



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0106434
(43) 공개일자 2008년12월05일

(51) Int. Cl.

C07K 14/025 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7022553

(22) 출원일자 2008년09월16일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년09월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/003973

국제출원일자 2007년02월13일

(87) 국제공개번호 WO 2007/095320

국제공개일자 2007년08월23일

(30) 우선권주장

60/773,374 2006년02월13일 미국(US)

(71) 출원인

프라운호퍼 유에스에이, 인코포레이티드

미국 미시간주 48170 플리마우스 포트 스트리트
46025

(72) 발명자

유시보브, 비다디

미국, 펜실베이니아 19083, 하베르타운, 마노르 로드
1808

메트, 바딤

미국, 텔라웨이 19711, 네워크, 웬지우드 로드
115

(74) 대리인

강명구

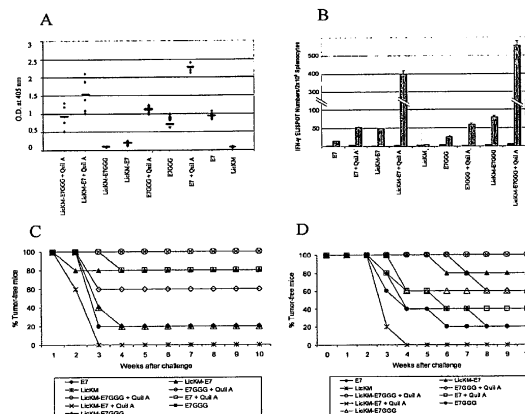
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) HPV 항원, 백신 조성물 및 관련된 방법

(57) 요약

본 발명은 면역학(immunology)과 단백질 가공(protein engineering) 분야의 교차, 특히, 인간 유두종 바이러스에 의한 감염의 예방에 유용한 항원과 백신에 관계한다. 또한, 이런 항원과 백신 조성물의 생산과 이용을 위한 재조합 단백질 항원, 조성물과 방법이 제시된다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분을 포함하는 분리된 항원에 있어서, 상기 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 2

청구항 1에 있어서, HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 3

청구항 1에 있어서, HPV 성분은 HPV 18로부터 E7로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 4

청구항 1에 있어서, HPV 성분은 SEQ ID NO.: 2 또는 SEQ ID NO.: 4로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리케나아제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 리케나아제에 대한 코딩 서열은 식물 내에서 단백질 발현을 위하여 최적화되는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 리케나아제 단백질 서열은 리케나아제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 또는 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 리케나아제에 융합된 HPV 성분은 N-말단 융합, C-말단 융합, 또는 표면 루프 삽입 융합 단백질 중에서 하나인 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 9

청구항 1에 있어서, HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 독립적으로 선택되는 최소한 2개의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 첫 번째 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7을 포함하고, 두 번째 HPV 성분은 HPV 18로부터 E7을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 11

열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항원을 포함하는 백신 조성물에 있어서,

상기 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터

E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함하고,

상기 조성물은 개체에 투여 이후에 면역 반응(immune response)을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7로 구성되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서, HPV 성분은 HPV 18로부터 E7로 구성되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 14

청구항 11에 있어서, HPV 성분은 SEQ ID NO.: 2 또는 SEQ ID NO.: 4로 구성되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 15

청구항 11에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리케나아제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 리케나아제에 대한 코딩 서열은 식물 내에서 단백질 발현을 위하여 최적화되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 리케나아제 단백질 서열은 리케나아제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 또는 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 리케나아제에 융합된 HPV 성분은 N-말단 융합, C-말단 융합, 또는 표면 루프 삽입 융합 단백질 중에서 하나인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 19

청구항 11에 있어서, HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 독립적으로 선택되는 최소한 2개의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 첫 번째 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7을 포함하고, 두 번째 HPV 성분은 HPV 18로부터 E7을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 항원.

청구항 21

청구항 11에 있어서, 두 번째 항원을 추가로 포함하고, 상기 조성물은 동물에 투여 이후에 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 22

청구항 11에 있어서, 두 번째 항원은 열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하고,

첫 번째 항원의 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서

선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함하고, 두 번째 항원의 HPV 성분은 HPV 16로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 선택되는, 첫 번째 항원과 상이한 최소한 하나의 도메인을 포함하고,

상기 조성물은 개체에 투여 이후에 면역 반응(immune response)을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 첫 번째 항원의 HPV 성분은 HPV 16로부터 E7, 또는 HPV 16로부터 E7의 단편에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함하고, 두 번째 항원의 HPV 성분은 HPV 18로부터 E7, 또는 HPV 18로부터 E7의 단편에서 선택되는, 첫 번째 항원과 상이한 최소한 하나의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 24

청구항 11에 있어서, 항원은 유전자도입 식물, 또는 상기 항원을 일시적으로 발현하는 식물에서 선택되는 식물 내에서 생산되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 25

청구항 11에 있어서, 식물 세포, 식물, 종자, 과일, 또는 이들의 추출물로부터 정제된, 부분적으로 정제된, 또는 정제되지 않은 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 26

청구항 11에 있어서, 백신 어쥬번트를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 어쥬번트는 명반, MF59, MALP2, 또는 사포닌을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 28

최소한 2개의 항원을 포함하는 백신 조성물에 있어서, 항원 각각은 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분을 포함하고, 이들 항원 중에서 최소한 하나는 열안정성 단백질을 더욱 포함하고, 상기 조성물 개체에 투여 이후에 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 최소한 2개의 항원은 HPV의 성분을 포함하고, 이들 각각은 HPV 16로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16로부터 E6의 단편, HPV 18로부터 E6의 단편, 또는 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 독립적으로 포함하고, 상기 조성물은 개체에 투여 이후에 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 30

개체 내에서 인간 유두종 바이러스(HPV) 감염에 대한 보호 면역 반응을 유도하는 방법에 있어서, 상기 방법은 효과량의 항-HPV 백신 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 투여는 항원 특이적인 항체의 생산을 촉진하거나 개체에 의한 세포 면역 반응을 촉진할 만큼 충분하고, 따라서 보호 면역 반응을 유도하고;

a. 상기 백신 조성물은 열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분을 포함하는 항원을 포함하고;

b. 상기 HPV 성분은 HPV 16로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 조성물은 경구, 비강내, 피하, 정맥내, 복강내, 또는 근육내 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 조성물은 식물 세포를 개체에 급식함으로써 경구 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

청구항 30에 있어서, 개체는 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분을 포함하는 항원 단백질을 생산하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 항원 성분을 인코딩하는 핵산 구조체를 제조하는 단계;
- a 단계의 핵산 구조체로 세포를 형질전환시키는 단계;
- 항원 단백질의 발현에 적합한 조건 하에 상기 세포를 배양하는 단계;
- 항원 단백질을 생산하는 단계;

여기서 상기 항원의 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함한다.

청구항 35

청구항 34에 있어서, HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

청구항 34에 있어서, HPV 성분은 HPV 18로부터 E7로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

청구항 34에 있어서, HPV 성분은 SEQ ID NO.: 1 또는 SEQ ID NO.: 3에서 선택되는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

청구항 34에 있어서, HPV 성분은 SEQ ID NO.: 2 또는 SEQ ID NO.: 4로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

청구항 34에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리케나아제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 리케나아제에 대한 코딩 서열은 식물 내에서 단백질 발현을 위하여 최적화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

청구항 39에 있어서, 리케나아제 단백질 서열은 리케나아제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 또는 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

청구항 39에 있어서, 리케나아제에 융합된 HPV 성분은 N-말단 융합, C-말단 융합, 또는 표면 루프 삽입 융합 단

백질 중에서 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

청구항 34에 있어서, HPV 성분은 최소한 2개의 도메인을 포함하고, 이들 각각은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, HPV 18로부터 E6의 단편, 또는 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 독립적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

청구항 34에 있어서, 항원 단백질의 발현은 바이러스 프로모터의 통제를 받는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

청구항 34에 있어서, 핵산 구조체는 벡터 핵산 서열을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 벡터는 이중 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

청구항 34에 있어서, 핵산 구조체는 바이러스 단백질을 인코딩하는 서열을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

청구항 34에 있어서, 세포는 식물 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 식물 세포는 알파파, 무, 겨자, 녹두, 브로콜리, 양갓냉이, 콩, 밀, 해바라기, 양배추, 토끼풀, 피튜니아, 토마토, 감자, 니코틴, 시금치, 또는 편두 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

청구항 48에 있어서, 항원 단백질은 클론 뿌리 세포 내에서 생산되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

청구항 48에 있어서, 항원 단백질은 싹튼 실생(seedlings) 내에서 생산되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

청구항 34에 있어서, 생산되는 부분적으로 정제된 또는 정제된 항원 단백질을 회수하는 단계가 더욱 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

열안정성 단백질에 융합된 인간 유두종 바이러스(HPV)의 성분을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 구조체에 있어서, 상기 HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, HPV 18로부터 E6의 단편, 또는 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 54

청구항 53에 있어서, HPV 성분은 HPV 16으로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, 또는 HPV 16으로부터 E6의 단편으로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 55

청구항 53에 있어서, HPV 성분은 HPV 18로부터 E7, HPV 18로부터 E6, HPV 18로부터 E7의 단편, 또는 HPV 18로부터 E6의 단편으로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 56

청구항 53에 있어서, HPV 성분은 SEQ ID NO.: 2 또는 SEQ ID NO.: 4로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 57

청구항 53에 있어서, 열안정성 단백질은 변형된 리케나아제 단백질 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 리케나아제에 대한 코딩 서열은 식물 내에서 단백질 발현을 위하여 최적화되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 59

청구항 57에 있어서, 리케나아제 단백질 서열은 리케나아제의 N-말단 도메인, C-말단 도메인, 또는 표면 루프 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 60

청구항 57에 있어서, 리케나아제에 융합된 HPV 성분은 N-말단 융합, C-말단 융합, 또는 표면 루프 삽입 융합 단백질 중에서 하나인 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 61

청구항 53에 있어서, HPV 성분은 최소한 2개의 도메인을 포함하고, 이들 각각은 HPV 16으로부터 E7, HPV 18로부터 E7, HPV 16으로부터 E6, HPV 18로부터 E6, HPV 16으로부터 E7의 단편, HPV 18로부터 E7의 단편, HPV 16으로부터 E6의 단편, HPV 18로부터 E6의 단편, 또는 이들의 조합에서 선택되는 최소한 하나의 도메인을 독립적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 62

청구항 53에 있어서, HPV 성분은 SEQ ID NO.: 1 또는 SEQ ID NO.: 3을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 63

청구항 53에 있어서, 벡터 핵산 서열을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 64

청구항 53에 있어서, 바이러스 프로모터 핵산 서열을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 65

청구항 63에 있어서, 벡터는 이중 벡터인 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 66

청구항 53에 있어서, 바이러스 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 구조체.

청구항 67

청구항 53의 핵산 구조체를 포함하는 세포.

청구항 68

청구항 67에 있어서, 식물 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 69

청구항 67에 있어서, 알파파, 무, 겨자, 녹두, 브로콜리, 양갓냉이, 콩, 밀 해바라기, 양배추, 토끼풀, 피튜니아, 토마토, 감자, 니코틴, 시금치, 또는 편두 세포에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 70

청구항 53의 핵산 구조체를 포함하는 식물에 있어서, 항원 단백질을 생산할수 있는 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 71

청구항 70에 있어서, 알파파, 무, 겨자, 녹두, 브로콜리, 양갓냉이, 콩, 밀 해바라기, 양배추, 토끼풀, 피튜니아, 토마토, 감자, 니코틴, 시금치, 또는 편두에서 선택되는 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 72

청구항 70에 있어서, 브라씨카(*Brassica*) 속, 니코티아나(*Nicotiana*) 속, 또는 피튜니아(*petunia*) 속에서 선택되는 속인 것을 특징으로 하는 식물.

명세서

기술분야

<1> 관련된 출원에 대한 교차 참조

<2> 본 출원은 35 USC 119(e) 하에, 2006년 2월 13일자 제출된 U.S.S.N. 60/773,374('374 출원)에 우선권을 주장한다; '374 출원의 전체 내용은 본 명세서에 참조로서 편입된다.

<3> 본 발명의 기술 분야

<4> 본 발명은 면역학(immunology)과 단백질 가공(protein engineering) 분야의 교차, 특히, 인간 유두종 바이러스에 의한 감염의 예방에 유용한 항원과 백신에 관계한다.

배경기술

<5> 자궁경부암(cervical cancer)은 전세계 여성에서 두 번째 빈번하게 발병하는 암이다. 검진(screening)은 선진국에서 상기 질환의 발병률을 극적으로 감소시키긴 했지만, 다수의 여성이 규칙적인 부인과 관리(gynecological care)와 검진(screening)을 받지 못하는 지역에서는 자궁경부암이 유방암에 이은 두 번째 암-관련된 사망 원인이다. 임상적, 분자와 역학 조사에서 자궁경부암과 자궁경부 이형성증(cervical dysplasia)의 주요 원인으로 인간 유두종 바이러스(HPV)가 확인되었다. 실질적으로, 모든 자궁경부암(대략 99%)이 고위험 HPV 유전자들, 가장 일반적인 유형 16, 18, 31과 45를 포함한다(Ferlay et al, 1999). 전세계적으로 여성 암(female cancer)의 대략 12%는 자궁경부의 HPV 감염에 기인한다. 매년, 대략 470,000 사례의 자궁경부암이 전세계적으로 진단되고, 이들 여성 환자 중에서 거의 절반이 사망한다. HPV 16은 자궁경부암의 대략 60%를 차지하고, HPV-18은 대략 10%-20%를 차지한다. 다른 고위험 유형에는 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68과 73 유형이 포함된다.

<6> 게다가, HPV는 두경부 부위의 특정 암종 및 더욱 치명적인 흑색종과 다른 암에서 일정한 역할을 수행한다(참조: Mellin et al, 2000, Internat. J. Cancer, 89:300; Zumbach et al, 2000, Internat. J. Cancer, 85:815; Dreau et al, 2000, Annals Surgery, 231 :664; Soini et al, 1996, Thorax, 51 :887).

<7> 자궁경부 이형성증의 기존 치료는 자궁경부 조직을 제거하거나 파괴하는 절제 또는 제거 절차에 한정된다. 이들 절차는 대략 90%의 효율(efficacy rate)을 갖지만 이병률(morbidity)과 비용에 연관된다. 부가적으로, 외과적 치료는 이형성 조직만을 제거하고, 정상적으로 보이는 HPV-감염된 조직이 치료되지 않고 남아 있게 된다(Bell et al, 2005). 이런 이유로, 백신을 이용하여 이러한 감염을 소멸시키는 것이 바람직하다. 청소년들이 HPV에 감염되기 이전에 이들의 예방적 백신접종은 이를 목표로 한다. 일부 예방적 백신이 현재 임상 시험 후기 단계에

들어가고 있는데, 결과가 긍정적이다. 감염과 암 사이에 긴 잠복 기간(latency period)으로 인하여, 암 발병률의 관점에서 예방적 백신 접종의 이점은 수십년후 가시화될 것이다. 하지만, 이미 감염된 개체 및 진전된 암으로 고통받는 환자는 치료적 백신 접종으로 혜택을 얻을 수 있다. HPV에 대하여 감염을 예방하고 및/또는 악성 질환을 치료하기 위한 백신 접종은 HPV-연관된 암으로부터 이병률과 치사율을 실질적으로 감소시킬 수 있다. 따라서, 저렴하고 다수의 사람들이 편의하게 구입할 수 있는, HPV에 대한 추가의 향상된 백신이 여전히 요구된다. 더 나아가, 기존의 병소와 악성 종양의 진행을 저해할 수 있고, 심지어 이들을 제거할 수 있는, HPV에 대한 치료 백신의 개발은 감염으로 고통받는 사람들에게 특히 유익할 것이다.

<8> 본 발명의 요약

<9> 본 발명에서는 식물 내에서 생산된 인간 유두종 바이러스(HPV) 백신과 백신 성분을 제시한다. 일부 구체예에서, 하나이상의 인간 유두종 바이러스 항원이 열안정성 단백질과의 융합 단백질로서 산출된다. 게다가, 본 발명에서는 HPV 항원을 포함하는 백신 조성물을 제시한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 HPV 백신은 최소한 2개의 상이한 HPV 항원을 포함한다. 더 나아가, 본 발명에서는 최소한 2개의 상이한 인간 유두종 바이러스(HPV) 항원을 포함하는 인간 유두종 바이러스(HPV) 백신을 제시한다. 대안으로 또는 부가적으로, 본 발명의 HPV 백신은 하나이상의 식물 성분을 포함한다. 또한, 본 발명의 항원과 백신 조성물의 생산과 이용을 위한 방법이 제시된다.

발명의 상세한 설명

<21> 본 발명은 HPV 감염에 대항하는 백신의 제조에 유용한 인간 유두종 바이러스(HPV) 항원 및 열안정성 단백질에 작동가능하게 연결된 이와 같은 HPV 항원을 포함하는 융합 단백질에 관계한다. 본 발명은 식물 시스템에서 생산이 포함되지만 이에 국한되지 않는, 제시된 항원의 생산 방법에 관계한다.

<22> 또한, 본 발명은 본 발명의 항원과 융합 단백질을 포함하는 벡터, 융합 단백질, 식물 세포, 식물과 백신 조성물에 관계한다. 또한, 본 발명은 개체 내에서 HPV 감염에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 본 발명의 백신 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

<23> HPV 항원

<24> 본 발명의 인간 유두종 바이러스(HPV) 항원 단백질에는 HPV 바이러스에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 면역원성 항원 단백질 또는 펩티드가 포함된다. 일반적으로, 목적하는 면역원성 단백질에는 HPV 항원(가령, E6 단백질, E7 단백질 등), 이의 면역원성 일부분 및/또는 이의 면역원성 변이체가 포함된다.

<25> 본 발명에 이용되는 HPV 항원에는 전장 HPV 단백질(가령, E6, E7 등), 또는 이런 단백질의 단편이 포함되는데, 여기서 이들 단편은 면역학적 활성 및/또는 전장 HPV 단백질 또는 단편을 포함하는 융합 단백질을 유지한다.

<26> 시험관내에서 세포의 형질전환에 관여하는 HPV 유전자는 E6 및/또는 E7을 인코딩하는 유전자이다(Bedell et al., 1987, J. Virol., 61 :3635). E6과 E7 단백질이 세포 형질전환을 유도하는 기전이 제안되었다(Park et al., 1995, Cancer, 76:1902 및 여기에 언급된 참고문헌). 바이러스 감염에 대한 면역보호 반응을 유도하는 능력에 기초하여, E7과 E6은 백신을 산출하는데 있어 일차적인 목적 항원이다. 면역보호의 효능을 향상시키기 위하여 다른 HPV 항원이 복합 백신의 생산에 유용할 수 있다.

<27> E6은 Zn-결합 도메인을 포함하는 소형(대략 15,000 MW) 폴리펩티드이다. 이의 형질전환 기능에 단서는 상기 단백질이 p53에 결합한다는 관찰 결과에 의해 제공되었다. p53 단백질은 세포 주기 진행 및 결과로써, 세포 성장과 분화를 부정적으로 조절하는 널리 공지된 종양 억제 단백질이다. p53에 E6의 결합은 후자 단백질의 유비퀴틴화(ubiquitination)와 궁극적인 변성(degradation)을 유발하는데, 이러한 과정은 "E6-연관된 단백질"이라고 하는 다른 세포 단백질을 필요로 한다. 결과적으로, E6을 발현하는 세포는 감소된 기저 수준의 p53을 보유하게 된다. p53 수준은 DNA 손상에 대한 반응에서 증가된다. 이런 증가된 수준은 사이클린-의존성 키나아제(cyclin-dependent kinase)의 저해물질인 p21의 강화된 발현을 유도하고, 상기 단백질은 세포 주기 정지(cell cycle arrest)를 매개한다. 이러한 기전은 손상/돌연변이의 확립을 유발하는 손상된 DNA의 복제에 앞서, 이러한 DNA가 회복될 수 있는 시간 창문(time window)을 세포에 제공한다. p53의 E6-매개된 강화된 반전은 이러한 기전이 작동하는 것을 예방한다. 최근에, E6이 p53의 변성을 가속화시킬 뿐만 아니라 더욱 직접적으로, p53이 DNA와 상호작용하는 것을 차단함으로써 세포 주기 조절에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다(Thomas et al., 1995, Oncogene, 10:261).

<28> HPV E7 종양단백질은 종양-특이적인 항원이고 악성 진행에 관여한다. E7은 단기간 존재하는 단백질인데, 이는 유비퀴틴-프로테아좀 경로(ubiquitin-proteasome pathway)에 의해 시험관내와 생체내 모두에서 변성된다

(Reinstein et al., 2000). E7 단백질은 망막아세포종(retinoblastoma) 유전자 산물 Rb에 결합할 수 있는 소형 (대략 10,000 Mw), Zn-결합 인단백질이다. Rb는 전사 인자(transcription factor) E2F에 결합하고 이를 불활성화시키는 종양 억제인자이다. 후자 인자는 티미딘 키나아제(thymidine kinase), c-myc, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase)와 DNA 중합효소 알파를 인코딩하는 것들을 비롯한 다수의 성장-관련된 유전자의 전사를 통제한다. Rb-E2F 복합체 형성은 세포 주기의 G0과 G1 단계에서 후자 유전자의 발현을 예방하고, 이들의 발현을 Rb-E2F가 분리되도록 예정되는 S 단계로 국한시키고, 활성 전사 인자 E2F를 유리시킨다. Rb-E7 복합체의 형성은 S-이전 단계의 단축, 다시 말하면, 세포 주기 진행의 가속화의 결과로써 Rb-E2F 복합체의 형성을 예방한다. 진핵 발현 시스템 내에서 다량의 서열-진성, 비-융합된 재조합 E7 단백질을 생산하는 시도는 이의 급속한 변성으로 인하여, 실질적으로 실패하였다(Fernando et al., 1999). 그럼에도 불구하고, 일부 E7-기초된 HPV-특이적 치료 백신이 현재, 임상 II기와 III기 시험 중에 있다. 예비 결과가 희망적이긴 하지만, 유효한 세포 매개된 면역(cell mediated immunity)을 자극할 수 있는 더욱 적절한 어쥬반트(adjuvant)와의 결합으로 추가적인 향상이 여전히 요구된다(Frazer, 2004).

