하면 스페이스 부위가 절단되지 않은 키메라릭 프로테이즈를 획득할 수 있었다. 이것은 gp120-CD4의 절단이 세린 프로테이즈에 의해 일어난다는 것을 의미한다. 293-SC 세포주가 생산하는 gp120-CD4 키메라릭 폴리펩타이드의 양은 항 gp120이 내제된 효소면역측정기에서 양의 항gp120항체인 D7324(International Enzymes) 및 gp120 C5구역의 보존된 에피토프에 대한 양의 폴리클로날 IgG와 함께 사용하여 측정하였다(Moore, J.P., 1990, *AIDS*, 4:297-305; Moore, J.P. *et al.*, 1992, *J. Viro.*, 67:863-75, Moore, J.P. *et al.*, 1990, *AIDS*, 4:307-15).
- [0147] 요약하면, 인산버퍼에 녹아있는 2 μ g/ml의 D7324이 포함된 플라스틱 플레이트에 흡수시킨다. 블러킹 용액(pH7의 tris 버퍼에 2% non-fat milk를 첨가한 용액)으로 비특이적 반응을 블러킹시키고, 293-SC 세포주의 배양상층액을 상기 플레이트에 첨가한다. 상기 플레이트의 항gp120혈청과 결합된 키메라릭 폴리펩타이드는 HIV 감염 환자의 불활성화된 혈청 및 horse-radish 과산화효소와 키주게이션된 항 인간 IgG를 사용하여 검출하였다. 293-SC세포주는 약 3 μ g/ml의 gp120-CD4 키메라릭 폴리펩타이드를 분비하였다. 면역블로팅 실험결과 gp120-CD4 키메라릭 폴리펩타이드에 몇개의 절단부위가 있다는 것을 밝혀졌으며, 정제된 단일 사슬의 시료가 교차연결(crosslink)되었으며, 교차연결된 시료로 gp120 및 CD40분자가 계속 연결되어 있는지를 확인하기 위한 분석이 수행되었다. 간단히 말해서, 293-SC세포주가 생산하는 배양상층액의 단일 사슬 gp120-CD4는 면역친화 칼럼(immunoaffinity column)을 사용하여 정제하였다. 상기 칼럼은 항-gp120 인간 모노클로날 항체 A32를 CNBr-활성화 sepharose 4B(Amersham-pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 연결시켜 제작하였다. A32는 gp120의 매우 변이가 많은 에피토프에 특이성을 가지며, CD4과 결합하는 외피를 선택적으로 인지한다. 상기 칼럼에 결합된 gp120-CD40은 pH 2.5의 0.1M 아세트산용액으로 용출하여, 동결건조한 후 PBS(phosphate buffered saline)에서 투석하였다. 단백질 농도는 BCA키트(BioRad, USA)를 사용하여 측정하였다. 20 μ l의 정제된 gp120-CD4를 1mM의 동종양기능성 크로스링커, BS3과 교차결합시킨 후, 교차결합시키지 않은 gp120-CD4와 함께 4-20% 폴리아크릴아마이드 젤로 전기영동하였다. 젤 상에서 분리된 단백질들을 니트로셀룰로스 막에 트랜스퍼하여 항 gp120 모노클로날 항체 알칼라인-포스파테이스로 표지된 항마우스 IgG를 사용하여 면역블로팅하였고, BCIP/NBT(KPL)을 사용하여 발색하였다.
- [0148] 상기 실시예의 결과를 도 3에 나타내었다. 레인 1은 교차결합시키지 않은 gp120-CD4이고, 레인 2는 교차결합된 gp120-CD4이다. 레인 1은 면역친화칼럼을 통해서 절단된 단일사슬 gp120-CD4와 절단되지 않은 단일 사슬 gp120-CD4가 모두 분리된 것을 보여준다. 레인 2에서는 교차연결을 통해 150 kDa와 300 kDa에서 두개의 넓은 밴드가 생긴 것을 볼 수 있으며, 이것은 용액 속에 단일사슬의 gp120-CD4가 150 kDa의 연결된 분자로 존재한다는 것을 의미한다. 절단이 일어난 뒤에도 gp120과 CD4 썸부유닛은 연결된 채 존재하였다. 300 kDa 밴드는 gp120-CD4가 용액속에서 이량체(dimer)로도 존재한다는 것을 나타내며, 아마도 서로 다른 분자의 외피와 CD4 도메인의 분자간 상호작용에 의해 단일사슬 분자가 연결되었을 것으로 생각된다. 단일사슬분자가 gp120과 CD4로 절단되는 것(도 2)은 이러한 절단과정은 생체 내에서도 일어날 것이기 때문에 DNA 백신에 이용할 수 있을 것이다. 그러나

상기 실시예들은 단일사슬분자의 절단에도 불구하고 gp150-CD4복합체체로서 연결되어 남아있다는 것을 보여준다 (도 3). FLSC의 구조적 성질을 알아보기 위하여, 상기 정제된 단백질을 서로 다른 농도(1µM-0.3µM)에서 용액 속에 존재하는 다량성 구조체들을 고정하기 위하여 PBS에서 공유결합적으로 교차결합시켰다. 교차결합된 분자는 항CD4 항체를 이용항 면역블러팅을 통해 분석하였다. 도 4에서 나타난 것과 같이, 172kD의 메이저 단백질 밴드 (삽입그림; 밴드 A)는 상대적으로 높은 분자량을 가지는 두개의 마이너 밴드와 함께 계속적으로 관찰된다. 마이너 밴드 중 하나의 밴드(삽입그림밴드 B)는 약 302kD의 분자량을 가지며 반면, 다른 한개의 밴드(삽입그림: 밴드 C)는 SDS-PAGE 상에서 정확한 분자량을 측정할 수 있을 정도로 이동하지 못하였다. 상기 단백질 밴드의 외양과 각 밴드간 면적의 비율은 FLSC의 농도에 영향을 받지 않았다. 그러므로, 밴드의 밀도 분석을 통한 밴드 A, B 및 C의 비율은 각각 총 단백질의 약 65%, 25% 및 10%이었다.

[0149] FLSC와 비교하여, 교차결합된 TcSC의 크로마토그래피 결과는 더적 복잡하였다. 비-변성 조건에서, TcSC는 166kD와 355kD 사이에서 넓은 피크로 용출된다. 상기와 같은 결과는 짧은 TcSC 폴리펩타이드가 발현 및/또는 정제과정에서 다양한 높은 분자량의 구조를 형성한다는 것을 나타낸다. 이는 TcSC가 독립적 분자에서 gp120과 CD4사이의 상호작용에 의해 결합된 여러가지 크기를 가진 폴리펩타이드 사슬로서 존재한다는 것을 나타낸다. TcSC가 gp120의 C말단 아미노산 20개를 삭제하여 제작된 것이기 때문에, CD4 핵심구조와 gp120의 CD4bd와의 거리는 짧아지고, 이것은 gp120-CD4의 분자간 상호작용에 의해 외부사슬간 복합체를 형성하는 TcSC의 능력을 억제시킬 것으로 생각된다.

[0150] 그림에도 불구하고, TcSC는 gp120-CD4 복합체에 대한 항원으로서 및 기능적 성질을 타나낸다. 다양한 TcSC분자를 포함하는 분자간 상호작용때문에, 총 단백질의 적은 부분은 표면의 공동수용체와 상호작용하는 공동수용체 결합부위를 발현한다. TcSC의 V1/V2구역을 삭제하는 것은 CCR5에대한 BaL 외피의 상대적 친화성을 감소시킬 것으로 생각된다. gp120과 CD4 사이의 링커를 신장시키는 TcSC의 변형은 사슬내 복합체를 높은 비율로 형성할 것이다. TcSC의 다량체적 성질은 이 분자가 FLSC 내에 존재하기 어렵게 한다. 왜냐하면, 다른 다량체적 분자들을 가지고 행한 실험에서 다량체들은 모노머에 비해 더욱 강력한 면역원이었기 때문이다(DeVico, A.L., *et al.*, 1999, *AIDS Rev.* 1:4-141 Jeffs, S.A. *et al.*, 1996, *J. Gen. Virol.*, 77:1403-1410; LaCasse, R.A. *et al.*, 1999, *Science*, 283:358-62)

[0151] 실시예 3

[0152] 본 실시예에서는 gp120 및 CD4와 반응하는 몇몇의 서로 다른 항체들과 gp120-CD4 키메릭 폴리펩타이드가 결합하는 것에 관한 데이터를 설명한다. gp120과 CD4의 결합은 상기 분자의 구조적 변화가 생기며 이로 인해 공동수용체 결합 도메인이 노출되게 된다. 그러므로 상기 도메인의 항체에 대한 에피토프는 적절하게 폴딩된 단일사슬 분자와 강하게 반응할 것이다. 키메릭 폴리뉴클레오티드에서 노출된 에피토프를 확인하기 위하여, FLSC와 TcSC 분자의 항원성을 비교하였다. 정제된 FLSC와 TcSC를 항원이 결합된 ELISA에 의해 면역화확적으로 분석하였다. 간단하게 말하면, gp120 C말단의 15개 아미노산 유래의 펩티드에 대한 폴리클로날 양 항체(International Enzymes, USA)인 D7324(Moore, J.P. *et al.*, 198X, *AIDS REs. Hum. Retroviruses*, 4:369-79)를 사용하여 BaLgp120, gp120-rsCD4 복합체 또는 단일 사슬 키메릭 분자를 획득하고 매트릭스에 부착시켰다. D7324는 PBS로 2µg/ml농도로 희석하여 96웰 플레이트(Maxisorb plates, VWR Scientific, USA)에 상온에서 하룻밤 반응시켜 부착시켰다. 상기 플레이트는 웰에 비특이적 결합을 억제하기 위하여 BLOTTO(5% 탈지유를 포함하는 tris 버퍼용액)를 처리하였다. TBS로 상기 플레이트를 수세한 후 시료를 BLOTTO로 희석하여 상기 웰에 200µl 씩 분주한 후, 상온에서 1시간 반응시킨다. 웰에 결합된 항원은 불활성화된 HIV-I 혈청을 VLOTTO로 1:1000으로 희석시킨 용액과 호오스래디쉬 과산화효소로 표지된 염소 항-인간 IgG(KPL, USA)로 검출하였다.

[0153] 검출은 적당한 표지가 된 2차 항체를 처리한 후, CD4가 gp120과 결합한 후 결합하는 것으로 이전에 알려진 모노클로날 항체(MAbs A32, 17b 및 48d)를 사용하여서도 수행되었다(Thali *et al.*, *J. Virol.*, 1993, 67:3978-86). 상기 항체 중 17b 및 48d는 CD4의 결합에 의해 유도되는 공동수용체 접착 부위에 결합된다(Sullivan N., *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72:4694-703; Trkola, A. *et al.*, 1996, *Nature*, 384:184-6; Wu, L. *et al.*, *Nature*, 1996, 384:179-183)). 또한 유리되어 있는 gp120의 C1-C5 구역의 보존된 에피토프를 인식하는 항체 C11 사용하여 실험하였다. 항체는 BLPTTO로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 플레이트는 각 반응 단계마다 TBS로 세번 수세하였다. 시료의 gp120의 양은 재조합 HIV IIIB gp120(Bartels, USA)을 사용하여 측정된 표준곡선을 기초로하여 결정하였다. BaLgp120-rsCD4 복합체를 포함하는 비교실험에서, D7324로 코팅된 플레이트에 포화농도의 gp120을 처리하였다. 웰을 수세한 후 과도한 농도의 rsCD4(1µg/ml)을 첨가하고 1시간동안 반응시켜 복합체를 형

성시켰다. D7324에피토프가 결합된 TcSC항원을 측정하기위하여, 항CD4 Mab45(Bartels, USA)를 사용한 ELISA를 수행하였다. 항체는 1 μ g/ml농도로 부착되었고, 웰은 BLOTTO로 블로킹시켰다. 분석은 상기의 ELISA방법에서 사용한 인간혈청 또는 인간 모노클로날 항체를 사용하여 수행하였다.

[0154] 도 5A에서 나타낸 바와 같이, 모든 항체는 FLSC와 강력하게 반응하였다. 그러나, A32, 17b 및 48d 항체의 반-최대 결합농도는 FLSC가 gp120 단독에 비해 높았으며, 수용성 비공유성 BaLgp120rsCD4 복합체와 동일하였다. FLSC의 높은 면역활성은 CD4에 의해 유도된 에피토프에 대한 항체에 특이적이고, C11항체에 대한 FLSC대 유리 gp120의 반-최대 결합농도는 별 차이가 없었다.

[0155] 도 5B에서 나타낸 바와 같이, 17b 및 48d의 TcSC와의 반응성의 수준은 FLSC와의 수준과 같았다. 항체 C11 및 항체 A32는 이들의 에피토프가 TcSC에서 삭제되었기 때문에 TcSC와 반응하지 않았다.

[0156] 또한 단일사슬 분자에서 gp120과 CD4 서열의 결합은 CD4의 gp120결합부위의 에피토프가 노출되는 것을 막는다. 이를 확인하기 위하여, gp120의 CD4 결합 부위는 사용할 수 없었고, FLSC와 TcSC는 gp120의 CD4결합도메인에 대한 모노클로날 항체들(IgG1b12, F91 및 205-469)과 Mab45 포함 포맷을 이용하여 측정하였다.

[0157] 도 5C에서 나타낸 바와 같이, 상기 항체들 중 어떤 것도 FLSC 또는 TcSC와 반응하지 않았으며, FLSC양성반응성은 HIV+ 혈청테스트로 확인하였다. 이 결과는 CD4서열과 FLSC와 TcSC분자 상의 gp120 CD4 결합 도메인 사이의 상호반응을 나타낸다.

[0158] 총괄하면, 상기 결과들은 gp120-CD4 키메라릭 폴리펩티드의 반응성은수용성 gp120과 CD4(교차결합되지 않은)의 결합에 의해 만들어진 복합체가 gp120 단독 보다 높았다. 상기 결과는 단일사슬 gp120-CD40 분자가 전이단계의 HIV 외피-CD4 복합체와 유사한 상호작용복합체를 형성한다는 것을 의미한다. 다른 ELISA 실험에서 gp120-CD4는 항CD4 항혈청과 항myc 항체와도 반응하였으며, 웨스턴 블로팅에서도 같은 결과가 나타났다. 종합하면, 상기 결과들은 단일사슬 gp120-CD4분자의 대부분은 적절히 폴딩된 gp120-CD복합체라는 것을 의미한다.

[0159] **실시예 4**

[0160] 본 실시예에서는 CCR-5특이적 HIV 외피 서열을 포함하는 gp120-CD4키메라릭 분자와 CCR5를 발현하는 세포와의 결합에 대해 설명하였다.

[0161] gp120-CD4복합체가 형성되면 적절한 공동수용체와 반응하는 외피 도메인이 노출되게 된다(Thali M. *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 57:3978-86). 그러므로, 적절히 폴딩된 gp120-CD4복합체와 세포에 바이러스가 감염하는 것을 막는 능력을 깨는 또다른 잣대는 CCR5 공동수용체에 결합하는 능력이다.

[0162] 단일사슬 복합체가 공동수용체와 결합하는 능력을 확인하기 위하여, 정제된 단일사슬 gp120-CD4분자를 CCR5 또는 CXCR4를 발현하는 세포와 반응시켰다. 요약하여 설명하면, gp120-CD4가 포함된 배양상층액은 pEF6-SC로 감염된 293세포주가 생산하는 것이다. 상기 배양상층액은 A32의 면역친화 칼럼에 로드되고 0.2mM의 아세트산 용액 (pH 2.5)에 의하여 용출하였으며, D7324가 부착된 ELISA와 면역블롯으로 분석하였다. 단일사슬이 포함된 분획을 수득하여 pH 7에서 평형화 시켰다.

[0163] 정제된 단일사슬을 CCR5를 발현하는 L1.2세포에 부착시키기 위하여 반응시켰다(Wu, L. *et al.*, 1996, *Nature*, 384:179-83, Wu, L. *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.*, 186:1373-81). L1.2, L1.2/X4 및 L1.2/R5 세포주, 공동 수용체를 발현하지 않는 무린 B-세포주, CXCR4 또는 CCR5를 정제된 단일사슬 단백질과 혼합하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, 세포를 세척하였다. 세포에 부착된 단일사슬 분자는 1 μ g/ml의 항gp120Mab인 MAB C11(Robinson, J.E. *et al.*, 1992, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 16E:71; Thali M. *et al.*, *J. Viol.*, 1993, 67:3978-86)와 형광분자인 pycoerythrin으로 표지된 항인간 IgG로 검출하였다. C11은 C1-C4 구역에 의해 형성된 구조를 인식한다. 결합된 형광물질의 수준은 FACS(fluorescence activated cell sorting)분석법에 의해 FACS 칼리버 기구(Becton Dickinson)를 사용하여 분석하였다. 각 시료의 평균 형광감도는 Cell Quest 3.1.3프로그램(Becton Dickinson)로 계산하였다.

