



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0005010
(43) 공개일자 2009년01월12일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *C07K 14/025* (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7025574

(22) 출원일자 2008년10월20일

심사청구일자 2008년12월29일

번역문제출일자 2008년10월20일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/003367

국제출원일자 2007년04월17일

(87) 국제공개번호 WO 2007/121894

국제공개일자 2007년11월01일

(30) 우선권주장

06360013.4 2006년04월21일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

트랜스진 에스.에이.

프랑스, 스트라스버그, 67000, 루 드 몰세임, 11
107

(72) 발명자

루크, 로날드

프랑스 67400 일키르히 그라펜스타텐 루뜨 뷔르켈
라블레 150

풀, 스테판

프랑스 42170 생 쥐스트 생 랑베르 뤼 프랑수아
라블레 150

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) H P V-18-기재의 유두종바이러스 백신

(57) 요 약

본 발명은 HPV-18 이외의 1종 이상의 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태의 예방용 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 인간 유두종바이러스(HPV)-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 면역요법에서, 특히, 자궁경부 상피내 종양(CIN)을 일으킬 수 있고, 결국에는 자궁경부암을 일으킬 수 있는 HPV 지속 감염을 예방하거나 치료하는 것에 특히 관심을 두고 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

HPV-18 이외의 1종 이상의 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태의 예방용 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도.

청구항 2

HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태의 치료용 약제를 제조하기 위한 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도.

청구항 3

HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위한, HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스가 HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70, 및 HPV-85로 구성된 군 중에서 선택되는 것인 용도.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 HPV-18 초기 폴리펩티드(들)가 E6 폴리펩티드, E7 폴리펩티드, 또는 E6 폴리펩티드 및 E7 폴리펩티드, 둘 모두인 것인 용도.

청구항 6

제5항에 있어서, HPV-18 E6 및/또는 E7 폴리펩티드(들)가 비-암유전자 변이체(들)인 용도.

청구항 7

제6항에 있어서, HPV-18 E6 폴리펩티드의 비-암유전자 변이체가 서열 번호: 1에 제시된 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 8

제6항에 있어서, HPV-18 E7 폴리펩티드의 비-암유전자 변이체가 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, HPV-18 E6 및/또는 E7 폴리펩티드(들)가 막-고정 서열 및 분비 서열을 혼입함으로써 세포 막에 고정되도록 변형된 것인 용도.

청구항 10

제9항에 있어서, 막-고정 서열 및/또는 분비 서열이 광견병 당단백질, HIV 바이러스 외피 당단백질 또는 홍역 바이러스 F 단백질로부터 수득되는 것인 용도.

청구항 11

제10항에 있어서, HPV-18 E6 폴리펩티드가 서열 번호: 3에 제시된 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 12

제10항에 있어서, HPV-18 E7 폴리펩티드가 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한

아미노산 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 추가로 사이토카인 또는 사이토카인을 코딩하는 핵산을 포함하는 것인 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 사이토카인이 IL-2인 용도.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 HPV-18 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산이 벡터 내 포함되어 있는 것인 용도.

청구항 16

제15항에 있어서, 벡터가 백시니아 벡터인 용도.

청구항 17

제16항에 있어서, 백시니아 벡터가 MVA 벡터인 용도.

청구항 18

제17항에 있어서, MVA 벡터가 7.5 K 프로모터하에 배치된 HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 7.5K 프로모터하에 배치된 HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 및 H5R 프로모터 제어하에 배치된 인간 IL-2 유전자를 포함하는 것인 용도.

청구항 19

제18항에 있어서, HPV-18 E6 폴리펩티드, HPV-18 E7 폴리펩티드 및 인간 IL-2 유전자를 코딩하는 핵산이 MVA 계놈의 결실부 III에 삽입되는 것인 용도.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 병적 용태가 HPV 지속 감염, 전암성 또는 암성 용태인 용도.

청구항 21

제20항에 있어서, HPV-관련 암성 용태가 자궁경부 암종, 항문 암종 또는 경구암인 용도.

청구항 22

제20항에 있어서, HPV-관련 전암성 용태가 1, 2, 또는 3등급의 자궁경부 상피내 종양(CIN)인 용도.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 피하 또는 근육내 경로에 의해 투여되는 것인 용도.

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 5×10^5 pfu 내지 5×10^7 pfu의 백시니아 벡터를 포함하는 용량(들)으로 투여되는 것인 용도.

청구항 25

제24항에 있어서, 조성물이 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에서 정의된 MVA 벡터를 포함하고, 1주 간격으로 피하 경로에 의해 5×10^5 pfu 내지 5×10^7 의 3회 용량으로 투여되는 것인 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 HPV-18 이외의 1종 이상의 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태의 예방용 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 인간 유두종바이러스(HPV)-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 면역요법에서, 특히, 자궁경부 상피내 종양(CIN)을 일으킬 수 있는 가능성이 있고, 결국에는 자궁경부암을 일으킬 수 있는 HPV 지속 감염을 예방하거나 치료하는 것에 특히 관심을 두고 있다.

배경기술

<2> 유두종바이러스는 인간을 비롯한 다수의 고등 유기체에서 동정된 작은 DNA 바이러스이다 (예를 들면, 문헌 [Pfister, 1987, in *The papovaviridae: The Papillomaviruses*, Salzman and Howley edition, Plenum Press, New York, p 1-38] 참조). 이는 양성부터 악성까지의 병적 용태와 관련이 있다. 양성 종양에서, 바이러스 계놈은 에피솜인 반면, 악성 종양에서 HPV DNA는 숙주 염색체 내로 통합되어 있는 것이다 (문헌 [Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path. 19, 16-28]).

<3> 유두종바이러스는 단백질 캡시드에 둘러싸여진 약 7900개의 염기쌍으로 이루어진 더블-스트랜드의 환형 DNA를 갖는다. 계놈은 리딩 프레임 E1-E7을 함유하는 초기(E) 부위와 후기(L) 부위를 포함한다. 후기 부위는 바이러스 캡시드를 형성하는 구조 L1 및 L2 단백질을 코딩하는 반면, 초기 유전자들은 주로 핵에서 발견되는 조절 단백질을 코딩한다. E1은 바이러스 계놈 유지 및 복제에 중요한 2개의 단백질을 코딩한다. E2는 E6 및 E7 전사를 지시하는 바이러스 프로모터를 조절하는 활성 인자 및 억제자 단백질을 코딩한다 (문헌 [Bechtold et al., 2003, J. Virol. 77, 2021-2028]). E4-코딩 단백질은 세포질 캐라틴 그물에 결합하여 그를 파괴시키고, 바이러스 성숙에 있어 중요한 역할을 할 수 있다. E5 단백질 역할에 대해서는 여전히 논쟁 중에 있으며, 대개 숙주 염색체내 바이러스 통합시에는 발현하지 못한다. 암-관련 HPV 유전자형의 E6 및 E7-코딩 유전자 산물은 감염된 세포의 암유전자 형질전환에 관여하는데 (문헌 ([Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613]; [Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1-9]; [Bedeil et al., 1987, J. Virol. 61, 30 3635-3640])), 이는 이를 바이러스 단백질이 세포 종양 억제 유전자 산물 p53 및 망막모세포종(Rb) 각각에 결합할 수 있는 능력에 기인하는 것으로 가정할 수 있다. 천연 HPV-16 E6 폴리펩티드가 p53에 결합하는데 관여하는 아미노산 잔기는 잔기 118부터 122까지로 명확하게 정의되어 있으며 (+1은 첫번째 Met 잔기이며, 또는 바람직하게 사용되는 두번째 Met 잔기로부터 출발할 경우 잔기 111부터 115까지이다) (문헌 [Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556]), 천연 HPV-16 E7 폴리펩티드가 Rb에 결합하는데 관여하는 것은 잔기 21부터 26까지에 위치한다 (문헌 ([Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105]; [Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446])). 그러한 결합 부위는 또한 HPV-18의 E6 및 E7에서 보존된다 (문헌 ([Pirn et al., 1994, Oncogene 9, 1869-1876]; [Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446])).

<4> 현재 100개 이상의 인간 유두종바이러스(HPV) 유전자형이 클로닝되어 있고, 서열 분석되어 있다 (문헌 [Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path 19, 16-28]). 단지 40개의 HPV 유전자형만이 생식 점막을 감염시키고, 그중 약 15개는 여성을 생식관의 악성 종양에 대한 위험에 처하게 한다. 더욱 특히, 2개의 가장 우세한 유전자형인 HPV-16 및 HPV-18은 70% 초과의 침습성 자궁경부 암종에서 검출된 반면, HPV-31, HPV-33 및 HPV-45는 함께 상기 사례의 10%를 차지한다 (문헌 [Cohen et al., 2005, Science 308, 618-621]).

<5> 자궁경부 스크리닝 프로그램이 있기는 하지만, 국제 암 연구 센터(International Agency for Research on cancer)의 데이터에 따르면 전세계적으로 매년 약 50만명의 여성이 자궁경부암 진단을 받고 있고, 27만명을 초과하는 여성들이 사망하고 있다. 종래 접근법으로는 수술과 방사선요법이 있지만, 새로운 백신 전략법, 예를 들면, 펩티드-기재의 백신 (문헌 [Feltkamp et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23, 2242-20 2249]), 바이러스-유사 입자(VLP) 백신, DNA 백신 (문헌 [Osen et al, 2001, Vaccine 19, 4276-4286]; [Smaheil et al., 2001, Virology 281, 231-238])) 및 바이러스 벡터 백신 (EP 462,187, 문헌 ([Daemen et al., 2000, Gene Ther. 7: 1859-1866]; [He et al., 2000, Virology 270, 146-161]; [Borysiewicz et al., 1996, Lancet 347, 1523-1527]))이 지난 15년간 디자인되어 왔다.

<6> 개념상, 예방용 및 치료용의 HPV 백신에 대한 2가지 접근법이 존재한다. 예방학적 접근법은 바이러스 감염을 예방하고자 하는 것이며, 즉, 주로 중화 항체의 유도를 통해 숙주 세포에 바이러스가 침투하기 이전에 바이러스

를 차단하고자 하는 것이다. 보통, 예방용 백신은 바이러스 표면에서 발현되는 캡시드 단백질을 표적한다. 그 중 대부분은 L1 단백질의 재조합적으로 생산된 VLP 또는 가장 우세한 HPV형의 VLP 혼합물에 의존한다. 최근, 유형-특이적인 자궁경부 감염을 예방함에 있어 효능이 100%인 성공적인 III상 임상 시험이 머크(Merck) 및 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)(GSK)에 의해 보고되었다. HPV-16 및 HPV-18 VLP 혼합물 투여 이후의 암유전자 HPV-31 및 HPV-45 유전자형에 대한 교차 보호에 관해 기술되었다 (WO 2004/056389). 그러나, VLP-기재의 예방용 백신은 HPV 감염 이후 발병되는 병적 용태의 퇴행을 유도하는 것으로 추정되지 않는다.