<29> 이들 기전의 중요성에 대한 상관적인 증거는 고도의 종양발생 HPV 유형(가령, HPV 16과 18)으로부터 E6 단백질이 비-종양발생 유형으로부터 상응하는 단백질보다 p53에 대하여 더욱 높은 친화성(affinity)을 갖는다는 관찰 및 고도의 종양발생 유형으로부터 E7 단백질이 비-종양발생 유형으로부터 상응하는 단백질보다 Rb에 대하여 더욱 높은 친화성을 갖는다는 관찰 결과에 의해 제공된다. 따라서, E6과 E7은 선택적인 백신과 항-암 요법의 개발을 위한 가장 중요한 표적이다.

<30> 따라서, 본 발명에서는 이질성 단백질(가령, HPV 항원)을 발현하는 식물 세포 및/또는 식물을 제시한다. 본 발명의 이질성 단백질은 E6, E7, E6의 일부분 및/또는 E7의 일부분이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 임의의 HPV 목적 항원일 수 있다. 한 가지 아류형(subtype)의 E7과 변형된 E7에 대한 전장 핵산과 단백질 서열은 SEQ ID NO.: 1, SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 3과 SEQ ID NO.: 4에 제공된다.

<31> 전형적인 HPV 항원의 서열이 본 명세서에서 제공되긴 하지만, 다양한 HPV 균주와 아류형에 대한 추가적인 E6과 E7 서열이 당분야에 공지되어 있고, 예로써, GenBank와 같은 데이터베이스에서 확인될 수 있다. E6과 E7 각각에 대한 활성과 도메인 역시 당분야에 공지되어 있다. 따라서, E6 및/또는 E7의 도메인의 면역원성 특성을 갖는 임의의 서열이 대안으로 이용될 수 있다. 당업자는 제시된 항원에 최소한 75%, 80%, 85%, 또는 90% 또는 그 이상의 동일성(identity)을 갖는 서열을 편의하게 산출할 수 있을 것이다. 특정 구체예에서, HPV 항원의 항원 서열에는 서열에 최소한 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 그 이상의 동일성을 갖는 서열, 또는 이의 일부분이 포함되는데, 여기서 상기 항원 단백질은 면역원성 활성을 유지한다. 가령, 면역원성 특성을 유지하는 HPV 항원에 충분한 동일성을 갖는 서열은 본 명세서에 제시된 도메인(항원)과 반응하는 항체와 결합할 수 있다. 면역원성 특성에는 종종, 관련된 아미노산 또는 측기(side group)의 3차원적 제시(three dimensional presentation)가 포함된다. 당업자는 서열 내에서 적당한 차이(가령, 면역원성 특성을 여전히 보존하는, 경계 영역에서 차이 및/또는 일부 서열 대안)를 갖는 서열을 편의하게 확인할 수 있다. 가령, 지정된 아미노산 서열의 한쪽 말단에서 본 명세서에 지정된 도메인 경계 영역에 경계 영역이 근접하는(가령, 대략 15개 아미노산, 14개 아미노산, 13개 아미노산, 12개 아미노산, 11개 아미노산, 10개 아미노산, 9개 아미노산, 8개 아미노산, 7개 아미노산, 6개 아미노산, 5개 아미노산, 4개 아미노산, 3개 아미노산, 2개 아미노산, 또는 1개 아미노산 이내) 서열은 본 발명에서 관련된 도메인을 포함하는 것으로 간주된다. 따라서, 본 발명에서는 이러한 도메인 지정에 근접하는 잔기를 포함하는 HPV 항원 서열의 이용을 계획한다. 가령, E7의 도메인은 본 발명의 항원으로서 인-프레임(in-frame) 융합 단백질로 가공되고 발현된다(실시에 참조). 더 나아가, 당업자가 인지하는 바와 같이, 면역원성인 HPV 항원(가령, E6, E7)의 아미노산 서열의 임의의 도메인, 부분 도메인, 또는 영역이 본 명세서에 제시된 구조체와 방법을 이용하여 산출될 수 있다. 또한, 도메인 또는 하위도메인(subdomain)은 HPV 항원의 생산을 위하여 독립적으로 및/또는 구조적으로 통합될 수 있다.

<32> 열안정성 단백질과의 항원 융합

<33> 본 발명의 특정 측면에서, 열안정성 단백질에 작동가능하게 연결된 HPV 항원(또는 이의 단편 또는 변이체)을 포함하는 융합 폴리펩티드가 제시된다. 본 발명의 융합 폴리펩티드는 당분야에 공지된 임의의 가용한 발현 시스템 내에서 생산될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은 식물 또는 이의 일부분(가령, 식물, 식물 세포, 뿌리, 새싹 등)에서 생산된다.

<34> 인간 또는 동물 세포에서 자연적으로 발견되지 않은 효소 또는 다른 단백질이 본 발명의 융합 폴리펩티드에 이용하기 특히 적합하다. 융합되면 융합 산물에 열안정성(thermostability)을 공여하는 열안정성 단백질이 유용하

다. 열안정성은 생산된 단백질이 실온에서 형태를 유지할 수 있도록 한다. 이러한 특징(feature)은 융합 폴리펩티드의 간편하고 시간과 비용 효율적인 회수를 용이하게 한다. 본 발명에 유용한 대표적인 열안정성 효소 집단은 글루카노하이드롤라아제(glucanohydrolase) 집단이다. 이들 효소는 혼성 연결된 폴리사카라이드 내에서 1,3-β 연쇄에 인접하는 1,4-β 글리코시드 결합(glucosidic bond)을 특이적으로 절단한다(Hahn et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:10417). 상기 효소는 귀리와 보리와 같은 곡물에서 발견되고, 또한 클로스트리듐 써모셀룸(*Clostridium thermocellum*)을 비롯한 다수의 진균과 세균 종류에서 발견된다(Goldenkova et al., 2002, Mol. Biol., 36:698). 따라서, 본 발명의 융합 폴리펩티드에 이용되는 전형적인 열안정성 단백질에는 글리코시다아제(glycosidase) 효소가 포함된다; 전형적인 열안정성 글리코시다아제 단백질에는 P29716, P37073, P45798, P38645; P40942; P14002; 033830, 043097, P54583, P14288, 052629, P29094, P49067, JC7532, Q60037, P33558, P05117, P04954, Q4J929, 033833, P49425, P06279, P45703, P45702, P40943, P09961, Q60042, AAN05438, AAN05437, AAN05440, AAN05439, 또는 AAD43138에서 선택되는 GenBank 수탁 번호로 대표되는 것들이 포함된다. 본 발명의 융합 단백질에 이용되는 리케나아제 효소에는 클로스트리듐 써모셀룸(*Clostridium thermocellum*) P29716, 브레비바실러스 브레비스(*Brevibacillus brevis*) P37073과 로도테르무스 마리누스(*Rhodothermus marinus*) P45798이 포함되는데, 이들 각각은 그들의 GenBank 수탁 번호를 인용하여 본 명세서에 편입된다. 실시예에 예시된 대표적인 융합 단백질은 클로스트리듐 써모셀룸(*Clostridium thermocellum*)으로부터 분리된 변형된 리케나아제를 이용하지만, 임의의 열안정성 단백질이 본 발명에 따라 유사하게 이용될 수 있다.

<35> 본 발명에 따른 융합 단백질과 폴리펩티드를 설계할 때, 항원의 면역원성을 보존하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 특정 측면에서, 융합 단백질의 열안정성을 제공하는 구조체를 제공하는 것이 바람직하다. 이러한 특징은 표적 항원의 간편하고 시간과 비용 효율적인 회수를 용이하게 한다. 특정 측면에서, 면역원성의 강화, 복수의 백신 결정부위를 통합하는 잠재력 등을 비롯한 부가적인 이점을 제공하는 항원 융합 파트너가 선택된다. 이들 시스템 중에서 2개는 클론 뿌리와 클론 식물 시스템 및 이들의 유도체의 생산과 싹튼 실생 시스템의 생산이다.

<36> 클론 식물

<37> 클론 뿌리는 연장된 기간과 복수의 계대배양(subculture) 동안, RNA 바이러스 발현 벡터를 유지하고 전체 뿌리에서 표적 단백질을 균일하게 안정적으로 생산한다. 표적 유전자가 세포-세포 또는 장거리 이동 동안 재조합(recombination)을 통하여 제거된 식물과 대조적으로, 뿌리 배양액 내에서 바이러스 벡터의 완전성(integrity)이 유지되고 시간의 흐름에서 생산된 표적 단백질의 수준이 최초 심사(screening) 동안 관찰되는 것들과 유사하다. 클론 뿌리는 항원과 백신 조성물의 경구 제제(oral formulation)를 위한 재료의 생산을 용이하게 한다. 항원(가령, 본 발명의 항원 단백질)의 생산에 유용한 식물로부터 유래된 다양한 클론 실체(entity)를 산출하기 위한 방법과 반응물은 기존 문헌에서 보고되었고 당분야에 공지되어 있다(참조: PCT Publication WO 05/81905). 클론 실체에는 항원(가령, 본 발명의 항원 단백질)을 생산할 수 있는 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인과 클론 식물이 포함된다. 본 발명에서는 또한, 다양한 식물 조직(가령, 뿌리, 잎)으로부터 유래된 클론 세포 라인 및 단일 세포로부터 유래된 완전 식물(클론 식물) 내에서 항원 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드 산물의 발현을 위한 방법과 반응물을 제시한다. 이들 방법은 전형적으로, 다양한 유형의 식물 바이러스 벡터의 이용에 기초한다.

<38> 가령, 한 측면에서, 본 발명에서는 아래의 단계를 포함하는, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 뿌리 라인을 획득하는 방법을 제시한다: (i) 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 식물 또는 이의 일부분 내로 도입하는 단계; (ii) 상기 식물로부터 하나 이상의 클론 뿌리 라인을 산출하는 단계. 클론 뿌리 라인은 예로써, 모상근(hairy root)의 형성을 유도하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)(가령, *A. rhizogenes*)로 식물 또는 식물 일부분(가령, 잎의 수확된 조각)을 감염시킴으로서 산출된다. 클론 뿌리 라인은 바이러스를 유지하는 라인, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 높은 수준으로 발현하는 라인 등을 확인하는 다양한 방법으로 심사될 수 있다. 본 발명에서는 또한, 클론 뿌리 라인, 예를 들면, 본 발명의 방법에 따라 생산된 클론 뿌리 라인을 제시하고, 이러한 클론 뿌리 라인을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 발현하고 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제시한다.

<39> 본 발명에서는 아래의 단계를 포함하는, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 뿌리 세포 라인을 산출하는 방법을 제시한다: (i) 클론 뿌리 라인을 산출하는 단계, 상기 뿌리 라인의 세포는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 게놈 내에 포함되는 바이러스 벡터를 포함하고; (ii) 상기 클론 뿌리 라인으로부터 개별 세포를 방출하는 단계; (iii) 뿌리 세포 증식에 적합한 조건 하에 이들 세포를 유지하는

단계. 본 발명에서는 클론 뿌리 세포 라인을 이용하여 폴리뉴클레오티드를 발현하고 폴리펩티드를 생산하는 클론 뿌리 세포 라인과 방법을 제시한다.

<40> 일부 구체예에서, 본 발명에서는 아래의 단계를 포함하는, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 식물 세포 라인을 산출하는 방법을 제시한다: (i) 클론 뿌리 라인을 산출하는 단계, 상기 뿌리 라인의 세포는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 게놈 내에 포함되는 바이러스 벡터를 포함하고; (ii) 상기 클론 뿌리 라인으로부터 개별 세포를 방출하는 단계; (iii) 식물 세포 증식에 적합한 조건 하에 배양액에 이들 세포를 유지하는 단계. 본 발명에서는 아래의 단계를 포함하는, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 식물 세포 라인을 산출하는 방법을 제시한다: (i) 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 배양액에 유지된 식물 세포 라인의 세포 내로 도입하는 단계; (ii) 상기 바이러스 벡터를 포함하는 세포를 농축하는 단계. 농축(enrichment)은 예로써, (i) 배양액으로부터 세포의 일부분을 이전하고; (ii) 이전된 세포를 회석하여 세포 농도를 감소시키고; (iii) 회석된 세포를 증식시키고; (iv) 바이러스 벡터를 포함하는 세포를 심사함으로써 수행된다. 클론 식물 세포 라인은 본 발명에 따른 HPV 항원의 생산에 이용될 수 있다.

<41> 본 발명에서는 클론 식물을 산출하는 다수의 방법을 포함하는데, 이들 식물의 세포는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 포함한다. 가령, 본 발명에서는 아래의 단계를 포함하는, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 식물을 산출하는 방법을 제시한다: (i) 클론 뿌리 라인을 산출하는 단계, 상기 뿌리 라인의 세포는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 게놈 내에 포함되는 바이러스 벡터를 포함하고; (ii) 상기 클론 뿌리 라인으로부터 개별 세포를 방출하는 단계; (iii) 식물 형성에 적합한 조건 하에 이들 방출된 세포를 유지하는 단계. 본 발명에서는 또한, 아래의 단계를 포함하는, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 식물을 산출하는 방법을 제시한다: (i) 클론 식물 세포 라인을 산출하는 단계, 상기 세포 라인의 세포는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 게놈 내에 포함되는 바이러스 벡터를 포함하고; (ii) 식물 형성에 적합한 조건 하에 이들 세포를 유지하는 단계. 일반적으로, 본 발명에 따른 클론 식물은 본 발명의 항원을 인코딩하는 임의의 폴리뉴클레오티드를 발현할 수 있다. 이런 클론 식물은 항원 폴리펩티드의 생산에 이용될 수 있다.

<42> 앞서 기술된 것과 같이, 본 발명은 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인(가령, 잎, 줄기 등으로부터 유도된 세포 라인), 클론 식물에서 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 시스템을 제시한다. 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된(즉, 프로모터의 통제 하에) 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 게놈에 포함된 식물 바이러스 벡터를 이용하여 선조(ancestral) 식물 세포로 도입된다. 클론 뿌리 라인 또는 클론 식물 세포 라인은 하기에 더욱 기술된 여러 기술 중 하나에 따라 바이러스를 포함하는 세포에서 확립한다. 식물 바이러스 벡터 또는 이의 일부분은 감염, 바이러스 전사체 또는 감염성 cDNA 클론으로 집중, 전기 천공, 또는 T-DNA 매개 유전자 전달에 의해 식물 세포 내로 도입될 수 있다.

<43> 아래에서는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인, 클론 식물을 생성하는 방법을 설명한다. "뿌리 라인(root line)"은 "뿌리 세포 라인(root cell line)"과 구별되는데, 뿌리 라인은 실질적인 뿌리-유사 구조 또는 뿌리를 생산하지만, 뿌리 세포 라인은 뿌리-유사 구조를 형성하지 않은 뿌리 세포로 구성된다. "라인(line)"은 이러한 라인의 세포가 증식하고 유전자 정보를 자손 세포에 전달할 수 있음을 지시하는 의도로 이용된다. 세포 라인의 세포는 전형적으로, 고유(intact) 식물에서 볼 수 있는 것과 같은 조직화된 구조의 일부가 없는 배양액에서 증식한다. "뿌리 라인(root line)"은 뿌리 구조에서 세포가 완전한 식물의 일부분 없이 증식할 수 있음을 지시하는 의도로 이용된다. "식물 세포"에는 뿌리 세포가 포함된다. 하지만, 비-뿌리 조직으로부터 직접적으로 식물 세포 라인을 생성하는데 이용된 방법들로부터 뿌리 라인과 뿌리 세포 라인을 생성하기 위한 본 발명의 방법을 구별하기 위해(클론 뿌리 라인 또는 클론 뿌리 라인에서 유래된 클론 식물로부터 클론 식물 세포 라인을 생성하는 것에 대조적으로), 본 명세서에서 "식물 세포"와 "식물 세포 라인"은 일반적으로, 비-뿌리 식물 조직으로 구성된 세포와 세포 라인을 지칭한다. 가령, 식물 세포는 잎, 줄기, 새싹(shoot), 꽃 부분이 될 수 있다. 본 명세서에서 유도된 것과 같이 생성된 클론 식물로부터 종자가 유도될 수 있다. 이와 같은 종자에는 이들 종자에서 수득된 식물처럼 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 종근(seed stock)을 수득하는 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: U.S Patent Publication 2004/093643).

<44> 클론 뿌리 라인

- <45> 본 발명은 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 감독하는데 식물 바이러스 벡터가 이용되는, 클론 뿌리 라인을 생성하는 시스템을 제시한다. 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 또는 이상의 바이러스 발현 벡터는 다양한 공지의 방법 중에서 한 가지에 따라 식물 또는 이의 일부분으로 도입된다. 가령, 식물 잎에 바이러스 전사체를 접촉할 수 있다. 벡터 자체가 식물에 직접 제공될 수도 있다(가령, 마찰성 접촉, 기계적 분무 접촉, 진공 침윤, 입자 폭발 또는 전기 천공을 통하여). 대안으로 또는 부가적으로, 공지 기술에 따라 비리온(가령, 이미 감염된 식물로부터)을 생성하거나 다른 식물에 적용할 수 있다.
- <46> 바이러스 계놈을 식물에 직접 사용하여 감염을 달성하는 경우에, 임의의 가용한 기술을 이용하여 계놈을 준비한다. 가령, 본 발명에 따라 유용하게 이용되는 많은 바이러스들은 ssRNA 계놈을 가진다. ssRNA는 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 계놈의 DNA 사본의 전사, 또는 RNA 사본의 복제에 의해 만들 수 있다. 사용하기 간편한 *in vitro* 전사 시스템(가령, SP6, T7, 레티쿨로사이트 용해질 등)의 용이한 이용가능성 및 RNA 벡터의 DNA 사본 유지의 편의성을 고려할 때, 본 발명의 ssRNA 벡터는 *in vitro* 전사, 특히 T7 또는 SP6 중합효소를 이용한 전사에 의해 만들어진다. 감염성 cDNA 클론이 이용될 수 있다. 아그로박테리아 매개된 유전자 전이를 이용하여 바이러스 벡터와 같은 바이러스 핵산(전체 바이러스 계놈 또는 이의 일부분)을 당분야에 공지된 방법에 따라, 진공침윤(agroinfiltration)을 이용하여 식물 세포로 전달할 수 있다.
- <47> 이후, 식물 또는 식물 일부분은 바이러스 전사체의 복제에 적합한 조건하에 유지시킨다(배양 또는 생장). 본 발명의 특정 구체예에서, 바이러스는 세포 간에 국소적으로 및/또는 처음 접촉된 잎에서 다른 잎으로 전신적으로, 초기 접촉된 세포를 벗어나 전파된다. 하지만, 본 발명의 일부 구체예에서, 바이러스는 전파되지 않는다. 따라서, 바이러스 벡터는 기능적 MP 및/또는 CP를 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있지만 이들 유전자 중에서 한쪽 또는 양쪽이 부재할 수도 있다. 일반적으로, 바이러스 벡터는 식물 또는 식물 일부분에서 다중 세포 내로 도입된다.
- <48> 식물로 바이러스 벡터를 도입한 이후에, 잎을 수확한다. 일반적으로, 잎은 바이러스 벡터를 도입한 이후 임의의 시점에 수확될 수 있다. 하지만, 바이러스 벡터를 식물로 도입한 이후 일정 시간 동안, 예를 들면, 바이러스 복제 및 임의적으로, 바이러스가 최초 도입된 세포로부터 전파될 만큼 충분한 시간 동안 식물을 유지하는 것이 바람직하다. 예로써, 하기에서 설명하는 공지의 방법을 이용하여 클론 뿌리 배양액(또는 다중 배양액)을 준비한다.
- <49> 일반적으로, 임의의 가용한 방법을 이용하여 바이러스 벡터가 도입된 식물 또는 식물 조직으로부터 클론 뿌리 배양액을 준비할 수 있다. 이와 같은 방법에는 특정 세균 플라스미드에 존재하는 유전자가 이용된다. 이들 플라스미드는 다양한 생물체를 감염시키고 DNA를 전달하는 다양한 종류의 아그로박테리움(*Agrobacterium*)에서 발견된다. 속(genus)으로써, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)은 쌍떡잎식물과 외떡잎식물 중 및 겉씨식물을 비롯한 크고 다양한 식물 유형으로 DNA를 전달할 수 있다(참조: Gelvin, 2003, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67:16). 식물 세포의 유전적 형질전환의 분자 근간은 세균으로부터 전달 및 다양한 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 중에 내재하는 거대 종양 유도성(Ti) 또는 뿌리를 내는(rhizogenic) 플라스미드의 식물 핵 계놈으로 융합이다. 이러한 영역은 플라스미드에 존재하는 경우에 T-영역으로 지칭되고, 플라스미드로부터 절제된 경우에 T-DNA로 지칭된다. 일반적으로, 단일 가닥 T-DNA 분자는 자연 발생적 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 감염으로 식물 세포로 전달되며 궁극적으로 계놈으로 융합(이중 가닥 형태로)된다. Ti 플라스미드에 기초한 시스템은 식물로 외부 유전자 물질을 도입하고 유전자도입 식물을 생산하는데 널리 이용된다.
- <50> 다양한 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 종으로 식물의 감염 및 T-DNA 전달은 많은 효과를 가진다. 가령, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*A. tumefaciens*)는 근두암종병(crown gall disease)의 원인이 되며, 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*)는 감염 부위에 "모근병(hairy root disease)"으로 알려진 모상근(hairy root) 발생의 원인이 된다. 각 뿌리는 단일한 유전학적으로 형질전환된 세포에서 생성된다. 따라서, 뿌리 내에서 뿌리 세포는 클론이며, 각 뿌리는 세포의 클론 집단이 된다. 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*) 감염에 의해 생성된 뿌리는 높은 생장률과 유전적 안정성을 특징으로 한다(Giri et al, 2000, Biotech. Adv., 18:1 및 여기에 인용된 참고문헌). 또한, 이와 같은 뿌리는 유전적으로 안정한 식물을 재생할 수 있다(Giri 2000, supra).
- <51> 일반적으로, 본 발명에는 식물 세포로부터 뿌리 형성을 유도할 수 있는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)의 임의의 균주(가령, 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*) 균주)를 이용하는 것이 포함된다. 상기에서 언급한 것과 같이, Ri 플라스미드(Ri T-DNA)의 일부분은 모근병을 유발하는 원인이 된다. Ri 플라스미드의 이러한 일부분을 식물 세포로 전달하는 것은 Ri 플라스미드를 보유하는 아그로박테리움으로 감염시켜 편리하게 달성될 수

있긴 하지만, 본 발명에는 식물 세포로 관련 부분을 도입하는 여러 다른 방법을 이용하는 것도 포함된다. 이와 같은 방법에는 식물 세포로 유전 물질을 도입하는 임의의 가용한 방법이 포함되는데, 여기에는 유전자총(biolistics), 전기천공(electroporation), PEG-매개된 DNA 취입, Ti-계 벡터 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. Ri T-DNA의 관련 부분은 바이러스 벡터를 이용하여 식물 세포로 도입할 수 있다. Ri 유전자는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 동일한 벡터에 포함되거나 상이한 바이러스 벡터에 포함될 수 있는데, 이때 상기 벡터는 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터와 동일한 또는 상이한 타입이 될 수 있다. 모상근을 생성하는데 전체 Ri T-DNA가 필요하지 않을 수 있으며, Ri-T-DNA의 일부분에 당분야에 공지된 것과 같이 뿌리 형성을 유도하는 충분한 유전 물질이 포함되는 경우에 본 발명은 Ri-T-DNA의 일부분의 이용을 포함한다. 추가 유전 물질, 예를 들면, Ri 플라스미드 내에 존재하지만 T-DNA 내에 존재하지 않는 유전자, 특히 발현 산물이 식물 세포 DNA로 T-DNA의 통합을 용이하게 하는 유전자가 본 발명에 따른 식물 세포로 전달될 수 있다.