[0164] 도 6에서 나타낸 바와 같이, 두가지 단일사슬 gp120-CD4 복합체(FLSC 및 TsSC)는 모두 CCR-5을 발현하고, CXCR4를 발현하지 않는 L1.2세포에 부착하였다. 최대 부착은 FLSC에서 10 μ g/ml의 농도에서 관찰되었으며 이것은 대조군인 수용성 BaL gp120-rsCD4복합체의 최고 부착 농도와 같았으며, TcSC의 경우와 비교하면 포화되게 부착하는데 10배정도 높은 농도의 TcSC가 필요하였다. 그러므로, gp120-CD4 키메라릭 폴리펩티드는 마크로파아지성

gp120을 포함하는 분자로서, CCR5와 결합하기 위한 공동 수용체 결합 부위가 존재한다.

[0165] 본 발명에서는 CD4를 위한 gp120-CD4 키메라의 HIV 외피 폴리펩티드의 특이성때문에 CXCR4와의 결합을 기대하였다. 그러므로 CXCR4 또는 다른 공동수용체와 결합하는 폴리펩티드 키메라를 제조함으로써, 또는 바이러스 코트 폴리펩티드를 변형시킴으로써 또 다른 공동수용체와 결합하는 키메릭 폴리펩티드를 획득하기 하여, 다른 공동수용체와 결합하는 다른 바이러스 코트 폴리펩티드-수용체 폴리펩티드키메라를 얻을 수 있다.

[0166] 단일사슬 gp120-CD4가 공동수용체 결합부위를 통해 CCR5와 결합하는 것을 확인하기 위하여, gp120의 공동수용체 결합부위와 상호반응하고, gp120/sCD4복합체가 공동수용체를 발현하는 세포와 상호반응하는 것을 방해하는 17b 및 48d 항체를 사용하여 경쟁적 결합에 대한 연구를 수행하였다. 또 다른 gp120항체인 C11과 gp41 항체 F240을 대조군으로 사용하였다. 상기의 모든 항체는 HIV-1에 감염된 환자로 부터 수득한 것이다. 각 항체는 10 µg/ml농도로 사용하였으며, 3µg/ml의 정제된 단일사슬 분자를 CCR5 또는 CXCR4를 발현하는 L1.2 세포에 첨가하였다. 부착된 gp120-CD4는 C11과 PE로 표지된 항인간 IgG에 의해 검출되었다. gp120-CD4의 양은 FACS에 의해 확인되었으며, 경쟁적 항체가 첨가되지 않은 대조군 웰의 총 부착 퍼센트와 같이 발현되었다.

[0167] 도 7에 나타낸 바와 같이, 17b 및 48d는 두가지의 단일사슬 복합체가 세포에 부착하는 것을 강력하게 저해하였다. 이들 항체가 존재할 때, CCR-5 발현 세포의부착 신호는 L1.2/CXCR4 및 L1.2 세포가 배경에 부착하는 것과 같았다. 흥미롭게도, 강한 중화 항체인 2G12 또한 모든 복합체 형태가 CCR5와 상호반응하는 것을 억제시켰다. gp120항체는 공동수용체 도메인, C11, A32 및 항 gp41항체인 F240의 에피토프를 인식하는 것을 비교해보면, 모두가 FLSC 또는 TcSC가 CCR5를 발현하는 L1.2세포에 부착하는 것을 억제하는 데는 실패하였다.

[0168] 상기 결과들은 gp120의 공동수용체 결합부위가 공동수용체와 결합하는데 중요하다는 것을 의미한다. 이 결과들은 또한 gp120-CD4와 공동수용체간의 부착과/상호반응을 저해하는 물질들을 상기와 같은 분석방법을 통하여 확인할 수 있다는 것을 말해 준다. 또한 상기 물질들은 잠재적으로 치료제로서 사용할 수 있을 것이다.

[0169] 총괄하면, 상기 결과들은 바이러스 코트 수용체 복합체의 전이 단계 구조를 복제하는 수용성 키메릭 폴리펩티드 성공적인 발현을 나타낸다. 상기 결과로, 키메릭 폴리펩티드 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클로에티드를 특정대상에 접종하여 바이러스나 바이러스가 가진 유사 코트 폴리펩티드 에피토프에 대하여 면역반응을 일으키게 할 수 있다. 상기 면역반응은 항체(체액성) 또는 CTL반응일 것이다. 덧붙여, 키메릭 폴리펩티드는 살아있는 세포 표면의 적절한 공동수용체와 반응하고, 상기 폴리펩티드는 면역결핍 바이러스에 노출된 특정대상에 투여하여 수동적으로 바이러스 감염으로 부터 공동수용체를 발현하는 세포를 방어할 수 있다.

[0170] **실시예 5**

[0171] 본 실시예에서는 gp120-CD4 키메릭분자가 공동수용체를 이용하여 HIV 바이러스의 감염을 중화시킬 수 있다는 것을 설명하였다. 상기 단일사슬분자는 R5와 X4 바이러스를 중화시키는 능력이 검증되었다. CCR5 또는 CXCR4를 발현하는 U373/CD4/MAGI 세포(Vodicka *et al.*, 1997, *Virology*, 233:193-8)10⁴개를 평균 배양웰에 하룻밤동안 부착시켰다. 배양 배지를 제거하고, 100µl의 여러 농도의 키메릭 단백질을 포함하는 새 배지로 교환하였다. 100 µl의 바이러스 50TCID₅₀이 포함된 배지를 추가로 첨가하고, 37°C에서 3-5일 정도로 syncytia가 보일때까지 배양한 후, 배양 웰을 P-갈락토시다아제 화학발광성 물질인 Galatostar(Tropix, USA)로 처리하였다. 바이러스 감염은 상기 화학발광성물질로 검출하였으며, Victor² 형광판독기(EG&G Wallac, USA)로 정량하였다. 배경 신호는 바이러스가 없는 상태를 분석하여 확인하였다. 얻어진 신호들의 값은 배경 값을 빼고 수정하여 구하였다.퍼센트 감염도는 각 실험 웰의 수정된 상대 광유닛을 세포와 바이러스만 포함된 대조군 웰의 수정된 광유닛으로 나누어서 계산하였다. 실험에 사용한 단백질 농도에 대한 퍼센트 감염도의 그래프를 통해 90% 저해 (ID₉₀)값이 확인되었다.

[0172] 도 8에서 나타낸 바와 같이, FLSC 및 TcSC는 강력하고 민감하게 R5HIV-1Ba1을 중화시키는 반면, 2044 분리체의 경우는 약하게 저해하였다(ID 90>10µg/ml). 비복합 Ba1gp120은 HIV-1Ba1과 X4(HIV-12044)바이러스의 침입을 저해하며, 이것은 CD4와의 직접적인 상호반응에 기인한다. 그러므로, 상기 결과는 바이러스 코트 폴리펩티드 수용체 키메릭 분자가 세포가 결합 또는 감염에 공동 수용체를 사용하는바이러스에 감염되는 것을 방지하여 세포의 공동수용체와 결합할 수 있다.

[0173] 실시예 6

[0174] 본 실시예에서는 이뮤노글로불린 폴리펩티드 서열인 gp120-CD4-IgG1을 가지는 변형된 gp120-CD4 키메라 폴리펩티드의 구조와 발현에 대하여 설명하였다. 상기의 전형적인 이종기원의 도메인은 gp120-CD4 키메라 폴리펩티드에 어드헤신과 면역강화 기능, 안정성의 유지, 순환 반감기의 연장 및 태반막을 통과할 수 있는 능력등의 기능을 첨가하여 준다. 본 실시예는 또한, gp120-Cd4-IgG1 키메라가 손상되지 않은 세포의 표면에서 발현되는 공동수용체와 결합하여, HIV 바이러스를 중화시킨다. HIV-1의 외피 단백질의 써브유닛인 gp120은 CD4와 결합하여 구조적 변화가 일어나 이 복합체가 CCR5와 같은 공동수용체와 상호작용하게 된다. 상기 상호작용이 HIV-1이 목적 CD4+ 세포에 감염되도록 한다. 항체 또는 HIV-1과 공동수용체의 상호작용을 방해하는 물질이 HIV바이러스의 감염을 막을 수 있다.

[0175] 상기와 같은 물질을 찾기 위하여, 단일사슬 gp120-CD4를 IgG1의 중사슬, 경첩 CH2 및 CH3으로 구성된 불변영역을 융합에 의해 변형시켰다(도 9). Gp120-Cd4-IgG1 폴리펩티드는 서열번호: 24, 11, 26 및 32로 구성되며, 주사바늘에 의한 외상등과 같은 다급하게 HIV에 노출된 환자의 감염을 막는 수동적 면역치료제로서 사용이 가능하다.

[0176] 293세포를 서열번호: 23, 25 및 31로 구성된 염기서열을 가지는 gp120-CD4-IgG1을 포함하는 플라스미드로 일시적으로 감염시키고, 상기 세포의 배양상층액의 면역블러iting에 의해 세포에서 발현되는 단백질의 특성을 규명하였다. 간단하게 설명하면, 수득된 배양상층액 시료는 4-20% 그라디언트 PAGE젤에서 전기영동시키고, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막에 트랜스퍼시킨 후, 항 gp120 모노클로날 항체를 이용하여 검출하였다. 도 10에서 나타낸 바와 같이, 일시적으로 감염된 세포는 gp120-CD4-IgG1을 발현하였다(레인 1). HIV-1BaL유래의 gp120을 발현하는 세포의 배양상층액(레인 2)은 분자량의 비교를 위하여 전기영동하였다. gp120-CD4-IgG1 폴리뉴클레오티드는 gp120-CD4-IgG1 중사슬 키메라의 예상분자량을 가지는 단백질을 코딩한다. 기존의 gp120-CD4와 마찬가지로 gp120-CD4-IgG1은 120 kD의 절단된 단백질 단편을 생산하고, 이것은 gp120(절단된 gp120)과 유사하다. 상기 단편의 크기는 gp120-Cd4-IgG1이 스페이서 부위에서 절단된다는 것을 의미한다. gp120-CD4-IgG1이 공동수용체와 결합할 수 있는 구조로 폴딩된다는 것을 증명하기 위하여, 희석된 배양상층액을 CCR5 또는 CXCR4 공동수용체를 발현하는 L1.2 세포에 첨가하였다. gp120-CD4-IgG1의 부착은 형광 물질인 Europium으로 표지된 항 인간 IgG로 검출하였다. 형광의 양은 부착된 물질의 양과 비례한다.

[0177] 도 11에서 나타낸 바와 같이, gp120-CD4-IgG1은 CCR5를 발현하는 L1.2세포에 특이적으로 부착한다. 또한, CXCR4에 작은량의 부착이 확인되었는데 이것은 gp120-CD4를 가지고 행한 실험결과와 일치하였다. 이 실험은 부가적인 기능을 부여하거나 기능을 향상시키는 이종기원 도메인이 세포의 공동수용체와 결합하여 복합체를 만드는 능력에 영향을 주지않으면서 키메라 분자에 삽입될 수 있다는 것을 의미한다.

[0178] 키메라 gp120-CD4-IgG1 중사슬이 CCR5를 발현하는 세포와 결합하는 것이 gp120의 공동수용체 부착부위에 의해 매개된다는 것을 증명하기 위하여, 블러킹 항체인 17b의 존재하에 실험하였다. 간단히 설명하면, MAb/FLSC-IgG1의 경쟁적 연구를 위하여, 소듐부칠레이트로 활성화된 공동수용체를 발현하는 L1.2세포를 V-바닥 플레이트에 1×10^5 세포/웰로 첨가 하였다. $10 \mu\text{g/ml}$ FLSC-IgG1과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MAbs를 세포에 첨가하였다. 세포와 단백질은 37°C에서 1시간 반응시켰다. 세포를 수득하여 TBS로 세 차례 수세하였다. 부착된 물질은 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 phytoerythrin이 표지된 항인간 IgG로 4°C에서 1시간동안 반응시켰다. 세포는 TBS로 세 차례 수세하여 FACS로 분석하였다.

[0179] 도 12에서 나타낸 바와 같이, 17b 항체는 gp120의 CCR5 부착 도메인을 인식하여, FLSC-IgG1과 L1.2R5세포와의 상호작용을 막는다. 반면 대조군인 F240 항체는 상기 상호작용을 억제하지 않았다. 상기 결과는 FLSC-IgG1이 gp120의 R5부착 도메인을 통하여 R5 공동수용체와 상호작용한다는 것을 의미한다. 키메라 gp120-CD4-IgG1 중사슬이 바이러스가 세포에 침투하는 것을 억제할 수 있다는 것을 증명하기위하여 중화 분석이 수행되었다. 요약하여 설명하면, CCR5 또는 CXCR4를 발현하는 U373/CD4/MAGI 세포를 평판 배양기에 10^4 세포/웰농도로 하룻밤 동안 부착시켰다. 배지를 제거하고 여러 농도의 MAb와 이뮤노어드헤신이 포함된 $100 \mu\text{l}$ 의 배지를 세포에 첨가하였다. 바이러스($100 \mu\text{l}$ 배지에 50TCID₅₀/웰)로 첨가하여 37°C에서 syncytia가 관찰될때까지 3-5일정도 배양하였다. P-갈락토시다아제 화학발광물질인 Galatostar를 사용하여 나타나는 화학발광 정도를 Victor²를 사용하여 전술한 방법과 동일하게 정량하였다. 바이러스 성장의 퍼센트는 상대적 광 유닛 (실험 웰)-바이러스가 없는 배경 웰)/(단백질을 첨가하지 않고 바이러스만 첨가한 웰)-(배경웰)로 나타내었다(표 2). ID₅₀ 및 ID₉₀은 그래프로 나타내었다.

표 2

[0180] FLSC-IgG1에 의한 X4, R5 및 X4/R5 HIV의 중화

U373/CD4/CCR5					
	FLSC-IgG1	2G12	2F5	1 IgG1b121B	대조군 IgG
ID90(ug/mL)					
BaL	3.1	> 10	> 10	1.57	> 10
ADA	4.58	> 10	> 10	> 10	> 10
89.6	3.56	8.07	> 10	3.39	> 10
U373/CD4/CXCR4					
	SC1g	2G12	2F5	IgG1b12	대조군 IgG
ID90(ug/mL)					
2044	> 10	> 10	> 10	1.57	> 10
2005	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
89.6	> 10	> 10	> 10	5.34	> 10

[0181] 표 2의 결과는 FLSC-IgG가 R5를 사용하는 바이러스의 세포 침투를 억제한다는 것을 보여준다.

[0182] FLSC-IgG는 수동적 면역치료 시도를 통해 효능이 확인된 항체인 2G12, 2F5 및 IgG1b12와 같은 효능으로 바이러스를 중화시킨다. 상기 결과를 통해 gp120-CD4 키메라가 특히 HIV감염을 억제하는데 유용하다고 할 수 있으며, 바이러스 코트 단백질 수용체 키메라들을 부착하거나 세포로 침투하는데 공동수용체를 사용하는 다른 바이러스들의 억제제로서 적용할 수 있을 것이다.

[0183] **실시예 7**

[0184] 본 실시예에서는 퓨린 절단부위의 변이가 FLSC복합체의 안정성을 향상시킨다는 것을 설명하였다. gp120의 C-말단이 없는 TcSC에서는 절단된 단편을 관찰할 수 없기 때문에, FLSC 단편을 분리하는 절단 부위는 FLSC에만 존재하는 gp120의 C-말단서열에 위치한다고 생각되어 진다. 그중에서도, 상기 서열은 퓨린 프로테아제에 의해 절단되는 gp120 gp41교차부위를 포함한다(Griard, M. *et al.*, 1999, *C. R. Acad. Sci. III*, 322:925-66). 원래의 퓨린 절단부위에서의 FLSC의 절단 결과는 gp120과 CD4의 구조와 상호작용능력에 최소한의 영향을 미친다는 점에서, FLSC 단편의 성질과 일치한다.