<7> 치료학적 접근법은 주로 세포 면역 반응의 유도를 통해 확립된 HPV 감염을 치료하고 HPV-관련된 전암성 및 암성 병적 용태의 퇴행을 유도시키고자 하는 것이다. 보통, 치료학적 전략법은 HPV-유도 종양 세포에 의해 발현되는 E6 및/또는 E7 암단백질에 대한 면역화에 의존한다. 지금까지는 E6 및 E7 HPV 항원에 의해 제공되는 면역이 유전자형-특이성인 것으로 간주되고 있으며, 임상 또는 임상전 개발에 있어서 현 치료용 백신은 주로 가장 우세한 암유전자 HPV-16에 집중되어 있고, 그보다는 덜 하지만 HPV-18에까지 확장되어 있다.

<8> 그러나, 이상적인 치료용 백신은 가장 우세한 HPV 유전자형에 대해서 뿐만 아니라, 남은 30%의 자궁경부암에 관여하는 기타 소수의 HPV 유전자형에 대해서도 보호할 수 있어야 한다. 이는 각 암유전자 HPV 유전자형에 대한 대체 백신 후보 물질 개발을 통해 이루어질 수 있다. 그러나, 이러한 전략법은 소수의 HPV 유전자형에 노출된 환자수가 제한되어 있는 것에 대비하여 규제 당국이 필요로 하는 임상 또는 임상전 개발 비용을 고려해 보면 그다지 관심 대상이 될 수 있는 것은 아니다.

<9> HPV는 감염의 만성 및 지속적인 성질, 그의 높은 유병률 및 HPV-유도 암의 상당한 이환율에 기인하여 수년간 계속하여 세계적으로 심각한 건강 위협이 될 것이라고 추정할 수 있다. 그러므로, HPV-18 이외에도 기타 소수의 암유전자 HPV 유전자형 및 잠재적인 암유전자 HPV 유전자형을 포함하는 다종 HPV 유전자형에 대해 보호하고/거나 그를 치료할 수 있으며, 적용 범위가 보다 넓은 백신을 개발할 필요가 있다.

<10> 따라서, 본 발명은 선진공업국 뿐만 아니라, 개발도상국에서 유두종바이러스 감염 또는 유두종바이러스-관련의 전암성 및 암성 병변의 예방 및 치료의 개선을 위한 현저한 진보를 나타낸다.

<11> 이러한 기술상의 문제는 청구의 범위에서 정의된 것과 같은 실시태양을 제공함으로써 해결된다.

<12> 본 발명의 다른 측면과 추가 측면들, 특징 및 장점은 본 발명의 바람직한 실시태양에 관한 하기 설명으로부터 자명해질 것이다. 이러한 실시태양은 개시 목적으로 제공한다.

발명의 상세한 설명

<13> 따라서, 제1 측면에서 본 발명은 HPV-18 이외의 1종 이상의 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태의 예방용 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

<14> 더욱 특히, 본 발명은 HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태의 치료용 약제를 제조하기 위한 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 숙주 유기체에게 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태를 치료하는 방법에 관한 것이다.

<15> 전체 출원을 통해 본원에서 사용되는 바, "하나(a)" 및 "하나(an)"라는 용어는 문맥상 달리 명시되지 않는 한, "1종 이상의," "적어도 제1의," "하나 이상의," 또는 "여러 개의" 관련 화합물 또는 단계를 의미한다는 점에서 사용된다. 예를 들면, "하나의 세포"라는 용어는 그의 혼합물을 비롯한 여러 개의 세포를 포함한다. 더욱 특히, "1종 이상의" 및 "하나 이상의"라는 의미는 1개 또는 1 초과의 수를 의미하며, 특히 바람직하게는, 1, 2, 또는 3을 의미하는 것이다.

<16> "및/또는"이라는 용어는 본원에서 사용되는 경우에는 언제나 "및," "또는, 및" "상기 용어에 관련된 모든 요소들 또는 상기 요소의 임의의 기타 조합"의 의미를 포함한다.

<17> 본원에서 사용되는 "약" 또는 "대략"이라는 용어는 주어진 값 또는 범위의 20% 이내에, 바람직하게는 10% 이내에, 및 더욱 바람직하게는 5% 이내에 존재한다는 것을 의미한다.

<18> "아미노산" 및 "잔기"라는 용어는 동의어이다. 이를 용어는 D 또는 L 광학 이성체, 변형된 아미노산 및 아미노

산 유사체를 비롯한, 천연, 비천연, 및/또는 합성 아미노산을 지칭한다.

- <19> "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 펩티드 결합을 통해 결합된 9개 이상의 아미노산을 포함하는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 것으로서, 본원에서는 상호교환적으로 사용된다. 상기 중합체는 선형, 분지형, 또는 환형일 수 있고, 천연적으로 발생된 아미노산 및/또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있고, 비-아미노산이 개재될 수 있다. 일반적인 표시로서, 아미노산 중합체가 길다면 (예로서, 50개 초과의 아미노산 잔기로 이루어진 경우), 이는 폴리펩티드 또는 단백질로 지칭하는 것이 바람직하다.
- <20> 본 발명의 맥락에서, "핵산", "핵산 분자", "폴리뉴클레오티드" 및 "뉴클레오티드 서열"라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 이는 임의 길이의 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA) (예로서, cDNA, 게놈 DNA, 플라스미드, 백터, 바이러스 게놈, 단리된 DNA, 프로브, 프라이머 및 그의 임의 혼합물) 또는 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 분자 (예로서, mRNA, 안티센스 RNA) 또는 혼합된 폴리리보-폴리데옥시리보뉴클레오티드 중합체를 정의한다. 이는 싱글 또는 더블-스트랜드, 선형 또는 환형, 천연 또는 합성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 비천연적으로 발생된 뉴클레오티드, 예로서, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있고 (변형에 관한 예는 US 5,525,711, US 4,711,955 또는 EPA 302 175를 참조), 비뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 존재할 경우, 뉴클레오티드에 대한 변형은 중합체화 이전에 또는 이후에 이루어질 수 있다.
- <21> 본원에서 사용되는 바, 산물, 조성물, 및 방법을 정의하는데 사용될 때, "포함하는"이라는 용어는 산물, 조성물, 및 방법이 관련 화합물 또는 단계를 포함하되, 다른 것을 배제시키지 않는다는 것을 의미하고자 한다. "본질적으로 ~으로 구성된"이라는 것은 본질적으로 중요한 임의의 기타 화합물 또는 단계를 배제시킨다는 것을 의미하여야 한다. 따라서, 본질적으로 인용된 화합물로 구성된 조성물은 미량의 오염원 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 배제시키지 않을 것이다. "~으로 구성된"이라는 것은 기타 화합물 또는 단계의 미량 원소 이상의 것은 배제시킨다는 것을 의미하여야 한다. 예를 들면, 폴리펩티드가 어떤 아미노산도 함유하지 않고 인용된 아미노산 서열만을 함유할 때 폴리펩티드는 아미노산 서열로 "구성된다." 아미노산 서열이 오직 몇개의 추가적인 아미노산 잔기, 전형적으로 약 1 내지 약 50개 등의 추가적인 잔기와 함께 존재할 때 폴리펩티드는 "본질적으로 아미노산 서열로 구성된다." 아미노산 서열이 폴리펩티드의 최종 아미노산 서열의 적어도 일부일 경우, 폴리펩티드는 아미노산 서열을 "포함한다." 상기 폴리펩티드는 몇개의 추가적인 아미노산 잔기에서부터 수백개의 추가적인 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 그러한 추가적인 아미노산 잔기는 그 중에서도 특히 폴리펩티드 추적에서 중요한 역할을 할 수 있고, 폴리펩티드 생산 또는 정제를 촉진시킬 수 있고, 반감기를 연장시킬 수 있다. 뉴클레오티드 서열에 대하여 동일한 것이 적용될 수 있다.
- <22> 본원에서 사용되는 바, "단리된"이라는 용어는 그의 천연 환경으로부터 정제되거나 제거된 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 핵산을 지칭하는 것이다. "정제된"이라는 용어는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 핵산과 천연적으로 결합되어 있는 1종 이상의 기타 성분(들)으로부터 분리된 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 핵산을 지칭하는 것이다.
- <23> "숙주 세포"라는 용어는 조직, 기관, 또는 단리된 세포에 있어서 특정 생물체에 관한 어떤 제한도 없이 광범위하게 이해되어야 한다. 그러한 세포는 독특한 유형의 세포 또는 상이한 유형의 세포 군일 수 있고, 배양된 세포주, 1차 세포 및 증식 세포를 포함할 수 있다. "숙주 유기체"라는 용어는 척추동물, 특히 포유동물 종의 구성원 및 특히, 가축, 경기용 동물, 및 인간을 포함하는 영장류를 지칭한다.
- <24> "HPV"는 "인간 유두종바이러스"를 의미한다. HPV의 분류는 그의 게놈 관련 정도에 기초한다. 현재 100개 초과의 HPV 유전자형이 동정되어 있으며, 그들이 단리된 연대 순서에 따라 번호 매김되었다. 규정에 의하면, 2개의 단리물이 오픈 리딩 프레임 E6, E7 및 L1을 함유하는 그의 게놈 중 약 2000개의 뉴클레오티드 길이의 부위에서 90% 미만의 동일성을 공유한다면, 상기 2개의 단리물은 서로 다른 유형을 구성하는 것이 된다. 이용 가능한 뉴클레오티드 서열 배열로부터 계통수를 작성하였다 (문헌 ([Van Ranst et al., 1992, J. Gen. Virol. 73, 2653]; [De Villiers et al., 2004, Virology 324, 17-27])).
- <25> 본원에서 사용되는 바, "초기 폴리펩티드"라는 용어는 바람직하게는 E1, E2, E4, E5, E6 및 E7 폴리펩티드로 구성된 군 중에서 선택되는 것으로서, 당업계에서 공인된 비구조 단백질을 지칭한다. 본 발명과 관련하여, 조성물내 포함되어 있는 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 본 발명에 따라 사용된 조성물내 포함된 핵산에 의해 코딩된 초기 폴리펩티드(들)는 HPV-18로부터 기원한다. "기원한다"라는 용어는 단리된 것, 클로닝된 것, 유래된 것 또는 관련된 것으로 의미된다. 따라서, 본 발명에 따라 하나 이상의 초기 HPV-18 폴리펩티드(들)는 천연 초기 HPV-18 폴리펩티드 또는 그의 유도체로부터 기원할 수 있다. "천연 초기 HPV-18 폴리펩티드"는 실험실에서 사람에 의해 인공적으로 변형되거나 변경된 것과는 상이한 것으로, 천연의 공급원으로부터 발견할 수 있거