<52> 본 발명의 특정 구체예에 따라 클론 뿌리 라인을 준비하기 위하여, 수확된 잎 부분을 감염과 형질전환에 적절한 조건하에 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*)와 접촉시킨다. 잎 부분은 배양액에 유지시켜 모상근의 발생을 유도한다. 각 뿌리는 클론이다, 다시 말하면, 뿌리 내에 세포는 Ri T-DNA가 전달된 단일 선조 세포로부터 유도된다. 본 발명에 따르면, 이와 같은 선조 세포의 일부는 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 따라서, 이와 같은 선조 세포로부터 유도된 뿌리 내에 세포는 바이러스 벡터가 복제하고 세포 분열 동안 전이되기 때문에, 이러한 바이러스 벡터를 포함하게 될 것이다. 따라서, 높은 비율(가령, 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%)의 세포, 모든(100%) 세포, 또는 실질적으로 모든(최소 98%) 세포가 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 바이러스 벡터가 클론 뿌리 내에 자녀 세포에 의해 유전되기 때문에, 뿌리 내에서 상기 바이러스 벡터의 이동이 이러한 바이러스 벡터를 뿌리를 통하여 유지시키는데 반드시 필요한 것은 아니다. 개별 클론 모상근은 잎 부분으로부터 떼어내어 추가 배양할 수 있다. 이와 같은 뿌리는 뿌리 라인으로 지칭된다. 분리된 클론 뿌리는 분리 이후에 성장을 계속한다.

<53> 본 발명의 방법을 이용하여 다양한 상이한 클론 뿌리 라인을 생성하였다. 뿌리 라인은 본 발명의 항원을 인코딩하는(가령, 면역원성 펩티드를 인코딩하는) 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 이용하여 생성하였다. 뿌리 라인은 웨스턴 블랏으로 검사하였다. 뿌리 라인은 다양한 폴리펩티드의 상이한 발현 수준을 나타냈다. 높은 발현을 보여주는 뿌리 라인은 선택하고 추가 배양하였다. 이들 뿌리 라인은 차후에 다시 검사하였는데, 안정성을 지시하는 상당 시간 동안 높은 발현 수준을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 발현 수준은 클론 뿌리 라인을 생성하는데 이용된 동일한 바이러스 벡터로 감염된 고유 식물에서 발현에 필적하거나 그 이상이었다. 또한, 뿌리 라인의 발현 안정성은 동일한 바이러스 벡터로 감염된 식물에서 수득한 것 이상이었다. 이와 같은 바이러스 감염된 식물의 최대 80%는 2-3회 계대후에 야생형으로 복귀되었다(이와 같은 계대는 전사체를 식물에 접종하고, 감염(국소 또는 전신)이 확립되도록 하고, 잎 샘플을 채취하고, 발현에 대하여 차후에 검사되는 새로운 식물에 접종하는 과정과 연관된다).

<54> 뿌리 라인은 하기에서 설명하는 바와 같이 본 발명의 펩티드의 항원을 생산하기 위하여 대규모로 배양될 수 있다. 클론 뿌리 라인(및 클론 뿌리 라인에서 유도된 세포 라인)은 뿌리와 식물 세포의 배양에 전형적으로 이용되는 다양한 화합물, 예를 들면, 옥신, 사이코키닌 등과 같은 식물 성장 호르몬을 포함하지 않은 배지에 유지될 수 있다. 이와 같은 특징은 조직 배양과 연관된 비용을 상당히 감소시키는데, 본 발명자는 이러한 특징이 식물을 이용한 단백질 생산의 경제적 가능성에 상당히 기여할 것으로 기대한다.

<55> 다양한 임의의 방법을 이용하여 본 발명의 HPV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 뿌리를 선택할 수 있다. 웨스턴 블랏, ELISA 검사 등을 이용하여 인코딩된 폴리펩티드를 감지할 수 있다. GFP와 같은 탐지가능 마커의 경우에, 비주얼 스크린과 같은 대안법이 수행될 수 있다. 선택가능 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 이용하면, 적절한 선택이 강제될 수 있다(가령, 잎 물질 및/또는 이로부터 유도된 뿌리는 적절한 항생제 또는 영양 조건하에서 배양하고, 생존하는 뿌리를 확인하고 분리할 수 있다). 특정 바이러스 벡터는 본 발명의 항원을 인코딩하는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 상이한 폴리펩티드를 인코딩하는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이들 중에서 하나가 선택가능 또는 감지가능 마커인 경우에, 마커의 발현을 선택하거나 탐지함으로써 선택되거나 탐지되는 클론 뿌리는 제2 폴리뉴클레오티드 역시 발현할 가능성이 높다. 특정 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뿌리 라인의 스크리닝은 PCR 및 다른 핵산 탐지 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

<56> 대안으로 또는 부가적으로, 클론 뿌리 라인은 바이러스 감염 결과로 국소 병소를 형성하는 숙주 식물(가령, 과민성 숙주 식물)의 접종에 의해 바이러스 존재에 대해 조사할 수 있다. 가령, 뿌리 조직 5 mg을 50 μ l 인산염

완충액에서 균질화시키고, 이를 이용하여 담배 식물의 단일 잎에 접종할 수 있다. 바이러스가 뿌리 배양액에 존재하는 경우에, 2 내지 3일 이내에 특징적인 병소가 감염된 잎에 나타날 것이다. 이는 뿌리 라인이 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(표적 유전자)를 운반하는 재조합 바이러스를 포함한다는 것을 의미한다. 국소 병소가 형성되지 않으면, 바이러스는 없는 것이고, 이러한 뿌리 라인은 네가티브로 거절된다. 상기 방법은 시간과 비용 측면에서 효율적이다. 바이러스 존재에 대해 초기 스크리닝 이후에, 바이러스를 포함하는 뿌리는 예로써, 높은 발현체를 선택하기 위하여 웨스턴 블랏 또는 ELISA에 의한 2차 스크리닝을 받을 수도 있다. 추가 스크리닝, 예를 들면, 신속한 생장, 특정 매체에서 생장 또는 특정 환경 조건하에서 생장 등에 대한 스크리닝이 적용될 수 있다. 이와 같은 스크리닝 방법은 일반적으로, 본 명세서에 기술된 임의의 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인, 클론 식물 세포 라인 및/또는 클론 식물의 발생에 이용될 수 있다.

<57> 당업자에게 명백한 것과 같이, 바이러스 벡터를 포함하는 클론 뿌리 라인을 생성하기 위한 본 발명의 방법에 관한 설명에 다양한 변형이 가능할 수 있다. 이와 같은 변형은 본 발명의 범주 내에 속한다. 가령, Ri T-DNA 유전자의 도입에 앞서 고유 식물 또는 이의 일부분으로 바이러스 벡터를 도입하는 것이 일반적으로 바람직하긴 하지만, 본 발명의 특정 구체예에서, Ri-DNA는 바이러스 벡터 도입 이전에 도입된다. 또한, 일 부분을 수확하여 세균에 노출시키는 것보다는 고유 식물을 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*)에 접촉시키는 것도 가능하다.

<58> 바이러스 벡터를 보유하는 식물 또는 식물의 일부분의 단일 세포로부터 클론 뿌리 라인을 생성하는 다른 방법(가령, Ri 플라스미드로부터 유전 물질 또는 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*)를 이용하지 않는 방법)이 이용될 수 있다. 가령, 특정 식물 호르몬 또는 식물 호르몬 복합물로 처리는 식물 조직으로부터 뿌리를 생성시키는 것으로 알려져 있다.

<59> 클론 뿌리 라인으로부터 유도된 클론 세포 라인

<60> 앞서 기술된 바와 같이, 본 발명은 클론 뿌리 라인을 생성하는 방법을 제공하는데, 이때 뿌리 라인의 세포에는 바이러스 벡터를 포함한다. 당분야에 공지된 바와 같이, 다양한 상이한 세포 라인이 뿌리로부터 생성될 수 있다. 가령, 뿌리 세포 라인은 다양한 공지의 방법을 이용하여 뿌리로부터 수득된 개별 뿌리 세포로부터 생성될 수 있다. 이와 같은 뿌리 세포 라인은 뿌리 내에 다양하고 상이한 뿌리 세포 타입으로부터 수득될 수도 있다. 일반적으로, 뿌리 물질은 수확하여 분리하여(가령, 물리적으로 및/또는 효소적으로 분해) 개별 뿌리 세포를 방출시키고, 이들 세포는 추가로 배양한다. 완전한 원형질체(protoplast)를 형성할 필요는 없다. 원하는 경우, 단일 뿌리 세포로부터 뿌리 세포 라인을 얻기 위해, 뿌리 세포를 매우 희석된 세포 농도로 도말할 수 있다. 이와 같은 방식으로 유도된 뿌리 세포 라인은 바이러스 벡터를 포함하는 클론 뿌리 세포 라인이다. 이와 같은 뿌리 세포 라인은 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 안정적인 발현을 나타낸다. 클론 식물 세포 라인은 예로써, 적절한 식물 호르몬 존재하에 분리된 뿌리 세포를 배양함으로써 클론 뿌리로부터 유사한 방식으로 수득할 수 있다. 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 높은 수준으로 발현하는 세포 라인을 확인하기 위해 스크리닝 및 연속 라운드(successive rounds)의 농축을 이용할 수 있다. 하지만, 세포 라인이 유도된 클론 뿌리 라인이 높은 수준으로 발현하면, 이와 같은 추가 스크리닝은 불필요하다.

<61> 클론 뿌리 라인의 경우에서와 같이, 클론 뿌리 세포 라인의 세포는 바이러스 벡터를 포함하는 단일 선조 세포로부터 유도되고, 따라서 상기 바이러스 벡터가 복제하고 세포 분열 동안 전이되기 때문에, 이러한 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 따라서, 높은 비율(가령, 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%)의 세포, 모든(100%) 세포, 또는 실질적으로 모든(최소 98%) 세포가 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 바이러스 벡터가 클론 뿌리 세포 라인 내에 자녀 세포에 의해 유전되기 때문에, 세포 간에 바이러스 벡터의 이동이 이러한 바이러스 벡터를 유지시키는데 반드시 필요한 것은 아니다. 클론 뿌리 세포 라인은 하기에서 설명하는 바와 같이 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 생산하는데 이용할 수 있다.

<62> 클론 식물 세포 라인

<63> 본 발명은 클론 식물 세포 라인을 생성하는 방법을 제시하는데, 이때 식물 바이러스 벡터가 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 감독하는데 이용된다. 본 발명의 방법에 따르면, 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 발명의 HPV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 또는 이상의 바이러스 발현 벡터가 세포 배양액 내에 유지된 식물 세포 라인의 세포 내로 도입된다. 다양한 타입의 식물로부터 다수의 식물 세포 라인이 공지되어 있는데, 이들 중에서 임의의 것이 이용될 수 있다. 새로 유도된 세포 라인은 본 발명을 실행하는데 이용되는 공지된 방법에 따라 생성할 수 있다. 다수의 방법 중에서 임의의 방법에 따라 식물 세포 라인의 세포 내로 바이러스 벡터가 도입된다. 가령, 원형질체를 준비하고 바이러스 전사체를 세포 내로 전기천

공할 수 있다. 식물 세포 라인의 세포 내로 식물 바이러스 벡터를 도입하는 다른 방법이 이용될 수 있다.

- <64> 본 발명에 따른 클론 식물 세포 라인 및 식물 세포(가령, 원형질체) 내로 도입에 적합한 바이러스 벡터를 생성하는 방법은 아래와 같이 이용될 수 있다: 바이러스 벡터를 도입한 이후에, 식물 세포 라인을 조직 배양액에 유지시킨다. 이 기간 동안, 바이러스 벡터는 복제하고, 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현된다. 클론 식물 세포 라인은 예로써, 연속 농축 과정에 의해 배양액으로부터 유도된다. 가령, 샘플은 임의적으로, 세포 농도가 낮도록 희석과 함께 배양액으로부터 이전하고, 개별 비말(droplet)로 페트리 접시 내에 도말한다. 이후, 이들 비말은 세포 분열이 가능하도록 유지시킨다.
- <65> 당업자가 인지하는 바와 같이, 비말은 배양액의 초기 밀도 및 희석 양에 따라 다양한 수의 세포를 포함할 수 있다. 1회 농축(enrichment)후 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 클론 세포 라인을 수득하는 것이 바람직한 경우에, 이들 세포는 대부분의 비말이 0 또는 1개 세포를 포함하도록 희석될 수 있다. 하지만, 복수 세포가 각 비말 내에 존재하도록 농도를 선택하고, 이후 이들 비말을 스크리닝하여 발현 세포를 포함하는 것들을 확인하는 것이 더욱 효율적일 수 있다. 일반적으로, 임의의 적절한 스크리닝 절차가 이용될 수 있다. 가령, GFP와 같은 탐지가능 마커가 이용될 수 있다. 웨스턴 블랏 또는 ELISA 검사가 이용될 수 있다. 각 비말(100 μ l)은 이들 검사를 실행하는데 충분한 세포 이상을 포함한다. 복수 농축 라운드를 실행하여 더욱 높은 발현 세포 라인을 연속적으로 분리한다. 단일 클론 식물 세포 라인(즉, 단일 선조 세포로부터 유도된 집단)은 단일 세포 클로닝(single cell cloning)을 위한 표준 방법을 이용하여 추가의 제한 희석(limiting dilution)으로 생성시킬 수 있다. 하지만, 개별 클론 라인을 반드시 분리할 필요는 없다. 복수 클론 세포 라인을 포함하는 집단은 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 이용할 수 있다.
- <66> 일반적으로, 클론 뿌리 라인을 생성하기 위한 앞서 기술된 특정 고려사항은 클론 식물 세포 라인 생성에 적용된다. 가령, 복수의 상이한 벡터의 조합에서와 같이, 본 발명의 항원을 인코딩하는 하나 또는 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 다양한 바이러스 벡터가 이용될 수 있다. 유사한 스크리닝 방법이 이용될 수 있다. 클론 뿌리 라인 및 클론 뿌리 세포 라인의 경우에서와 같이, 클론 식물 세포 라인의 세포는 바이러스 벡터를 포함하는 단일 선조 세포로부터 유도되고, 따라서 상기 바이러스 벡터가 복제하고 세포 분열 동안 전이되기 때문에, 이러한 바이러스 벡터를 포함하게 될 것이다. 따라서, 높은 비율(가령, 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%)의 세포, 모든(100%) 세포, 또는 실질적으로 모든(최소 98%) 세포가 바이러스 벡터를 포함될 것이다. 바이러스 벡터가 클론 식물 세포 라인 내에 자녀 세포에 의해 유전되기 때문에, 세포 간에 바이러스 벡터의 이동이 이러한 바이러스 벡터를 유지시키는데 반드시 필요한 것은 아니다. 클론 식물 세포 라인은 하기에서 설명하는 바와 같이 본 발명의 항원을 인코딩하는 폴리펩티드를 생산하는데 이용할 수 있다.
- <67> 클론 식물
- <68> 클론 식물은 앞서 기술된 다양한 방법에 따라 생성된 클론 뿌리, 클론 뿌리 세포 라인 및/또는 클론 식물 세포 라인으로부터 생성될 수 있다. 본 명세서에 기술된 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인과 클론 식물 세포와 같은 뿌리, 뿌리 세포 라인과 식물 세포 라인으로부터 식물을 생성하는 방법은 당분야에 공지되어 있다(가령, Peres et al, 2001, Plant Cell, Tissue, Organ Culture, 65:37; and standard reference works on Plant molecular biology and biotechnology cited elsewhere herein). 따라서, 본 발명은 아래의 단계를 포함하는, 클론 식물을 생성하는 방법을 제시한다; (i) 앞서 기술된 본 발명의 방법 중에서 한 가지 방법에 따라 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인 또는 클론 식물 세포 라인을 생성하는 단계; (ii) 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인 또는 클론 식물로부터 완전한 식물을 생성하는 단계. 클론 식물은 증식되고 표준 방법에 따라 성장될 수 있다.
- <69> 클론 뿌리 라인, 클론 뿌리 세포 라인과 클론 식물 세포 라인의 경우에서와 같이, 클론 식물의 세포들은 바이러스 벡터를 포함하는 단일 선조 세포로부터 유도되고, 따라서, 상기 바이러스 벡터가 복제하고 분열 동안에 전이되기 때문에 이러한 바이러스 벡터를 포함하게 될 것이다. 따라서, 높은 비율(가령, 최소 50%, 최소 75%, 최소 80%, 최소 90%, 최소 95%)의 세포, 모든 세포(100%), 또는 실질적으로 모든(최소 98%) 세포가 바이러스 벡터를 포함할 것이다. 바이러스 벡터가 클론 식물 내에 자녀 세포에 의해 유전되기 때문에, 바이러스 벡터의 이동이 이러한 바이러스 벡터를 유지시키는데 반드시 필요한 것은 아니다.
- <70> 새싹과 싹튼 실생 식물 발현 시스템
- <71> 본 발명에 따른 HPV 항원의 생산에 유용한 다양한 새싹과 싹튼 실생을 산출하기 위한 시스템과 반응물은 기존 문헌에서 기술되었고 당분야에 공지되어 있다(참조: PCT Publication WO 04/43886). 본 발명에서는 또한, HPV

항원 펩티드 또는 단백질을 포함하는 바이오매스로서 식용가능 싹튼 실생을 제시한다. 특정 측면에서, 이러한 바이오매스는 항원 조성물의 소비를 위하여 직접적으로 제공된다. 일부 측면에서, 바이오매스는 예로써, 균질화(homogenizing), 압착(crushing), 건조(drying), 또는 추출(extracting)에 의해, 소비 이전에 가공된다. 특정 측면에서, HPV 항원은 바이오매스로부터 정제되고 약학 조성물로 제제화된다.

<72> 부가적으로, 생으로 소비되거나 수확될 수 있는 싹튼 실생(가령, 브라씨카(*Brassica*) 속의 새싹, 싹튼 실생) 내에서 HPV 항원을 생산하는 방법에 제시된다. 특정 측면에서, 본 발명은 통제된 조절가능 환경(가령, 실내, 컨테이너 등) 내에서 종자를 식용가능 싹튼 실생으로 성장시키는 과정을 필요로 한다. 종자는 HPV 항원을 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 유전자 조작된 종자일 수 있는데, 이의 발현은 외인적 유도성 프로모터에 의해 작동된다. 예로써, 광, 열, 식물호르몬(phytohormone), 영양분 등에 의해 유도되는 다양한 외인적 유도성 프로모터가 이용될 수 있다.

<73> 관련된 구체예에서, 본 발명에서는 먼저, 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 형질전환 시스템을 이용하여 HPV 항원을 인코딩하는 발현 카세트로 식물을 형질전환함으로써 싹튼 실생에 대한 종근(seed stock)을 산출함으로써 싹튼 실생 내에서 HPV 항원을 생산하는 방법을 제시하는데, 여기서 HPV 항원의 발현은 유도성 프로모터에 의해 작동된다. 유전자도입 종자는 통제된 조절가능 환경 내에서 성장된 형질전환된 식물로부터 획득될 수 있고, HPV 항원을 발현하도록 유도될 수 있다.