[0185] 퓨린 부위로 생각되어지는 부위가 절단되는 지를 알아보기 위하여, gp120의 C-말단에 특이적인 항체를 통하여 CD4, FLSC 및 FLSC R/T의 첫번째 두 도메인(V1V2)으로 구성된 sCD4와 BaLgp120의 복합체를 플레이트에 부착하였다(항체와의 결합은 R/T변이에 의해 영향을 받지 않았다). V1-V4 sCD4의 네가지 도메인을 상기 부착된 복합체에 30µg/ml의 농도로 부터 적정하였다. 네가지 도메인 sCD4는 V1V2보다 gp120에 훨씬 더 높은 친화성을 가지고 있었으며, 복합체의 더 작은 유닛에 대해서는 경쟁이 되지 않았을 것이다. 도 13에서 나타낸 바와 같이, 퓨린 절단부위의 변이가 FLSC R/T에서 발견되는 V1V2가 쉽게 떨어져 나가는 것을 억제하므로, FLSC R/T복합체의 안정성을 향상시킨다. BaLgp120의 C-말단의 RT 변이는 FLSC에서 발견되는 퓨린 매개 분열을 억제한다. 상기 분열을 억제하는 것은 연결서열의 연속성을 향상시키고, gp120과 CD4의 부분 농도를 증가시켜 FLSC의 안정성을 향상시킨다(도 13). 상기 실시예의 결과는 FLSC R/T에서 발견되는 두 도메인 CD4가 경쟁하기 위한 수용성의 네 도메인 CD4의 능력의 억제를 말한다.

[0186] **실시예 8**

[0187] 본 실시예에서는 gp120-CD4의 변형된 키메라 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 세포를 감염시키는 것과 상기 세포가 발현하는 수용성 폴리펩티드의 특징을 설명하였다. 재조합 pEF6-FLSC, pEF6-RLSC-R/T, pEF6-FLSC-R/TC4M9 및 pEF6-BaLgp120으로 293세포를 Fugene을 사용하여 감염시켰다. 5µg/ml의 블라스티시딘(blasticidin)을 선택마커로 사용하여 안정한 감염체를 획득하였다. 요약하면, 세포의 키메라 폴리펩티드를 포

함하고 있는 배양상층액을 수득하여 SDS-PAGE 로딩버퍼(75mM Tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue, pH 8.3)에서 끓였다. 상기 시료를 4-20% SDS-폴리아크릴아마이드 그라디언트(gradient) 젤을 사용하여 전기영동을 수행하고, 상기 젤을 니트로셀룰로스 막에 트랜스퍼하였다. 니트로셀룰로스 막상의 비특이적 반응은 블러킹 용액(pH7의 tris 버퍼에 2% non-fat milk를 첨가한 용액)으로 30분간 블러킹하였다. 그후 상기 니트로셀룰로스 막은 HIVgp120에 대한 뮤린 단 클론항체로 블로팅하고 부착된 항체는 알칼린 포스파테이스로 표지된 염소의 항마우스 IgG로 검출하였다.

[0188] 도 14에 나타낸 바와 같이, BaLgp120(레인 1)과 FLSC-R/TCD4M9(레인 4)는 약 120 kD의 분자량 부위에서 밴드가 나타났다. FLSC-R/TCD4M9는 약 130 kD로 예상되었으나, 블러팅 결과에서는 10 kD의 차이가 있었다. FLSC(레인 2)는 단백질의 C-말단이 퓨린부위에서 절단된 150 kD가 나타났다. FLSC는 절단에 의해서 gp120과 CD4로 분리되었다. 낮은 120 kD의 밴드는 이 절단의 결과로 생긴 것이다. 상기 블로팅에 사용한 항체가 gp120에 특이적인 단백질을 검출하는 항체이기 때문에 분리된 CD4는 관찰할 수 없었다. 특정조건에서 단일사슬분자가 gp120과 CD4로 분해되는 것은 이러한 과정이 생체 내에서도 일어날 수 있기 때문에 DNA 백신으로 사용 할 수도 있을 것이다.

[0189] 본 실시예의 결과는 퓨린 절단 부위의 변이가 FLSC 복합체의 안정성을 향상시킴을 나타낸다. FLSC 단편을 분리시키는 절단 부위는 FLSC에만 존재하는 gp120의 C-말단 서열 상에 존재할 것이다. 특히, 상기 서열은 퓨린 프로테아제에 의해 분해되는 gp120/gp41 연결부위를 포함한다(Griard, M. *et al.*, 1999, *C. R. Acad. Sci. III*, 322:925-66). 원래의 퓨린 절단부위에서의 FLSC의 절단 결과는 gp120과 CD4의 구조와 상호작용능력에 최소한의 영향을 미친다는 점에서, FLSC 단편의 성질과 일치한다. 상기 결과는 퓨린 절단부위의 변이가 FLSC R/T에서 발견되는 V1V2가 쉽게 떨어져 나가는 것을 억제하므로, FLSC R/T복합체의 안정성을 향상시킨다. BaLgp120의 C-말단의 RT 변이는 FLSC에서 발견되는 퓨린 매개 분열을 억제한다. 결과적으로, FLSC R/T를 형성하는 R/T변이가 상기 절단을 최소화시키고, 단백질을 안정화 시킨다.

[0190] **실시예 9**

[0191] 본 실시예에서는 gp120-CD4 키메라 폴리펩티드와 gp120 및 CD4와 반응하는 항체와의 결합에 대하여 알아보았다. gp120과 CD4의 결합은 분자구조의 변화를 야기시켜 공동수용체 결합 도메인을 노출시키게 된다. 그러므로, 이 도메인의 에피토프에 대한 항체는 적절히 폴딩된 단일사슬분자와 강하게 결합하게 된다. 키메라 분자의 노출된 에피토프를 확인하기 위하여, BaLgp120, FLSC, FLSC-R/T 및 FLSC-R/T CDM9분자의 항원성을 비교하였다. 검출은 gp120이 CD4와 부착한후 결합하는 모노클로날 항체인 17b를 사용하여 수행하였다(Thali *et al.*, *J. Virol.*, 1993, 67:3978-86). 17b는 CD4의 결합에 의해 유도되는 공동 수용체 접촉 부위에 결합된다(Sullivan N., *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72:4694-703; Trkola, A. *et al.*, 1996, *Nature*, 384:184-6; Wu, L. *et al.*, *Nature*, 1996, 384:179-183). 항체는 BLPTT0로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 플레이트는 각 반응 단계마다 TBS로 세번 수세하였다. 시료의 gp120의 양은 재조합 HIV IIIB gp120(Bartels, USA)을 사용하여 측정된 표준곡선을 기초로하여 결정하였다. 항체는 1µg/ml 농도로 부착되었고, 웰은 BLOTTO로 블로킹시켰다. 분석은 상기의 ELISA방법에서 사용한 인간 모노클로날 항체를 사용하여 수행하였다.

[0192] 도 16에서 나타낸 바와 같이, 17b와 BaLgp120, FLSC, FLSC-R/T 및 FLSC-R/T-CDM9분자의 결합은 17b가 gp120 및 CD4를 포함하는 FLSC-R/T 또는 FLSC 키메라 단백질과 결합함으로써 증가하였다. 또한 17b의 FLSC-R/T-CDM9분자와의 결합이 FLSC-R/T분자와의 결합과 같은 효율을 가지는 것은 17b 에피토프가 FLSC-R/T-CDM9 단백질에서 노출된 것이라는 것을 나타낸다. 총괄하면, 상기 결과는 단일사슬 gp120-CD4분자인 FLSC, FLSC-R/T 및 FLSC-R/T-CDM9가 적절하게 폴딩된 gp120-CD4 복합체 라는 것을 의미한다.

[0193] **실시예 10**

[0194] 본 실시예에서는 CCR5에 특이적인 HIV 외피 서열을 포함하는 gp120-CD4 키메라 분자와 CCR5를 발현하는 세포와의 결합을 알아보았다. gp120-CD4복합체가 형성되면 자연적으로 공동수용체와 상호작용하는 외피 도메인이 노출되게 된다(Thali *et al.*, *J. Virol.*, 1993, 67:3978-86; Vodicka, *et al.*, 1997, *Virol.*, 233: 193-8). 그러므로 적절히 폴딩된 gp120-CD4복합체와 세포에 바이러스가 감염하는 것을 막는 능력을 재는 또다른 잣대는 CCR5 공동수용체에 결합하는 능력이다.

[0195] 단일사슬복합체가 공동수용체와 결합하는 능력을 확인하기 위하여, 정제된 단일 사슬 gp120-CD4분자를 CCR5를 발현하거나 또는 공동수용체를 가지고 있지 않은 개의 thymocytes세포인 Cf2Th와 상호반응시켰다. 요약하여 설명

하면, pEF6으로 일시적으로 감염된 293세포에 의해서 gp120-CD4 단일사슬 키메라 폴리펩티드인 FLSC-R/T 및 FLSC-R/TCDM9분자를 포함하는 배양상층액이 생산된다.

[0196] 정제된 단일사슬 분자를 부착시키기 CCR5를 발현하거나 공동수용체를 가지고 있지 않는 개의 thymocyte와 상호 반응 시켰다. 부착된 단일사슬분자는 항gp120MAb인 A32와 형광분자인 phycoerythrin으로 표지된 염소의 항 인간 IgG를 사용하여 검출하였다. 결합된 형광물질의 수준은 FACS(fluorescence activated cell sorting)분석법에 의해 FACS 칼리버 기구(Becton Dickinson)를 사용하여 분석하였다. 형광물질의 양은 부착된 물질의 양과 비례한다. 각 시료의 평균 형광강도는 Cell Quest 3.1.3프로그램(Becton Dickinson)로 계산하였다. 결과를 도 15에 나타내었으며, FLSC-R/T CD4M9는 CCR5를 발현하는 세포에 부착하였으며, 공동수용체가 없는 세포에는 부착하지 않았으며, 부착효율은 FLSC-R/T와 동일하였다.

[0197] **실시예 11**

[0198] 본 실시예에서는 FLSC가 접종된 마우스의 혈청에 의한 일차 R5HIV-1(92BR020)의 중화작용에 대해 알아보았다. C537B1/6마우스 한마리 당 25 μ g의 FLSC를 10 μ g의 콜레라 독소(CT)와 함께 네차례 접종하였다. 접종은 2주간격으로 행하였다. 마지막 접종을 행한 후 14일째에 각 마우스의 혈청을 회수하여 일차적 R5 HIV-1의 92BR020분리주에 대한 중화 능력을 분석하였다. 혈청을 1:2비율에서부터 차례로 희석하여 감염 농도 50 TCID₅₀ 바이러스/웰와 10⁴ U373/CD4/R5/MaGI 세포/웰과 혼합하였다. 24시간 후 혈청과 바이러스 및 배지는 200 μ l의 새로운 배지로 교환하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 3-5일 정도로 syncytia가 보일때까지 배양한 후, 배양 웰을 P-갈락토시다아제 화학발광성 물질인 Galatostar(Tropix, USA)로 처리하였다. 바이러스 감염은 상기 화학발광성물질로 검출하였으며, Victor² 형광판독기(EG&G Wallac, USA)로 정량하였다. 배경 신호는 바이러스가 없는 상태를 분석하여 확인하였다. 얻어진 신호들의 값은 배경 값을 빼고 수정하여 구하였다. 퍼센트 감염도는 각 실험 웰의 수정된 상대 광유닛을 세포와 바이러스만 포함된 대조군 웰의 수정된 광유닛으로 나누어서 계산하였다. FLSC를 접종하여 혈청을 얻은 마우스는 #1, #2, #3, #4로 표지하였으며 FLSC를 접종하지 않은 마우스는 "C"로 표지하였다.

[0199] 도 17에 나타난 바와 같이, 희석배율이 증가함에 따라 바이러스 감염도 증가 하였다. 덧붙여, 대조군 마우스에서 분리된 혈청은 바이러스 감염에 아무런 영향을 미치지 않았으며, #2 마우스의 혈청의 높은 농도에서 가장 낮은 양의 바이러스 감염이 나타났다.

[0200] 종합하면, 상기 결과들은 바이러스 코트 수용체 복합체의 진이 단계 구조를 복제하는 수용성 키메라 폴리펩티드 성공적인 발현을 나타낸다. 상기 결과로, 키메라 폴리펩티드 또는 상기 폴리펩티드를 코팅하는 폴리뉴클로에티드를 특정대상에 접종하여 바이러스나 바이러스가 가진 유사 코트 폴리펩티드 에피토프에 대하여 면역반응을 일으키게 할 수 있다. 상기 결과들은 상기 면역반응은 항체(체액성) 또는 CTL반응일 것이다. 덧붙여, 키메라 폴리펩티드는 살아있는 세포 표면의 적절한 공동수용체와 반응고, 상기 폴리펩티드는 면역결핍 바이러스에 노출된 특정대상에 투여하여 수동적으로 바이러스 감염으로부터 공동수용체를 발현하는 세포를 방어할 수 있다.

[0201] **실시예 12**

[0202] FLSC와 BaLgp120과 sCD4의 복합체가 D7324가 코팅된 ELISA 플레이트 상에 부착되었다. D7324는 양의 폴리클로날 IgG로서 gp120의 C-말단 부위와 반응하며, ELISA에 코팅되어 HIV-1외피 단백질의 항원성을 검사하는데 사용되는 항체이다. BaLgp120/sCD4 복합체를 0.5mM의 BIS(sulfosuccinimidyl)기질(Pierce)과 교차결합시키고, 10mM의 Tris-HCL의 처리에 의하여 반응을 정지시킨다. 이후 BaLgp120/sCD4와 FLSC 플레이트는 TBS로 세번 세척한다. BaLgp120의 V3 루프(39F), C1-C5(C11), C1-C4(A32), 공동수용체 결합 도메인(17b) 및 C3-V4(2G12) 구역들에 대한 모노클로날 항체를 플레이트에 부착된 항원들에 적정하였다. 플레이트에 부착된 항체들은 호오스 래디쉬 과산화효소로 표지된 염소-항 인간 IgG로 검출하였다.

[0203] 도 18은 교차결합이 BaLgp120/sCD4 복합체의 구조를 변화시키고, 39F, C11, A32 및 17b 에피토프의 항원성을 감소시킨다는 것을 나타낸다. 이에 반해, 상기 에피토프는 FLSC에서는 나타나지 않았다. 상기 항원성의 변화는 상기 에피토프의 기능에 영향을 줄것이다. 예를 들어, 17b에 의해 인식되어지는 에피토프는 R5 공동수용체와 상호작용한다. 교차결합에 의한 상기 에피토프의 폐쇄는 공동수용체와 상호작용하는 교차결합된 복합체의 능력을 감소시킨다. 상기 결과는 또한, 교차결합된 복합체가 공동수용체를 통한 HIV-1을 잠재적으로 억제시킬 물질을

찾는데 쓰일 수 없다는 것을 의미한다.

[0204] **실시예 13**

[0205] 정제된 R/T FLSC-IgG1을 0.5mM의 BIS(sulfosuccinimidyl)기질(Pierce)과 30분간 교차결합시키고, 10mM의 Tris-HCL을 처리하여 의하여 반응을 정지시킨다. 교차결합된 분자는 교차결합되지 않은 분자 환원성 SDS-PAGE 조건과 비환원성 SDS-PAGE 조건에서 전기영동 하였다. 도 19에서 나타낸 것과 같이, 환원된 젤의 교차결합되지 않은 분자는 BaLgp120-CD4-IgG1 키메라의 예상 크기인 180 kD에 밴드가 나타났다(중간 레인). CD4-IgG의 크기로서 적당한 작은 밴드는 분자의 BaLgp120과 CD4-IgG사이의 절단에 의해 생긴 키메라를 나타낸다. 상기 결과는 R/T변이가 퓨린 프로테아제에 의한 절단을 제거하더라도, 다른 프로테아제가 gp120의 C-말단에 작용할 수 있다는 것을 나타낸다. 비환원 조건의 교차결합되지 않은 분자(오른쪽 레인)는 360 kD를 나타내었고, 완전하게 조립된 이뮤노어드헤신의 예상 크기와 일치하였다. 상기 결과는 분자가 분래되어도(중간 레인) 이뮤노어드헤신은 연결되어 남아 있다는 것을 나타낸다. 분자의 교차결합은 조립된 구조를 안정화 시키고, 상기 결과를 확인시킨다(왼쪽 레인).