나, 그로부터 단리된 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 지칭한다. 그러한 천연 공급원으로는 생물학적 샘플(예로서, HPV-18로 감염된 환자로부터 얻은 혈액, 혈장, 혈청, 절액 및 자궁경부액, 조직 절편, 생검, 부인과적 샘플), 배양된 세포 뿐만 아니라, 재조합 물질(예로서, HPV-18 바이러스 또는 게놈, 게놈 또는 cDNA 라이브러리, HPV-18 게놈 단편을 함유하는 플라스미드, 재조합 초기 HPV-18 폴리펩티드 등)을 포함한다. 따라서, "천연 초기 HPV-18 폴리펩티드"라는 용어는 천연적으로 발생된 초기 HPV-18 폴리펩티드 및 그의 단편을 포함할 것이다. 단편은 바람직하게 9개 이상의 아미노산 잔기로 이루어진 것이며, 1종 이상의 면역원성 에피토프 및 특히 T 에피토프를 포함한다. 그러한 단편은 독립적으로, 또는 조합하여 함께(예로서, 융합하여) 사용될 수 있다. HPV-18 초기 유전자/폴리펩티드의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 문현상에 기재되어 있고, 이는 각각 전문 데이터뱅크, 예를 들면, 진뱅크의 수탁번호 NC_001357 및 X05015로 이용가능하다. 그러나, 천연 초기 HPV-18 폴리펩티드가 이러한 대표적인 서열로 제한되는 것은 아니다. 실제로 아미노산 서열은 상이한 HPV-18 단리를 사이에서도 여러 가지일 수 있고, 이러한 자연 범위내의 유전자 변형은 본 발명의 범주내 포함된다.

<26> 초기 HPV-18 폴리펩티드의 유도체는 천연 HPV-18 초기 폴리펩티드에 관해 하나 이상의 변형(들), 예로서, 하기 정의되는 것과 같은 것을 포함한다. 변형(들)은 화학적 부분(예로서, 알킬화, 아세틸화, 아미드화, 인산화 등) 또는 표지 부분의 돌연변이 및/또는 첨가에 의해 생성될 수 있다. 돌연변이로는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)의 결실, 치환 또는 첨가 또는 이들의 가능한 임의 조합을 포함한다. 여러 변형이 예기되는 경우, 이는 연속적인 잔기 및/또는 비연속적인 잔기에 관계될 수 있다. 예로서, 부위-지정 돌연변이(예로서, 프랑스 레스 울리스에 소재하는 아머샴(Amersham)의 스컬터(Sculptor)™ 시험관내 돌연변이유발법 시스템 사용), PCR 돌연변이유발법 및 DNA 셀플링과 같이 당업자에게 공지되어 있는 많은 방법들에 의해 변형될 수 있다.

<27> 유리하게, 변형된 초기 HPV-18 폴리펩티드는 전장의 아미노산 서열 또는 보다 짧은 그의 단편(예로서, 적어도 9, 20, 30, 40, 50, 100개의 아미노산 길이)에 걸쳐서 상응하는 천연 초기 HPV-18 폴리펩티드와 고도의 아미노산 서열 동일성을 유지하는데, 이는 75% 초과, 유리하게는 80% 초과, 바람직하게는 85% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 더욱 바람직하게는 95% 초과, 더욱더 바람직하게는 97% 초과(예로서, 100%의 서열 동일성)이다. 두 폴리펩티드 사이의 동일성(%)은, 최적으로 정렬시키기 위해 도입되어야 하는 캡의 수와 각 캡의 길이를 고려한, 상기 서열들이 공유하는 동일 위치의 갯수에 관한 함수이다. 아미노산 서열 사이의 동일성(%)을 측정하기 위해서 당업계에서는 다양한 컴퓨터 프로그램 및 수학적 알고리즘, 예를 들면, NCBI에서 이용가능한 W2H HUSAR 소프트웨어 및 Blast 프로그램(문헌 ([Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402]; [Altschul et al., 2005, FEBS J. 272, 5101-5109]))이 이용가능하다.

<28> 바람직하게는, 본 발명에 따라 사용되는 변형된 초기 HPV-18 폴리펩티드는 세포-매개 면역 반응을 자극시킬 수 있는 능력과 같은, 천연 초기 HPV-18 폴리펩티드의 면역원성 활성을 유지한다.

<29> 하나의 실시태양에서, 조성물은 HPV-18 이외의 1종 이상의 HPV 유전자형에 의해 유발된 것으로서, 특히 항문관, 피부 또는 구강에서의 HPV 감염 및/또는 병적 용태를 치료하는데 사용된다. 하나의 측면에서, 1종 이상의 인간 유두종바이러스의 게놈은 E6 또는 E7 폴리펩티드를 코딩하는 HPV-18 게놈 일부와 90% 미만, 유리하게는 87% 미만 및 바람직하게는 86% 미만의 뉴클레오티드 서열 동일성을 공유하지만, E6 또는 E7 폴리펩티드를 코딩하는 HPV-18 게놈 일부와 50% 초과, 유리하게는 55% 초과 및 바람직하게는 60% 초과의 뉴클레오티드 서열 동일성을 공유한다. 바람직하게는 완전한 HPV-18 E6 또는 E7 ORF와 대략 61% 내지 대략 86%의 뉴클레오티드 동일성을 공유한다. HPV 게놈 일부 사이의 동일성(%)은 최적으로 정렬시키기 위해 도입되어야 하는 캡의 수와 각 캡의 길이를 고려한, 상기 서열들이 공유하는 동일 위치의 갯수에 관한 함수이다. 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성(%)을 측정하기 위해서 당업계에서는 다양한 컴퓨터 프로그램 및 수학적 알고리즘이 이용가능하다. 그러한 HPV 유전자형의 대표적인 예로는 제한없이, HPV-13, HPV-18, HPV-30, HPV-32, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-61, HPV-64, HPV-68, HPV-70 및 HPV-85를 포함한다.

<30> 바람직하게는, HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스는 HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70, 및 HPV-85 또는 그의 가능한 임의 조합으로 구성된 군 중에서 선택되며, 특히 HPV-45가 바람직하다. 이를 HPV 유전자형의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 문현상에 기재되어 있고, 표 I에 제시한 바와 같은 전문 데이터뱅크에서 이용가능하다.

표 1

진뱅크 수탁번호

HPV18	X05015
HPV 39	M62849
HPV 45	X74479
HPV 51	NC_001533
HPV 56	X74483
HPV 59	NC_001635 (X77858)
HPV 68	X67161
HPV-70	U21941
HPV-85	AF131950

<31>

<32>

또다른 실시태양에서, 본 발명에 따라 사용되는 조성물은 HPV-18 E6 폴리펩티드, HPV-18 E7 폴리펩티드 또는 HPV-18 E6 폴리펩티드 및 HPV-18 E7 폴리펩티드 둘 모두를 포함하거나, 그를 코딩한다. E6 및 E7 폴리펩티드의 형질전환 능력에 관해 위에서 상기된 관찰 결과들을 가정하면, 각각 세포 종양 억제 유전자 산물 p53 및 Rb와 상호작용하는데 관여하는 부위에서 돌연변이화된 비-암유전자 변이체인 변형된 HPV-18 E6 및/또는 E7 폴리펩티드가 바람직하게 사용된다. 본 발명은 p53에 결합하는 것이 변경되거나 적어도 유의적으로 감소된 임의의 HPV-18 E6 폴리펩티드의 용도 및/또는 Rb에 결합하는 것이 변경되거나 적어도 유의적으로 감소된 임의의 HPV-18 E7 폴리펩티드의 용도를 포함한다 (문헌 ([Pirn et al., 1994, Onco유전자 9, 1869-1876]; [Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446])). 본 발명의 목적에 적합한 비-암유전자 HPV-18 E6 변이체는 대략 113번 위치에서부터 대략 117번 위치 (천연 HPV-18 E6 폴리펩티드의 첫번째 메티오닌으로부터 출발)에 위치하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실된 것이며, 잔기 113 내지 117 (NPAAEK)이 완전히 결실된 것이 특히 바람직하다. HPV-18 E6 폴리펩티드의 가장 바람직한 비-암유전자 변이체는 서열 번호: 1에 제시한 아미노산 서열과 상동성이거나 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 별법으로는 본질적으로 그로 구성되거나, 별법으로는 그로 구성된다. 본 발명의 목적에 적합한 비-암유전자 HPV-18 E7 변이체는 대략 24번 위치에서부터 대략 28번 위치 (+1이 천연 HPV-18 E7 폴리펩티드의 첫번째 아미노산을 나타낸다)에 위치하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실된 것이며, 잔기 24 내지 28 (DLLCH)이 완전히 결실된 것이 특히 바람직하다. HPV-18 E7 폴리펩티드의 가장 바람직한 비-암유전자 변이체는 서열 번호: 2에 제시한 아미노산 서열과 상동성이거나 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 별법으로는 본질적으로 그로 구성되거나, 별법으로는 그로 구성된다.