<74> 일부 구체예에서, HPV 항원을 인코딩하는 바이러스 발현 카세트로 싹튼 실생을 감염시키는 단계를 포함하는 방법이 제시되는데, 상기 발현 카세트의 발현은 바이러스 프로모터 또는 유도성 프로모터에 의해 작동된다. 싹튼 실생은 통제된 조절가능 환경 내에서 2 내지 14 일 동안, 또는 최소한, 소비 또는 수확을 위한 충분한 수준의 HPV 항원이 획득될 때까지 성장된다.

<75> 본 발명에서는 또한, 싹튼 실생 내에서 HPV 항원을 생산하는 시스템을 제시하는데, 상기 시스템은 기후가 통제된 하우스 단위(housing unit) 및 하나이상의 HPV 항원을 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 싹튼 실생을 포함하는데, 여기서 발현은 구조성 또는 유도성 프로모터에 의해 작동된다. 본 발명의 시스템은 통제될 수 없는 외부 환경 또는 온실에 비하여 독특한 이점을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명은 재배자가 정확한 시점에 HPV 항원의 발현을 유도할 수 있도록 한다. 본 발명은 또한, HPV 항원의 생산 비용을 상당히 감소시킬 수 있다.

<76> 특정 측면에서, 일시적으로 형질감염된 새싹은 본 발명의 HPV 항원을 인코딩하는 바이러스 벡터 서열을 포함한다. 실생은 새싹 내에서 바이러스 핵산의 생산이 가능하도록 하는 기간 동안 성장되고, 이후 바이러스의 복수 사본이 생산되는 성장 기간이 후행하여 항원의 생산을 결과한다.

<77> 특정 측면에서, HPV 항원을 인코딩하는 도입유전자를 포함하는 유전자 조작된 종자 또는 배아는 통제된 조절가능 환경에서 싹튼 실생 단계로 성장된다. 이러한 통제된 조절가능 환경은 종자가 실내에서 성장될 수 있는 하우스 단위(unit) 또는 공간(room)이다. 통제된 조절가능 환경의 모든 환경 인자가 통제될 수 있다. 새싹이 성장에 광원을 필요로 하지 않고 조명(lightning)에 많은 비용이 소요될 수 있기 때문에, 이들 유전자 조작된 종자 또는 배아는 광원의 부재 하에 실내에서 싹튼 실생 단계로 성장된다.

<78> 본 발명의 통제된 조절가능 환경에서 조절될 수 있는 다른 환경 인자에는 온도, 습도, 물, 영양분, 가스(가령, O₂ 또는 CO₂ 함량 또는 공기 순환(air circulation)), 화학물질(당과 당 유도체와 같은 소형 분자, 또는 식물호르몬(phytohormone) 지베렐린산(gibberellic acid) 또는 아브시식산(abscisic acid)과 같은 호르몬 등) 등이 포함된다.

<79> 본 발명의 특정 방법에 따라, HPV 항원을 인코딩하는 도입유전자의 발현은 외인적 유도성 프로모터(exogenously inducible promoter)에 의해 통제될 수 있다. 외인적 유도성 프로모터는 내부 자극보다는 외부 자극에 반응하여 도입유전자의 발현을 증가 또는 감소시킨다. 다수의 환경 인자가 유전자 조작된 새싹의 발현 카세트에 의해 운반된 도입유전자의 발현을 위한 유도인자로서 기능할 수 있다. 프로모터는 열-유도성 프로모터, 예를 들면, 열-쇼크 프로모터이다. 가령, 열-쇼크 프로모터를 이용하여, 통제된 환경의 온도를 상승시켜 도입유전자의 발현을 유도할 수 있다. 다른 프로모터에는 광 유도성 프로모터가 포함된다. 광-유도성 프로모터는 통제된 조절가능 환경에서 광원이 항상 켜져 있으면 구조성 프로모터로서 유지될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 도입유전자의 발현은 광원을 켜므로써 발달 동안 특정 시점에서 작동될 수 있다. 프로모터는 도입유전자의 발현을 유도하는데 이용되는 화학 유도성 프로모터이다. 이들 구체예에 따라, 도입유전자의 발현을 유도하기 위하여 화학물질이 종자, 배아 또는 실생 위에 분무되거나 분사될 수 있다. 분사(spraying)와 분무(misting)는 정확하게 통제되고, 의도된 표적 종자, 배아, 또는 실생으로 지향될 수 있다. 통제된 환경은 의도된 표적으로부터 화학물질을

분산시키는 바람 또는 기류(air current)가 결여되고, 따라서 화학물질은 의도된 표적 상에 존재한다.

- <80> 본 발명에 따라, 발현이 유도되는 시점은 수확 시점에 싹튼 실생 내에서 HPV 항원의 발현을 극대화시키도록 선택될 수 있다. 생장의 특정 단계, 예를 들면, 발아후 특정 일자에서 배아 내에서 발현 유도는 수확 시점에 HPV 항원의 최대 생산을 결과할 수 있다. 가령, 발아후 4 일 시점에 프로모터로부터 발현 유도는 3 일 또는 5 일후 프로모터로부터 발현 유도보다 더욱 많은 단백질 합성을 결과할 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 발현 극대화는 통상적인 실험에 의해 달성될 수 있다. 일부 구체예에서, 싹튼 실생은 발아후 대략 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 일 시점에 수확된다.
- <81> 발현 백터가 유도성 프로모터가 아닌 구조성 프로모터를 보유하는 경우에, 싹튼 실생은 이러한 싹튼 실생의 형질전환후 특정 시점에 수확될 수 있다. 가령, 싹튼 실생이 발달의 초기 단계, 예를 들면, 배아 단계에서 바이러스에 의해 형질전환되면, 싹튼 실생은 발현이 형질전환후 최대인 시점, 예를 들면, 형질전환후 대략 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14 일 시점에 수확될 수 있다. 또한, 종자의 발아에 따라, 형질전환후 1, 2, 3 개월 또는 그 이상의 시점에 새싹이 발달할 수도 있다.
- <82> 일반적으로, HPV 항원의 발현이 시작되면, 종자, 배아, 또는 싹튼 실생은 HPV 항원이 충분한 수준으로 발현될 때까지 성장하게 된다. 특정 구체예에서, 충분한 수준은 수확된 바이오매스가 생으로 식용될 때 환자에 치료 혜택을 제공하는 수준이다. 대안으로 또는 부가적으로, 충분한 수준은 HPV 항원이 바이오매스로부터 농축되거나 정제되고, 투여 이후에 환자에 치료 혜택을 제공하는 약학적 조성물로 제제화될 수 있는 수준이다. 전형적으로, 항원은 싹튼 실생 내에서 자연적으로 발현되지 않는다. 어쨌든, HPV 항원은 전형적으로, 싹튼 실생 내에서 자연적으로 존재하는 농도를 초과하는 농도로 발현된다.
- <83> HPV 항원의 발현이 유도되면, 싹튼 실생이 수확되는 싹튼 실생 단계까지 생장이 지속된다. 이들 싹튼 실생은 생으로 수확된다. 살아있는 싹튼 실생의 수확은 최소 노력과 손상을 비롯한 여러 이점을 제공한다. 본 발명의 싹튼 실생은 수경 성장될 수 있고, 성장 용액(hydroponic solution)으로부터 이들 싹튼 실생을 단순히 들어 올림으로써 수확될 수 있다. 본 발명의 싹튼 실생의 성장을 위하여 토양이 요구되지 않지만 당업자가 필요하다고 판단하는 경우에 제공될 수도 있다. 새싹이 토양 없이 성장될 수 있기 때문에, 수확 시점에 싹튼 실생 재료의 정화(cleansing)가 불필요하다. 세척(washing) 또는 세정(scrubbing) 없이 수경 환경으로부터 직접적으로 싹튼 실생을 수확할 수 있다는 것은 수확된 물질의 손상을 최소화시킨다. 식물의 손상과 시들음은 아포토시스(apoptosis)를 유도한다. 아포토시스 동안, 특성의 단백질 분해 효소가 활발해지는데, 이는 싹튼 실생 내에서 발현된 약학적 단백질을 변성시키고 상기 단백질의 감소된 치료 활성을 유발한다. 아포토시스-유도된 단백질 분해(apoptosis-induced proteolysis)는 성숙 식물로부터 단백질의 수율을 현저하게 감소시킬 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하면, 단백질이 식물로부터 추출될 때까지 수확이 진행되지 않기 때문에 아포토시스가 회피된다.
- <84> 가령, 살아있는 새싹은 프로테아제 저해물질을 포함하는 완충액 내에서, 싹튼 실생 바이오매스의 슬러리를 생산하기 위하여 분쇄되거나, 으깨어지거나, 또는 혼합된다. 완충액은 대략 4℃에 유지된다. 일부 측면에서, 싹튼 실생 바이오매스는 자연 건조되거나, 분무 건조되거나, 동결되거나, 또는 냉동-건조된다. 성숙 식물에서처럼, 이들 방법 중에서 일부, 예를 들면, 자연 건조(air-drying)는 약학적 단백질의 활성 상실을 유발할 수 있다. 하지만, 싹튼 실생이 매우 작고 높은 표면적 대 부피 비율(surface area to volume ratio)을 나타내기 때문에, 이러한 현상이 발생할 가능성이 훨씬 낮다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 발현된 단백질의 단백질 분해를 최소화시키는 바이오매스를 수확하는 다양한 기술이 가용하고 본 발명에 적용될 수 있다.
- <85> 일부 구체예에서, 싹튼 실생은 식용가능하다. 특정 구체예에서, 싹튼 실생이 충분한 수준의 HPV 항원을 발현하고 수확 이후에(가령, 수확 직후에, 수확후 최소 기간 이내에) 소비되는 경우에, 싹튼 실생이 소비되기 이전에 어떤 가공도 진행되지 않는다. 이러한 방식으로, 치료가 필요한 환자에 HPV 항원의 투여 이전에 상기 HPV 항원의 수확-유발된 단백질 분해 파괴가 발생되지 않는다. 가령, 소비되는 싹튼 실생이 환자에 직접적으로 전달될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 유전자 조작된 종자 또는 배아가 치료가 필요한 환자에 전달되고 상기 환자에 의해 싹튼 실생 단계로 성장된다. 한 측면에서, 유전자 조작된 싹튼 실생이 환자, 또는 환자를 치료하는 의사에게 제공되고, 따라서, 특성의 바람직한 HPV 항원을 발현하는 싹튼 실생의 연속 스탁(continual stock)이 배양될 수 있다. 이는 값비싼 약제를 감당할 수 없거나 이러한 약제가 공급되지 않는 후진국 국민들에게 특히 귀중하다. 본 발명의 싹튼 실생은 용이하게 성장될 수 있기 때문에, 이런 후진국 국민들에게 특히 바람직하다.
- <86> 통제된 환경의 조절가능 특성은 외부 환경에서 식물 성장에 비하여 본 발명에 이점을 부여한다. 일반적으로, 식물 내에서 약학적 단백질을 발현하는 유전자 조작된 싹튼 실생의 생장은 유전자 조작된 식물의 성장보다 더욱 신속하고(이들 식물이 더욱 어린 단계에서 수확되기 때문에), 더욱 적은 노력, 위험과 조절 사항으로 약학적 산

물을 제공한다. 본 발명에 이용되는 통제된 조절가능 환경은 자연에서 식물의 교차-수분(cross-pollinating) 위험을 감소 또는 제거한다.

<87> 가령, 열 유도성 프로모터는 야외에서 결코 이용될 수 없는데, 그 이유는 야외 온도가 통제될 수 없기 때문이다. 상기 프로모터는 야외 온도가 특정 수준을 초과하여 상승하는 시점에 작동될 것이다. 유사하게, 상기 프로모터는 야외 온도가 떨어지는 시점마다 중지될 것이다. 이런 온도 변화는 하루 동안 발생할 있다, 가령, 낮 시간 동안 발현 작동과 밤 시간 동안 발현 중지. 열 유도성 프로모터, 예를 들면, 본 명세서에 기술된 프로모터는 야외와 거의 동일한 수준으로 기후 변화(climatic shift)에 민감한 온실에서 실질적인 이용이 어려울 것이다. 온실 내에서 유전자 조작된 식물의 생장은 상당한 비용이 소요된다. 대조적으로, 본 발명의 시스템에서, 모든 변수는 매 수확 시에 최대량의 발현이 달성될 수 있도록 통제될 수 있다.

<88> 특정 구체예에서, 본 발명의 싹튼 실생은 이러한 싹튼 실생의 발달 동안 임의의 시점에서 관개되거나, 분사되거나 또는 분무될 수 있는 트레이(tray) 내에서 성장된다. 가령, 상기 트레이는 싹튼 실생의 발달 동안 특정 시점에 정확한 양으로 물, 영양분, 화학물질 등을 운반 및/또는 이전할 수 있는 하나이상의 관개(watering), 분사(spraying), 분무(misting)와 배수(drainage) 장치가 구비된다. 가령, 종자는 이들을 축축한 상태로 유지하기 위하여 충분한 수분을 필요로 한다. 과량의 수분은 트레이 내에 구멍을 통하여 공간의 바닥에 배수관(drain)으로 배수된다. 전형적으로, 배수(drainage water)는 주변 환경으로 방출에 앞서, 유해한 화학물질의 제거를 위하여 적절히 처리된다.

<89> 트레이의 다른 이점은 이들이 매우 작은 공간 내에서 통제될 수 있다는 점이다. 싹튼 실생이 성장하는데 광원이 불필요하기 때문에, 종자, 배아, 또는 싹튼 실생을 포함하는 이들 트레이는 서로의 상부에서 수직으로 밀집되게 쌓여지고, 이들 목적을 위하여 특수하게 구성된 하우스형 시설(housing facility) 내에서 단위 면적(unit floor space)당 다량의 바이오매스를 제공한다. 이에 더하여, 트레이의 이들 스택(stack)은 하우스형 단위 내에서 수평 열로 정렬될 수 있다. 이들 실생이 수확을 위한 적절한 단계(대략 2 내지 14 일)까지 성장되면, 개별 실생 트레이는 수동으로 또는 자동화 수단, 예를 들면, 컨베이어 벨트에 의해 처리 시설(processing facility)로 이동된다.

<90> 본 발명에서는 HPV 항원의 공급원인 싹튼 실생 바이오매스를 제공하는 독특한 시스템을 제시한다. 직접적으로 소비되거나, 또는 약학적 조성물의 형태로 가공되는 지에 상관없이, 이들 싹튼 실생이 통제된 조절가능 환경 내에서 성장될 때, 상기 바이오매스로부터 유래된 싹튼 실생 바이오매스 및/또는 약학적 조성물은 저렴한 가격으로 소비자에게 제공될 수 있다. 이에 더하여, 이들 싹튼 실생의 성장을 위한 조건이 통제될 수 있다는 사실은 산물의 품질과 순도를 일정하게 만든다. 본 발명의 통제된 조절가능 환경은 또한, 과학자가 실외에서 유전자 조작된 농작물을 성장시키는 것을 방지하기 위한, EPA의 여러 안전 규정(safety regulation)을 회피한다.

<91> **형질전환된 새싹**

<92> 식물 세포를 형질전환하고 유전자 조작된 싹튼 실생을 생산하기 위하여 다양한 방법이 이용될 수 있다. 유전자 도입 식물 세포 라인을 시험관내에서 산출하는 식물의 형질전환 및 이후에, 이들 세포 라인의 완전 식물로의 재생산을 위한 현재 가용한 2가지 방법은 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전달 및 미세 투사물 폭발(microprojectile bombardment) 또는 전기천공(electroporation)이다. 바이러스 형질전환은 원하는 산물을 획득하기에 앞서, 실험적 또는 세대적 지체(lag) 없이 수확될 수 있는 배아와 싹튼 실생을 형질전환시키는 더욱 신속하고 더욱 저렴한 방법이다. 이들 기술과 관련하여, 당업자들은 식물, 종자, 배아, 또는 싹튼 실생에 전통적으로 이용되는 형질전환 프로토콜을 조정하고 최적화시킬 수 있을 것이다.

<93> **아그로박테리움(*Agrobacterium*) 형질전환 발현 카세트**

<94> 아그로박테리움(*Agrobacterium*)은 그람-음성 계통 리조비아케아이(*Rhizobiaceae*)의 대표적인 속(genus)이다. 상기 종은 근두암종(crown gall)과 털뿌리병(hairy root disease)과 같은 식물 종양을 유발한다. 종양의 특징인 탈분화된 식물 조직에서, 오피(opine)으로 알려져 있는 아미노산 유도체가 아그로박테리움(*Agrobacterium*)에 의해 생산되고 상기 식물에 의해 이화된다. 오피의 발현을 담당하는 세균 유전자는 키메라 발현 카세트에 대한 조절 요소의 편의한 공급원이다. 본 발명에 따라, 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 형질전환 시스템은 성숙 식물보다 이전에 수확되는 식용가능 싹튼 실생을 산출하는데 이용될 수 있다. 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 형질전환 방법은 HPV 항원을 발현하는 싹튼 실생을 재생하는데 용이하게 적용될 수 있다.

<95> 일반적으로, 식물의 형질전환은 식물/세균 벡터를 운반하는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)와의 공동-배양(co-cultivation)으로 조직 배양액 내에서 성장된 식물 세포의 형질전환을 수반한다. 상기 벡터는 HPV

항원을 인코딩하는 유전자를 포함한다. 아그로박테리움(*Agrobacterium*)은 상기 벡터를 식물 호스트 세포로 이전하고, 이후 항생제 처리를 이용하여 제거된다. HPV 항원을 발현하는 형질전환된 식물 세포는 선택되고, 분화되고, 최종적으로 완전한 작은 식물(plantlet)로 재생된다(Hellens et al., 2000, Plant Molecular Biology, 42(819-832); Pilon-Smits et al, 1999, Plant Physiology., 119(1):123; Barfield et al., 1991, Plant Cell Reports 10:308; Riva et al., 1998, Journal of Biotechnology 1(3)).

<96> 본 발명에 이용되는 발현 벡터는 식물에서 작동하도록 설계된, HPV 항원을 인코딩하는 유전자(또는 발현 카세트) 및 상기 발현 카세트의 상류와 하류에 동료 서열(companion sequence)을 포함한다. 동료 서열은 일반적으로, 플라스미드 또는 바이러스 기원이고, 세균으로부터 소량의 식물 호스트로 DNA를 전달하는 벡터에 필수적인 특성을 제공한다.

<97> 적절하게는, 이러한 기본적인 세균/식물 벡터 구조체는 폭넓은 호스트 범위 원핵생물 복제 기원, 원핵생물 선택 가능 마커를 제공한다. 적절한 원핵생물 선택가능 마커에는 암피실린(ampicillin) 또는 테트라사이클린(tetracycline)과 같은 항생제에 대한 저항성이 포함된다. 당분야에 널리 공지된 추가적인 기능을 인코딩하는 다른 DNA 서열 역시 벡터 내에 존재할 수 있다.

<98> DNA의 식물 염색체로의 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 매개된 전달을 위하여 아그로박테리움(*Agrobacterium*) T-DNA 서열이 요구된다. T-DNA의 종양-유도 유전자는 전형적으로 제거되고, HPV 항원을 인코딩하는 서열로 대체된다. T-DNA 경계 서열은 유지되는데, 그 이유는 이들이 식물 게놈 내로 T-DNA 영역의 통합을 개시하기 때문이다. HPV 항원의 발현이 용이하게 탐지되지 않으면, 세균/식물 벡터 구조체는 식물 세포가 형질전환되었는지를 결정하는데 적합한 선택가능 마커 유전자, 예를 들면, nptII 카나마이신 저항성 유전자를 포함할 수 있다. Ti 서열은 동일한 또는 상이한 세균/식물 벡터(Ti 플라스미드) 상에 존재한다. Ti 서열은 T-DNA의 절제, 전달 및 식물 게놈 내로 통합을 담당하는 일단의 단백질을 인코딩하는 독력 유전자(virulence gene)를 포함한다(Schell, 1987, Science, 237: 1176). 이질성 서열의 식물 게놈 내로의 통합을 가능하게 하는데 적합한 다른 서열에는 상동성 재조합(homologous recombination)을 위한 트랜스포손(transposon) 등이 포함된다.

<99> 특정의 구조체는 항원 단백질을 인코딩하는 발현 카세트를 포함한다. 소정의 형질전환에 1개, 2개, 또는 그 이상의 발현 카세트가 이용될 수 있다. 이러한 재조합 발현 카세트는 HPV 항원 인코딩 서열 이외에, 최소한 아래의 요소를 포함한다: 프로모터 영역, 식물 5' 비-번역된 서열, 개시 코돈(initiation codon)(발현된 유전자가 자체의 개시 코돈을 보유하는지의 여부에 따라) 및 전사와 번역 종결 서열. 이에 더하여, 전사와 번역 종결 인자가 본 발명의 발현 카세트 또는 키메라 유전자 내에 포함될 수 있다. 적절한 경우에, 단백질의 가공(processing)과 전좌(translocation)를 가능하게 하는 신호 분비 서열 역시 발현 카세트 내에 포함될 수 있다. 다양한 프로모터, 신호 서열 및 전사와 번역 종결 인자가 기술된다(참조: Lawton et al., 1987, Plant Mol. Biol., 9:315-324; U.S. Patent No. 5,888,789). 이에 더하여, 항생제 저항성에 대한 구조 유전자는 선택 인자로서 통상적으로 이용된다(Fraley et al. 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1983) 80:4803-4807). 상기 카세트의 5'와 3' 말단에서 독특한 제한 효소 부위는 기존 벡터 내로 편의한 삽입을 가능하게 한다. 최소한 하나의 T-DNA 경계 서열을 보유하는, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개된 형질전환을 위한 다른 이중 벡터 시스템은 PCT/EP99/07414에 기술된다.