[0206] **실시예 14**

[0207] 293세포는 사용하기 24시간전에 pcDNA-인간 CCR5 또는 pcDNA-rhesus CCR5 또는 플라스미드 없이 일시적으로 감염시킨다. 감염된 세포(10^5 /웰)는 37°C에서 1시간 동안 지시된 농도의 R/T FLSC-IgG1과 반응시켰다. 부착된 R/T FLSC-IgG1는 phycoerythrin이 표지된 염소 항 인간 IgG로 검출하여 FACS로 분석하였다. 도 20은 R/T FLSC-IgG1이 인간과 rhesus의 CCR5와 결합하는 것을 나타낸다.

[0208] CCR5를 발현하는 개의 thymocyte(CF2Th-R5) 10^5 세포는 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 R/T FLSC-IgG1과 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 부착된 R/T FLSC-IgG1는 phycoerythrin이 표지된 염소 항 인간 IgG로 검출하여 FACS로 분석하였다. RANTES는 CCR5에 특이적인 케모카인으로서 R/T FLSC-IgG1과 수용체(CCR5)에 대해 경쟁한다. SDF는 CXCR4에 특이적인 케모카인으로 대조군으로 사용하였다. 도 21은 R/T FLSC-IgG1이 공동수용체인 CCR5를 통하여 HIV-1이 감염되는것을 막는 물질을 찾는 데 유용하게 쓰일 것이라는 증거를 제공한다.

[0209] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

SEQUENCE LISTING

<110> DeVico, Anthony L.
Fouts, Timothy R.
Tuskan, Robert G.

<120> VIRUS COAT PROTEIN/RECEPTOR CHIMERAS AND METHODS OF USE

<130> 4115-144 CIP

<140> US 09/934,060
<141> 2001-08-21

<150> US 09/684,026
<151> 2000-10-06

<150> US 60/158,321
<151> 1999-10-08

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 2159
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct

<400> 1

[0210]

atgccccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggctgct 60
 tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtaactacgg cgtgcccgtg 120
 tggaaaggagg ccaaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180
 gtgcacaacg tgtggggccc ccaacgctgc gtgcccaccg accccaacce ccaggagggtg 240
 gagatgaaga acgtgaccga gaaactcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300
 caagaggaca tcatcagcct ttgggaaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgaccccc 360
 ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgccca ccaacggcaa cgacaccaac 420
 accactagta gcagccgctg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480
 atcaccacca acatccgctg caaggtgcag aaggagtagc ccctgttcta caagctggac 540
 atgccccca tgcacaaca cagcaacaac cgctaccgca tgatcagctg caacaccgac 600
 gtgatcacc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tccccatcca ctactgccc 660
 cccgcccgtc tgcctatcct gaagtgcag gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc 720
 accaacgtga gcaccctgca gtgcaccac ggcatccgccc cgtggtgag caccagctg 780
 ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccea cttcgcgac 840
 aacgccaaag tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg caccgcccc 900
 aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggcgccggcc gcgcttcta caccaccggc 960
 gagatcatcg gcgacatccg ccaggccccc tgcaacctga gccgcgcccga gtggaacgac 1020
 accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080
 aagcacagca gcggcggcga ccccagatc gtgaccaca gcttcaattg cggcggcgag 1140
 ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200
 aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcataagca gatcatcaac 1260
 atgtggcagg aggtgggccc gcceatgtac gccccccca tccgoggcca gatccgctgc 1320
 agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380
 gaggtgttcc gcccggcggc cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440
 tacaaggtgg tgaagatcga gccctgggc gtggccccc ccaaggccaa gcgcccgtg 1500
 gtgcagcgcg agaagcgtg atcctctggt ggcggtggct cgggctccg aggaggtggg 1560
 tcgggtggcg gcgcggccgc taagaaagtg gtgctgggca aaaaagggga tacagtggaa 1620
 ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc atacaattcc actgaaaaa ctccaaccag 1680
 ataaagattc tgggaaatca gggctccttc ttaactaaag gtccatccaa gctgaatgat 1740
 cggctgact caagaagaag cctttgggac caaggaaact tccccctgat catcaagaat 1800
 ctaagatag aagactcaga tacttacatc tgtgaagtgg aggaccagaa ggaggaggtg 1860

[0211]

```

caattgctag tgttcggatt gactgccaac tctgacacce acctgcttca ggggcagagc 1920
ctgacctga ccttgagagag cccccctggt agtagcccct cagtgcaatg taggagtcca 1980
aggggtaaaa acatacaggg ggggaagacc ctctccgtgt ctcagctgga gotccaggat 2040
agtggcacct ggacatgcac tgtcttgcag aaccagaaga aggtggagtt caaaatagac 2100
atcgtggtgc tagctgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaata tgtttaaac 2159

```

<210> 2

<211> 720

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (716)..(716)

<223> Xaa can be any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (719)..(719)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 2

```

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20           25           30

```

```

Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu
35           40           45

```

```

Phe Cys Ala Ser Asp Arg Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val

```

[0212]

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
 305 310 315 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
 325 330 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
 340 345 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
 355 360 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
 370 375 380

Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
 405 410 415

Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro
 420 425 430

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
 435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
 465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
 485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Gly Ser Ser Gly Gly Gly
 500 505 510

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys
 515 520 525

Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr
 530 535 540

[0214]

Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln
 545 550 555 560

Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
 565 570 575

Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
 580 585 590

Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr
 595 600 605

Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val
 610 615 620

Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser
 625 630 635 640

Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln
 645 650 655

Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser
 660 665 670

Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val
 675 680 685

Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu
 690 695 700

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
 705 710 715 720

<210> 3

<211> 2159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 3

atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc acctgtacc tgctggggat gctggtcgct 60

[0215]

t c c t g c c t c g g a a a c g c c g a g g a g a a g c t g t g g g t g a c c g t g t a c t a c g g c g t g c c c g t g 120
t g g a a g g a g g c c a c c a c c a c c c t g t t t c t g c g c a g c g a c c g c a a g g c c t a c g a c c c g a g 180
g t g c a c a a c g t g t g g g c c a c c a c g c t g c g t g c c c a c c g a c c c c a a c c c c a g g a g g t g 240
g a g c t g a a g a a c g t g a c c g a g a a c t t c a a c a t g t g g a a g a a c a a c a t g g t g g a g c a g a t g 300
c a c g a g g a c a t c a t c a g c c t g t g g g a c c a g a g c c t g a a g c c c t g c g t g a a g c t g a c c c c c 360
c t g t g c g t g a c c c t g a a c t g c a c c g a c c t g c g a a c g c c a c c a a c g g c a a c g a c a c c a a c 420
a c c a c t a g t a g c a g c g c g c g c a t g g t g g g c g g c g g c g a g a t g a a g a a c t g c a g c t t c a a c 480
a t c a c c a c c a a c a t c c g c g c g c a a g g t g c a g a a g g a t a c g c c t g t t c t a c a a g t g g a c 540
a t c g c c c c c a t e g a c a a c a a c a g c a a c a a c c g t a c c g c c t g a t c a g c t g c a a c a c c a g c 600
g t g a t c a c c a g g c t g c c c a a g g t g a g c t t c g a g c c c a t c c c c a t c c a c t a c t g c g c c 660
c c g c c g c g t t e g c c a t c c t g a a g t g c a a g g a c a a g a a g t t c a a c g g c a a g g c c c c t g c 720
a c c a a c g t g a g c a c c g t g c a g t g a c c c c a c g g c a t c c g c c c g t g a g c a c c c a g c t g 780
c t g t g a a c g g a g c c o t g g c c g a g g a g g a g t g t g g t g a t c c g a g c g c c a a c t t c g c g a c 840
a a c g c c a a g g t a t c a t c g t g c a g c t g a a c g a g a g c g t g g a g a g a g a t c a a c t g c a c c c g c c c c 900
a a c a a c a a c a c c g c a a g t c a t c c a c a t c g g c c c g g c c g o g c c t t o t a c a c c a c g g c 960
g a g a t c a t c g g c a c a t c c g c a g g c c c a c t g c a a c c t g a g c c g c g c c a a g t g g a a c g a c 1020
a c c c t g a a c a g a t c g t g a t c a a g t g c g c g a g c a g c a g t t c g c a a c a a g a c c a t c g t g t t c 1080
a a g c a c a g c a g c g g g c g c g a c c c g a g a t c g t a c c a c a g o t t c a a t t g c g g c g g c g a g 1140
t t c t t c t a c t g c a a c a g c a c c a g c t g t t c a a c a g c a c c t g g a a c g t g a c c g a g a g a g c 1200
a a c a a c a c c g t g g a g a a c a a c a c c a t c a c c c t g c c g e a t c a a g c a g a t c a t c a a c 1260
a t g t g g c a g g a g g t g g g c g c c a t g t a c g c c c c c c a t c c g c g g c a g a t c c g c t g c 1320
a g t t c h a a c a t c a c c g g c c t g c t g c t g a c c c g c g a c g g c g g c c c c e g a g g a c a a c a a g a c c 1380
g a g g t g t t c c c c c g g c g c g g c a c a t g c g g a c a a c t g g c g c a g c g a g c t g t a c a a g 1440
t a c a a g g t g g t a a g a t c g a g c c c t g g g c g t g g c c c c a c c a a g g c c a a g c g c c g c g t g 1500
g t g c a g c g c g a g a a g a c c g g a t c c t c t g g t g g c g g t g g c t c g g c t c c g g a g g a g t g g g 1560
t c g g g t g g c g c g c g g c c g t a a g a a a g t g t g c t g g g c a a a a a g g g g a t a c a g t g g a a 1620
c t g a c c t g t a c a g c t t c c c a g a a g a g c a t a c a a t t c c a c t g g a a a a c t c c a a c c a g 1680
a t a a a g a t t c t g g g a a a t c a g g c t c c t t c t t a a c t a a a g g t c c a t c c a a g c t g a a t g a t 1740
c g c g c t g a c t c a a g a a g a a g c c t t t g g g a c c a a g g a a a c t t c c c c t g a t c a t c a a g a a t 1800
c t t a a g a t a g a a g a c t c a g a t a c t t a c a t c t g t g a a g t g g a g g a c c a g a a g g a g g a g t g 1860

[0216]

```

caattgctag tgttcggatt gactgccaac tctgacaccc acctgcttca ggggcagagc 1920
ctgaccctga cettggagag cccccctggg agtagccct cagtgcaatg taggagtcca 1980
aggggtaaaa acatacaggg ggggaagacc ctctccgtgt ctcagctgga gctccaggat 2040
agtggcacct ggacatgcac tgtcttcag aaccagaaga aggtggagtt caaaatagac 2100
atcgtggtgc tagctgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaata tgtttaaac 2159

```

```

<210> 4
<211> 720
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthesized construct
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (716)..(716)
<223> Xaa can be any amino acid

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (719)..(719)
<223> Xaa can be any amino acid

```

```

<400> 4
Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15
Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30
Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu
35 40 45
Phe Cys Ala Ser Asp Arg Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val
50 55 60

```

[0217]

Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Glu Leu Lys Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met
 85 90 95
 Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu
 100 105 110
 Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn Cys Thr
 115 120 125
 Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
 130 135 140
 Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 145 150 155 160
 Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
 165 170 175
 Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
 180 185 190
 Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
 195 200 205
 Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
 210 215 220
 Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly Pro Cys
 225 230 235 240
 Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
 245 250 255
 Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
 260 265 270
 Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
 275 280 285
 Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr
 290 295 300

[0218]

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
 305 310 315 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
 325 330 335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
 340 345 350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
 355 360 365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
 370 375 380

Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
 405 410 415

Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro
 420 425 430

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
 435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
 465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
 485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Thr Gly Ser Ser Gly Gly Gly
 500 505 510

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys
 515 520 525

Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr
 530 535 540

[0219]

Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln
 545 550 555 560

Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
 565 570 575

Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
 580 585 590

Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr
 595 600 605

Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val
 610 615 620

Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser
 625 630 635 640

Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln
 645 650 655

Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser
 660 665 670

Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val
 675 680 685

Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu
 690 695 700

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
 705 710 715 720

<210> 5

<211> 1668

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 5

atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgacc tgctgggat gctggtcgct 60

[0220]

```

ccctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120
tgggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180
gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaacce ccaggagggtg 240
gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300
cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgaccccc 360
ctgtgctgta ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcc acaacggcaa cgacaccaac 420
accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggcggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480
atcaccacca acatccgcgg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540
atgccccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccagc 600
gtgatcacc aggcctgccc caaggtgagc ttogagccca tccccatcca ctactgcgcc 660
cccgcggct tcgccatcct gaagtgcaag gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc 720
accaacgtga gcaccgtgca gtgacccca ggcacccgc cctggtgtag caccagctg 780
ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgcaa cttcgccgac 840
aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg caccgcccc 900
aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggcgccggcc gcgccttcta caccaccggc 960
gagatcatcg gcacatccg ccaggccac tgcaacctga gccgcgcaa gtggaacgac 1020
accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080
aagcacgca gcggcgccga ccccgagatc tgacccaca gcttcaattg cggcgccgag 1140
ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200
aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260
atgtggcagg aggtgggccg cgccatgtac gcccccca tccgcgcca gatccgctgc 1320
agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380
gaggtgttcc gccccggcg cgcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440
tacaagggtg tgaagatcga gcccctgggc gtggcccca ccaaggcca gcgccgctg 1500
gtgcagcgcg agaagaccgg atcctctggg ggcgggtggc cgggctccgg aggaggtgg 1560
tcgggtggcg gcgcggccgc ttgcaacctg gcccgctgcc agctgcctg caagagcctg 1620
ggcctgctgg gcaagtgcgc cggcagcttc tgcgcctgcg gcccta 1668

```

```

<210> 6
<211> 556
<212> PRT

```

[0221]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (556)..(556)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 6

```

Met  Pro  Met  Gly  Ser  Leu  Gln  Pro  Leu  Ala  Thr  Leu  Tyr  Leu  Leu  Gly
 1      5      10      15

Met  Leu  Val  Ala  Ser  Cys  Leu  Gly  Asn  Ala  Glu  Glu  Lys  Leu  Trp  Val
 20      25      30

Thr  Val  Tyr  Tyr  Gly  Val  Pro  Val  Trp  Lys  Glu  Ala  Thr  Thr  Thr  Leu
 35      40      45

Phe  Cys  Ala  Ser  Asp  Arg  Lys  Ala  Tyr  Asp  Thr  Glu  Val  His  Asn  Val
 50      55      60

Trp  Ala  Thr  His  Ala  Cys  Val  Pro  Thr  Asp  Pro  Asn  Pro  Gln  Glu  Val
 65      70      75      80

Glu  Leu  Lys  Asn  Val  Thr  Glu  Asn  Phe  Asn  Met  Trp  Lys  Asn  Asn  Met
 85      90      95

Val  Glu  Gln  Met  His  Glu  Asp  Ile  Ile  Ser  Leu  Trp  Asp  Gln  Ser  Leu
 100     105     110

Lys  Pro  Cys  Val  Lys  Leu  Thr  Pro  Leu  Cys  Val  Thr  Leu  Asn  Cys  Thr
 115     120     125

Asp  Leu  Arg  Asn  Ala  Thr  Asn  Gly  Asn  Asp  Thr  Asn  Thr  Thr  Ser  Ser
 130     135     140

Ser  Arg  Gly  Met  Val  Gly  Gly  Gly  Glu  Met  Lys  Asn  Cys  Ser  Phe  Asn
 145     150     155     160

Ile  Thr  Thr  Asn  Ile  Arg  Gly  Lys  Val  Gln  Lys  Glu  Tyr  Ala  Leu  Phe

```

[0222]

	165		170		175
Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr	180		185		190
Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys	195		200		205
Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe	210		215		220
Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly Pro Cys	225		230		240
Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val	245		250		255
Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val	260		265		270
Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln	275		280		285
Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr	290		295		300
Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly	305		310		320
Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala	325		330		335
Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln	340		345		350
Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro	355		360		365
Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys	370		375		380
Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu Glu Ser	385		390		400
Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys	405		410		415

Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro
 420 425 430

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
 435 440 445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
 465 470 475 480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
 485 490 495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Thr Gly Ser Ser Gly Gly Gly
 500 505 510

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ala Ala Cys
 515 520 525

Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu Gly
 530 535 540

Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro Xaa
 545 550 555

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthesized construct

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (39)