<33>

바람직한 측면에서, 본 발명에서 사용되는 하나 이상의 HPV-18 초기 폴리펩티드(들)는 제I류 MHC 및/또는 제II류 MHC 제시를 개선시키고/거나 항-HPV 면역을 자극시키기 위하여 추가로 변형된다. HPV-18 E6 및 E7 폴리펩티드는 핵 단백질이며, 막 제시를 통해 상응하는 HPV-16 폴리펩티드의 치료학적 효능을 개선시킬 수 있는 것으로서 앞서 제시된 바 있다 (예를 들면 WO99/03885 참조). 따라서, 세포막에 고정될 수 있도록 HPV-18 초기 폴리펩티드(들) 중 적어도 하나를 변형시키는 것이 타당할 수 있다. HPV-18 초기 폴리펩티드에 막-고정 서열과, 천연 폴리펩티드에 결여되어 있다면 분비 서열 (즉, 신호 펩티드)을 혼입시킴으로써 막-고정을 쉽게 달성할 수 있다. HPV-18 E6 및/또는 E7 폴리펩티드(들)는 바람직하게 막-고정 서열 및 분비 서열을 혼입함으로써 변형된다. 막-고정 및 분비 서열이 당업계에 공지되어 있다. 간략하면, 분비 서열은 막 제시 또는 분비 폴리펩티드의 N-말단에 존재하고, 소포체(ER) 내로 상기 폴리펩티드가 통과할 수 있도록 한다. 보통 15 내지 35개의 본질적으로 소수성인 아미노산을 포함하는데, 이는 성숙한 폴리펩티드를 제공하기 위해 특이적인 ER-위치의 엔도펩티다제에 의해 제거된다. 막-고정 서열은 보통 사실상 고도로 소수성이며 세포막에 폴리펩티드를 고정시키는 역할을 한다 (예를 들면, 문헌 [Branden and Tooze, 1991, in Introduction to Protein Structure p. 202-214, NY Garland]).

<34>

본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 막-고정 및 분비 서열을 선택하는 것은 방대하다. 광견병 당단백질, HFV 바이러스 외피 당단백질 또는 홍역 바이러스 F 단백질과 같은 것을 포함하는 임의의 막-고정 및/또는 분비 폴리펩티드 (예로서, 세포 또는 바이러스 폴리펩티드)로부터 수득할 수 있고, 합성일 수 있다. 본 발명에 따라 사용되는 초기 HPV-18 폴리펩티드의 각각에 삽입되는 막-고정 및/또는 분비 서열은 공통의 또는 상이한 기원을 가

질 수 있다. 분비 서열이 삽입되는데 바람직한 부위는 번역 개시에 대한 코돈의 하류에 있는 N-말단이며, 막-고정 서열에 대한 부위는 예를 들면, 종결 코돈의 상류 바로 가까이에 위치하는 C-말단이다. 또한, 링커 웨პ티드는 본 발명에서 사용되는 초기 HPV-18 폴리웨პ티드에 분비 서열을 연결시키거나, 막-고정 서열에 초기 HPV-18 폴리웨პ티드를 연결시키기 위해 사용될 수 있다. 링커 웨პ티드는 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 2 내지 20개의 아미노산을 함유하며, 알라닌, 글리신, 프롤린 및/또는 세린을 포함한다.

<35> 본 발명에 사용되는 HPV-18 E6 폴리웨პ티드는 바람직하게 홍역 F 단백질의 분비 및 막-고정 신호의 삽입에 의해 변형되는데, 서열 번호: 3의 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 별법으로는 본질적으로 그로 구성되거나, 별법으로는 그로 구성된 폴리웨პ티드가 특히 바람직하다. 임의로, 또는 조합하여, 본 발명에 사용되는 HPV-18 E7 폴리웨პ티드는 바람직하게 광견병 당단백질의 분비 및 막-고정 신호의 삽입에 의해 변형되는데, 서열 번호: 4의 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 별법으로는 본질적으로 그로 구성되거나, 별법으로는 그로 구성된 폴리웨პ티드가 특히 바람직하다.

<36> 또다른 것으로서 더욱 바람직한 측면에서, 본 발명에 사용되는 조성물의 치료학적 효능은 또한 하나 이상의 면역강화제 폴리웨პ티드(들) 또는 그러한 면역강화제 폴리웨პ티드(들)를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 사용함으로써 개선될 수 있다. 예를 들면, HPV-18 초기 폴리웨პ티드(들)를 예로서, 칼레티클린 (문헌 [Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678]), 마이코박테리움 투버큐로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 열 충격 단백질 70 (HSP70) (문헌 [Chen et al., 2000, Cancer Res. 60, 1035-1042]), 유비퀴틴 (문헌 [Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71, 8497-8503]) 또는 세균 독소, 예로서, 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A의 전위 도메인 (ETA(dIII)) (문헌 [Hung et al., 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703])과 같은 폴리웨პ티드에 연결시키는 것이 이로울 수 있다. 별법으로, 본 발명에 사용되는 조성물은 사이토카인 또는 사이토카인을 코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 사이토카인으로는 제한없이, 인터루킨(IL)-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21 및 IFNg를 포함하며, IL-2가 특히 바람직하다.

<37> 또다른 것으로 바람직한 실시태양에 따라, 본 발명에 따라 사용되는 조성물은 상기 정의된 바와 같은 하나 이상의 HPV-18 초기 폴리웨პ티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함한다. 적어도,

<38> o 서열 번호: 1 또는 서열 번호: 3에 제시된 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 별법으로는 본질적으로 그로 구성되거나, 별법으로는 그로 구성된 HPV-18 E6 폴리웨პ티드; 및

<39> o 서열 번호: 2 또는 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열과 상동성이거나, 그와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 별법으로는 본질적으로 그로 구성되거나, 별법으로는 그로 구성된 HPV-18 E7 폴리웨პ티드를 코딩하는 핵산이 바람직하다.

<40> 필요하다면, 본 발명에 사용되는 핵산 문자는 특정 숙주 세포 또는 유기체, 예로서, 인간 숙주 세포 또는 유기체에서 HPV-18 초기 폴리웨პ티드(들)이 높은 수준으로 발현될 수 있도록 최적화될 수 있다. 전형적으로, 포유동물 숙주 세포에서 드물게 사용되는 코돈에 상응하는 하나 이상의 "천연" (예로서, HPV) 코돈을 보다 빈번하게 사용되는 것으로서 동일 아미노산을 코딩하는 하나 이상의 코돈으로 대체함으로써 코돈 최적화를 실시한다. 통상의 돌연변이유발법에 의해 또는 화학적 합성 기법 (예로서, 합성 핵산이 생성됨)에 의해 달성될 수 있다. 부분적으로 대체한 경우라도 발현이 증가할 수 있기 때문에 드물게 사용되는 코돈에 상응하는 천연 코돈 모두를 대체할 필요는 없다. 또한, 제한 부위(들)의 도입을 조정하기 위하여 엄격한 고수로부터 최적화된 코돈 선호도로 몇몇 이탈이 이루어질 수 있다.

<41> 바람직하게는, 본 발명에 사용되는 HPV-18 초기 폴리웨პ티드-코딩 핵산은 숙주 세포 또는 유기체에서 발현되기 적합한 형태로 존재하는데, 이는 E6 폴리웨პ티드를 코딩하는 핵산 서열 및/또는 E7 폴리웨პ티드를 코딩하는 핵산 서열이 숙주 세포 또는 유기체에서 발현되기 위해서 필요한 하나 이상의 조절 요소의 제어하에 배치되어 있다는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, "조절 요소"라는 용어는 소정의 숙주 세포에서 복제, 중복, 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성 및/또는 숙주 세포 내로의 핵산 또는 그의 유도체 중 하나 (즉, mRNA)의 수송을 비롯한, 핵산의 발현을 허용하거나, 그에 도움을 주거나, 그를 조정하는 임의 서열을 지칭한다. 조절 요소를 선택하는 것은 예로서, 숙주 세포, 벡터, 및 원하는 발현 수준과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

<42> 프로모터가 특히 중요하며, 본 발명은 여러 유형의 숙주 세포에서 핵산의 발현을 지시하는 구성적 프로모터 및 오직 특정의 숙주 세포에서만 또는 특정 이벤트 또는 외인성 인자 (예로서, 온도, 영양 첨가제, 호르몬 또는 기타 리간드)에 대한 반응으로 발현을 지시하는 프로모터를 사용하는 것을 포함한다. 적합한 프로모터는 문헌상

에 광범위하게 기재되어 있고, 더욱 구체적으로는 바이러스 프로모터, 예로서, RSV(라우스 육종 바이러스), SV40(원숭이 바이러스-40), CMV(거대세포 바이러스) 및 MLP(주요 후기 프로모터) 프로모터를 예로 들 수 있다. 폭스바이러스 벡터에 사용하기에 바람직한 프로모터로는 제한없이, 백시니아 프로모터 7.5K, H5R, TK, p28, p11 및 K1L, 초기 및 후기 폭스바이러스 프로모터 사이의 키메라 프로모터 뿐만 아니라, 문헌 ([Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23, 1094-1097)], [Hammond et al. (1997, J. Virological Methods 66, 135-138)] 및 [Kumar and Boyle (1990, Virology 179, 151-158)])에 기재되어 있는 것과 같은 합성 프로모터를 포함한다.

<43> 핵산 발현을 제어하는 조절 요소는 추가로 적절한 개시, 전사의 조절 및/또는 종결 (예로서, 폴리 A 전사 종결 서열s), mRNA 수송 (예로서, 핵 위치 신호 서열), 프로세싱 (예로서, 스플라이싱 신호), 안정성 (예로서, 인트론 및 비-코딩 5' 및 3' 서열), 및 숙주 세포 또는 유기체로의 번역 (예로서, 3개로 나누어진 리더 서열, 리보솜 결합 부위, 샤인-달가노 등)에 대한 추가의 요소를 포함할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

<44> 또다른 바람직한 실시태양에 따라, 본 발명에 따라 사용되는 핵산은 벡터내 포함된다. 본원에서 사용되는 "벡터"라는 용어는 염색체외 (예로서, 에피솜), 다중 카피 및 통합 벡터 (즉, 숙주 염색체내로 혼입시키기 위한 것)를 비롯한, 바이러스 및 비바이러스 (예로서, 플라스미드 DNA) 벡터를 지칭한다. 유전자 요법 벡터 (즉, 핵산을 숙주 유기체로 전달할 수 있는 것) 뿐만 아니라, 다양한 발현 시스템에서 사용하기 위한 발현 벡터가 본 발명의 맥락에서 특히 중요하다. 적합한 비바이러스 벡터로는 예로서, pREP4, pCEP4 (인비트로겐(Invitrogen), pCI (프로메가(Promega)), pCDM8 (문헌 [Seed, 1987, Nature 329, 840]), pVAX 및 pgWiz (진 테라피 시스템 인크.(Gene Therapy System Inc); 문헌 [Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746])와 같은 플라스미드를 포함한다. 적합한 바이러스 벡터는 각종 상이한 바이러스 (예로서, 레트로바이러스, 아데노바이러스, AAV, 폭스바이러스, 포진 바이러스, 홍역 바이러스, 거품형성 바이러스 등)로부터 유래될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "바이러스 벡터"라는 용어는 벡터 DNA 뿐만 아니라, 그에 대해 생성된 바이러스 입자를 포함한다. 바이러스 벡터는 복제-가능한 것일 수 있거나, 복제-결손이거나 복제-손상인 것이 되도록 유전적으로 무력화시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 "복제-가능한 것"이라는 용어는 특정 숙주 세포 (예로서, 종양 세포)에서 보다 잘 또는 선택적으로 복제하도록 공학처리된 복제-선별적 및 조건부로 복제하는 바이러스 벡터를 포함한다.