<100> 재생

<101> 형질전환된 식물의 종자는 수확되고, 건조되고, 정화되고, 생존능(viability) 및 소량의 유전자 산물의 존재와 발현에 대하여 조사된다. 이것이 결정되면, 종근(seed stock)은 전형적으로, 적절한 온도, 습도, 위생과 보안 조건 하에 보관되고 필요할 때 이용된다. 이후, 배양된 원형질체(protoplast)로부터 완전 식물이 재생된다(참조: Evans et al., Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. 1, MacMillan Publishing Co., New York, 1983; Vasil I, R. (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants, Acad. Press, Orlando, Vol. I, 1984, and Vol. III, 1986). 특정 측면에서, 식물은 싹튼 실생 단계로만 재생된다. 일부 측면에서, 완전 식물은 종근을 생산하기 위하여 재생되고, 싹튼 실생은 종근의 종자로부터 산출된다.

<102> 원형질체가 분리되고 배양되어 완전한 재생된 식물을 제공할 수 있는 모든 식물은 본 발명에 의해 형질전환될 수 있고, 따라서 전이된 유전자를 포함하는 완전 식물이 회수된다. 식용가능 새싹을 생산하는 모든 주요 식물 종이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 실질적으로 모든 식물이 배양된 세포 또는 조직으로부터 재생될 수 있다. 일부 적합한 식물에는 알파파, 녹두, 무, 밀, 겨자, 시금치, 당근, 비트, 양파, 마늘, 셀러리, 대황, 양배추 또는 상추와 같은 잎줄기 식물, 양갓냉이 또는 다닥냉이, 파슬리, 박하 또는 토끼풀과 같은 허브, 콜리플라워, 브로콜리, 콩, 편두, 해바라기와 같은 식용가능 꽃 등이 포함된다.

- <103> 재생 수단은 각 식물 종마다 상이하다. 하지만, 당업자가 인지하는 바와 같이, 일반적으로, 이질성 유전자의 사본을 포함하는 형질전환된 원형질체의 현탁액이 먼저 제공된다. 캘러스(callus) 조직이 형성되고, 캘러스로부터 새싹이 유도되고, 차후에 착근된다. 대안으로 또는 부가적으로, 배아 형성(embryo formation)이 원형질체 현탁액으로부터 유도될 수 있다. 이들 배아는 자연 배아처럼 발아하고 식물을 형성한다. 종자의 수분 함량(moisture content)을 35 내지 45%로 증가시키기 위하여 종자를 물에 담구거나 종자에 물을 뿌리면, 발아(germination)가 시작된다. 발아가 진행되도록 하기 위하여, 종자는 전형적으로, 통제된 온도와 기류 조건 하에, 물로 포화된 공기 중에 유지된다. 배양 배지는 일반적으로, 다양한 아미노산과 호르몬, 예를 들면, 옥신(auxin)과 사이토킨을 포함한다. 또한, 알파파와 같은 종의 경우에 글루탐산과 프롤린을 배지에 추가하는 것이 바람직하다. 새싹과 뿌리는 정상적으로, 동시에 발달한다. 효과적인 재생은 배지, 유전형(genotype) 및 배양의 이력에 좌우된다. 이들 3가지 변수가 통제되면, 재생은 완전히 재현가능하고 반복가능하다.
- <104> 형질전환된 식물 세포로부터 성장된 성숙 식물은 그 자신이고, 비-차별성 동형접합 유전자도입 식물이 확인된다. 이러한 동종 변식(inbred) 식물은 본 발명의 항원-인코딩 서열을 포함하는 종자를 생산한다. 이들 종자는 발아되고 싹튼 실생 단계로 성장되어, 본 발명에 따른 HPV 항원을 생산할 수 있다.
- <105> 관련된 구체예에서, 본 발명의 종자는 종자 산물로 형성되고, 약학적 조성물로 투여 또는 수확을 위한 적절한 싹튼 실생 단계까지 실생을 성장시키는 방법에 관한 지시 사항과 함께 판매된다. 다른 관련된 구체예에서, 소효의 특질을 구현하는 하이브리드(hybrid) 또는 새로운 품종이 본 발명의 동종 변식 식물로부터 개발된다.
- <106> 직접적인 통합
- <107> 미세투사물 폭발(microprojectile bombardment) 또는 전기천공(electroporation)에 의한 식물 세포의 게놈 내로 DNA 단편의 직접적인 통합이 본 발명에 이용될 수 있다(참조: Kikkert et al, 1999, Plant: J. Tissue Cult. Assoc, 35:43; Bates, 1994, Mol. Biotech, 2:135). 더욱 구체적으로, 본 발명의 HPV 항원을 발현하는 벡터는 다양한 기술에 의해 식물 세포 내로 도입될 수 있다. 앞서 기술된 바와 같이, 벡터는 식물 세포 내에서 유용한 선택가능 마커를 포함할 수 있다. 벡터는 또한, 이차 호스트 내에서 그들의 선택과 증식을 가능하게 하는 서열, 예를 들면, 복제 기점(origin of replication)과 선택가능 마커를 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 전형적으로, 이차 호스트는 세균과 진균이다. 한 구체예에서, 이차 호스트는 세균(가령, 대장균(*Escherichia coli*))이고, 복제 기점은 colEI-타입의 복제 기점이고, 선택가능 마커는 암피실린 저항성을 인코딩하는 유전자이다. 이들 서열은 당분야에 널리 공지되어 있고 상업적으로 가용하다(가령, Clontech, Palo Alto, CA 또는 Stratagene, La Jolla, CA).
- <108> 본 발명의 벡터는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*) 벡터에 상동한 영역, 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)로부터 T-DNA 경계 영역 및 앞서 기술된 항원 인코딩 핵산 또는 발현 카세트를 포함하는 중간 식물 형질전환 플라스미드로 변형될 수도 있다. 추가의 벡터는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)의 무해한 식물 종양 유도 플라스미드가 포함될 수 있다.
- <109> 본 구체예에 따라, 이들 벡터의 직접적인 형질전환은 제조할 DNA를 기계적으로 이전하는 마이크로피펫(micropipette)의 이용으로, 이들 벡터를 식물 세포 내로 직접적으로 미세주입(microinjecting)하는 단계를 수반한다(참조: Crossway, 1985, Mol. Gen. Genet., 202:179-185, 1985). 유전 물질은 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)을 이용함으로써 식물 세포 내로 이전될 수 있다(참조: Krens et al., Nature 296:72-74). 핵산을 식물 내로 도입하는 다른 방법은 소형 비드 또는 입자의 매트릭스 내에, 또는 표면 상에 핵산이 존재하는 소형 입자에 의한 고속 비행 침투(high velocity ballistic penetration)이다(참조: Klein et al., 1987, Nature, 327:70-73; Knudsen et al., 1991, Planta, 185:330-336)). 다른 도입 방법은 원형질체와 다른 실체(entity), 예를 들면, 미니세포, 세포, 리소솜, 또는 다른 융합가능 지질-표면체(lipid-surfaced body)의 융합이다(참조: Fraley et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79:1859). 본 발명의 벡터는 또한, 전기천공에 의해 식물 세포 내로 도입될 수 있다(참조: Fromm et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5824). 이러한 기술에 따라, 식물 원형질체는 유전자 구조체를 포함하는 플라스미드의 존재에서 전기천공된다. 높은 필드 에너지(high field strength)의 전기 임펄스(electrical impulse)는 생체막(biomembrane)을 가역적으로 투과하여 플라스미드의 도입을 가능하게 한다. 전기천공된 식물 원형질체는 세포 벽을 재형성하고, 분화하고, 식물 캘러스를 형성하는데, 이는 재생시켜 본 발명의 싹튼 실생을 형성할 수 있다. 당업자는 식용가능 싹튼 실생을 산출하는데 이용될 수 있는 식물 세포를 형질전환하기 위하여 이들 방법을 이용하는 방법을 인지할 것이다.
- <110> 바이러스 형질전환

- <111> 통상적인 발현 시스템과 유사하게, 식물 바이러스 벡터는 전장 항원을 비롯한 전장 단백질을 생산하는데 이용될 수 있다. 본 발명에 따라, 종자, 배아, 싹튼 실생 등을 감염시키고 이들에서 항원을 생산하는데 식물 바이러스 벡터, 예를 들면, 짧은 펩티드에서부터 크고 복잡한 단백질까지 모든 것을 발현하는데 이용될 수 있는 바이러스 시스템이 이용된다. 구체적으로, 토마모바이러스(tobamovirus) 벡터의 이용이 기술된다(참조: McCormick et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:703; Kumagai et al., 2000, Gene, 245:169; Verch et al., 1998, J. Immunol Methods, 220:69). 따라서, 식물 바이러스 벡터는 짧은 펩티드뿐만 아니라 크고 복잡 단백질을 발현하는 검증된 능력을 갖는다.
- <112> 특정 구체예에서, HPV 항원을 발현하는 유전자도입 새싹이 호스트/바이러스 시스템을 이용하여 산출된다. 바이러스 감염에 의해 생산된 유전자도입 새싹은 안전한 것으로 이미 증명된 유전자도입 단백질의 공급원을 제공한다. 가령, 새싹은 동물 병원균으로 오염의 위험이 없다. 예로써 담배와 달리, 식용가능 새싹으로부터 단백질은 최소한 이론적으로, 정제 없이 경구 적용에 이용될 수 있고, 따라서 비용을 현저하게 감소시킬 수 있다. 이에 더하여, 바이러스/새싹 시스템은 규모 확대(scale-up)와 제조를 위한 훨씬 간편하고 저렴한 경로를 제공하는데, 그 이유는 외래유전자(transgene)가 바이러스 내로 도입되고, 상기 바이러스가 수일 이내에 상업적 규모로 성장될 수 있기 때문이다. 대조적으로, 유전자도입 식물은 충분한 종자 또는 식물 재료가 대규모 시험 또는 상업화에 가용해 질 때까지 최대 5-7년이 요구될 수 있다.
- <113> 본 발명에 따라, 식물 RNA 바이러스는 특징의 이점을 갖는데, 이들 이점으로 인하여, 상기 바이러스는 외래 단백질 발현을 위한 벡터로서 매력적이다. 다수의 식물 RNA 바이러스의 분자생태와 병리는 충분히 특성화되고, 바이러스 생물학, 유전학 및 조절 서열에 관한 충분한 지식이 존재한다. 대부분의 식물 RNA 바이러스는 소형 게놈을 보유하는데, 유전자 조작을 용이하게 하기 위하여 감염성 cDNA 클론이 가용하다. 감염성 바이러스 물질은 감수성 호스트 세포 내로 들어가면, 높은 수준으로 복제하고 싹튼 실생 전체에 급속하게 퍼진다(접종후 1 일 내지 10 일). 바이러스 입자는 감염된 싹튼 실생 조직으로부터 편의하게 경제적으로 회수된다. 바이러스는 폭넓은 호스트 범위를 보유하는데, 이는 여러 감수성 종의 감염을 위한 단일 구조체의 이용을 가능하게 한다. 이들 특성은 새싹에 용이하게 전달된다.
- <114> 외래 서열은 바이러스 유전자 중에서 하나를 소량의 서열로 치환함으로써, 적절한 위치에서 외래 서열을 바이러스 게놈 내로 삽입함으로써, 또는 바이러스의 구조 단백질에 외래 펩티드를 융합함으로써 발현될 수 있다. 게다가, 이들 접근법은 바이러스의 핵심적인 기능의 트랜스-상보성(trans-complementation)에 의해 외래 서열을 발현하기 위하여 통합될 수 있다. 담배 모자이크 바이러스(TMV), 알파파 모자이크 바이러스(AIMV) 및 이들의 키메라를 이용하여 바이러스-감염된 식물 내에서 외래 서열을 발현하는 도구로서 다수의 상이한 전략이 존재한다.
- <115> AIMV의 게놈은 브로모비리데(Bromoviridae) 과의 바이러스를 대표하고, 3개의 게놈 RNA(RNA1-3)와 하부게놈 RNA(RNA4)로 구성된다. 게놈 RNA1과 2는 각각, 바이러스 레플리카아제 단백질 P1과 2를 인코딩한다. 게놈 RNA3은 세포-세포 이동 단백질 P3과 외피 단백질(CP)을 인코딩한다. CP는 게놈 RNA3으로부터 합성된 하부게놈 RNA4로부터 번역되고, 감염을 시작하는데 필요하다. 여러 연구에서, 게놈 활성화, 복제, RNA 안정성, 증상 형성(symptom formation) 및 RNA 캡시드조립(encapsidation)을 비롯한 복수의 기능에서 CP의 관여가 증명되었다(참조: Bol et al, 1971, Virology, 46:73; Van Der Vossen et al, 1994, Virology 202:891; Yusibov et al., Virology, 208:405; Yusibov et al, 1998, Virology, 242:1; Bol et al, (Review, 100 refs.), 1999, J. Gen. Virol., 80:1089; De Graaff, 1995, Virology, 208:583; Jaspars et al, 1974, Adv. Virus Res., 19:37; Loesch-Fries, 1985, Virology, 146:177; Neeleman et al, 1991, Virology, 181 :687; Neeleman et al, 1993, Virology, 196: 883; Van Der Kuyl et al, 1991, Virology, 183:731; Van Der Kuyl et al, 1991, Virology, 185:496).
- <116> 바이러스 입자의 캡시드조립은 종자, 배아 또는 싹튼 실생의 접종된 부분에서 접종되지 않은 부분으로 바이러스의 장거리 이동 및 전신 감염을 위하여 필수적이다. 본 발명에 따라, 접종은 임의의 식물 발단 단계에서 수행될 수 있다. 배아와 새싹에서, 접종된 바이러스의 확산은 매우 급속하다. AIMV의 비리온은 독특한 CP(24 kD)에 의해 캡시드 조립되고, 한 가지 이상 유형의 입자를 형성한다. 입자의 크기(30- 내지 60-nm 길이와 18 nm 직경) 및 형상(구, 타원체, 또는 간상)은 캡시드 조립된 RNA의 크기에 좌우된다. 조립 직후에, AIMV CP의 N-말단은 바이러스 입자의 표면 상에 위치하는 것으로 생각되고, 바이러스 조립을 간섭하지 않는 것으로 보인다(Bol et al., 1971, Virology, 6: 73). 부가적으로, N-말단에 추가의 38개-아미노산 펩티드를 포함하는 AIMV CP는 시험관내에서 입자를 형성하고 생물학적 활성을 유지한다(Yusibov et al., 1995, J. Gen. Virol., 77: 567).
- <117> AIMV는 폭넓은 호스트 범위를 보유하는데, 여기에는 식물 종자, 배아와 새싹을 비롯한 다수의 농업적으로 귀중

한 작물(crop plant)이 포함된다. 종합하면, 이들 특성으로 인하여, AIMV CP는 담체 분자로서 우수한 후보이고, AIMV는 발달의 새싹 단계에서 식물 내에서 외래 서열의 발현을 위한 매력적인 후보 벡터이다. 게다가, TMV와 같은 이질성 벡터로부터 발현 직후에, AIMV CP는 바이러스 감염성(infectivity)을 간접하지 않으면서 TMV 계통을 캡시드 조립한다(Yusibov et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 5784). 이는 외래 서열에 융합된 AIMV CP에 대한 담체 바이러스로서 TMV의 이용을 가능하게 한다.

<118> 토마모바이러스의 원형인 TMV는 17.0 kD CP로 캡시드 조립된 단일 플러스-센스 RNA로 구성되는 계통을 보유하는데, 이는 막대-형상 입자(300 nm 길이)를 결과한다. CP는 TMV의 유일한 구조 단백질이고, 감염된 호스트 내에서 바이러스의 캡시드 조립과 장거리 이동에 필요하다(Saito et al., 1990, Virology, 176: 329). 이러한 183과 126 kD 단백질은 계통 RNA로부터 번역되고 바이러스 복제에 요구된다(Ishikawa et al., 1986, Nucleic Acids Res., 14: 8291). 30 kD 단백질은 바이러스의 세포-세포 이동 단백질이다(Meshi et al., 1987, EMBOJ., 6: 2557). 이동과 외피 단백질은 하부계통 mRNA로부터 번역된다(Hunter et al., 1976, Nature, 260: 759; Bruening et al., 1976, Virology, 71: 498; Beachy et al., 1976, Virology, 73: 498).

<119> 식물 조직을 형질전환시키는 다른 방법에는 식물의 꽃을 형질전환시키는 것이 포함된다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 형질전환은 식물의 꽃을 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)의 용액 내로 담금으로써 달성될 수 있다(Curtis et al., 2001, Transgenic Res., 10:363; Qing et al., 2000, Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement, 1:67). 형질전환된 식물은 "담겨진" 식물에 의해 산출된 종자 집단에서 형성된다. 꽃 발달 동안 특정 시점에서, 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)가 씨방(ovary)의 내부에 접근할 수 있는, 씨방 벽(ovary wall) 내에 구멍이 존재한다. 씨방 내에서, 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)는 증식하고 개별 배주(ovule)를 형질전환시킨다(Desfeux et al., 200, Plant Physiology, 123: 895). 형질전환된 배주는 씨방 내에서 종자 형성의 전형적인 경로를 따른다.

<120> 향원의 생산과 분리

<121> 일반적으로, 향원의 생산을 위한 본 발명의 식물, 식물 세포 및/또는 식물 조직(가령, 클론 식물, 클론 식물 세포, 클론 뿌리, 클론 뿌리 라인, 새싹, 싹튼 싹, 식물, 등)을 배양하거나 성장시키는데 당분야에 공지된 표준 방법이 이용될 수 있다. 모상 뿌리 세포, 뿌리 세포 라인과 식물 세포를 배양하는데 다양한 배양 배지와 생물반응기(bioreactor)가 이용되고 있다(참조: Giri et al., 2000, Biotechnol Adv., 18:1; Rao et al., 2002, Biotechnol Adv., 20:101; 이들 문헌에서 인용된 임의의 참고문헌). 클론 식물은 임의의 적절한 방식으로 생산될 수 있다.

<122> 특정 구체예에서, 본 발명의 HPV 향원은 임의의 공지된 방법으로 생산될 수 있다. 일부 구체예에서, HPV 향원이 식물 또는 이의 일부분 내에서 발현된다. 단백질은 당분야에 공지된 통상적인 조건과 기술에 따라 분리되고 정제된다. 이들에는 추출(extraction), 침전(precipitation), 크로마토그래피(chromatography), 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography), 전기영동(electrophoresis) 등과 같은 방법이 포함된다. 본 발명은 당분야에 공지되고 본 명세서에 제공된 다양한 식물 발현 시스템, 예를 들면, 본 명세서에 기술된 바이러스 식물 발현 시스템을 이용한, HPV 향원의 정제와 생산 규모 확대에 관계한다.

<123> 본 발명의 많은 구체예에서, 백신 향원 산물을 분리하는 것이 바람직할 것이다. 본 발명의 단백질이 이들을 발현하는 식물 조직 또는 이의 일부분, 예를 들면, 뿌리, 뿌리 세포, 식물, 식물 세포로부터 생산되는 경우에, 본 명세서에 상세하게 기술된 방법, 또는 당분야에 공지된 임의의 적용가능 방법이 식물 재료로부터 부분적인 또는 완전한 분리에 이용될 수 있다. 발현 산물을 발현하는 식물 세포 또는 조직의 일부 또는 전체로부터 이러한 산물을 분리하는 것이 바람직한 경우에, 임의의 가능한 정제 기술이 이용될 수 있다. 당업자는 광범위한 분획과 분리 절차에 익숙하다(참조: Scopes et al., Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Janson et al., 1993; Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, Wiley-VCH, 1998; Springer-Verlag, NY, 1993; Roe, Protein Purification Techniques, Oxford University Press, 2001). 종종, 산물을 대략 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 순수하게 하는 것이 바람직하다(식물 조직 또는 유체로부터 물질을 정제하는데 유용한 특정 방법의 검토를 위하여 U.S. Patent 6,740,740과 6,841,659를 참조한다).

<124> 당업자가 인지하는 바와 같이, 소요의 백신 산물을 획득하는 방법은 추출이다. 식물 재료(가령, 뿌리, 잎 등)는 추출하여 잔류 바이오매스로부터 소요의 산물을 이전하고 상기 산물의 농도와 순도를 증가시킨다. 식물은 완충된 용액 내에서 추출될 수 있다. 가령, 식물 재료는 예로써, 인산염 완충액으로 완충된 일정량의 차가운 물 내로, 중량으로 1:1의 비율로 이전될 수 있다. 프로테아제 저해물질이 필요에 따라 추가될 수 있다. 식물 재료는

완충액 내에서 현탁되는 동안 활발한 혼합 또는 분쇄에 의해 파괴될 수 있고, 추출된 바이오매스는 여과 또는 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 용액에 담겨 운반된 산물은 추가적인 단계에 의해 더욱 정제되거나, 또는 냉동-건조 또는 침전에 의해 건조 분말로 전환될 수 있다. 추출은 압축(pressing)에 의해 수행될 수 있다. 식물 또는 뿌리는 프레스(press) 내에서 압축함으로써 또는 이들이 촘촘하게 놓인 롤러(roller)를 통과할 때 으갠으로써 추출될 수 있다. 으갠 식물로부터 발현된 유체는 회수되고 당분야에 널리 공지된 방법에 따라 가공된다. 압축에 의한 추출은 더욱 농축된 형태로 산물의 방출을 가능하게 한다. 하지만, 산물의 전체적인 수율은 산물이 용액에서 추출되는 경우보다 낮다.