<223>

[0223]

```

<400> 7
gggggtacca tgcccatggg gtctctgcaa ccgctggcc 39

<210> 8
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthesized construct

<400> 8
gggtccggag cccgagccac cggcaccaga ggatccacgc ttctcgcgct gcaccacg 60
gcgctt 66

<210> 9
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(69)
<223>

<400> 9
gggtccggag gaggtgggtc ggggtggcggc gcggccgcta agaaagtggg gctgggcaaa 60
aaaggggat 69

<210> 10
<211> 76

```

[0224]

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct
<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(76)
<223>

<400> 10
ggggtttaaa cttattacag atcctcttct gagatgagtt ttgttcagct agcaccacga      60
tgtctatattt gaactc      76

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Spacer

<400> 11
gssgggsgs gggsgggaa a      21

<210> 12
<211> 1769
<212> DNA

```

[0225]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

```

<400> 12
atgcccattgg ggtctctgca accgctggcc acctgtacc tgctggggat gctggtcgct    60
tcctgcctog gaaagaacgt gaccgagaac ttcaacatgt ggaagaacaa catggtggag    120
cagatgcaag aggacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccctg cgtgaagctg    180
acccccctgt gcgtgacctt gggcgccggc gagatgaaga actgoagctt caacatcggc    240
gcggggcccg tgatcagctg caaccaccagc gtgatcaccg aggcctgccc caaggtgagc    300
ttcagagcca tccccatcca ctactgcgcc ccgcccggct tcgccatcct gaagtgcaag    360
gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc accaacgtga gcaccgtgca gtgcaccac    420
ggcatccgcc ccgtggtgag caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag    480
gtggtgatcc gcagcgccaa ctccgcccgc aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac    540
gagagcgtgg agatcaactg caccgcccc aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc    600
ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac    660
tgcaacctga gccgcgcaa gtggaacgac accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc    720
gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc aagcacagca gcggcggcga ccccagatc    780
gtgaccocaa gcttcaattg cggcggcgag ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc    840
aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc    900
ctgocctgcc gcacaaagca gatcatcaac atgtggcagg aggtggggcg cgccatgtac    960
gcccccccca tccgcgccca gatccgctgc agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc   1020
cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc gaggtgttcc gcccggcgcg cggcgacatg   1080
cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag tacaaggtgg tgaagatcgg atcctctggt   1140
ggcgggtggc cgggctccgg aggaggtggg tcgggtggcg gcgcccggcg taagaaagtg   1200
gtgctgggca aaaaagggga tacagtggaa ctgacctgta cagcttccca gaagaagagc   1260
atacaattcc actgaaaaaa ctccaaccag ataaagattc tgggaaatca gggctccttc   1320
ttaactaaag gtccatccaa gctgaatgat cgcgctgact caagaagaag cctttgggac   1380
caaggaaact tccccctgat catcaagaat cttaagatag aagactcaga tacttacatc   1440
tgtgaagtgg aggaccagaa ggaggaggtg caattgctag tgttcggatt gactgccaac   1500
tctgacaccc acctgcttca ggggcagagc ctgacctga ccttggagag ccccctgggt   1560

```

[0226]

```

agtagccct cagtgcaatg taggagtcca aggggtaaaa acatacaggg ggggaagacc 1620
ctctccgtgt ctcagctgga gctccaggat agtggcacct ggacatgcac tgtcttgag 1680
aaccagaaga aggtggagtt caaaatagac atcgtggtgc tagctgaaca aaaactcatc 1740
tcagaagagg atctgtaata tgtttaaac 1769

```

```

<210> 13
<211> 590
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthesized construct
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (586)..(586)
<223> Xaa can be any amino acid

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (589)..(589)
<223> Xaa can be any amino acid

```

```

<400> 13
Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1          5          10          15
Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Lys Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn
20          25          30
Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser
35          40          45
Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys
50          55          60

```

[0227]

val Thr Leu Gly Ala Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Gly
 65 70 75 80
 Ala Gly Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys
 85 90 95
 Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala
 100 105 110
 Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly
 115 120 125
 Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
 130 135 140
 Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu
 145 150 155 160
 Val Val Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile
 165 170 175
 Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
 180 185 190
 Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr
 195 200 205
 Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser
 210 215 220
 Arg Ala Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg
 225 230 235 240
 Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly
 245 250 255
 Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
 260 265 270
 Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu
 275 280 285
 Glu Ser Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg
 290 295 300
 Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr

[0228]

Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Glu
 565 . 570 575

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
 580 585 590

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 14

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Xaa Tyr Val Xaa Thr
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0230]

```

<220>
<223> Synthesized construct
<400> 15
gggggtacca tgcccatggg gtctctgcaa ccgctggcca ccttgtacct getgggggatg 60
ctggtegett cctgcctcgg aaagaacgtg accgagaact tcaacatgtg g 111

<210> 16
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct
<400> 16
gggggatcgg atcttcacca ccttgatctt gtacagctc 39

<210> 17
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct
<400> 17
ctgtgctgga ccctgggggc ggccgagatg aagaactgca gettcaacat cggcgcgggc 60
cgcctgatca gctgc 75

<210> 18
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct

```

[0231]

<400> 18
 gcagctgatac aggcggcccg cgccgatggt gaagctgcag ttcttcatct cgcccgcgcc 60
 cagggtcaag cacag 75

<210> 19
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized construct
 <400> 19
 tgcaacctgg cccgctgcca gctgctgtgc aagagcctgg gcctgctggg caagtgcgcc 60
 ggcagcttct ggcctgcgg ccctaa 87

<210> 20
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized construct
 <400> 20
 Cys Asn Leu Ala Arg Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Gly Pro
 20 25

<210> 21
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

[0232]

<220>
 <223> Synthesized construct
 <400> 21
 gcgggccgctt gcaacctggc ccgctgccag ctgcgctgca agagcctggg cctgctgggc 60
 aagtgcgcgcg gcagcttctg cgctgcggc ccctaagaat tc 102

<210> 22
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized construct
 <400> 22
 gaattcttag gggccgcagg cgcagaagct gccggcgcac ttgccagca ggcccaggct 60
 cttgcagcgc agctggcagc gggccagggt gcaagcggcc gc 102

<210> 23
 <211> 1518
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized construct
 <400> 23
 atgcccattgg ggtctctgca accgctggcc acctgtacc tgctggggat gctggctcgt 60
 tcctgcctcg gaaacgcoga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120
 tggaaggagg ccaccaccac cctgttctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180
 gtgcacaacg tgtgggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaacc ccaggagggtg 240
 gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300
 cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgaccccc 360
 ctgtgcgtga ccetgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420
 accactagta gcagccgcgg catggtgggc ggccggcaga tgaagaactg cagcttcaac 480

[0233]

```

atcaccacca acatcccggg caaggtgcag aaggagtacg ccctgttcta caagctggac 540
atcgcccca tcgacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccage 600
gtgatcacc aggctgccc caaggtgagc ttogagccca tccccatcca ctactgcgcc 660
cccgccggtt tcgcatcctt gaagtgaag gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc 720
accaacgtga gcaccgtgca gtgcaccac ggcatccgcc ccgtggtgag caccacgtg 780
ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac 840
aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg caccgcgcc 900
aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggcgccggcc gcgccttcta caccacggc 960
gagatcatcg gcgacatccg ccaggccac tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac 1020
accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080
aagcacagca gggcgggcga ccccgagatc gtgaccaca gcttcaattg cggcgggcag 1140
ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200
aacaacacog tggagaacaa caccatcacc ctgcccctgcc gcacaaagca gatcatcaac 1260
atgtggcagg aggtgggccc cgccatgtac gccccccca tccgcgcca gatccgctgc 1320
agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380
gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag 1440
tacaaggtgg tgaagatcga gcccctgggc gtggcccca ccaaggccaa gcgcccgtg 1500
gtgcagcgcg agaagcgt 1518

```

<210> 24

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 24

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30

[0234]

Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu
 35 40 45

Phe Cys Ala Ser Asp Arg Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val
 50 55 60

Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val
 65 70 75 80

Glu Leu Lys Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met
 85 90 95

Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu
 100 105 110

Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn Cys Thr
 115 120 125

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
 130 135 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
 165 170 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
 180 185 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
 195 200 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
 210 215 220

Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly Pro Cys
 225 230 235 240

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
 245 250 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
 260 265 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln

[0235]

```

                275                280                285
Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr
   290                295                300

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
   305                310                315                320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala
   325                330                335

Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln
   340                345                350

Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro
   355                360                365

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
   370                375                380

Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu Glu Ser
   385                390                395                400

Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys
   405                410                415

Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro
   420                425                430                435

Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu
   435                440                445

Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg
   450                455                460

Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys
   465                470                475                480

Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala
   485                490                495

Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg
   500                505

```

<210> 25

[0236]

<211> 534
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized construct

<400> 25
 aagaaagtgg tgctgggcaa aaaaggggat acagtggaac tgacctgtac agcttcccag 60
 aagaagagca tacaattcca ctggaaaaac tccaaccaga taaagattct gggaaatcag 120
 ggctccttct taactaaagg tccatccaag ctgaatgatc gcgctgactc aagaagaagc 180
 ctttgggacc aaggaaactt cccctgatc atcaagaatc ttaagataga agactcagat 240
 acttacatct gtgaagtgga ggaccagaag gaggaggtgc aattgctagt gttcggattg 300
 actgccaact ctgacacca cotgcttcag gggcagagcc tgaccctgac cttggagagc 360
 cccctggta gtacccttc agtgcaatgt aggagtccaa ggggtaaaaa catacagggg 420
 ggggaagacc tctccgtgtc tcagctggag ctccaggata gtggcacctg gacatgcaact 480
 gtcttgcaga accagaagaa ggtggagtcc aaaatagaca tcgtgggtgct agct 534

<210> 26
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized construct

<400> 26
 Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
 20 25 30
 Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
 35 40 45
 Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln

[0237]

gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc accaacgtga gcaccgtgca gtgcaccac 420
 ggcatccgcc ccgtggtgag caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag 480
 gtggtgatcc gcagcgccaa cttcgccgac aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac 540
 gagagcgtgg agatcaactg caccgcccc aacaacaaca cccgaagtc catccacatc 600
 ggccccggcc gcgccttcta caccaccggc gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac 660
 tgcaacctga gccgcgccaa gtggaacgac accctgaaca agatcgtgat caagctgctc 720
 gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc aagcacagca gcggcggcga ccccagatc 780
 gtgaccaca gcttcaattg cggcggcgag ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc 840
 aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc aacaacaccg tggagaaca caccatcacc 900
 ctgcctgcc gcataagca gatcatcaac atgtggcagg aggtgggccc cgccatgtac 960
 gccccccca tcccgccca gatccgctgc agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc 1020
 cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg 1080
 cgcgacaact ggcgcagcga gctgtacaag tacaaggtgg tgaagatc 1128

<210> 28

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 28

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
 1 5 10 15

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

Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser
 35 40 45

Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys
 50 55 60

Val Thr Leu Gly Ala Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Gly

[0239]

Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly
 325 330 335

Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val
 340 345 350

Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu
 355 360 365

Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
 370 375

<210> 29

<211> 1518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 29
 atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttggtacc tgctggggat gctggtcgct 60
 tcctgcctcg gaaacgccga ggagaagctg tgggtgaccg tgtactacgg cgtgcccgtg 120
 tggaaggagg ccaccaccac cctggtctgc gccagcgacc gcaaggccta cgacaccgag 180
 gtgcacaacg tgtggggccac ccacgcctgc gtgcccaccg accccaaccc ccaggagggtg 240
 gagctgaaga acgtgaccga gaacttcaac atgtggaaga acaacatggt ggagcagatg 300
 cacgaggaca tcatcagcct gtgggaccag agcctgaagc cctgcgtgaa gctgaccccc 360
 ctgtgcgtga ccctgaactg caccgacctg cgcaacgcca ccaacggcaa cgacaccaac 420
 accactagta gcagccggcg catggtgggc gccggcgaga tgaagaactg cagcttcaac 480
 atcaccacca acatccggcg caaggtgcag aaggagtacg cctgttcta caagctggac 540
 atcgccccca tgcacaacaa cagcaacaac cgctaccgcc tgatcagctg caacaccagc 600
 gtgatcacc aggcctgccc caaggtgagc ttcgagccca tcccaccca ctactgcgcc 660
 cccgcccgtc tcgccatcct gaagtgaag gacaagaagt tcaacggcaa gggcccctgc 720
 accaacgtga gcaccgtgca gtgcaccacc gccatccgcc ccgtggtgag caccagctg 780
 ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggag tgggtgatcc gcagcgcaa cttcgccgac 840

[0241]

```

aacgccaagg tgatcatcgt gcagctgaac gagagcgtgg agatcaactg caccgcgccc 900
aacaacaaca cccgcaagtc catccacatc ggccccggcc ggccttcta caccaccggc 960
gagatcatcg gcgacatccg ccaggcccac tgcaacctga gccgcgcca gtggaacgac 1020
accctgaaca agatcgtgat caagctgcgc gagcagttcg gcaacaagac catcgtgttc 1080
aagcacagca gcggcgcgga ccccgagatc gtgaccaca gcttcaattg cggcgcgag 1140
ttcttctact gcaacagcac ccagctgttc aacagcacct ggaacgtgac cgaggagagc 1200
aacaacaccg tggagaacaa caccatcacc ctgccctgcc gcatcaagca gatcatcaac 1260
atgtggcagg aggtggggccg cgccatgtac gccccccca tccgcgcca gatccgctgc 1320
agttchaaca tcaccggcct gctgctgacc cgcgacggcg gccccgagga caacaagacc 1380
gaggtgttcc gccccggcgg cggcgacatg cgcgacaact ggcgagcga gctgtacaag 1440
tacaagggtg tgaagatcga gccccgggc gtggcccca ccaaggcca gcgccgctg 1500
gtgcagcgcg agaagacc 1518

```

<210> 30

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<400> 30

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Asn Ala Glu Glu Lys Leu Trp Val
20 25 30

Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu
35 40 45

Phe Cys Ala Ser Asp Arg Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val
50 55 60

Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val
65 70 75 80

[0242]

Glu Leu Lys Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met
 85 90 95

Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu
 100 105 110

Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn Cys Thr
 115 120 125

Asp Leu Arg Asn Ala Thr Asn Gly Asn Asp Thr Asn Thr Thr Ser Ser
 130 135 140

Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Ile Thr Thr Asn Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu Phe
 165 170 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Ala Pro Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Arg Tyr
 180 185 190

Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys
 195 200 205

Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe
 210 215 220

Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Lys Gly Pro Cys
 225 230 235 240

Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
 245 250 255

Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
 260 265 270

Ile Arg Ser Ala Asn Phe Ala Asp Asn Ala Lys Val Ile Ile Val Gln
 275 280 285

Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr
 290 295 300

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Gly
 305 310 315 320

Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala

[0243]

325	330	335
Lys Trp Asn Asp Thr Leu Asn Lys Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Gln 340	Ile Val Ile Lys Leu Arg 345	Glu Gln 350
Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser Gly Gly Asp Pro 355	Thr Ile Val Phe Lys His Ser Ser 360	Gly Gly Asp Pro 365
Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys 370	Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly 375	Glu Phe Phe Tyr Cys 380
Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr Glu Glu Ser 385	Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Thr 390	Glu Glu Ser 400
Asn Asn Thr Val Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys 405	Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 410	Lys 415
Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro 420	Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 425	Met Tyr Ala Pro 430
Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu 435	Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 440	Leu Leu 445
Leu Thr Arg Asp Gly Gly Pro Glu Asp Asn Lys Thr Glu Val Phe Arg 450	Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 455	Glu Val Phe Arg 460
Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys 465	Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 470	Glu Leu Tyr Lys 475
Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala 485	Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile 490	Pro Thr Lys Ala 495
Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Thr 500	Lys Thr 505	

<210> 31

<211> 776

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

```

<400> 31
atgcccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgctggggat gctggtcgct    60
tccgtgctag cggatcccga ggagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg    120
tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag    180
gacacccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac    240
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag    300
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc    360
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc    420
ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg    480
tacacccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg    540
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag    600
aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc    660
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg    720
catgaggctc tgcacaacca ctacacgagc aagagcctct ccctgtctcc gggtaa    776

```

<210> 32

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (259)..(259)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 32