<45> 하나의 측면에서, 본 발명에서 사용되는 벡터는 아데노바이러스 벡터 (리뷰를 위해, 문헌 ["Adenoviral vectors for gene therapy", 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press]을 참조)이다. 이는 다양한 인간 또는 동물 기원으로부터 유래될 수 있고, 아데노바이러스 혈청형 1부터 51까지의 임의 혈청형이 사용될 수 있다. 인간 아데노바이러스 2(Ad2), 5(Ad5), 6(Ad6), 11(Ad11), 24(Ad24) 및 35(Ad35)가 특히 바람직하다. 그러한 아데노바이러스는 아메리칸 타이프 컬쳐 컬랙션(American Type Culture Collection)(메릴랜드주 로크빌에 소재하는 ATCC)으로부터 이용가능하고, 그의 서열, 기구 및 생산 방법을 기술하며, 당업자가 그를 사용할 수 있도록 하는, 다수의 간행물의 대상이 된다 (예를 들면 US 6,133,028; US 6,110,735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; 문헌 [Vogels et al., 5 2003, J. Virol. 77, 8263-8271] 참조).

<46> 본 발명에서 사용되는 아데노바이러스 벡터는 복제-가능한 것이다. 복제-가능한 아데노바이러스 벡터의 많은 예를 당업자가 용이하게 이용할 수 있다 (문헌 ([Hernandez-Alcoceba et al., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024]; [Nemunaitis et al., 2001, Gene Ther. 8, 746-759]; [Alemany et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727])). 예를 들면, E1A CR2 도메인내 결실에 의해 (예로서, W000/24408) 및/또는 천연 E1 및/또는 E4 프로모터를 조작, 종양 또는 세포 상태-특이 프로모터로 대체함으로써 (예로서, US5,998,205, W099/25860, US5,698,443, W000/46355, W000/15820 및 W001/36650) 야생형 아데노바이러스 계놈으로부터 공학 처리될 수 있다.

<47> 별법으로, 본 발명에 사용되는 아데노바이러스 벡터는 복제-결손인 것이다 (예를 들면 W094/28152; 문헌 [Lusky et al., 1998, J. Virol 72, 2022-2032] 참조). 바람직한 복제-결손 아데노바이러스 벡터는 E1-결손인 것으로 (예로서, US 6,136,594 및 US 6,013,638), E1 결실은 대략 450번 위치부터 3328번까지의 위치, 또는 대략 459 번 위치로부터 3510번까지의 위치에 이른다 (수탁번호 M 73260하에 진뱅크에, 그리고, 문헌 [Chroboczek et al., 1992, Virol. 186, 280-285]에 개시된 인간 아데노바이러스 5형의 서열 참조). 아데노바이러스 계놈의 추가 부위(들) (비필수 E3 부위 또는 기타 필수 E2, E4 부위의 모두 또는 그 일부)를 결실시킴으로써 클로닝 능력은 추가로 개선될 수 있다. 문헌 [Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810)]에 기재된 바와 같이 아데노바이러스 계놈의 임의 위치에서의 상동성 재조합을 통해 핵산 삽입을 실시할 수 있다. 예를 들면, HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 E1 부위를 대신하여 삽입될 수 있고, HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 E3 부위를 대신하여 삽입될 수 있으며, 그 반대의 경우로도 이루어질 수 있다.

- <48> 또 다른 바람직한 측면에서, 본 발명에서 사용되는 벡터는 폭스바이러스 벡터 (예를 들면, 문헌 [Cox et al. in "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press] 참조)이다. 이는 폭스바이러스과의 임의 구성원, 특히, 카나리폭스, 계두 및 백시니아 바이러스로부터 수득할 수 있으며, 후자의 것이 바람직하다. 적합한 백시니아 바이러스로는 제한없이, 코펜하겐(Copenhagen) 균주 (문헌 ([Goebel et al., 1990, Virol. 179, 247-266 and 517-563]; [Johnson et al., 1993, Virol. 196, 381-401]), 와이어쓰(Wyeth) 균주 및 고도로 약독화된 변형 앙카라(Ankara) (MVA) 균주 (문헌 [Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16])를 포함한다. MVA 계놈의 전체 서열의 결정 및 코펜하겐 계놈과의 비교를 통해 MVA 계놈에서 발생된 7개의 결실부를 정확하게 동정할 수 있었으며 (문헌 [Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396]), 그 중 임의의 것을 사용하여 HPV-18 초기 폴리펩티드-코딩 핵산을 삽입시킬 수 있다.
- <49> 핵산 및 폭스바이러스 계놈에서의 발현에 필요한 관련된 조절 요소에 관하여 기초적인 기법은 당업계의 숙련인이 쉽게 이용할 수 있는 많은 문서상에 기재되어 있다 (문헌 ([Paul et al., 2002, Cancer Gene Ther. 9, 470-477]; [Piccini et al., 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563]; US 4,769,330; US 4,772,848; US 4,603,112; US 5,100,587 및 US 5,179,993). 보통, 바이러스 계놈, 및 삽입 핵산을 수반하는 플라스미드, 둘 모두에 존재하는 중복 서열 (즉, 원하는 삽입 부위 측면에 위치하는) 사이에서의 상동성 재조합을 통해 진행된다.
- <50> 재조합 폭스바이러스가 그대로 생육성 및 감염성으로 유지되도록 핵산은 폭스바이러스 계놈의 비필수 유전자 좌위에 삽입되는 것이 바람직하다. 비필수 부위는 비-코딩 유전자간 부위이거나, 유전자에 대한 불활성화 또는 결실이 바이러스 성장, 복제 또는 감염에 유의적인 손상을 일으키지 않는 임의의 유전자이다. 바이러스 입자 생산시에 결손 기능이, 예를 들면, 폭스바이러스 계놈에서 결실된 것에 상응하는 상보적인 서열을 수반하는 보조 세포주를 사용함으로써 트랜스로 공급될 수 있다면, 필수 바이러스 유전자 좌위에서의 삽입도 고려할 수 있다.
- <51> 코펜하겐 백시니아 바이러스를 사용할 때, HPV-18 초기 폴리펩티드-코딩 핵산은 바람직하게는 티미딘 키나제 유전자(tk)에 삽입된다 (문헌 ([Hruby et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415]; [Weir et al., 1983, J. Virol. 46, 530-537]). 그러나, 예로서, 적혈구응집소 유전자 (문헌 [Guo et al., 1989, J. Virol. 63, 4189-4198]), K1L 유전자 좌위, u 유전자 (문헌 [Zhou et al., 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190]) 또는 각종의 자발적 또는 공학처리된 결실이 문헌 (문헌 ([Altenburger et al., 1989, Archives Virol. 105, 15-27]; [Moss et al. 1981, J. Virol. 40, 387-395]; [Panicali et al., 1981, J. Virol. 37, 1000-1010]; [Perkus et al, 1989, J. Virol. 63, 3829-3836]; [Perkus et al, 1990, Virol. 179, 276-286]; [Perkus et al, 1991, Virol. 180, 406-410]))상에 보고되어 있는 백시니아 바이러스 계놈의 좌측 말단부의 다른 삽입 부위 또한 적절하다.
- <52> MVA를 사용할 때, HPV-18 초기 폴리펩티드-코딩 핵산은 동정된 결실부 I 내지 VII 중 어느 것 뿐만 아니라, D4R 유전자 좌위에 삽입될 수 있지만, 결실부 II 또는 III내 삽입이 바람직하다 (문헌 ([Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038]; [Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040])).
- <53> 계두 바이러스를 사용할 때, 티미딘 키나제 유전자내의 삽입을 고려할 수 있지만, HPV-18 초기 폴리펩티드-코딩 핵산은 바람직하게 ORF 7과 9 사이에 위치하는 유전자간 부위에 삽입된다 (예를 들면, EP 314 569 및 US 5,180,675).
- <54> 상기 기술된 바와 같이, 본 발명에 사용되는 조성물은 추가로 사이토카인-발현 핵산을 포함할 수 있다. 이는 하나 이상의 HPV-18 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 벡터에 의해, 또는 기원이 동일하거나 상이할 수 있는 독립된 벡터에 의해 수반될 수 있다.
- <55> 본 발명의 바람직한 실시태양은 7.5 K 프로모터하에 배치된 HPV-18 E6 폴리펩티드, 7.5K 프로모터하에 배치된 HPV-18 E7 폴리펩티드, 및 H5R 프로모터 제어하에 배치된 인간 IL-2 유전자를 코딩하는 MVA 벡터를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, HPV-18 E6 폴리펩티드, HPV-18 E7 폴리펩티드 및 인간 IL-2를 코딩하는 핵산은 MVA 계놈의 결실부 III에 삽입된다.
- <56> 추가로, 본 발명에 사용되는 조성물은 동물/인체내에서의 그의 분해를 보호하고/거나, 벡터를 숙주 세포 또는 유기체내로 형질감염/감염시키는 것을 개선시키기 위하여 하나 이상의 안정화 물질(들), 예로서, 지질 (예로서, 양이온성 지질, 리포좀, W098/44143에 기재되어 있는 지질), 뉴클레아제 저해제, 하이드로겔, 하이알루로니다제 (W098/53853), 콜라게나제, 양이온성 중합체, 다당질, 키페이트제 (EP890362)를 포함할 수 있다. 그러한 물질

은 단독으로 또는 조합하여 (예로서, 양이온성 및 중성 지질) 사용될 수 있다.

<57> 상기-기술된 핵산 또는 벡터를 포함하는 감염성 바이러스 입자는 통상의 방법에 의해 생산될 수 있다. 대표적인 방법은

<58> (a) 바이러스 벡터를 적합한 세포주내로 도입시키는 단계,

<59> (b) 상기 감염성 바이러스 입자가 생산될 수 있도록 하는 적합한 조건하에서 상기 세포주를 배양하는 단계,

<60> (c) 상기 세포주의 배양물로부터 생산된 감염성 바이러스 입자를 회수하는 단계, 및

<61> (d) 임의로 상기의 회수된 감염성 바이러스 입자를 정제하는 단계를 포함한다.