<125> 백신

<126> 본 발명에서는 HPV 감염의 치료적 및/또는 예방적 처리를 위한 백신으로서 활성을 나타내는 치료 용도의 약학적 항원 단백질, 예를 들면, 항원 단백질 또는 면역원성 일부분을 제시한다. 더 나아가, 본 발명에서는 수의학적 용도, 예를 들면, 수의 적용에서 활성을 나타내는 항원 단백질 또는 면역원성 이의 일부분을 제시한다. 특정 구체예에서, 항원은 본 발명의 식물 또는 이의 일부분(가령, 뿌리, 세포, 새싹, 세포 라인, 식물 등)에 의해 생산된다. 특정 구체예에서, 제시된 HPV 항원은 식물, 식물 세포 및/또는 식물 조직(가령, 새싹, 싹튼 싹, 뿌리, 뿌리 배양액, 클론 세포, 클론 세포 라인, 클론 식물 등) 내에서 발현되고, 개체에 약학적 투여를 위한 제조에서 식물로부터 직접적으로 이용되거나, 또는 부분적으로 정제되거나 정제될 수 있다.

<127> 본 발명에서는 필요 개체에 투여될 때 약학적 활성을 유지하는 항원을 발현하는 식물, 식물 세포와 식물 조직을 제시한다. 특정 구체예에서, 개체에는 척추동물(vertebrate)(가령, 인간과 같은 포유동물)이 포함된다. 본 발명에 따라, 개체에는 소, 양, 개, 고양이 등과 같은 수의 개체가 포함된다. 특정 측면에서, 식용가능 식물 또는 이의 일부분(가령, 새싹, 뿌리)은 치료 효과량으로 개체에 경구 투여된다. 일부 측면에서, 하나이상의 HPV 항원이 본 명세서에 기술된 바와 같이, 약학적 제제물 형태로 제공된다,

<128> 본 발명의 백신 조성물은 하나이상의 HPV 항원을 함유한다. 특정 구체예에서, 투여된 백신 조성물에 본 발명의 최소한 2개의 HPV 항원이 내포된다.

<129> 본 발명에 따라, 백신 항원으로 개체의 치료는 생리학적 효과를 유도하도록 의도된다. 백신 단백질은 질환이나 질병에 대한 치유 또는 완화 특성을 나타내고, 질환이나 질병의 발병을 개선, 경감, 완화 또는 지연시키기 위하여, 또는 이러한 질환이나 질병의 증상 또는 심각도(severity)를 반전 또는 감소시키기 위하여 투여될 수 있다. 백신 항원은 예방적 특성을 나타내고, 질환, 질병 또는 수반되는 병리학적 이상의 발병을 예방 또는 지연시키기 위하여, 또는 이러한 질환, 질병 또는 수반되는 병리학적 이상의 심각도를 감소시키는데 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 항원으로 개체의 치료에 의해 유도되는 생리 효과(physiological effect)에는 생물체에 의한 감염이 저해되도록 하는 효과적인 면역 반응이 포함될 수 있다.

<130> 일부 구체예에서, 본 발명의 백신은 경구 및/또는 점막 경로에 의해 전달된다. 경구 및/또는 점막 전달은 많은 병원균(pathogen)의 감염에서 일차적인 통로인 점막 조직의 감염을 예방하는 잠재력을 갖는다. 경구 및/또는 점막 전달은 전신 면역 반응을 유도할 수 있다. 점막-면역계를 자극하고 전신 면역 반응을 유도할 수 있는 항원의 경구 투여를 위한 이질성 발현 시스템의 개발에서 상당한 진전이 있어 왔다. 하지만, 경구 백신의 전달에서 기존의 노력은 효능(efficacy)을 발휘하는데 있어 상당한 양의 항원이 필요함을 증명하였다. 따라서, 다량의 표적 항원의 경제학적 생산은 효과적인 경구 백신의 산출을 위한 전제조건이다. 항원, 예를 들면, 열안정성 항원을 발현하는 식물의 개발은 이와 같은 어려움에 대한 더욱 현실적인 접근법을 대표한다.

<131> 본 발명의 약학적 제제물은 다양한 방식, 예를 들면, 경구, 비강, 장관, 비경구, 근육내 또는 정맥내, 직장, 질, 국소, 안구, 폐, 또는 접촉 적용(contact application)으로 개체에 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 식물 또는 이의 일부분 내에서 발현된 HPV 항원은 개체에 식물의 직접적인 투여에 의해 상기 개체에 경구 투여된다. 일부 측면에서, 식물 또는 이의 일부분 내에서 발현된 백신 단백질은 추출 및/또는 정제되고, 약학적 조성물의 제조에 이용된다. 의도된 용도(가령, 약학적 약물, 백신 조성물 등)에 맞게 이들 분리된 산물을 제제화하는 것이 바람직하다. 일부 구체예에서, 이들을 발현하는 식물 조직의 일부 또는 전체와 함께, 이들 산물을 제제화하는 것이 바람직할 것이다.

<132> 식물 재료와 함께 산물을 제제화하는 것이 바람직한 경우에, 관련된 수용자(가령, 인간 또는 다른 동물)에 비독성인 식물을 이용하는 것이 종종 바람직하다. 관련된 식물 조직(가령, 세포, 뿌리, 잎)은 발현된 산물의 활성 유지에 충분한 고려와 함께, 당분야에 공지된 기술에 따라 수확되고 가공될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 식용가능 식물(구체적으로, 식물의 식용가능 부분) 내에서 백신 항원을 발현하여 상기 재료가 차후에 식용

될 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 가령, 백신 항원이 경구 전달(적절하게 제제화될 때) 이후에 활성을 나타내는 경우에, 식용가능 식물 부분 내에서 항원 단백질을 생산하고, 상기 단백질이 발현된 식물 재료의 일부 또는 전체와 함께, 경구 전달을 위한 발현된 백신 항원을 제제화하는 것이 바람직하다.

<133> 제시된 백신 항원은 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 가령, 백신 산물의 효과량이 하나이상의 유기 또는 무기, 액상 또는 고형, 약학적으로 적합한 담체 물질과 함께 제제화된다. 본 발명에 따라 생산된 백신 항원은 정제(tablet), 캡슐(capsule), 트로치(troche), 분산액(dispersion), 현탁액(suspension), 용액(solution), 겔캡(gelcap), 알약(pill), 캡슐(capsule), 크림(cream), 연고(ointment), 에어로졸(aerosol), 분말 패킷(powder packet), 액상 용액(liquid solution), 용매(solvent), 희석제(diluent), 표면 활성제(surface active agent), 등장성제(isotonic agent), 농후제(thickening agent) 또는 유화제(emulsifying agent), 보존제(preservative), 고형 결합제(solid binding)와 같은 제형(dosage form)으로 이용될 수 있는데, 단서로써, 상기 단백질의 생물학적 활성이 이런 제형에 의해 파괴되지 않아야 한다.

<134> 일반적으로, 조성물은 다양한 상이한 약학적으로 허용되는 담체, 어쥘런트, 또는 운반제, 또는 하나이상의 이와 같은 담체, 어쥘런트, 또는 운반제의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "약학적으로 허용되는 담체, 어쥘런트, 또는 운반제"에는 약학적 투여에 적합한 용매, 분산 매체, 코팅, 항균제와 항진균제, 등장성제와 흡수 지연제 등이 포함된다. 약학적으로 허용되는 담체로서 이용될 수 있는 물질의 실례에는 당, 예를 들면, 락토오스, 글루코오스와 수크로오스; 전분, 예를 들면, 옥수수 전분과 감자 전분; 셀룰로오스와 이의 유도체, 예를 들면, 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스(sodium carboxymethyl cellulose), 에틸 셀룰로오스(ethyl cellulose)와 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate); 분말 트래거캔스(powdered tragacanth); 맥아(malt); 젤라틴(gelatin); 활석(talc); 부형제, 예를 들면, 코코아 버터(cocoa butter)와 좌약 왁스(suppository wax); 기름, 예를 들면, 땅콩 기름, 목화씨 기름, 잇꽃 기름, 참기름, 올리브 기름, 옥수수 기름과 콩 기름; 글리콜, 예를 들면, 프로필렌 글리콜; 에스테르, 예를 들면, 에틸 올레에이트(ethyl oleate)와 에틸 라우레이트(ethyl laurate); 아가(agar); 완충제(buffering agent), 예를 들면, 수산화마그네슘(magnesium hydroxide)과 수산화알루미늄(aluminum hydroxide); 알긴산(alginic acid); 발열원-없는 물(pyrogen-free water); 등장성 염수(isotonic saline); 링거액(Ringer's solution); 에틸 알코올(ethyl alcohol); 인산염 완충액; 다른 비-독성 적합성 윤활제, 예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트(sodium lauryl sulfate)와 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate); 착색제(coloring agent); 방출제(releasing agent); 코팅제(coating agent); 감미료(sweetening agent); 풍미제(flavoring agent)와 방향제(perfuming agent); 보존제(preservative); 항산화제(antioxidant) 역시 제조자의 판단에 따라, 조성물 내에 존재할 수 있다(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Fifteenth Edition, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton PA, 1975)). 가령, 백신 항원 산물은 통상적인 혼합, 과립화(granulating), 당의정(dragee)-만들기, 용해, 동결 건조(lyophilizing), 또는 유사한 과정에 의해 약학적 조성물로서 제공될 수 있다.

<135> 추가적인 백신 성분

<136> 본 발명의 백신은 개체에 투여될 때 상기 백신의 면역원성을 강화시키기 위한 임의의 적절한 어쥘런트(adjuvant)를 추가적으로 포함할 수 있다. 가령, 이런 어쥘런트에는 제한 없이, Quil A와 QS-21과 같은 식용 등급(food grade) QS의 정제된 추출물을 비롯한 키라야 사포닌(*Quillaja saponaria*, QS)의 추출물, 명반, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, MF59, Malp2, 불완전 Freund 어쥘런트; 완전 Freund 어쥘런트; 3 De-O-아세틸화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)가 포함된다. 다른 어쥘런트에는 면역조절 올리고뉴클레오타이드, 예를 들면, WO 96/02555에 기술된 비메틸화된 CpG 서열이 포함된다. 앞서 언급된 것들과 같은 상이한 어쥘런트의 조합은 TH1 세포 반응의 선호적인 자극인자인 어쥘런트를 제공할 것으로 기대된다. 가령, QS21은 3D-MPL과 함께 제제화될 수 있다. QS21:3D-MPL의 비율은 전형적으로, 1:10 내지 10:1; 1:5 내지 5:1; 종종, 실질적으로 1:1이다. 일부 구체예에서, 최적 상승효과(synergy)를 위한 범위는 2.5:1 내지 1:1 3D-MPL:QS21이다. 인간 백신 제제에 적합한 정제된 QS 추출물의 용량은 체중 kg당 0.01 mg 내지 10 mg이다.

<137> 특정의 열안정성 단백질(가령, 리케나아제)은 자체적으로 면역반응 강화 활성을 나타내고, 따라서 HPV 항원과의 융합체로 또는 독립적으로 이런 단백질의 이용은 어쥘런트의 이용으로 간주될 수 있다. 따라서, 본 발명의 백신 조성물은 하나이상의 어쥘런트를 더욱 함유할 수 있다. 특정의 백신 조성물은 2가지 이상의 어쥘런트를 함유할 수 있다. 더 나아가, 제제화와 투여 경로에 따라, 특정의 어쥘런트가 특정 제제 및/또는 조합에서 바람직할 수도 있다.

<138> 특정 상황에서, 피하 또는 근육내 주사된 백신 산물의 하나이상의 성분(가령, 항원)의 흡수를 지연시킴으로써

본 발명의 백신의 효과를 연장시키는 것이 바람직하다. 이는 수용성(water solubility)이 불량한 결정성 또는 무정형 물질의 액상 현탁액의 이용으로 달성될 수 있다. 이러한 산물의 흡수 속도는 용해 속도에 좌우되고, 상기 용해 속도는 크기와 형태에 좌우된다. 대안으로 또는 부가적으로, 비경구 투여된 산물의 지연된 흡수는 오일 운반제(oil vehicle)에 상기 산물을 용해 또는 현탁시킴으로써 달성된다. 주사가능 저장소 형태(injectable depot form)는 폴리락티드-폴리글리콜리드(poly(lactide-polyglycolide))와 같은 생물분해성 중합체 내에서 단백질의 마이크로피포 매트릭스(microencapsule matrix)를 형성함으로써 만들어진다. 산물 대 중합체의 비율 및 이용된 특정 중합체의 성격에 따라, 방출 속도가 통제될 수 있다. 다른 생물분해성 중합체의 실례에는 폴리(오르토에스테르)(poly(orthoester))와 폴리(안하이드라이드)(poly(anhydride))가 포함된다. 주사가능 저장소 체제는 또한, 신체 조직과 양립하는 리포솜(liposome) 또는 마이크로에멀전(microemulsion) 내에 단백질을 가둠으로써 제조된다. 대안적 중합성 전달 운반체가 경구 체제에 이용될 수 있다. 가령, 생물분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 등이 이용될 수 있다. 항원 또는 이의 면역학적 일부분은 예로써, 중합성 전달 운반체와 조합된 마이크로 입자로서 체제화될 수 있다.

<139> 백신 항원의 장관 투여된 제조물은 고형, 반-고형, 현탁액 또는 에멀전 형태로 도입되고, 임의의 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 물, 현탁제(suspending agent)와 유화제(emulsifying agent)와 혼합될 수 있다. 이들 항원은 특히, 개체에서 발병을 예방하거나, 또는 이미 확립된 질병을 완화하거나 지연시키기 위한 예방 조치(preventive measure)로서 투여되는 경우에, 펌프 또는 지속-방출 형태(sustained-release form)로 투여될 수도 있다. 보충 활성 화합물, 예를 들면, 치료되는 질환이나 임상적 이상에 독립적인 활성을 나타내는 화합물, 또는 본 발명의 화합물의 활성을 강화시키는 화합물이 이들 조성물 내에 통합되거나, 또는 이들 조성물과 함께 투여될 수 있다. 풍미제와 착색제가 이용될 수 있다.

<140> 임의적으로 식물 조직과 함께, 본 발명의 백신 산물은 약학적 조성물로서 경구 투여에 특히 적합하다. 경구 액상 체제가 이용될 수 있는데, 이는 소아 집단에게 특히 유용하다. 수확된 식물 재료는 원하는 치료 산물의 특성 및 이의 원하는 형태에 따라 다양한 방법(가령, 자연 건조, 냉동 건조, 추출 등)으로 가공될 수 있다. 앞서 기술된 이들 조성물은 단독으로, 또는 식품 또는 사료 또는 음료와 함께 경구 섭취된다. 경구 투여용 조성물은 식물; 이들 식물의 추출물 및 건조 분말, 식품, 수성이나 비-수성 용매, 현탁액 또는 에멀전으로 제공되는, 감염된 식물로부터 정제된 단백질을 함유한다. 비-수성 용매의 실례는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 식물성 오일(vegetable oil), 어유(fish oil)와 주입가능 유기 에스테르(organic ester)이다. 수성 담체에는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스 용액(Ringer's dextrose solution), 텍스트로스 + 염화나트륨 용액, 락토오스 또는 고정된 오일을 포함하는 링거액을 비롯한 염수와 완충된 의학적 비경구 운반체(parenteral vehicle)를 함유하는 물, 물-알코올 용액, 에멀전 또는 현탁액이 포함된다. 건조 분말의 실례에는 건조된, 예를 들면, 냉동 건조된, 자연 건조된, 또는 스프레이 건조된 임의의 식물 바이오매스가 포함된다. 가령, 이들 식물은 바이오매스가 중량으로 5% 이하의 수분을 포함할 때까지 대략 120°F에서 상업적 자연 건조기(air dryer) 내에 이들을 배치함으로써 건조될 수 있다. 건조된 식물은 대형 고형물(bulk solid)로서 추가적인 가공을 위하여 보관되거나, 또는 소량의 메시 크기 분말로 분쇄함으로써 더욱 가공된다. 대안으로 또는 부가적으로, 냉동-건조가 자연 건조에 민감한 산물에 이용될 수 있다. 산물은 바이오매스가 중량으로 대략 5% 이하의 수분을 포함할 때까지 이들을 진공 건조기(vacuum drier) 내에 위치시키고 진공하에 냉동 건조시킴으로써 냉동 건조될 수 있다. 건조된 물질은 본 명세서에 기술된 바와 같이 추가로 가공될 수 있다.

<141> 식물-유래된 물질은 하나이상의 허브 제조물로서 또는 이러한 허브 제조물과 함께 투여될 수 있다. 유용한 허브 제조물에는 액상과 고형 허브 제조물이 포함된다. 허브 제조물의 일부 실례에는 톱크(tincture), 추출물(가령, 수성 추출물, 알코올 추출물), 데코션(decoction), 건조된 제조물(가령, 자연 건조된, 스프레이 건조된, 동결된, 또는 냉동 건조된), 분말(가령, 동결 건조된 분말) 및 액체가 포함된다. 허브 제조물은 임의의 표준 전달 운반체, 예를 들면, 캡슐, 정제, 좌약, 액형(liquid dosage) 등으로 제공될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 허브 제조물의 다양한 제제와 전달 양식이 본 발명에 적용될 수 있다.

<142> 본 발명의 뿌리 라인, 세포 라인, 식물, 추출물, 분말, 건조된 제조물 및 정제된 단백질 산물 또는 핵산 산물 등은 앞서 언급된 하나이상의 부형제(excipient)를 포함하거나 포함하지 않는 피포된 형태(encapsulated form)일 수도 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 알약과 과립의 고형 제형(dosage form)은 코팅(coating)과 약껍질(shell), 예를 들면, 장용 코팅(enteric coating), 방출 통제 코팅(release controlling coating) 및 약학적 체제화 분야에 널리 공지된 다른 코팅으로 제조될 수 있다. 이런 고형 제형에서, 활성 약제는 최소한 하나의 불활성 희석제, 예를 들면, 수크로오스, 락토오스 또는 전분과 혼합될 수 있다. 이런 제형은 통상의 관례에서처럼, 불활성

희석제 이외에 추가의 물질, 예를 들면, 정제화 윤활제(tableting lubricant) 및 마그네슘 스테아레이트와 미세 결정성 셀룰로오스와 같은 다른 정제화 보조제(tableting aid)를 함유할 수 있다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 이들 제형은 완충제(buffering agent)를 함유할 수 있다. 이들은 임의적으로, 불투명화제(opacifying agent)를 함유하고, 지연된 방식으로 장관(intestinal tract)의 특정 부분 내에만 활성 성분을 방출하는 조성물일 수도 있다. 이용될 수 있는 내포(embedding) 조성물의 실례에는 중합성 물질과 왁스가 포함된다.

<143> 일부 방법에서, 본 발명의 HPV 항원을 발현하는 식물 또는 이의 일부분, 또는 이런 식물의 바이오매스는 의료 식품으로서 경구 투여된다. 이런 식용가능 조성물은 고형 형태이면 생으로 식용함으로써, 또는 액상 형태이면 음용함으로써 소비된다. 식물 재료는 사전 가공 단계 없이 또는 최소의 요리 제조(culinary preparation) 이후에 직접적으로 섭취될 수 있다. 가령, 백신 단백질은 직접적으로 식용될 수 있는 새싹 내에서 발현된다. 가령, 백신 항원은 알파파 새싹, 녹두 새싹, 또는 시금치 또는 상추 잎 새싹 등에서 발현된다. 한 구체예에서, 식물 바이오매스가 가공되고, 가공 단계 이후에 회수된 물질이 섭취된다.

<144> 본 발명에 이용하기 적합한 가공 방법은 식품 또는 사료 업계에서 통상적으로 이용되는 방법이다. 이런 방법의 최종 산물은 상당한 양의 발현된 항원을 전형적으로 함유하고, 편의하게 식용되거나 음용된다. 이러한 최종 산물은 다른 식품 또는 사료 형태, 예를 들면, 염, 담체, 풍미 강화제(favor enhancer), 향생제 등과 혼합되고 고형, 반-고형, 현탁액, 에멀전 또는 액상 형태로 소비될 수 있다. 이들 방법은 보존 단계, 예를 들면, 저온 살균(pasteurization), 조리(cooking), 또는 보존제(preservation agent)의 추가를 포함할 수 있다. 본 발명에서 식용가능 또는 음용가능 식물 물질을 생산하기 위하여 임의의 식물이 이용되고 가공된다. 식물-유래된 제조물 내에서 HPV 항원의 양은 상기 산물에 특이적인 프로브 또는 항체를 이용한 당분야의 표준 방법, 예를 들면, 겔 전기영동, ELISA, 또는 웨스턴 블랏 분석으로 조사될 수 있다. 이러한 결정은 백신 항원 단백질의 양을 표준화 시키는데 이용될 수 있다. 가령, 백신 항원의 양은 예로써, 단일 분량(single dose)을 섭취하기 위하여 음용되거나 식용되는 재료의 양이 표준화될 수 있도록 상이한 수준의 단백질을 보유하는 산물의 배치를 혼합함으로써 결정되고 조절될 수 있다. 하지만, 본 발명에 따른 통제된 조절가능 환경의 이용은 이런 표준화 절차를 수행해야 하는 필요성을 최소화시킨다.

<145> 식물 세포 또는 조직 내에서 생산되고 개체에 의해 식용되는 단백질은 소화계에 의해 흡수된다. 최소한으로 가공된 식물 조직을 섭취하는 한 가지 이점은 식물 세포 내에서 단백질의 피포(encapsulation) 또는 격리(sequestration)를 제공한다는 것이다. 따라서, 산물은 위 또는 장에 도달하기에 앞서 상부 소화관(upper digestive tract) 내에서 소화로부터 상당한 보호를 받고, 더욱 높은 비율의 활성 산물이 흡수에 가용하다.