```

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Met Leu Val Ala Ser Val Leu Ala Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys
          20           25           30

```

[0245]

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 35 40 45
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 50 55 60
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 65 70 75 80
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 85 90 95
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 100 105 110
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 115 120 125
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 130 135 140
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 145 150 155
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 165 170 175
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 180 185 190
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 195 200 205
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 210 215 220
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 225 230 235 240
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 245 250 255
 Pro Gly Xaa

[0246]

```

<210> 33
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized construct

<400> 33
ggatcctctg gtggcgggtgg ctcgggctcc ggaggaggtg ggtcgggtgg cggcgcggcc 60
gct 63
    
```

[0247]

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 전형적인 키메라릭 폴리펩티드를 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드 구조를 도식화한 것이다. 전장의 단일 사슬(FLSC)인 키메라릭 폴리펩티드는 HIVgp120 (BaL 계통), 20개의 아미노산으로 구성된 스페이서 서열, 도메인 1(D1)과 도메인 2(D2)로 구성된 CD4 폴리펩티드 서열, 및 꼬리표인 myc 펩티드로 이루어져 있다. 잘린 단일 사슬(TcSC) 키메라는 불변영역 1(C1), 가변영역 1(V1), 가변영역 2(V2) 및 불변영역 5(C5)에서 삭제부분을 포함하고 있다. TcSC에 표시된 삭제부분은 BaL gp120 서열에 따라 번호를 부여하였다. 전장의 단일 사슬(FLSC) R/T 키메라는 퓨린 절단 부위에서 gp120의 C-말단 부위에서 R이 T로 치환된 단 하나의 돌연변이를 가지고 있다. 전장의 단일 사슬(FLSC) R/T CD4M9 키메라는 21개의 아미노산으로 구성된 스페이서 폴리펩티드, CD4M9 펩티드 서열 및 gp120의 퓨린 절단 부위에 단 하나의 돌연변이를 가지고 있다.

[0017]

도 2는 293-SC 세포에서 발현되는 전장의 단일 사슬(FLSC)와 잘린 단일 사슬(TcSC) 수용성 키메라릭 폴리펩티드를 포함하고 있는 세포 배양 상등액으로 특수 단백 검출 검사(Western blot analysis)를 한 것이다. 면역블로팅(immunoblotting)은 gp120(레인 1 ~ 레인 4)과 CD4(레인 5 ~ 레인 8)으로 수행하였으며, 화살표는 젤의 이동성이 감소하는 순서로 gp120-CD4 단일 사슬(단일 사슬), 잘려진 gp120 (gp120 단편), 그리고 CD4 (CD4 단편)을 가르킨다.