<62> 바이러스 벡터가 결손성인 경우, 감염성 입자는 보통 보완 세포주에서 생산되거나, 또는 비기능성 바이러스 유전자를 트랜스로 공급하는 것인 보조 바이러스를 사용함으로써 생산된다. 예를 들면, E1-결실된 아데노바이러스 벡터를 보완하는데 적합한 세포주는 293 세포 (문헌 [Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72]) 뿐만 아니라, PER-C6 세포 (문헌 [Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917])를 포함한다. 폭스바이러스 벡터를 증식시키는데 적절한 세포는 조류 세포이고, 수정란으로부터 수득한 닭 배아로부터 제조된 1차 닭 배아 섬유아세포가 가장 바람직하다.

<63> 감염성 바이러스 입자는 배양물 상등액으로부터, 또는 용해 (예로서, 화학적 수단, 냉동/해동, 삼투압 충격, 기계적 충격, 초음파처리 등) 후 세포로부터 회수할 수 있다. 바이러스 입자를 플라크 정제의 연속적인 순환에 의해 단리시킨 후, 이어서, 당업계의 기법 (크로마토그래프 방법, 염화세슘상의 한의여과 또는 수크로스 구배)을 사용하여 정제할 수 있다.

<64> 본 발명은 또한 특정의 표적 숙주 세포를 차별적으로 표적하도록 변형된 벡터 또는 바이러스 입자의 용도를 포함한다 (예를 들면, 문헌 ([Wickam et al., 1997, J. Virol. 71, 8221-8229]; [Arnberg et al., 1997, Virol. 227, 239-244]; [Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668]); W094/10323; W002/96939 및 EP 1 146 125 참조). 표적화된 벡터 및 바이러스 입자의 전형적인 특징은 세포 및 표면-노출된 성분, 예로서, 세포-특이적 마커 (예로서, HPV-감염된 세포), 조직-특이적 마커 (예로서, 자궁경부-특이적 마커) 뿐만 아니라, 바이러스 (예로서, HPV) 항원을 인식하고 그에 결합할 수 있는 리간드의 표면에 존재한다는 것이다. 적합한 리간드의 예로서 HPV 항원 도메인에 대한 항체 또는 그의 항원을 포함한다. 리간드는 보통 바이러스 표면상에 존재하는 폴리펩티드 (예로서, 아데노바이러스 섬유, 펜톤, pIX 또는 백시니아 p14 유전자 산물)에 유전자적으로 삽입된다.

<65> 본 발명에 사용되는 조성물은 임의의 적합한 방법에 의해, 예를 들면, 표준 직접적인 웨이퍼 합성 기법 (예로서, 문헌 [Bodanszky, 1984 in Principles of peptide synthesis, Springer-Verlag])에 의해, 및 재조합 DNA 기술에 의해 적절한 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 예를 들면, HPV-18 E6 및 E7 초기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 통상의 문자 생물학 또는 PCR 기법에 의해 HPV-함유 세포, cDNA 및 게놈 라이브러리, 바이러스 게놈 또는 그를 포함하는 것으로 알려진 선행 기술의 벡터로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 필요하다면, 통상의 돌연변이유발 기법에 의해 추가로 변형될 수 있다. 별법으로, 본 발명에 사용되는 핵산은 또한 자동화된 방법으로 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다 (예를 들면, 문헌 ([Edge, 1981, Nature 292, 756]; [Nambair et al., 1984, Science 223, 1299]; [Jay et al., 1984, J. Biol. Chem. 259, 6311])에 기재되어 있는 중복 합성 올리고뉴클레오티드로부터 조립된 것). 당업자는 적절한 숙주에서 HPV-18 초기 폴리펩티드를 생산하는데 이용 가능한 다수의 발현 시스템과 벡터 또는 감염성 바이러스 입자를 숙주 세포내로 도입시키는 방법에 관한 전문적 지식을 갖고 있다.

<66> 본 발명에 따른 조성물의 바람직한 용도는 각종 질환 및 병적 용태, 특히, 상기 열거되어 있는 HPV 유전자형들 중 적어도 하나에 의해 유발된 HPV 감염과 관련된 것을 치료하기 위한 것이다. 본 발명은 또한 예방법도 포함하지만, 본 발명은 예로서, HPV 지속 감염, HPV-감염 환자에서 발병될 수 있는 전암성 뿐만 아니라 암성 용태를 치료하기 위한 요법에 특히 유용하다. HPV-관련 암성 용태의 예로는 자궁경부 암종, 항문 암종 및 경구암을 포함한다. HPV-관련 전암성 용태는 1, 2, 또는 3등급의 자궁경부 상피내 종양(CIN)을 비롯한 저등급 병변부터 고등급 병변까지의 범위에 이른다.

<67> 바람직하게는, 본원에 기술된 양식에 따라 숙주 유기체내로 투여할 때, 본 발명의 조성물은 치료되는 숙주 유기체에 치료학적 잇점을 제공한다. 치료학적 잇점은 예를 들면, HPV 감염 빈도의 감소에 의한, 전형적으로 HPV 감염과 관련된 병적 용태의 발병 저연 (예로서, CIN 병변 또는 자궁경부암 발병의 저연)에 의한 군집 수준 또는 HPV 바이러스혈증의 감소에 의한, 및/또는 바이러스 유전자 발현 저해 (예로서, HPV E6 또는 E7-발현 RNA 감

소)에 의한, 및/또는 임상 결과 (예로서, 안정화, HPV-관련 병변의 부분적인 또는 전체적인 퇴행)의 개선에 의한, 및/또는 체액성 또는 세포성 또는 둘 모두 (예로서, 항-HPV 항체 생산 및/또는 T 세포-매개 면역)이든지 간에 항-HPV 반응을 증진시키는 면역계의 자극에 의한, 및/또는 통상의 요법에 대한 숙주 유기체의 반응 개선에 의한 개인별 수준을 여러 방법에 의해 치료전과 비교함으로써 입증될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 조성물은, HPV 양성인 여성에게 조성물을 투여한 후, (i) 하나 이상의 양성 검출 후에 음성 HPV 검출되었을 때, (ii) 고등급의 CIN2/3 병변이 저등급의 CIN1로 퇴행되었을 때, (iii) 침윤성 자궁경부 암종이 안정화되거나 퇴행하였을 때에 이익을 제공하는 것이다. 치료 이후 환자는 최소한 6개월에 걸쳐 정기적으로 계속 치료받을 것을 권장한다.

<68> HPV의 존재는 생물학적 체액(예로서, 질액 및 자궁경부액, 혈액, 혈청, 혈장), 통상의 자궁경부 샘플링 장치를 사용하여 수집한 부인과적 샘플, 조직 절편 및 생검에서 측정할 수 있다. 샘플내 HPV DNA 및 RNA의 존재를 평가하는 각종 방법들이 당업자에게 이용가능하며, 예로서, LiPA 시스템 (WO99/14377; 네덜란드 소재의 라보 바이오메디칼 프로덕츠(Labo Biomedical products)), Pre Tect HPV 프루퍼(Proofer) (노르웨이 소재의 노르칩 AS(NorChip AS)), 하이브리드 캡쳐 II 시스템(Hybrid Capture) II 시스템 (미국 소재의 디진 코포레이션 (Digene Corp)), 씬 프렙(Thin Prep) 시스템 (매사추세츠 말보루 소재의 사이티 코포레이트(Cytoc Corporate)) 및 PCR/RT-PCR 시스템이 있다. 적합한 프라이머는 당업자에게 공지되어 있거나, 관심의 대상이 되는 HPV 유전자형의 뉴클레오티드 서열에 기초하여 용이하게 합성될 수 있다. 또한 적합한 항체를 사용하여 면역원성 분석법 (예로서, ELISA)에 의해 진행할 수 있다. HPV-유도성 병변의 퇴행 또는 안정화는 일정 기간 동안 병변의 실제 크기를 측정함으로써 결정될 수 있다. 직접적인 관찰 (예로서, 질화대경검사), 방사선 영상 방법, 면역 영상 방법 또는 울트라손을 사용하여 시간 경과에 따른 병변의 크기를 추정할 수 있다. 또한, 숙주 유기체에서의 HPV-관련 병변의 안정화 또는 퇴행을 예측하기 위해 비정형 세포의 존재를 추정하는 세포학적 및 조직학적 분석법과 같은 각종 시험관내 방법을 사용할 수 있다. 면역 반응을 유도하거나 자극시키기 위한 조성물의 용도와 관련하여 하기 기술되는 것과 같은 다수의 통상적인 기법을 사용하여 항-HPV 면역 반응의 자극을 추정할 수 있다.

<69> 적합하게는, 본 발명의 조성물이 추가로 약제학적 조성물을 제공하기 위해 약제학적으로 허용가능한 비히클을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "약제학적으로 허용가능한 비히클"은 약제학적 투여 적합성인, 임의의 및 모든 담체, 용매, 희석제, 부형제, 애주번트, 혼탁 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 조성물내 포함된 약제학적으로 허용가능한 비히클(들)은 또한 냉동 (예로서, -70°C, -20°C), 냉장 (예로서, 4°C) 또는 주변 온도 (예로서, 20°C)에서 또는 동결 건조 상태에서의 제조 및 장기간 (즉, 1개월 이상)의 저장이라는 조건하에서 그의 안정성을 보존시킬 수 있어야 한다.

<70> 본 발명에 사용되는 조성물은 생리학적 pH 또는 약간 염기성인 pH (예로서, 약 pH 7 내지 약 pH 9 사이)에서 인간에 사용하기에 적절하도록 적합하게 완충처리된다. 적합한 완충제로는 제한없이 인산염 완충액 (예로서, PBS), 중탄산염 완충액 및/또는 트리스 완충액을 포함한다.

<71> 추가로, 인간 또는 동물에 사용하기에 적절한 희석제를 포함할 수 있다. 그러한 희석제는 바람직하게는 등장성, 저장성, 또는 약간 고장성이고, 상대적으로 낮은 이온 세기를 갖는다. 대표적인 예로서 멸균수, 생리학적 염수 (예로서, 염화나트륨), 링커액, 글루코스, 트레할로스, 또는 사카로스 용액, 행크 용액 및 기타 생리학적 평형 염 수용액 (예를 들면, 문헌 [Remington : The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins] 최신판 참조)을 포함한다.