<146> 본 발명의 약학적 조성물은 치료적으로 또는 예방적으로 투여될 수 있다. 이들 조성물은 질병을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 가령, HPV 감염으로 고통받거나 이러한 감염이 발생할 위험이 높은 임의의 개체가 치료될 수 있다. 개체는 증상에 의해 진단되지 않은 질병이 발병할 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 가령, 개체가 HPV 감염에 노출 위험이 상대적으로 높은 상황에 처해 있거나 처하게 되면, 상기 개체는 상기 질환이 발병할 위험이 높은 것으로 간주될 것이다. 유사하게, 한 개체의 가족 구성원, 친구 또는 동료가 HPV 감염으로 진단되면, 상기 개체는 이러한 질환이 발병할 위험이 높은 것으로 간주될 수 있다.

<147> 경구 투여를 위한 액상 제형에는 약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽과 엘릭시르(elixir)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 활성 약제 이외에, 이들 액상 제형은 당분야에 통상적으로 이용되는 불활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 용해제 및 유화제, 예를 들면, 에틸 알코올(ethyl alcohol), 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 에틸 카보네이트(ethyl carbonate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 벤질 알코올(benzyl alcohol), 벤질 벤조에이트(benzyl benzoate), 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아마이드(dimethylformamide), 기름(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 배아, 올리브, 피마자, 참깨 기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올(tetrahydrofurfuryl alcohol), 소르비탄(sorbitan)의 폴리에틸렌 글리콜과 지방산 에스테르, 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제(wetting agent), 유화제와 현탁제, 감미료, 풍미제 및 방향제와 같은 어쥬반트(adjunct) 역시 함유할 수 있다.

<148> 직장 또는 질 투여를 위한 조성물은 좌약(suppository) 또는 유지 관장제(retention enemas)인데, 이는 본 발명의 조성물을 적절한 비-자극성 부형제 또는 담체, 예를 들면, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 실온에서 고체이지만 체온에서 액체이고, 따라서 직장 또는 질강(vaginal cavity) 내에서 용해되고 활성 단백질을 방출하는 좌약 왁스(suppository wax)와 혼합함으로써 제조될 수 있다.

<149> 본 발명의 백신 조성물의 국소, 경점막 또는 경피 투여를 위한 제형에는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔,

분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치가 포함된다. 활성 단백질, 또는 이의 제조물은 무균 조건 하에서 약학적으로 허용되는 담체 및 임의의 필요한 보존제 또는 완충제와 혼합된다. 경점막 또는 경피 투여를 위하여, 투과되는 장벽에 적합한 침투제(penetrant)가 제제 내에 이용될 수 있다. 이런 침투제는 당분야에 널리 공지되어 있는데, 여기에는 예로써, 경점막 투여의 경우에, 세정제, 담즙산염(bile salt)과 푸시딘산(fusidic acid) 유도체가 포함된다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌약의 이용을 통하여 달성될 수 있다. 경피 투여를 위하여, 항원 또는 이의 면역원성 부분은 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 연고, 고약, 젤, 또는 크림으로 제제화된다. 안과 제제, 점안약(eardrop)과 점안약(eyedrop) 역시 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 기대된다. 부가적으로, 본 발명에서는 신체에 백신 단백질의 통제된 전달을 제공하는 부가적인 이점을 갖는 경피 패치의 이용을 계획한다. 이런 제형은 적절한 매체 내에서 백신 산물을 현탁시키거나 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 피부를 통한 백신 단백질의 유동(flux)을 증가시키기 위하여 흡수 강화제(absorption enhancer)가 이용될 수 있다. 속도는 속도 조절 막(rate controlling membrane)을 제공함으로써, 또는 중합체 매트릭스 또는 젤 내에 백신 단백질을 분산시킴으로써 통제될 수 있다.

<150> 본 발명의 조성물은 소요의 결과를 달성하는데 필요한 양으로 필요한 시간 동안 투여된다. 본 발명의 특정 구체예에서, 약학적 조성물의 "치료 효과량"은 개체 내에서 질병을 치료, 완화, 또는 예방하는데 효과적인 양이다. 따라서, 본 명세서에서, "질병을 치료, 완화, 또는 예방하는데 효과적인 양"은 임의의 개체 내에서 질병을 치료, 완화, 또는 예방하는 약학적 조성물의 비-독성이면서 충분한 양을 지칭한다. 가령, "치료 효과량"은 감염(가령, 바이러스 감염, HPV 감염 등)을 치료, 완화, 또는 예방하는 양이다.

<151> 요구되는 정확한 양은 개체의 종류, 연령과 전반적인 상태, 질병의 단계, 특성의 약학적 혼합물, 투여 방식 등에 따라, 개체마다 상이하다. 본 발명의 탄저균(anthrax) 항원, 또는 이러한 항원을 발현하는 식물 및/또는 이의 제조물은 투여의 편의 및 용량의 균일성(uniformity)을 위하여 투약단위 형태(dosage unit form)로 제제화된다. 본 명세서에서 "투약 단위 형태"는 치료되는 환자에 적합한 백신 조성물의 물리적으로 독립된 단위를 지칭한다. 하지만, 본 발명의 조성물의 총 일일 용법(total daily usage)은 전형적으로, 건전한 의학적인 판단의 범위 내에서 담당 의사에 의해 결정된다. 임의의 특정 환자 또는 생물체에 대한 구체적인 치료 효과적 용량 수준은 감염의 심각도 또는 위험; 이용된 특정 화합물의 활성; 이용된 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강과 성별; 환자의 식이; 환자의 약동학적 상태(pharmacokinetic condition); 이용된 특정 화합물의 투여 시간, 투여 경로와 배출 속도; 치료의 지속 기간; 이용된 백신 조성물과 조합으로 또는 동시에 이용되는 약제; 의 약 분야에 널리 공지된 유사 인자를 비롯한 다양한 인자에 좌우된다.

<152> 본 발명의 약학적 조성물은 복합 요법(combination therapy)(가령, 복합 백신 요법)에 이용될 수 있다, 다시 말하면, 이들 약학적 조성물은 하나이상의 다른 소요의 백신접종 절차와 동시에, 이러한 절차 이전에, 또는 이러한 절차 이후에 투여될 수 있다. 복합 섭생(combination regimen)에 이용되는 요법(가령, 백신, HPV 감염의 치료적 절차)의 특정 조합은 소요의 치료제 및/또는 절차의 양립성(compatibility) 및 달성되는 소요의 치료 효과를 고려해야 한다. 이용되는 이들 요법 및/또는 백신은 동일한 질환에 대한 소요의 효과(가령, 본 발명의 화합물은 다른 HPV 백신과 동시에 투여된다)를 달성하거나, 또는 상이한 효과를 달성할 수 있다. 특정 구체예에서, 백신 조성물은 최소한 2개의 HPV 항원을 함유한다. 가령, 특성의 백신 조성물은 본 발명의 최소한 2개의 HPV 항원(가령, 본 발명의 항원을 포함하는 HPV16 도메인의 E7과 HPV 18 도메인의 E7)을 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 이들 복합 백신은 HPV 항원을 포함하는 하나의 열안정성 용해 단백질 함유한다; 일부 측면에서, HPV 항원을 포함하는 2개 이상의 열안정성 용해 단백질이 제공된다. 특정 구체예에서, 복수 항원은 동일한 균주의 HPV로부터 유래되고, 상이한 단백질로부터 유래된 항원을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 복수 항원은 동일한 균주의 HPV로부터 유래되고, 동일한 단백질로부터 유래된 항원(가령, 동일한 단백질의 상이한 도메인)을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 복수 항원은 상이한 균주의 HPV로부터 유래되고, 상이한 단백질로부터 유래된 항원을 포함할 수 있다. 다른 조합에서는 상이한 균주로부터 유래된 복수 항원 및 동일한 단백질의 이용을 계획한다. 상기한 전형적인 복합의 변이 및/또는 결합이 기대된다. 가령, 일부 구체예에서, 상이한 균주로부터 1개의 E7, 2개의 E7 또는 3개의 E7 도메인을 통합하여 본 발명의 백신 조성물을 구성한다. 복합 백신이 이용되는 경우에, HPV 항원의 임의의 결합이 이런 복합에 이용될 수 있다.

<153> 키트

<154> 한 측면에서, 본 발명에서는 본 발명의 약학적 조성물의 한가지이상의 성분으로 채워진 하나이상의 용기 내에서, 본 발명에 따른 HPV 항원을 생산하는 살아있는 싹튼 실생, 클론 실체 또는 식물, 또는 제조물, 추출물, 또는 이러한 백신을 함유하는 약학적 조성물을 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제시한다. 특정 구체예에서, 약학적 팩 또는 키트는 복합 요법으로서 이용을 위한 다른 승인된 치료제를 포함한다. 임의적으로, 이런 용기와

관련하여 약학적 산물의 제조, 이용 또는 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 규정된 형태로 공고(notice)가 있을 수 있는데, 이러한 공고는 인간 투여를 위한 제조, 이용, 또는 판매에 관한 당국의 승인 사항을 반영한다.

<155> 치료 반응물을 포함하는 키트가 제시된다. 무제한적 실험으로써, HPV 백신이 경구 제제로서 제공되고 치료제로서 투여될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, HPV 백신이 투여를 위한 주사가능 제제로 제공될 수 있다. 약학적 복용량 또는 이에 대한 사용설명서가 HPV 감염으로 고통받고 있거나 HPV 감염의 위험이 있는 개체에 투여를 위한 키트에 제공된다.

<156> 아래의 대표적인 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 결코 한정하지 않는다. 실제로, 본 발명에 도시되고 기술된 것들 이외에, 본 발명의 다양한 변형 및 이의 많은 다른 구체예는 아래의 실시예 및 본 명세서에 인용된 과학 문헌과 특허 문헌을 비롯한 본 문서의 전체 내용으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 아래의 실시예는 정보, 예시와 보도(guidance)를 포함하는데, 이들은 다양한 구체예 및 이의 등가물에서 본 발명의 실시예 적합하도록 변경될 수 있다.

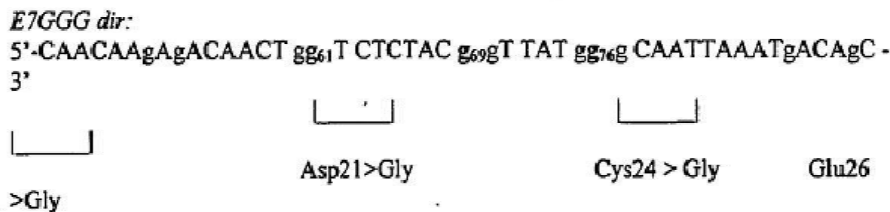
실시예

<157> 실시예 1. 백신 후보 구조체의 산출

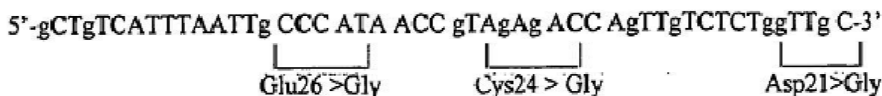
<158> 인간 유두종 바이러스로부터 항원 서열의 산출

<159> 안전성 우려로 인하여, pQE30 내로 BamHI/PstI 제한 부위 사이에 이미 클론된 HPV16 E7 종양유전자(K02718, Seedorf et al., 1985, Virology, 145:181)(pQE30-E7)는 Quikchange 직접 부위 돌연변이유발(site directed mutagenesis) 키트(Stratagene)를 이용하여 돌연변이시커 플라스미드 pQE30-E7GGG를 산출하였다. 3 포인트 돌연변이를 E7 유전자의 pRB-결합 부위 내로 도입하였는데, 이들은 각각, 이와 같은 돌연변이를 도입하기 위하여 설계된 전방과 후방 "신속 폴리뉴클레오티드 액상 크로마토그래피"-정제된 프라이머의 굵게 표시된 올리고뉴클레오티드에 의해 지시된다.

<160> E7GGG dir:



<162> E7GGG rev:



<164> 이들 도입된 돌연변이는 E7 단백질 서열 내에서 3개 아미노산의 치환: D21G(Asp21 > Gly), C24G(Cys24 > Gly), E26G(Glu26 > Gly)를 유발하고, E7 단백질 형질전환 가능성을 배제시켰다. E7GGG로 명명된 생성 유전자의 진정성(authenticity)은 염기서열분석으로 입증하였다.

<165> HPV16 E7(K02718, Seedorf et al., supra) (SEQ ID NO.: 1)

<166> ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGA

<167> GACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAG

<168> GATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATTACA

<169> ATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAA

<170> AGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAG

<171> GAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA

<172> E7 (SEQ ID NO.: 2):

<173> MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI

<174> VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

<175> HPV16 E7GGG (SEQ ID NO.: 3):

<176> ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGA

<177> GACAACCTGGTCTCTACGGTTATGGGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAG

<178> GATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACA

<179> ATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAA

<180> AGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAG

<181> GAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA

<182> E7GG (SEQ ID NO.: 4):

<183> MHGDTPTLHEYMLDLQPETTGLYGYGQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI

<184> VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

<185> 열안정성 담체 구조체의 산출

<186> 전장 고유 클로스트리디움 테르모셀룸(*Clostridium thermocellum*) 리케나아제, LicB는 리더 펩티드(Lp), N-말단 일부분(A), 표면 루프(I), C-말단 일부분(C), Pro-Thr 상자 및 셀룰로솜(cellulosome)-결합 도메인(C-BD)으로 순차적으로 구성된다. LicB 인코딩 유전자로부터 Lp, Pro-Thr 상자와 C-BD 인코딩 서열을 제거하고, 상기 분자를 순환 치환하여 N-과 C-말단을 반전시키고(Musiyuchuk et al., 2007, Influenza and Other Respiratory Viruses, 1:1), 표적 서열을 클로닝하기 위한 독특한 제한 엔도뉴클레아제(restriction endonuclease) 부위를 새로운 N-과 C-말단에서뿐만 아니라 표면 루프(I) 내로 통합하였다. 결과의 조작된 담체 분자 서열은 검증하고 LicKM으로 명명한다.

<187> SEQ ID NO.: 5:

<188> GGATCCTTAATTAATAATGGGAGGTTCTTATCCATATAAGTCTGGTGAGTATAG

<189> AACTAAGTCTTTCTTTGGATATGGTTATTATGAAGTTAGGATGAAGGCTGCAA

<190> AGAACGTTGGAATGTTTCTTTCTTTCTTACTTATACTGGACCATCTGATAACA

<191> ACCCATGGGATGAGATTGATATTGAGTTTCTTGAAAGGATACTACTAAGGTT

<192> CAATTCAACTGGTATAAGAATGGTGTGGTGGAACGAGTATCTTCATAACCT

<193> TGGATTGATGCTTCTCAAGATTTTCATACTTATGGTTTTGAGTGGAGACCAG

<194> AITATATTGATTTTTATGTTGATGGAAGAAGGTTTATAGAGGTACTAGAAAC

<195> ATTCCAGTTACTCCTGGAAGATTATGATGAATCTTTGGCCAGGAATTGGTGT

<196> TGATGAATGGCTTGGTAGATATGATGGAAGAACTCCACTCAAGCTGAGTAT

<197> GAGTATGTTAAGTATTATCCAAACGGTAGATCTGAATTCAAGCTTGTTGTTAA

<198> TACTCCATTTGTTGCTGTTTTCTCTAACTTTGATTCTTCTCAATGGGAAAAGGC

<199> TGATTGGGCTAACGGTTCTGTTTTTAACTGTGTTTGAAGCCATCTCAAGTTA

<200> CTTTTCTAACGGAAGATGATTCTTACTTTGGATAGAGAGTATGTCGACCAT

<201> CATCATCATCATCATTGACTCGAGCTC

- <202> SEQ ID NO.: 6:
- <203> MGGSYPYKSGEYRTKSFFGYGYEVRMKAANKVGISSFFTYTGPSDNNPWDEI
- <204> DIEFLGKDTTKVQFNWYKNGVGGNEYLHNLGFDASQDFHTYGFWRPDYIDFY
- <205> VDGKKVYRGTRNIPVTPGKIMMNLWPGIGVDEWLGRYDGRTPQLAEYEVVKYY
- <206> PNGRSEFKLVVNTPFVAVFSNFDSSQWEKADWANGSVFNCVWKPSQVTFSSNGK
- <207> MILTLDREYVDHHHHHH
- <208> 특정 구조체를 위하여, LicKM의 N-과 C-말단에서 PR1a 신호 펩티드와 KDEL 서열을 조직하였다. 이들 구조체의 핵산과 아미노산 서열은 SEQ ED NO.: 7과 SEQ ID NO.: 8에 열거된다.
- <209> SEQ ID NO.: 7:
- <210> GGATCCTTAATTAATAATGGGATTGTTCTCTTTTACAATTGCCTTCATTTCTT
- <211> CTGTCTCTACACTTCTCTTATTCCTAGTAATATCCACTCTTGCCGTGCCCAA
- <212> AATGGAGGTTCTTATCCATATAAGTCTGGTGAAGTATAGAACTAAGTCTTTCTT
- <213> TGGATATGGTTATTATGAAGTTAGGATGAAGGCTGCAAAGAAGCTTGAATT
- <214> GTTCTCTCTTTCTTTACTTATACTGGACCATCTGATAACAACCATGGGATGAG
- <215> ATTGATATTGAGTTTCTTGAAAGGATACTACTAAGGTTCAATTCAACTGGTA
- <216> TAAGAATGGTGTGGTGGAAACGAGTATCTCATAACCTGGATTGTATGCTT
- <217> CTCAAGATTTTCATACTTATGGTTTTGAGTGGAGACCAGATTATATTGATTTTT
- <218> ATGTTGATGGAAGAAGGTTTATAGAGGTACTAGAAACATTCCAGTTACTCCT
- <219> GGAAAGATTATGATGAATCTTTGGCCAGGAATTGGTGTGATGAATGGCTTG
- <220> GTAGATATGATGGAAGAACTCCACTTCAAGCTGAGTATGAGTATGTTAAGTA
- <221> TTATCCAAACGGTAGATCTGAATTCAAGCTTGTGTTAATACTCCATTGTTGC
- <222> TGTTTTCTCTAACTTTGATTCTTCTCAATGGGAAAAGGCTGATTGGGCTAACG
- <223> GTTCTGTTTTTAAGTGTGTTTGAAGCCATCTCAAGTTACTTTTTCTAACGGAA
- <224> AGATGATTCTTACTTTGGATAGAGATATGTCGACCATCATCATCATCAT
- <225> AAGGATGAACTTTGAATCGAGCTC
- <226> SEQ ID NO.: 8:
- <227> MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAQNGGSYPYKSGEYRTKSFFGYGYEVR
- <228> RMKAANKVGISSFFTYTGPSDNNPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNWYKNGVGGNE
- <229> YLFINLGFDAQDFHTYGFWRPDYIDFYVDGKKVYRGTRNIPVTPGKIMMNLW
- <230> PGIGVDEWLGRYDGRTPQLAEYEVVKYYPNGRSEFKLVVNTPFVAVFSNFDSSQ
- <231> WEKADWANGSVFNCVWKPSQVTFSSNGKMILTLDREYVDHHHHHHKDEL
- <232> 제조합 항원 구조체의 산출
- <233> pBR322 플라스미드로부터 유래되고, 높은-수준 전사와 번역을 촉진하는 T7 박테리오파지(bacteriophage) 유전자 10의 특징을 이용하도록 조작된 pET 발현 벡터가 이용되었다. 상기 박테리오파지 인코딩된 RNA 중합효소는 T7 파지 계놈을 제외한 다른 계놈에서 좀처럼 발견되지 않는 T7 프로모터 서열에 고도로 특이적이다(도 1). pET-32는 상기 벡터 내로 클론된 변형된 리케나아제 서열의 루프 영역 내로 E7과 E7GGG 구조체를 융합하는데 이용되었다. 상류 서열 PR-1A(병원균-관련된 단백질 1A), 소포체(endoplasmic reticulum) 보존 서열(KDEL) 또는 액포(vacuolar) 보존 서열(VAC) 및 하류 His6 태그를 포함하는 리케나아제 유전자의 촉매 도메인(catalytic

domain)이 변형된 pET-32 벡터(여기서, T7 프로모터와 T7 종결인자 사이에 영역이 결실되었다) 내에 PacI과 XhoI 부위 사이에 클론되었다. 이러한 방식으로, pET-PRACS-LicKM-KDEL과 pET-PRACS-LicKM-VAC가 획득되었다(도 2). DNA 단편 E7 또는 E7GGG는 LicKM의 루프(I) 부분 내로 서브클론하여 번역을 위한 정확한 해독틀(reading frame)에서 융합체를 제공하였다.

<234> 실시예 2. 백신 후보 항원 벡터의 산출

<235> 표적 항원 구조체 LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG는 선택된 바이러스 벡터(pBI-D4) 내로 개별적으로 서브클론하였다. pBI-D4는 대장균(*E. coli*) β -D-글루쿠로니다아제(GUS)를 코딩하는 리포터 유전자가 XbaI과 SacI 부위 사이에 TMV-유래된 벡터가 클론된 "폴리링커(polylinker)"로 대체된 pBI121-유래된 이중 벡터이다(도 3). pBI-D4는 발현되는 외래 유전자(가령, 표적 항원(가령, LicKM-E7, LicKM-E7GGG))가 TMV의 외피 단백질(CP) 유전자를 대체하는 TMV-기초된 구조체이다. 상기 바이러스는 TMV 126/183kDa 유전자, 이동 단백질(MP) 유전자 및 CP 개방 해독틀(open reading frame, ORF)로 확장되는 CP 하부게놈(subgenomic) mRNA 프로모터(sgp)를 유지한다. CP에 대한 출발 코돈(start codon)은 돌연변이된다. 상기 바이러스는 CP가 결핍되고, 이런 이유로, 체관부(phloem)를 통하여 호스트 식물 전체에 이동할 수 없다. 하지만, 바이러스 감염의 세포-세포 이동은 여전히 기능하고, 상기 바이러스는 이러한 방식으로 상부엽(upper leaf)으로 천천히 이동할 수 있다. 외래 유전자의 발현을 위하여 sgpl의 말단에서 복수의 클로닝 부위(PacI-PmeI- AgeI-XhoI)가 조작되고, 여기에 TMV 3' 비-번역된 영역(NTR)이 연결된다. 35S 프로모터가 상기 바이러스 서열의 5' 말단에 융합된다. 상기 벡터 서열은 pBI121의 BamHI과 SacI 부위 사이에 배치된다. 해머헤드 리보자임(hammerhead ribozyme)이 상기 바이러스 서열의 3'에 위치한다(Chen et al, 2003, Mol. Breed., 11:287). 이들 구조체는 담배 PR-1a 단백질로부터 신호 펩티드, 6x His 태그와 ER-보존 앵커 서열 KDEL 또는 액포 분류 서열을 인코딩하는 서열에 LicKM-E7 또는 E7GGG를 인코딩하는 서열의 융합을 포함한다(도 4). PRACS-LicKM-E7-KDEL, PRACS-LicKM-E7VAC, PRACS-LicKM-E7GGG-KDEL과 PRACS-LicKM-E7GGG-VAC를 인코딩하는 서열을 포함하는 구조체에서, 코딩 DNA는 PacI-XhoI 단편으로서 pBI-D4 내로 도입되었다. 뉴클레오티드 서열은 차후에 검증하고 최종 발현 구조체의 서브클로닝 접합(subcloning junction)에 걸쳤다(도 5).