[0018]

도 3은 293-SC 세포에서 발현되는 gp120-CD4를 분석한 것이다. 교차결합하지 않는 gp120-CD4은 레인 1에, 교차결합하는 gp120-CD4는 레인 2에 나타나 있다.

[0019]

도 4는 교차결합시킨 후 전장의 단일 사슬(FLSC)을 면역블롯(immunoblot) 분석한 것이다. 각 각 다른 전장의 단일 사슬(FLSC)의 농도(1-0.03 μM)에 대한 모든 단백질의 상대적인 백분율(%)은 막대 그래프에 나타내었다: (A), 45% 172kD; (B), 25% 302kD; 그리고 (C), 10% 고순위의 올리고머.

[0020]

도 5A-5C는 gp120-CD4의 결합을 분석한 것이다. (A), 교차결합한 gp120-rsCD4와 교차결합하지 않은 gp120-

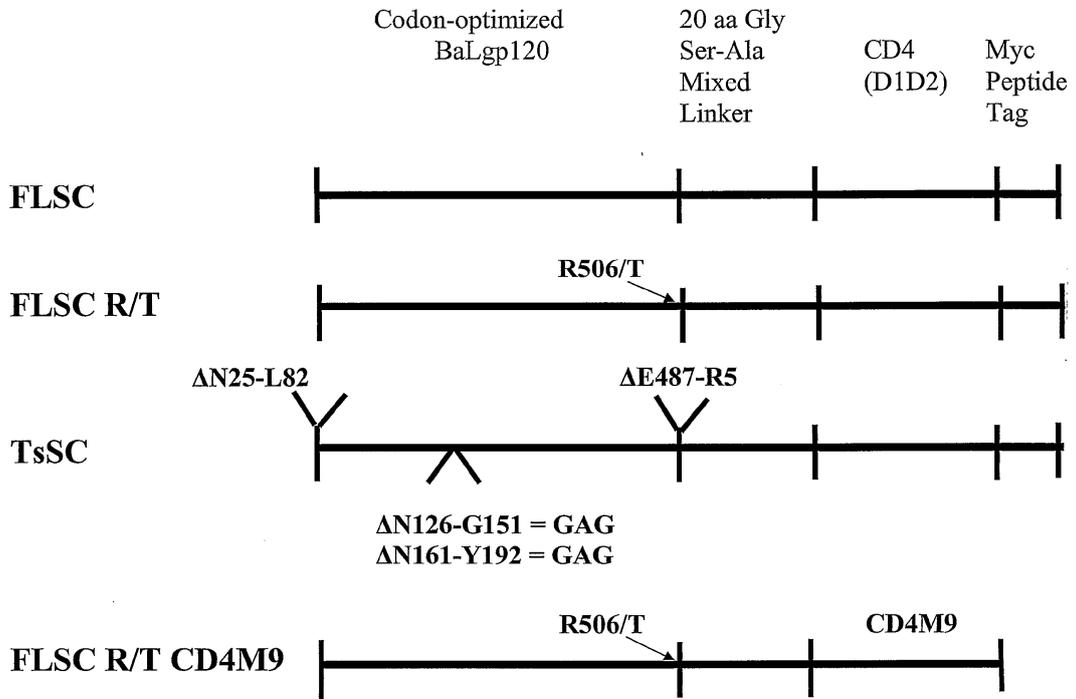
rsCD4를 비교하기 위하여, 전장의 단일 사슬(FLSC)를 gp120에 대한 항체(17b, 48d, A32, C1 1)와 배양한다. 17b, 48d 및 A32는 복합된 gp120(gp120)에 우선적으로 결합한다. 막대는 표준 오차와 함께 나타내었다. (B), 전장의 단일 사슬(FLSC)과 잘린 단일 사슬(TcSC)에서 gp120에 대한 인간 단클론 항체의 reciprocal half-maximal binding concentration (효소면역측정법(ELISA)). (C), gp120 CD4 결합 부위와 반응하는 인간 모노클로날 항체 IgG1b12, F91 및 205-469의 상호 반-최대 결합(reciprocal half-maximal binding).

- [0021] 도 6은 L1.2 세포에서 발견되는 CCR5 (R5) 또는 CXCR4 (X4) 공동 수용체에 결합하는 gp120-CD4 키메라 (전장의 단일 사슬(FLSC), 잘린 단일 사슬(TcSC))를 분석한 것이다. CCR5 (R5) 또는 CXCR4 (X4)를 발현하지 않는 대조구 세포는 L1.2로 표시된다. 결합한 복합체들은 5 µg/ml의 CD4 Mab45에 대한 항체를 이용하여 유식세포측정기 (flow cytometry)로 검출하였다. 나타낸 수치는 3번의 실험을 수행하여 얻은 값이다.
- [0022] 도 7은 gp120 결합 항체들(17b, 48d, A32, C11 및 2G12)과 gp41 항체가 있을 때 공동 수용체에 결합하는 gp120-CD4 (전장의 단일 사슬(FLSC), 잘린 단일 사슬(TcSC))를 분석한 것이다. 도 7에 도시된 바와 같이, L1.2 세포는 공동 수용체 CR5 (R5)와 CXCR4 (X4)를 발현하거나 발현하지 않는다. 항체가 없는 대조구는 "+"로 표시하였고, 처리하지 않은 세포에서 측정된 수치는 "-"로 표시하였다. 결합한 복합체들은 5 µg/ml의 CD4 Mab45에 대한 항체를 사용하여 유식세포측정기 (flow cytometry)로 검출하였다. 결과는 matched control assay에서 얻은 형광 광도의 평균값에 대한 백분율(%)로 나타내었다. 평균값은 3번의 독립적 실험에서 측정된 값으로 얻은 것이다. 표준 오차는 막대와 같이 나타내었다.
- [0023] 도 8은 전장의 단일 사슬(FLSC), 잘린 단일 사슬(TcSC), BaLgp120 및 BaLgp120rsCD4 결합체들에 의해 중화되는 HIV-1₂₀₄₄ (X4 특이적 분리물) 바이러스와 HIV-Ba19 (R5 특이적 분리물) 바이러스를 분석한 것이다. U373 세포는 CD4, R5 또는 X4, 그리고 HIV-1LTR 프로모터에 의해 조절되는 P-갈락토시다아제를 발현한다. HIV-1₂₀₄₄ 에 대한 FLSC와 TcSC의 ID₉₀은 검사한 최고 농도에서 이루어지지 않았으므로 >10 µg/ml로 나타내었다.
- [0024] 도 9는 암호화하고 있는 도메인을 보여주는 키메라 gp120-CD4-IgG1의 모식도이다. 플라스미드로 서브클로닝된 gp120-CD4는 본질적으로 IgG1 중사슬의 경첩부위 CH2와 CH3를 가지고 있으므로 키메라 gp120-CD4-IgG1 폴리펩티드의 발현이 가능하다.
- [0025] 도 10은 293 세포에서 발견된 gp120-CD4-IgG1 키메라 폴리펩티드의 면역블롯을 분석한 것이다. 키메라 gp120-CD4-IgG1은 배양한 상등액에서 분리하였고(레인 1), HIV 계통 BaL에서 분리한 gp120 폴리펩티드와 비교하여 보여주었다(레인 2).