<72> 조성물은 또한 바람직한 약제학적 또는 약역학적 성질을 제공하기 위하여, 예를 들면, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 무균성, 안정성, 제제의 해리 속도를 변형시키거나 유지시키기 위해, 인간 또는 동물 유기체로의 방출 또는 흡수를 변형시키거나 유지시키기 위해, 특정 기관 (예로서, 간)에서의 혈액막을 가로지르는 수송 또는 투과를 촉진시키기 위해 다른 약제학적으로 허용가능한 부형제를 함유할 수 있다. 적합한 부형제로는 아미노산을 포함한다.

<73> 추가로, 조성물은 인간에서 전신 또는 점막 적용에 적합한 통상의 애주번트(들)와 함께 조합하여 사용될 수 있다.

<74> 조성물은 전신 투여, 국소 투여 및 국부 투여를 비롯한 다양한 투여 방식에 의해 숙주 유기체에게 투여될 수 있다. 적합한 투여 경로로는 제한없이, 피하, 진피내, 근육내, 정맥내, 복강내, 종양내, 혈관내, 및 동맥내 주사 를 포함한다. 주사는 통상의 주사기 또는 바늘, 또는 당업계에서 이용가능한 임의의 다른 적절한 장치에 의해 이루어질 수 있다. 별법으로, 조성물은 점막 경로, 예로서, 경구/소화관, 비강, 기관내, 폐내, 질내, 또는 직

장내 경로를 통해 투여될 수 있다. 국소 투여는 또한 경피 수단 (예로서, 패치 등)을 사용하여 실시될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 근육내 및 피하 투여가 바람직한 경로를 구성한다. 단일 용량으로 또는 1일 내지 1년까지의 다양한 특정 시간 간격을 두고 1회 내지 수회 반복되는 용량으로 투여될 수 있다. 바람직하게, 간격은 약 1주 내지 1개월이다.

<75> 적절한 투여량은 다양한 파라미터, 특히, 투여 방식; 사용되는 조성물; 숙주 유기체의 연령, 건강 상태 및 체중; 증상의 성질 및 정도; 현 치료 방법의 종류; 치료 빈도; 및/또는 예방 또는 치료 요법에 대한 필요성에 대한 상관관계에 따라 적합화될 수 있다. 추가로, 친료의가 관련 환경을 고려하여 적절한 투여량을 결정하는데 필요한 추정을 치밀하게 행한다. 일반적인 가이던스로, 백시니아-함유 조성물에 대한 적합한 투여량은 약 10^4 내지 10^9 pfu (플라크 형성 단위), 바람직하게는, 약 10^5 내지 10^8 pfu로 다양한 반면, 아데노바이러스-포함 조성물은 약 10^5 내지 10^{13} iu (감염 단위), 바람직하게는 약 10^7 내지 10^{11} iu로 다양하다. 벡터 플라스미드에 기초한 조성물은 $10\text{ }\mu\text{g}$ 내지 20 mg , 유리하게는 $100\text{ }\mu\text{g}$ 내지 2 mg 사이의 용량으로 투여될 수 있다. 단백질 조성물은 10 ng 내지 20 mg 사이의 용량으로 투여될 수 있으며, 체중 1kg 당 약 $0.1\text{ }\mu\text{g}$ 내지 약 2 mg 의 투여량이 특히 바람직하다.

<76> 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 사용되는 조성물은 상기 기술된 MVA 벡터를 포함하고, 이는 1주 간격으로 피하 경로에 의해 5×10^5 pfu 내지 5×10^7 의 3회 용량으로 투여된다.

<77> 원하는 경우, 본 발명의 용도는 하나 이상의 통상적인 치료학적 양식 (예로서, 방사선 조사, 화학요법 및/또는 수술)과 함께 수행될 수 있다. 다중의 치료학적 접근법은 보다 광범위한 기초의 개입을 환자에 제공한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 방법은 HPV-관련 병변의 외과적 절제술 (예로서, 원뿔절제술) 이전에 또는 바람직하게는 그 이후에 진행될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 방사선요법 (예로서, 감마 방사선 조사) 이전에 또는 이후에 진행될 수 있다. 당업자는 사용될 수 있는 적절한 방사선조사 요법 프로토콜 및 파라미터를 용이하게 체계적으로 나타낼 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Perez and Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co] 참조; 당업자에게는 용이하게 자명한 바, 적절한 개조 및 변형을 사용한다)). 추가의 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법 또는 용도를 HPV 감염, HPV-관련 병적 용태를 치료하거나 예방하는데 통상 사용되는 하나 이상의 약물과 함께 화학요법을 결합시킨다.

<78> 본 조성물은 또한 다른 HPV 폴리펩티드, 예로서, 초기 HPV-16 폴리펩티드, 바람직하게는 E6 및/또는 E7 HPV-16 폴리펩티드, 비암유전자이고 막-제시되도록 당업계에 기재된 바와 같이 변형된 것 (WO99/03885 참조) 중 하나 이상의 것과 함께 조합하여 사용될 수 있다. HPV-16 및 HPV-18의 E6 및/또는 E7 폴리펩티드, 또는 HPV-16 및 HPV-18의 E6 및/또는 E7 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물은 HPV-16 및 HPV-18 이외의 1종 이상의 유두종바이러스, 예로서, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-56, HPV-59, HPV-68, HPV-70, 및 HPV-85에 더하여 HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, 및 HPV-58 중 어느 것 또는 그의 임의 조합 (예로서, HPV-31 및 HPV-45)에 의해 유발된 감염 또는 병적 용태를 치료하는데 특히 유용할 수 있다.

<79> 또 다른 실시태양에서, 하나 이상의 초회감작 조성물(들) 및 하나 이상의 추가감작 조성물(들)을 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 초회감작-추가감작의 치료학적 양식에 따라 본 발명의 용도를 수행한다. 전형적으로, 초회감작 및 추가감작 조성물은 적어도 공통된 면역원성 도메인을 포함하거나 코딩하는 상이한 비히클을 사용한다. 먼저 초회감작 조성물을 숙주 유기체에게 투여하고, 1 내지 12개월간의 다양한 기간을 두고 순차적으로 추가감작 조성물을 투여한다. 또한, 초회감작 및 추가감작 조성물은 동일한 투여 경로에 의해 또는 상이한 투여 경로에 의해 동일한 부위 또는 대체 부위에 투여될 수 있다. 예를 들면, HPV-18 초기 폴리펩티드(들) 기재의 초회감작 조성물은 점막 경로에 의해 투여될 수 있는 반면, 핵산 벡터 기재의 추가감작 조성물은 예로서, MVA 벡터의 경우에는 피하 주사로, DNA 플라스미드 및 아데노바이러스 벡터의 경우에는 근육내 주사로 주사하는 것이 바람직하다.

<80> 본 발명은 또한 HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스에 대한 면역 반응을 유도하거나 자극시키기 위한, HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들) 또는 HPV-18의 하나 이상의 초기 폴리펩티드(들)를 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 HPV-18 이외의 1종 이상의 인간 유두종바이러스에 대한 면역 반응을 유도하거나 자극시키는 방법에 관한 것이다. 면역 반응은 바람직하게는 HPV 초기 폴리펩티드에 대한 세포 면역 반응이며, CD4+, CD8+ 또는 둘 모두의 CD4+ 및 CD8+-매개 면역 반응에 대한 것이 바람직하다.

- <81> 동물 또는 인간 유기체에 투여할 때 항-HPV 면역 반응을 유도 또는 자극시킬 수 있는 능력은 당업계에서 표준인 다양한 분석법을 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 평가할 수 있다. 면역 반응의 개시 및 자극을 평가하는데 이용될 수 있는 기법에 관한 일반적인 설명에 대해서는 예를 들면, 문헌 [Coligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health)]을 참조한다. CD4+ 및 CD8+ T-세포로부터 유래된 것을 비롯한 활성화된 효과기 세포에 의해 분비된 사이토카인의 프로파일 측정 (예로서, 엘리스폿(ELIspot)에 의한 IL-10 또는 IFNg-생산 세포의 정량화)에 의해, 면역 효과기 세포의 활성 상태 측정 (예로서, 종래의 ^3H 티미딘 흡수에 의한 T 세포 증식 분석법)에 의해, 감작된 대상자에서 항원-특이 T 림프구 분석 (예로서, 세포독성 분석법에서 펩티드-특이 용해)에 의해, 예를 들면, ^{51}Cr 방출 분석법에 의해 측정된 림프구 매개 항-종양 세포용해 활성에 의해 세포 면역 측정을 실시할 수 있다. 체액 반응을 자극시킬 수 있는 능력은 항체 결합 및/또는 결합에 대한 경쟁에 의해 (예를 들면 문헌 [Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press]) 또는 세포 성장의 종양 특이적 항체-매개 저해의 시험관내 발생에 의해 (문헌 [Gazit et al., 1992, Cancer Immunol. Immunother 35, 135-144]) 측정될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 추가로 항-HPV 면역 반응의 유도 또는 자극을 반영하는 항-종양 활성을 측정하기 위해 적절한 종양-유도제 (예로서, HPV-18 E6 및 E7-발현 TC1 세포)로 시험감염된 동물 모델에서 확인할 수 있다.
- <82> 본 발명은 예시적인 방식으로 기술되었으며, 사용된 용어는 본질적으로 제한적이라기 보다는 설명적인 것을 의도한다는 것을 이해하여야 한다. 상기 교시에 비추어 본 발명에 대해 다수의 수정과 변형이 이루어질 수 있다는 것은 분명하다. 그러므로, 첨부된 청구의 범위의 범주내에서 본 발명은 본원에 구체적으로 기술된 것과 상이한 방식으로 실시될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.
- <83> 상기 인용된 특허, 간행물 및 데이터베이스 엔트리의 개시 내용 모두는 각각의 특허, 간행물, 또는 엔트리가 구체적이고 개별적으로 참고로 인용된 것과 동일한 범위로 참고로서 인용된다.
- <84> 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제공된다.

실시예

- <85> 실시예 1: HPV-18 E6 및 E7 폴리펩티드를 발현하는 바이러스 작제
- <86> 문헌 [Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY)]에 설명되어 있는 일반 유전자 공학처리 기법 및 분자 클로닝 기법에 따라, 또는 시판용 키트를 사용하는 경우, 제조사의 권고에 따라 하기 기술하는 작제를 수행한다. PCR 증폭 기법은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들면, (Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press)에 의해 공개된 [PCR protocols-A guide to methods and applications, 1990]). 인용된 상기 문헌, 및 문헌 ([Mackett et al. (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419)] 및 [Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864)])상의 본 분야의 종래 기술에 따라 재조합 백시니아 바이러스 작제를 실시한다. 재조합 백시니아 바이러스의 선별을 촉진시키기 위하여 E. 콜라이의 선별 유전자 gpt (크산티 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제) (문헌 [Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854])를 사용한다.
- <87> HPV-18 E6 및 E7 폴리펩티드 (E6*TMF 및 E7*TMR)의 막-고정 및 비-암유전자 변이체를 발현하는 재조합 MVA 바이러스는, W099/03885 및 US 6,884,786 (HPV-16 E6 및 E7 폴리펩티드의 막-고정 및 비-암유전자 변이체를 발현하는 MVATG8042 기재)에 기재되어 있는 바와 같이 작제할 수 있다. 바람직하게는, HPV-18 유전자 서열 둘 모두 p7.5K 프로모터의 제어하에 배치하고, MVA 계놈의 절제부 III에 삽입한다. 작제물이 면역강화제 유전자를 포함한다면, H5R 프로모터에 의해 유도되는 IL-2 유전자를 제공하는 것이 바람직하다. 생성된 작제물을 MVA-HPV-18로 명명한다.
- <88> MVA-HPV-18의 바이러스 입자는 종래 기법에 따라 CEF 세포에서 생산할 수 있다. 감염일까지 바이러스 스톡을 -80°C 에서 유지시킬 것이다. 바이러스 혼탁액을 급속 해동시키고, 투여하기 전에 $100 \mu\text{l}$ 부피 중 $5 \times 10^7 \text{ pfu}$ 의 바이러스 용량을 얻기 위하여 예를 들면, 트리스-HCl 10 mM (pH 8), 사카로스 5% (w/v), 및 50 mM NaCl을 함유하는 적합한 완충액에 희석시킬 것이다.
- <89> 실시예 2: HPV-18 E6 및 E7 폴리펩티드에 의해 제공되는 교차 반응
- <90> 하기 기술되는 바와 같이 MVATG HPV-18로 면역화된 마우스로부터 수득한 비장 세포에서 IFNg 엘리스폿 분석법을 실시하여 교차 반응성을 평가할 수 있다.

- <91> HUSAR 다중 정렬 프로그램 ((CLUSTAL) (<https://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/cgi-bin/w2h/w2h.start>)을 사용하여 상이한 HPV 유전자형으로부터 얻은 E6 및 E7 아미노산 서열을 정렬시킨다.
- <92> 예측되는 T 세포-인식 웨티드 ($H2^b$ -제한)는 인터넷 (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) 상에서 이용가능한 BIMAS 웨티드 결합 소프트웨어를 사용하여 동정할 수 있다. E7-특이 CTL에 의해 인식되는 바, 당업계에 기재된 참조 웨티드를 사용하였을 때 얻은 것과 동일하거나 그보다 큰 결합 점수를 갖는 웨티드를 추가로 분석할 것이다. 아미노산 서열 HPV-18 E6 및 E7 폴리웨티드에 대하여 1개 또는 2개의 아미노산 차이를 나타내는 것을 상기 교차-반응성 분석을 위해 선택할 것이다. 선택된 웨티드는 종래 합성 기법에 의해 합성할 수 있고, HPV-18 E6 및 E7 폴리웨티드로 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포와 교차 반응할 수 있는 그의 능력에 대하여 하기와 같이 측정할 수 있다.
- <93> SPF 건강한 암컷 C57B1/6 마우스를 상업체로부터 입수하고, 통제 조건 (1시간당 최소 11회 환기시켜주는 냉난방 장치가 구비된 싱글 전용룸이며, 온도 및 상대 습도 범위는 각각 18°C 내지 22°C 및 40 내지 70% 이내이다. 빛은 12시간 명/12시간 암 주기로 자동으로 조절된다. 음식물과 물은 전 연구 기간 내내 임의대로 제공한다) 하에 수용했다.
- <94> 상업체로부터 입수하고, 상기 정의된 바와 같은 조건하에서 수용된 7주령된 특정 무병원체(SPF) C57B1/6 암컷 마우스를 5×10^7 pfu의 MVATGN33 또는 MVATG HPV-18을 사용하여 0, 7 및 14일째에 3회에 걸쳐 피하로 면역화시킬 수 있다. 매번 동물의 우측 옆구리의 다른 위치에 피하 주사하는 것이 바람직하다. 최종 면역화후 24일째에 비장을 채취할 수 있다. 새로운 비장 세포를 당업계의 종래 기법을 사용하여 제조할 수 있다.
- <95> 96-웰 닉트로셀룰로스 플레이트를 탄산나트륨 완충액 중 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 모노클로날 래트 항-마우스 IFNg 항체 (클론 R4-6A2; 파르미겐(Pharmingen), 카탈로그 번호 551216, $100 \mu\text{l}/\text{웰}$)로 코팅할 수 있다. 플레이트를 밤새도록 4°C에서 또는 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션시킬 수 있다. 플레이트를 DMEM 10% FCS로 3회에 걸쳐 세척하고, $100 \mu\text{l}$ DMEM 10% FCS/웰로 2시간 동안 37°C에서 포화시킬 수 있다. 비장 세포를 10^6 세포/ $100 \mu\text{l}$ 의 농도로 플레이팅할 수 있다. IL-2 (R&D 시스템; $10 \text{ ng}/\text{ml}$)를 $60 \text{ U}/50 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 농도로 웰에 가할 수 있다. 일반적으로 콘카나발린 A ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 양성 대조군으로 사용한다.
- <96> 예측되는 T 에피토프-수반 웨티드를 합성하고, $10 \text{ mg}/\text{ml}$ DMSO에 제공하여 4°C에서 저장한다. HPV-18 참조 웨티드를 양성 대조군으로 사용하고, 관련이 없는 웨티드를 음성 대조군으로 사용한다. 웨티드를 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 웰에 가하고, $5\% \text{ CO}_2$ 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다.
- <97> PBS 1X로 1회, PBS-트윈 0.05%로 5회에 걸쳐 세척한 후, 비오틴화된 항-마우스 IFNg (클론 XMG1.2, 파르미겐)를 $0.3 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{웰}$ 의 농도로 가하고, 천천히 교반하면서 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시킬 수 있다. 플레이트를 PBS-트윈 0.05%로 5회에 걸쳐 세척할 수 있다. PBS-트윈 0.05%-FCS 1%에 1/5000로 희석된 엑스트라비딘(Extravidin) AKP (미주리주 세이트루이스에 소재하는 시그마(Sigma)) 또한 웰 ($100 \mu\text{l}/\text{웰}$)에 첨가할 수 있다. 플레이트를 실온에서 45분 동안 인큐베이션시키고, PBS-트윈 0.05%로 5회에 걸쳐 세척할 수 있다. 바이오래드 키트를 사용하여 IFNg 분비를 나타낼 수 있다. $100 \mu\text{l}$ 기질 (NBT+BCIP)을 웰마다 첨가하고, 플레이트를 0.5시간 동안 실온에 방치할 수 있다. 플레이트를 물로 세척하고, 실온에서 밤새도록 건조시킬 수 있다. 엘리스포 판독기 바이오리더(Bioreader) 4000 Pro-X (BIOSYS-GmbH; 프랑스 세르라보 소재)를 사용하여 스포트을 계수할 수 있다.
- <98> HPV-18 참조 웨티드 존재하의 면역화된 비장세포 배양물은 IFNg 생산을 자극하는 반면, 비장세포 배양물에 비-교차-반응성 웨티드 (예로서, 관련이 없는 웨티드)를 첨가하는 것은 어떤 유의적인 효과를 미치지 못하는 것 (기준 수준 아래로 IFNg 생산)으로 예상된다. 비-HPV-18 웨티드가 면역화된 마우스의 CTL에 의해 인식될 때 교차-반응성이 입증되는데, 이는 HPV-18 E6 및/또는 E7 폴리웨티드 또는 발현 벡터 (예로서, MVATG HPV-18)로 백신화시키는 것 또한 기타 HPV 유전자형으로 감염을 치료하는데 효능이 있을 수 있음을 제안한다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

- <110> TRANSGENE S.A.
 <120> HPV-18-based papillomavirus vaccine
 <130> TG175
 <160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> artificial sequence <220> <223> non oncogenic variant of the HPV-18 E6 polypeptide

<400> 1

Met	Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Arg	Pro	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp
1				5				10					15		

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

Val	Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Phe	Ala
					35			40				45			

Phe	Lys	Asp	Leu	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala
			50			55					60				

Cys	His	Lys	Cys	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His
				65			70			75		80			

Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr
				85				90				95			

Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu
				100			105				110				

Leu	Arg	His	Leu	Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His
				115			120				125				

Tyr	Arg	Gly	Gln	Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg
				130			135				140				

Leu Gln Arg Arg Glu Thr Gln Val

145 150

<210> 2
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> artificial sequence <220> <223> non oncogenic variant of the HPV-18 E7 polypeptide

<400> 2

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu
 20 25 30

Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg
 35 40 45

Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu
 50 55 60

Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala
 65 70 75 80

Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys
 85 90 95

Ala Ser Gln Gln
 100

<210> 3
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> artificial sequence <220> <223> membrane-presented non oncogenic variant of HPV-18 E6 polypeptide

<400> 3

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr	Leu	Gln	Thr	Pro	Thr	Gly	Gln	Ile	His	Trp	Gly	Met	Ala	Arg	Phe
20															
															30

Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Arg	Pro	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Leu	Cys	Thr	Glu
35															45

Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr	Cys	Val	Tyr	Cys	Lys
50															60

Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Phe	Ala	Phe	Lys	Asp	Leu
65															80

Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala	Cys	His	Lys	Cys
85															95

Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser	Asp	Ser
100															110

Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Tyr	Asn
115															125

Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg	His	Leu
130															140

Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His	Tyr	Arg	Gly	Gln
145															160

Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Arg	Arg
165															175

Arg	Glu	Thr	Gln	Val	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Val	Tyr	Ile	Leu
180															190

Ile	Ala	Val	Cys	Leu	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Ile	Pro	Ala	Leu	Ile	Cys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

195

200

205

Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val Gly Met Ser
 210 215 220

Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val
 225 230 235 240

Arg Ser Leu

<210> 4

<211> 193

<212> PRT

<213> artificial sequence <220> <223> membrane-presented non oncogenic variant of HPV-18 E7 protein

<400> 4

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Met His Gly Pro Lys Ala Thr
 20 25 30

Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val
 35 40 45

Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val
 50 55 60

Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr
 65 70 75 80

Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val
 85 90 95

Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn

100 105 110

Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln Arg Ser Tyr
115 120 125

Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
130 135 140

Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His
145 150 155 160

Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly
165 170 175

Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
180 185 190

Leu