- [0026] 도 11은 L1.2 세포에서 발견되는 공동 수용체에 결합하는 키메라 폴리펩티드의 상반된 희석 분석법의 결과를 보여주고 있다. L1.2 세포에서 발견되는 CCR5와 CXCR4는 표시된 바와 같다.
- [0027] 도 12는 CCR5-발현 세포에서는 gp120의 R5 결합 부위를 통해 FLSC-IgG1이 R5 공동 수용체와 상호작용하는데, 이 세포에 결합하는 FLSC-IgG1에 차단 모노클로날 항체(17b)를 처리하여 분석한 것이다.
- [0028] 도 13은 퓨린 절단 부위에서 R을 T로 치환하여 돌연변이를 일으키면 gp120-CD4(FLSC)의 안정성이 증가함을 보여준 것이다.
- [0029] 도 14는 BaLgp120, FLSC 및 FLSC R/T와 FLSC R/T CD4M9을 비교하는 면역블롯을 보여준 것이다. FLSC R/T CD4M9은 FLSC R/T의 CD4D1D2를 CD4M9 유전자 서열로 치환하여 제조하였다.
- [0030] 도 15는 CCR5(R5)에 대한 FLSC R/T CD4M9의 결합을 분석한 것이다. 분석 결과는 형광 광도의 평균값으로 나타내었다. 도면은 FLSC R/T CD4M9이 FLSC R/T와 유사한 효율을 가지고 R5-발현 세포에 결합하는 것을 보여주고 있다.
- [0031] 도 16은 gp120이 CD4와 상호작용을 할 때 노출이 증가하고, 노출된 17b 에피토프가 FLSC R/T와 같은 에피토프의 결합을 보여주고 있다.
- [0032] 도 17은 FLSC로 배양한 쥐에서 추출한 혈청에 의한 최초의 R5 HIV-1의 중화를 보여주고 있다.
- [0033] 도 18은 FLSC상에 노출된 에피토프를 막는 BaLgp120/sCD4의 공유적 교차결합을 보여주고 있다.
- [0034] 도 19는 환원성 및 비환원성 조건에서 분리한 R/T FLSC-IgG1을 비교한 면역블롯의 결과이다.
- [0035] 도 20은 인간과 붉은털 원숭이의 CCR5에 대한 R/T FLSC-IgG1의 결합을 보여주고 있다.

[0036] 도 21은 R/T FLSC-IgG1가 CCR5에 결합하는 것을 RANTES가 경쟁적으로 저해한다는 것을 보여주고 있다.

도면

도면1



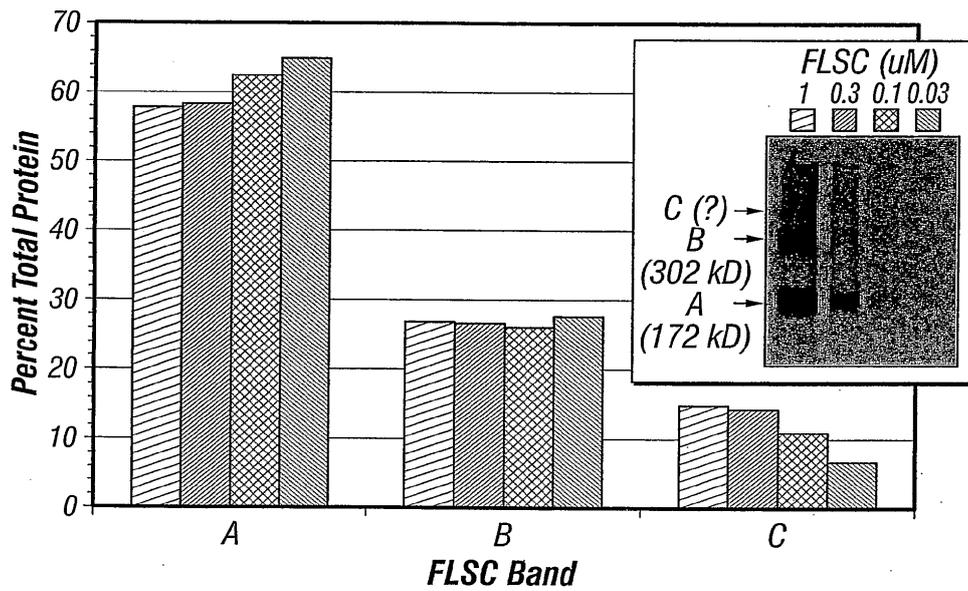
도면3



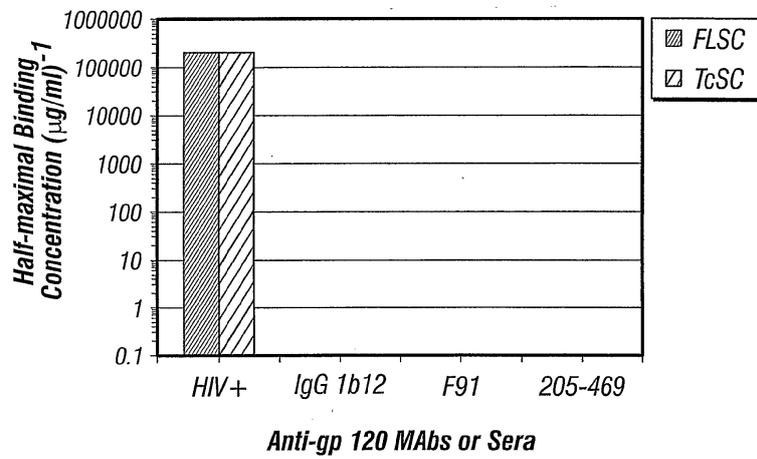
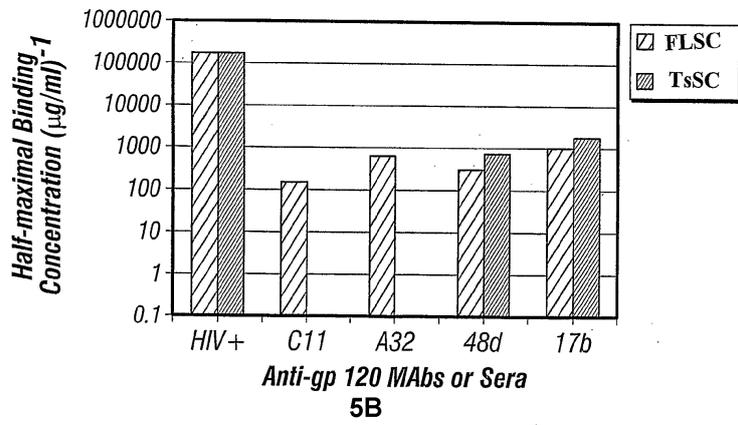
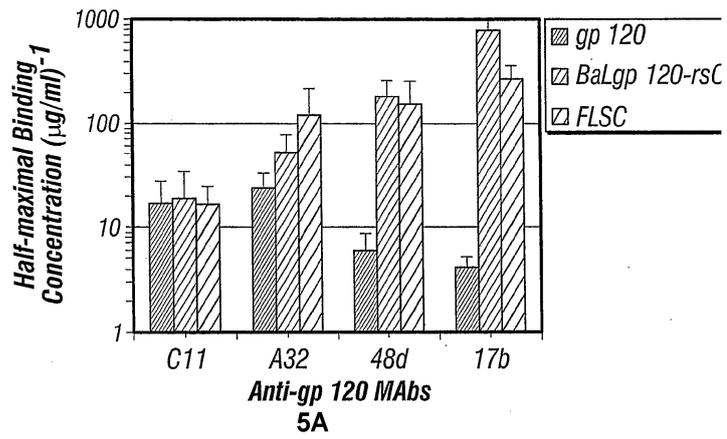
1. Purified Single Chain

2. Single Chain crosslinked with BS³

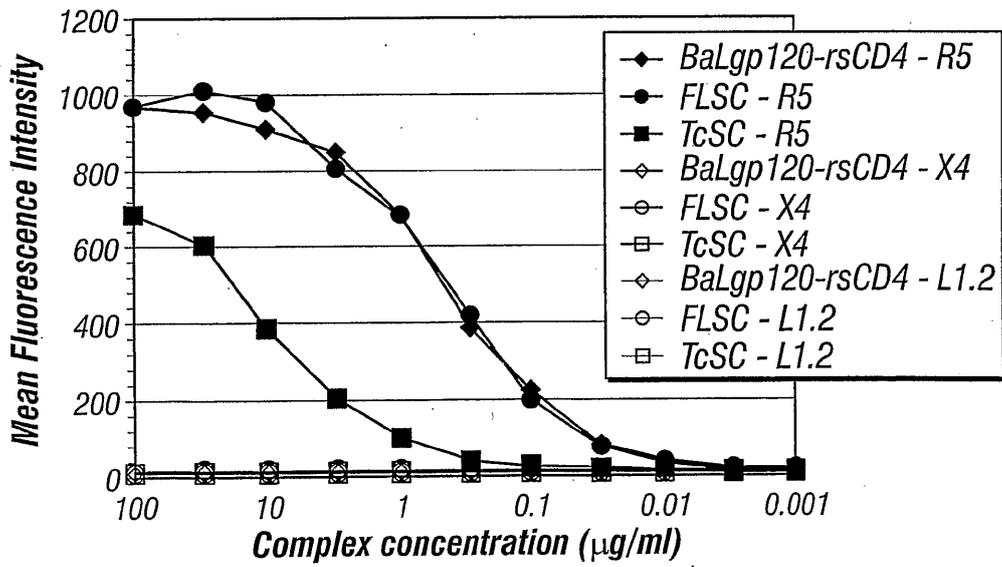
도면4



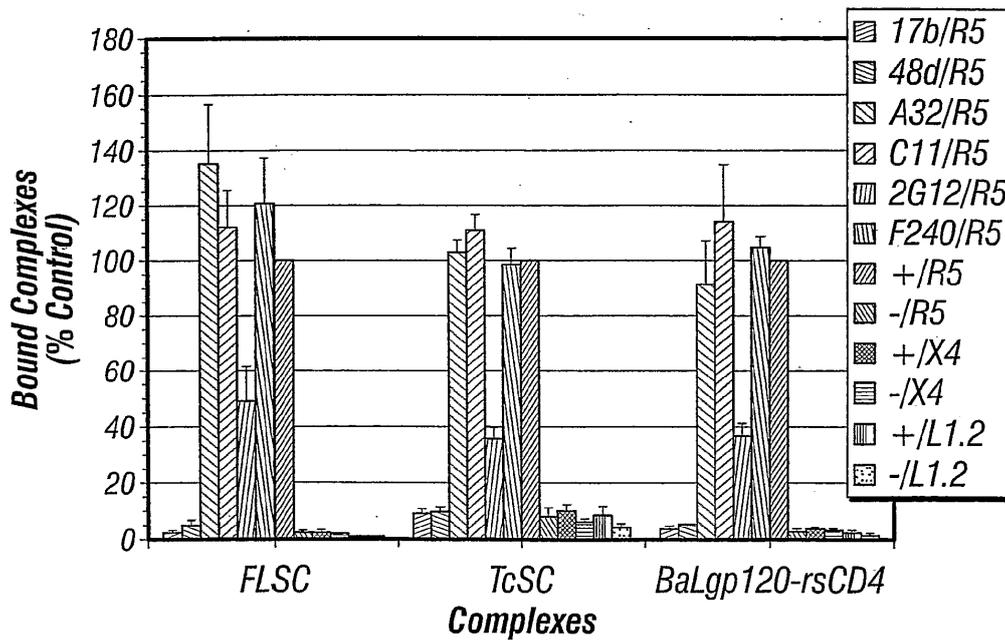
도면5



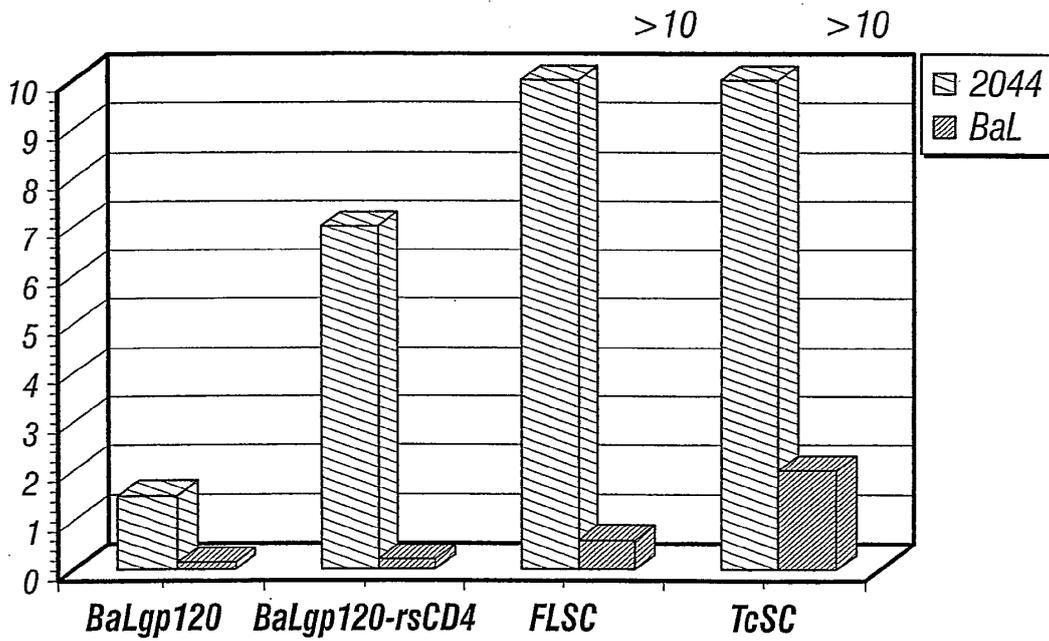
도면6



도면7

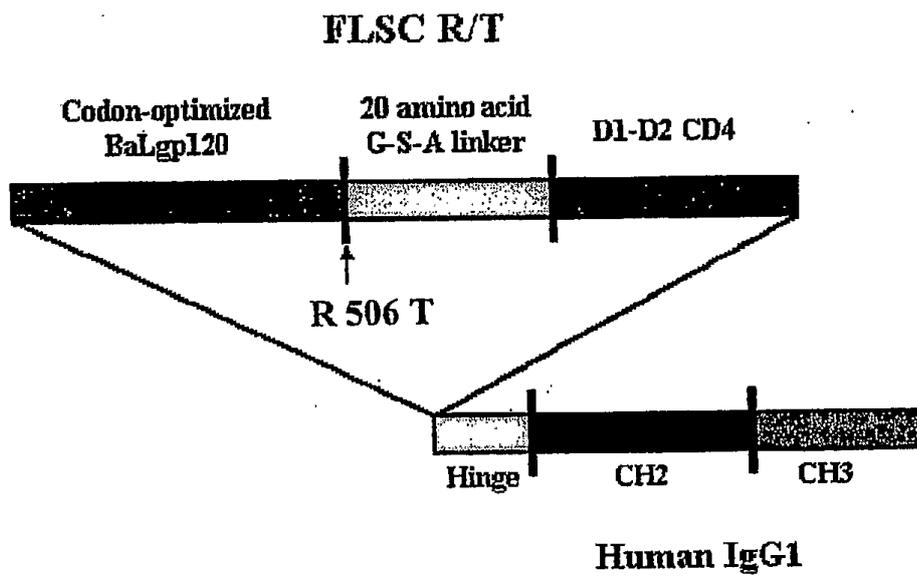


도면8

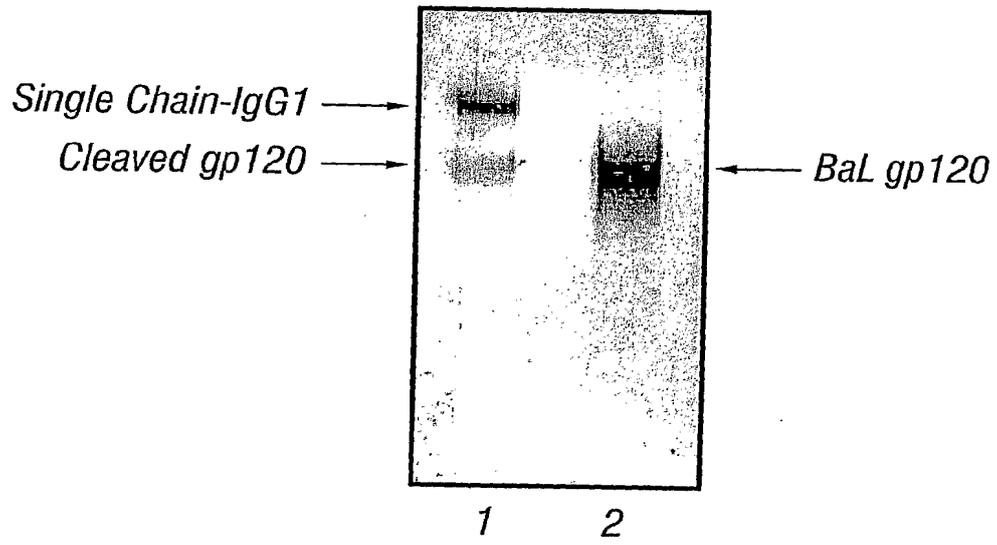


도면9

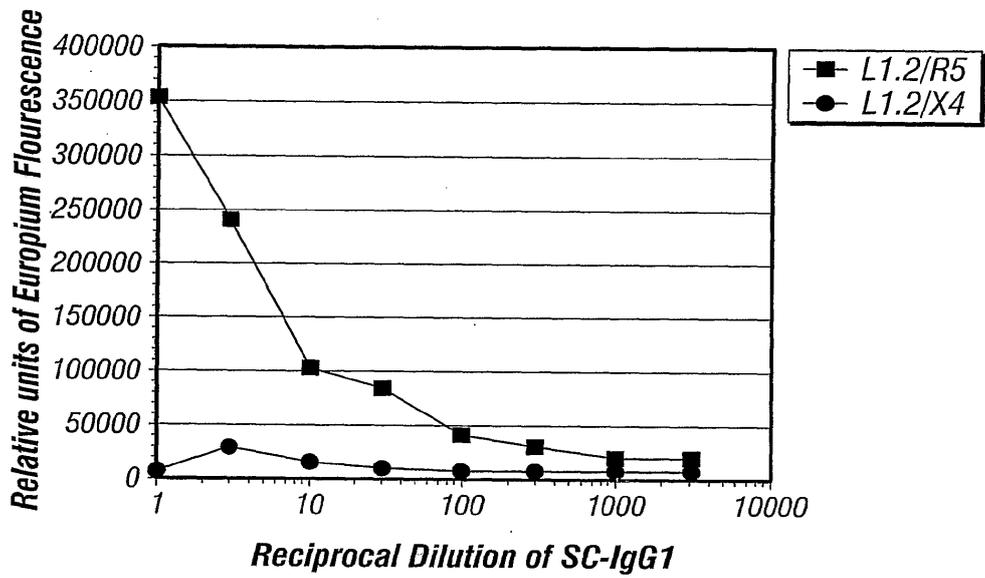
Genetic structure of FLSC R/T-IgG1



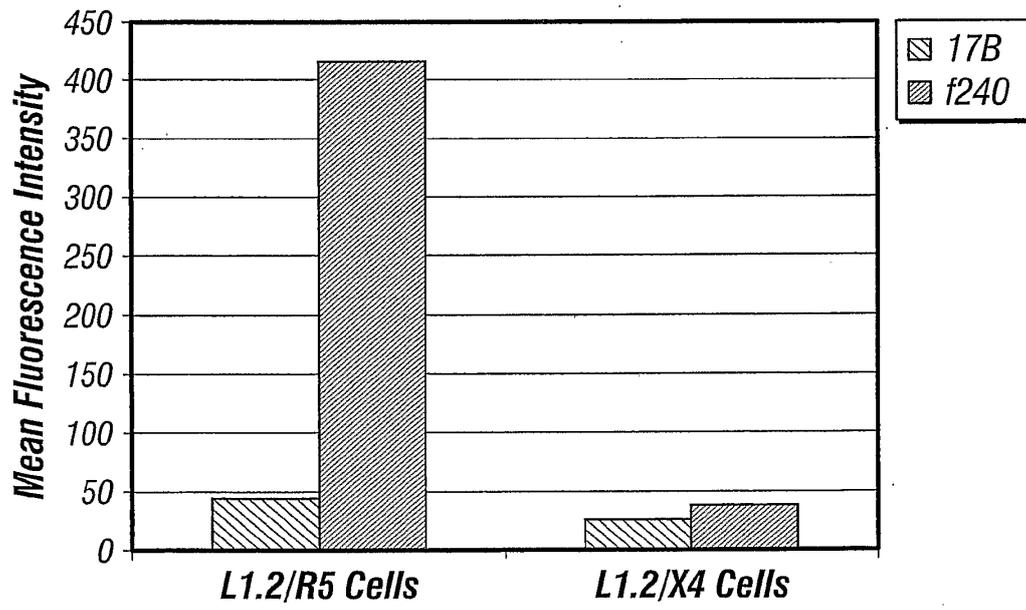
도면10



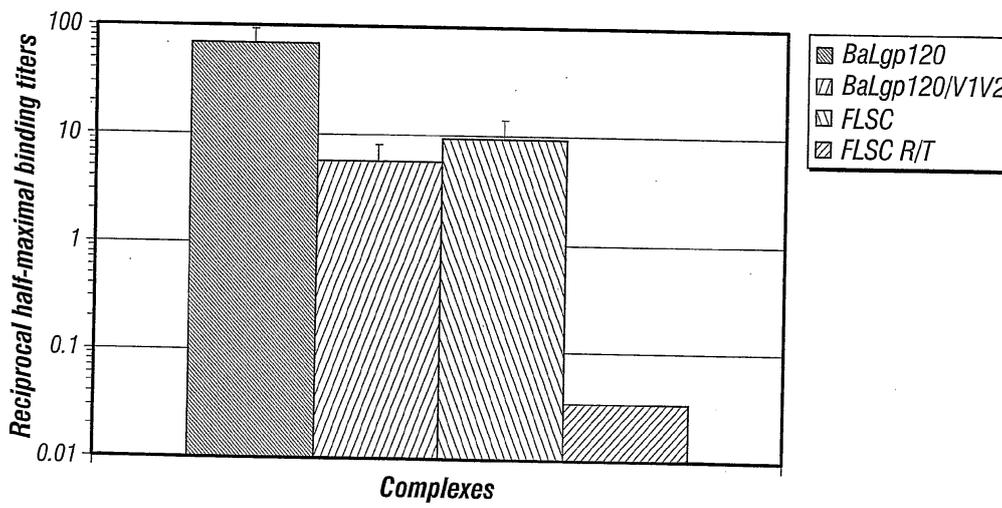
도면11



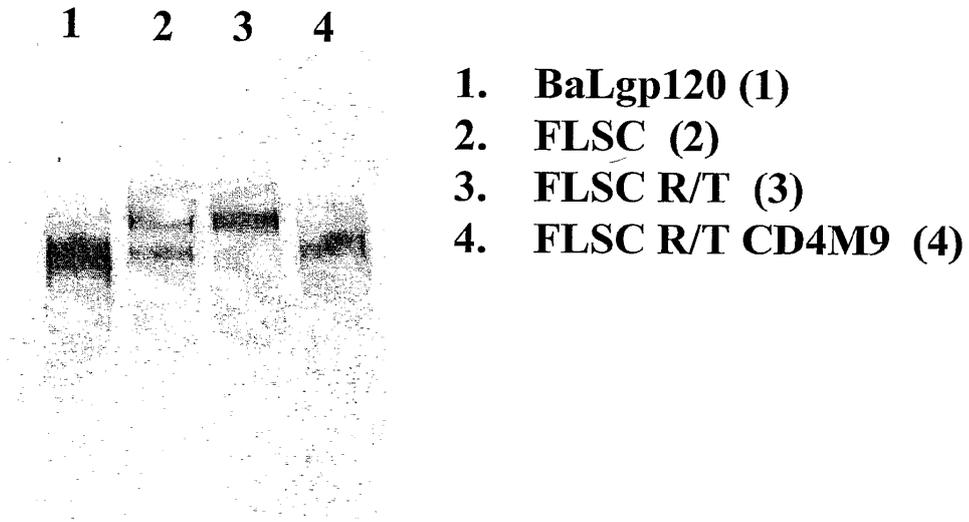
도면12



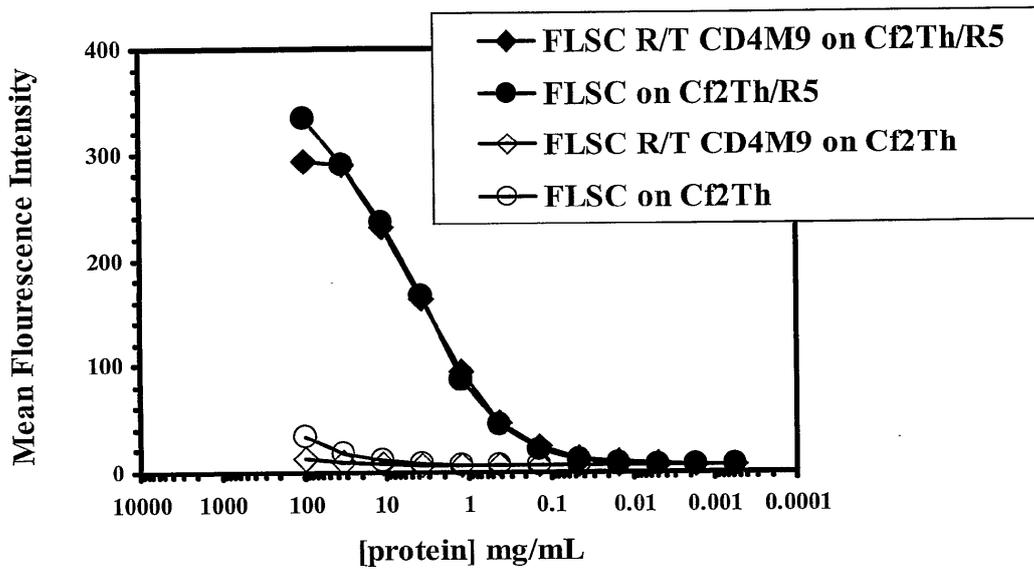
도면13



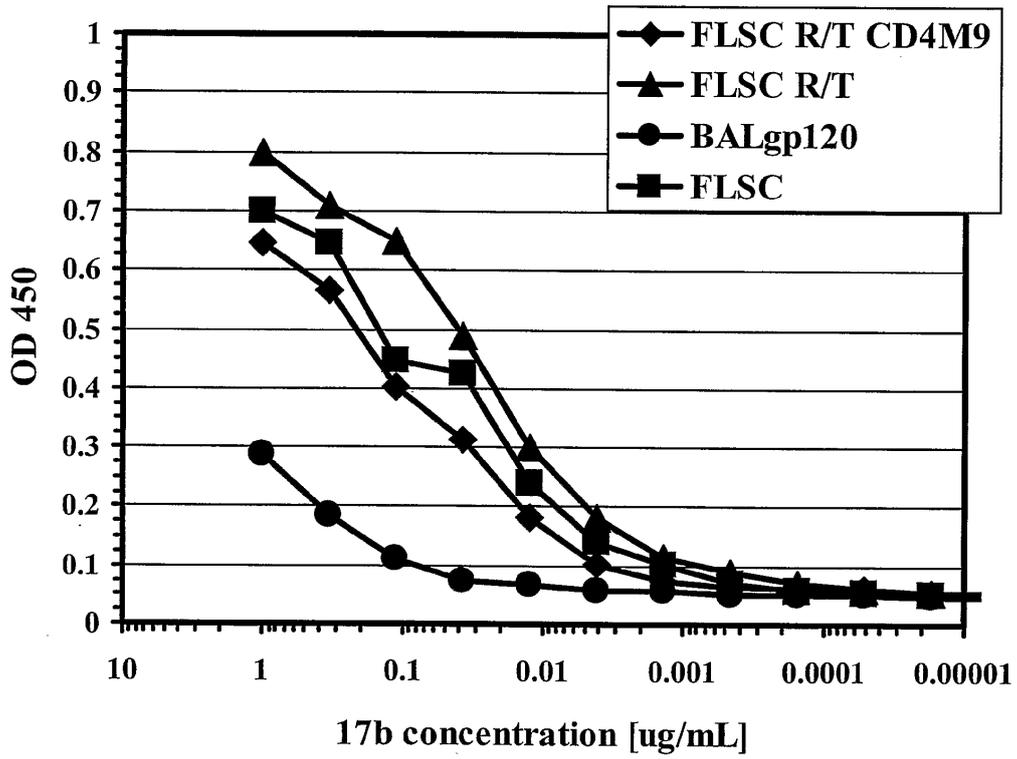
도면14



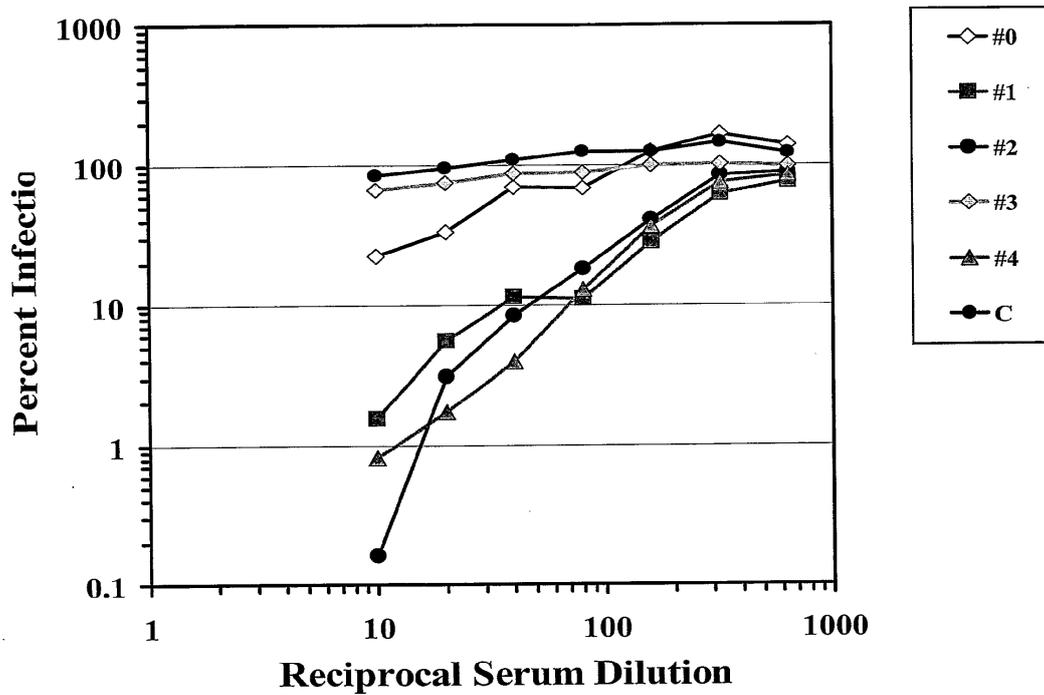
도면15



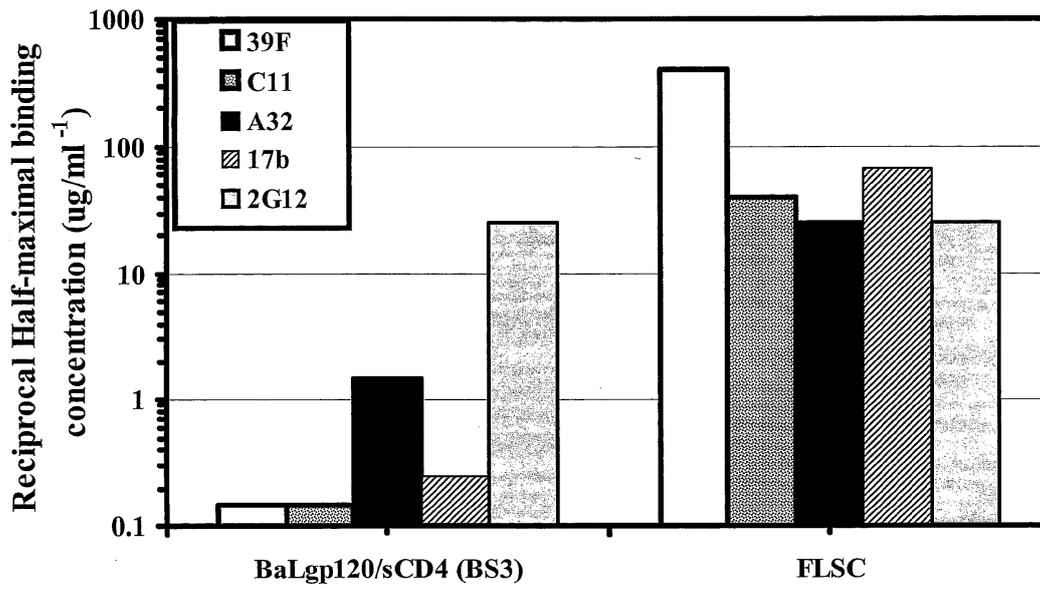
도면16



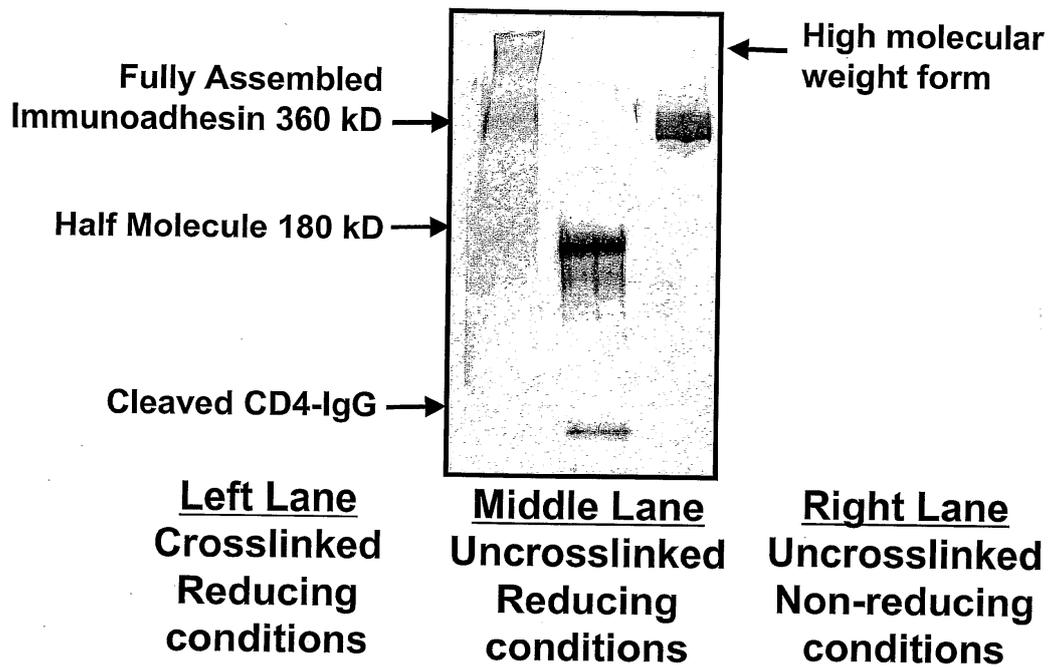
도면17



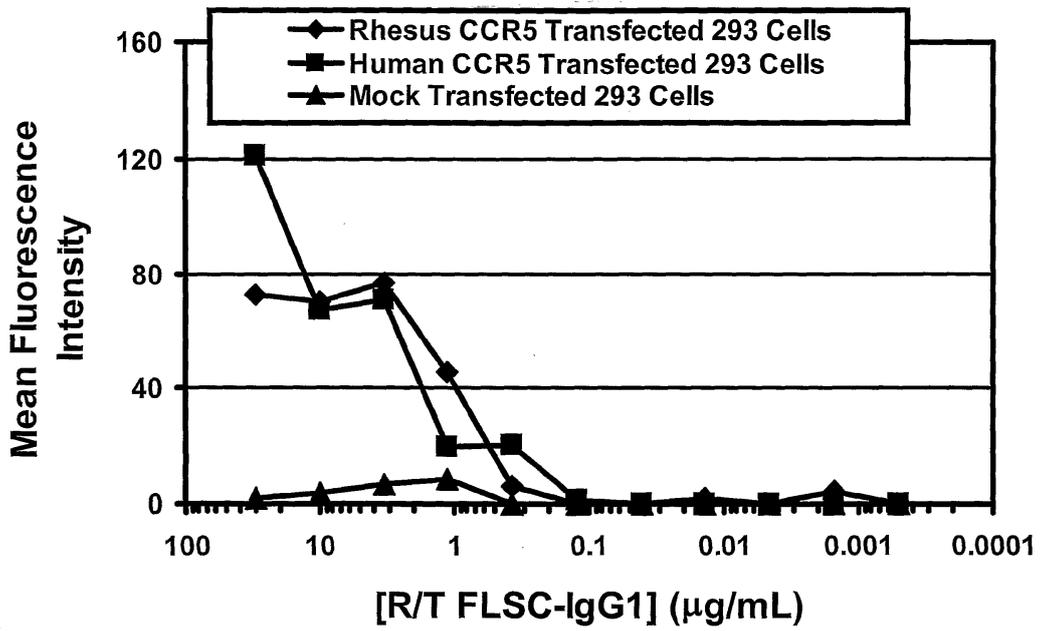
도면18



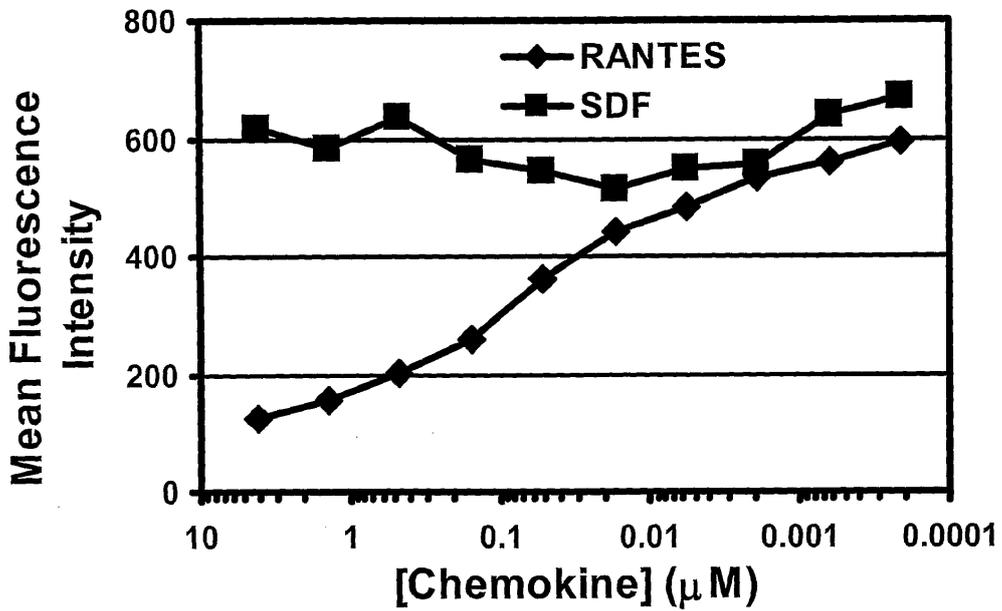
도면19



도면20



도면21



서열목록