<236> 실시예 3: 식물 산출과 항원 생산

<237> 식물의 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤

<238> 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤에 의해 달성된 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개된 일시적인 발현 시스템이 이용될 수 있다(Turpen et al., 1993, J. Virol. Methods, 42:227). 니코티아나 벤자미아나(*Nicotiana benthamiana*)의 건강한 잎은 LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG를 발현하도록 조작된 바이러스 벡터를 포함하는 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*)로 침윤시켰다.

<239> 아그로박테리움 리조제네스(*A. rhizogenes*) 균주 A4(ATCC 43057) 또는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)(GV3103)는 구조체 pBI-D4-PRACS-LicKM-E7-KDEL, pBI-D4-PRACS-LicKM-E7VAC, pBI-D4-PRACS-LicKM-E7GGG-KDEL과 PBI-D4-PRACS-LicKM-E7GGG-VAC로 형질전환시켰다. 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 배양액은 기존 문헌(Kapila et al., 1997, Plant Sci., 122:101)에 기술된 바와 같이 성장시키고 유도하였다. 2 ml 출발-배양액(새로운 콜로니로부터 선택됨)은 25 μ g/ml 카나마이신을 포함하는 YEB(5 g/l 쇠고기 추출물, 1 g/l 효모 추출물, 5 g/l 펩톤(peptone), 5 g/l 수크로오스, 2 mM $MgSO_4$) 내에서 28°C에서 하룻밤동안 성장시켰다. 출발 배양액은 25 μ g/ml 카나마이신, 10 mM 2-4-(모르폴리노)에탄설폰산(MES) pH 5.6, 2 mM 추가의 $MgSO_4$ 와 20 μ M 아세트시린곤을 포함하는 500 ml의 YEB 내로 1:500 희석하였다. 희석된 배양액은 이후, 28°C에서 ~1.7의 O.D.₆₀₀으로 하룻밤동안 성장시켰다. 이들 세포는 3,000 x g에서 15 분 동안 원심분리하고, 2.4의 O.D.₆₀₀으로 MMA 배지(MS 염, 10 mM MES pH 5.6, 20 g/l 수크로오스, 200 μ M 아세트시린곤) 내에서 재-현탁시키고, 실온에서 1 시간 동안 유지시키고, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-침윤에 이용하였다. 니코티아나 벤자미아나(*Nicotiana benthamiana*) 잎은 바늘이 없는 1회용 주사기를 이용하여 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-현탁액을 주입하였다. 침윤된 잎은 침윤후 6 일 시점에 수확하였다.

<240> 클론 뿌리와 클론 뿌리 라인 산출

<241> 페튜니아(*petunia hybrida*) 잎 외식체(explant)(1 cm x 1 cm 너비)는 0.1% NH_4Cl 에서 멸균과 무균 dH_2O 에서 6회 세척후 잎으로부터 획득하였다. 이들 외식체는 abacsial 면에 칼로 약하게 손상시키고, pBI-D4-LicKM-E7-KDEL 또는 pBI-D4-LicKM-E7GGG-KDEL을 포함하는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*) 균주 A4와 함께

배양하였다. 이들 외식체는 4℃에서 3000 rpm으로 10' 동안 원심분리된 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 하룻밤 배양액(O.D.600 nm=0.8-1)과 함께 2 분 동안 배양하고, 20 mM 아세트시린곤의 존재에서 최종 O.D.600 nm=0.5로 MMA 배지에서 재현탁시켰다. 배양의 종결 시점에서, 이들 외식체는 무균 페이퍼(sterile paper) 상에서 건조시키고 1% 글루코오스와 20 mM 아세트시린곤의 존재에서 0.8% 아가 MS 평판으로 이전하였다. 평판은 파라필름(parafilm) 처리하고 2 일 동안 실온에 유지시켰다. 이들 외식체는 이후, 500 mg/ℓ 세포탁심(Cefotaxim, Cif), 100 mg/ℓ 티멘틴(Timentin, Tim)과 25 mg/ℓ 카나마이신의 존재에서 MS 평판으로 이전하였다. 5 주후, pBID4-LicKM-E7-KDEL과 pBID4-LicKM-E7GGG-KDEL 구조체를 포함하는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로 형질전환된 페튜니아(*petunia hybrida*) 잎 외식체로부터 유전자도입 뿌리의 산출을 달성하였다. pBID4-LicKM-E7GGG-KDEL 구조체보다는 pBID4-LicKM-E7-KDEL 구조체로 형질전환으로부터 더욱 많은 뿌리가 획득되었다. Zymogram 분석에서, 검사된 페튜니아(*petunia hybrida*) 유전자도입 뿌리 내에서 E7과 E7GGG 키메라 단백질 둘 모두의 발현이 확인되었다. 이러한 발현은 리케나아제 활성과 연관된다. 이들 융합 단백질에 관련된 활성 밴드는 리케나아제 대조보다 높은 분자량 및 아그로-감염(agro-infection) 이후에 식물에 의해 발현되는 산물의 동일한 분자량을 보이는데, 이는 완전 융합 산물의 존재를 증명한다.

<242> 형질전환후, 모상근(hairy root)은 절단되고 고형의 호르몬-없는 K3 배지 내에 놓일 수 있다. 4 내지 6 일후, 가장 활발하게 성장하는 뿌리는 분리하고 반-고형(0.4% 아가) K3 배지로 이전한다. 선택된 뿌리는 22℃에서 어둠에서 배양하고, 클론 라인은 분리하고 6주마다 계대배양한다. 뿌리 및/또는 클론 라인은 리케나아제 활성 분석과 면역블랏 분석의 평가로 표적 항원 발현의 존재를 조사할 수 있다.

<243> 실시예 4: 백신 후보의 생산

<244> 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana benthamiana*) 침윤된 잎 재료의 100 mg 샘플은 감염후 4 일, 5 일, 6 일과 7 일 시점에 채취하였다. 새로운 조직은 차후의 가공되지 않은 식물 추출물의 제조 또는 융합 단백질 제조를 위하여 -80℃에서 수확하거나 수집한 직후에 단백질 발현을 분석하였다.

<245> 새로운 샘플은 1/3 w/v 비율(1 ml/ 0.3 g 조직)로 차가운 PBS 1x + 프로테아제 저해물질(Roche) 내에서 재현탁시키고 페스텔(pestel)로 분쇄하였다. 균질액(homogenate)은 SDS 겔 적하 완충액(loading buffer) 내에서 5 분 동안 끓이고, 4℃에서 12,000 rpm으로 5 분 동안 원심분리로 정화하였다. 상층액은 새로운 튜브로 이전하고 20 μℓ, 1 μℓ 또는 이들의 희석액은 12% SDS-PAGE 상에서 분리하고, 항-His6-E7 생쥐 또는 토끼 항-리케나아제 폴리클론 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 및/또는 기능적 리케나아제 활성을 지시하는 가수분해 활성을 평가하는 zymogram 분석으로 분석하였다. Zymography는 효소 활성을 측정하기 위한 전기영동(electrophoretic) 방법이다. 이러한 방법은 배양 기간 동안 용해된 효소에 의해 변성된 기질이 주입된 도데실 황산나트륨(sodium dodecyl sulfate) 겔에 기초한다. 겔의 염색은 짙은 적색 배경에서 백색 밴드로서 효소 활성을 드러낸다. 특정 범위 내에서, 밴드 강도(band intensity)는 적하된 효소의 양에 선형적으로 관련될 수 있다.

<246> 플라스미드 pBID4-LicKM-E7-KDEL을 포함하는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로 침윤된 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물 내에서 E7 발현은 융합 단백질 내에서 E7 단백질 전기영동 이동성(electrophoretic mobility)이 11 kD의 이론적 MW(리케나아제 효소 MW는 대략 28 kD이다)에 상응하면 키메라 단백질 LicKM-E7-KDEL의 분자량(대략 39 kD)에 상응하는 특이적인 밴드를 발생시킨다(도 6A-D). pBID4-LicKM-E7-VAC 플라스미드를 포함하는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로 침윤된 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물은 키메라 단백질 LicKM-E7-VAC를 발현한다. 그럼에도 불구하고, 노출된 밴드는 이중선(doublet)이다. 이중 밴드는 아마도, 키메라 단백질 내에서 적절하게 가공된 엑포 신호 서열과 가공되지 않은 엑포 신호 서열 둘 모두의 존재를 암시한다(도 6A-D). 양쪽 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 균주에서, 최고의 발현 구조체는 리케나아제 효소와의 E7(또는 E7GGG) 융합을 발현하는 식물 조직의 대량 생산을 위하여 선택된, KDEL 서열이 포함된 구조체인 것으로 밝혀졌다. 동일한 발현 결과가 E7GGG 키메라 단백질에서 획득되었다(도 7A).

<247> Zymogram 분석에서, E7과 E7GGG 키메라 단백질 둘 모두의 발현이 리케나아제 활성과 연관되는 것으로 밝혀졌는데, 이는 리케나아제 효소의 촉매 도메인의 루프 내에서 앞서 언급된 단백질의 융합이 이러한 효소 활성을 손상시키지 않는다는 것을 지시한다. 이들 융합 단백질에 관련된 활성 밴드는 리케나아제 대조보다 높은 분자량을 보이는데, 이는 완전 융합 산물의 존재를 확증한다. pBID4-LicKM-E7-KDEL, pBID4-LicKM-E7GGG-KDEL을 포함하는 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로 침윤된 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물로부터 획득된 추출물은 활성 밴드를 보이는 반면,

VAC 구조체는 더욱 낮은 활성을 유도하였다(도 8A-D).

<248> E7-LicKM-KDEL 융합체와 E7-LicKM-VAC 융합체의 발현은 6 일에서부터 7 일까지 급격하게 하락하는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)-매개된 발현을 제외하고, 감염후 4 일에서부터 7 일까지 지속적으로 높고 안정하다(5 일 시점에 약간 더 높은 것으로 보이긴 하지만). 단백질 변성을 피하기 위하여 감염후 5 일 시점에 수확하기로 결정하였다. 가공되지 않은 추출물에서 발현된 키메라 단백질 LicKM-E7-KDEL과 LicKM-E7GGG-KDEL의 정량은 수동으로 침윤된 조직 및 진공-침윤된 조직 모두에서 면역블랏팅(immunoblotting)으로 수행하였다(도 7B,C). 가공되지 않은 추출물 내에서 발현의 예상된 수율은 조직 g당 최소한 400 μ g의 키메라 단백질 LicKM-E7-KDEL과 LicKM-E7GGG-KDEL(조직 g당 100 μ g의 E7 또는 E7GGG 단백질에 상응함)이다.

<249> 항원의 정제

<250> pBID4-LicKM-E7-KDEL과 pBID4-LicKM-E7GGG-KDEL 구조체를 포함하는 재조합 뿌리혹박테리아(*Agrobacterium tumefaciens*)로 침윤된 식물로부터 얻은 균질화시켰다. "EDTA-없는" 프로테아제 저해물질(Roche)과 Triton X-100 1%를 포함하는 추출 완충액은 3 부피 w/v의 비율로 이용하고, 4°C에서 30 분 동안 흔들었다. 추출물은 4°C에서 9000 x g로 10 분 동안 원심분리로 정화하였다. 상층액은 Mira cloth를 통하여 순차적으로 여과하고, 4°C에서 20,000 x g로 30' 동안 원심분리하고, 0.45 μ m 필터를 통하여 여과하고, 이후 크로마토그래피 정제하였다.

<251> His-태그된 LicKM-E7-KDEL과 LicKM-E7GGG-KDEL 키메라 단백질은 중력 하에 실온에서 IMAC("고정된 금속 친화성 크로마토그래피(Immobilized Metal Affinity Chromatography)", GE Health)를 이용하여 정제하였다. 이러한 정제는 비-변성 조건 하에 수행되었다. 단백질은 0.5 ml 분획물로서 수집하였는데, 이들은 합치고, 20 mM EDTA를 추가하고, 4°C에서 하룻밤동안 PBS 1X에 투석하고, SDS-PAGE로 분석하였다.

<252> 대안으로, 분획물은 함께 수집하고, 20 mM EDTA를 추가하고, 4°C에서 하룻밤동안 NaH_2PO_4 10 mM에 투석하고, 음이온 교환 크로마토그래피(Anion Exchange Chromatography)로 정제하였다. LICKM-E7-KDEL E LICKM-E7GGG-KDEL 정제를 위하여, 음이온 교환 칼럼 Q Sepharose Fast Flow(Amersham Pharmacia Biosciences)가 이용되었다. LICKM-E7-KDEL E LICKM-E7GGG-KDEL 친화성 또는 이온-교환 정제된 키메라 단백질의 샘플은 12% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 분리하고, 이후 Coomassie 염색을 수행하였다. 분리된 단백질은 또한, PVDF 막으로 전기영동 이동시키고, 폴리클론 항-리케나아제 항체와 항-토끼 IgG 양고추냉이 과산화소-공액된 항체를 순차적으로 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 분석하였다.

<253> 투석이후 수집된 분획물은 pAb α -리케나아제(도 9A)와 pAb α -항-His6(데이터 제시되지 않음)을 이용한 면역블랏팅으로 분석하였다. His-태그는 발현된 키메라 단백질로 유지시키고, 정제된 단백질의 최종 농도는 소프트웨어로 평가하였다(도 9A,B). 40 g의 침윤된 조직으로부터, 6.5 mg의 각 LicKM-E7-KDEL과 LicKM-E7GGG-KDEL 키메라 단백질은 조직 g당 163 μ g의 키메라 단백질(조직 g당 대략 50 μ g의 E7 또는 E7GGG 단백질, 여기서 E7과 E7GGG 단백질의 분자량은 완전 융합체의 대략 1/4이다)의 최종 수율로 정제되었다. 정제 프로토콜로부터 결과는 도 9C,D에 도시된다.

<254> 실시예 5: 면역원성 연구

<255> 표적 항원의 생산과 특성화

<256> 식물-생산된 LicKM-E7-KDEL과 LicKM-E7GGG-KDEL이 복강내 면역된 생쥐 내에서 특이적인 혈청 IgG을 유도할 수 있는지의 여부 및 이들 유도된 항체가 E7-발현 세포에 결합할 수 있는지의 여부를 결정하기 위하여 최초 면역원성 연구를 수행하였다. 본 연구에는 앞서 기술된 바와 같이, 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana benthamiana*)의 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤된 잎으로부터 순수하게 농축된 LicKM-E7-KDEL과 LicKM-E7GGG-KDEL이 이용되었다. 간단히 말하면, HPV16 E7 종양유전자(GenBank 수탁 번호 K02718)는 Quikchange 특정 부위 돌연변이 유발(Site-Directed Mutagenesis) 키트(Stratagene; La Jolla, CA)를 이용하여 돌연변이시켜 E7의 pRB-결합 부위 내에서 아래의 아미노산 치환: D21G, C24G와 E26G를 포함하는 E7GGG를 제공하였다(Smahel et al, 2001, Virology, 281:231). HPV16 E7과 E7GGG를 인코딩하는 서열은 LicKM의 인-프레임 내부 융합체로서 클론하여 LicKM-E7과 LicKM-E7GGG를 수득하였다. 이들 융합체는 N-말단에서 연초(*Nicotiana tabacum*) PR1a 단백질의 신호 서열, 6xHis 태그 및 C-말단에서 소포체(endoplasmic reticulum) 보존 신호 KDEL을 포함하였다. 이들 융합체는 식물 발현 벡터 pBID4 내로 클론하여(Musiychuk et al., 2007, Influenza and Other Respiratory Viruses, 1:1, in press) pBID4-LicKM-E7과 pBID4-LicKM-E7GGG를 제공하였다. 각 구조체는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*) 균주 A4 내로 도입하고, 결과의 세균은 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana*

benthamiana) 내로 접종하였다. 침윤후 5 내지 7 일 시점에, 표적 항원은 친화성 크로마토그래피로 정제하였다.

<257> LicKM-E7과 LicKM-E7GGG에 대한 예상된 수율은 새로운 잎 조직 kg당 대략 400 mg이고, LicKM에 대한 예상된 수율은 kg당 대략 1g이었다. 정제된 표적 항원은 SDS-PAGE 분석으로 특성화하여 28 kD(LicKM), 39 kD(LicKM-E7)와 39 kD(LicKM-E7GGG)의 예측된 크기 단백질을 확인하였다(도 9B). 대조 물질(control material)을 제공하기 위하여, LicKM을 니코티아나 벤쌈미아나(*Nicotiana benthamiana*) 내에서 유사하게 생산하였다. 이들 식물-발현된 단백질의 항원성은 LicKM과 E7에 특이적인 항체를 이용한 면역블랏팅으로 검증하였다. 샘플은 GeneTools 소프트웨어(Syngene; Cambridge, UK)를 이용한 음영계측(densitometry)으로 정량하였다.

<258> 면역원성 연구

<259> 식물-생산된 표적 항원의 효능을 평가하기 위하여, 4 내지 8 주령 암컷 C57BL/6 생쥐(Charles River; Como, Italy)는 표적 항원으로 면역시켰다.

<260> 질병 예방 연구를 위하여, 군당 10마리 생쥐는 0 일, 14 일, 28 일, 42 일과 76 일 시점에, Quil A 어쥬번트(10 μ g/생쥐)와 함께 또는 이런 어쥬번트 없이, 40 μ g의 LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG(각각, 대략 10 μ g의 E7 또는 E7GGG에 상당하다)를 피하 투여하였다. 동물로부터 혈청 샘플은 각 투여 당일에 수집하고, ELISA로 E7-특이적인 항체의 존재를 평가하였다. 49 일 시점에, 각 군에서 2마리 동물을 희생시켜 세포 매개된 면역 반응을 평가하였다. 모든 남아있는 동물은 이후, TC-1 종양 세포를 발현하는 5×10^4 개 E7로 피하 주입하여 공격하였다(Lin et al., 1996, Cancer Research, 56:21). 면역 반응의 특성화를 위하여, 기존 문헌(Franconi et al., 2002, Cancer Research, 62:3654)에서 기술된 바와 같이, ELISA, ELISPOT 및 자발적 지연형 과민반응(spontaneous delayed-type hypersensitivity, DTH) 검사를 수행하였다.

<261> 질병 치료 연구를 위하여, 군당 8 내지 10마리 생쥐는 0 일, 15 일, 30 일, 45 일과 60 일 시점에, Quil A 어쥬번트(10 μ g/생쥐)와 함께 또는 이런 어쥬번트 없이, 40 μ g LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG로 피하 면역(subcutaneous immunization)에 3일 앞서, TC-1 종양 세포를 발현하는 5×10^4 개 E7로 피하 접종하였다.

<262> 질병 예방과 치료 연구 모두를 위하여, 대조 동물은 Quil A 어쥬번트와 함께 또는 이런 어쥬번트 없이, 10 μ g의 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG, 또는 식물-생산된 LicKM을 투여하였다. 종양 성장은 주2회 촉진(palpation)으로 모니터하였다. 이들 연구에서, 동물은 고통(distress), 설사(diarrhea), 폐사(death), 또는 표적 항원의 투여에 기인한 다른 임상적 징후와 같은 잠재적 징후가 관찰되었다. 식물-생산된 LicKM-E7과 LicKM-E7GGG의 면역원성과 질병예방 잠재력을 검사하기 위하여, 동물은 표적 항원으로 면역시켰다. 어쥬번트의 존재에서, LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG로 면역된, 또는 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG로 면역된 모든 동물은 특이적인 IgG 반응을 나타내는 반면(도 11A), 어쥬번트의 부재에서 LicKM 융합체는 현저한 체액 반응(humoral response)을 유도하지 않았다(도 11A). $CD8^+$ 세포독성 T 세포가 항암 반응에서 효과기(effector)로서 역할이 인정되고 있기 때문에, E7-특이적인 $CD8^+$ T 세포의 유도를 ELISPOT로 조사하였다. 어쥬번트의 존재에서, LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG로 백신접종된 생쥐에서는 많은 숫자의 IFN γ 발현 세포가 탐지되는 반면, 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG로 백신접종된 생쥐에서는 적은 숫자의 E7-특이적인 $CD8^+$ 세포가 관찰되고 LicKM 백신접종된 생쥐에서는 IFN γ 분비 세포가 탐지되지 않았다(도 11B). 양쪽 LicKM 융합체 및 대장균(*E. coli*)-생산된 항원은 어쥬번트의 부재에서 적지만 유의한 숫자의 반점을 유도하는데, 이들 LicKM 융합체는 더욱 높은 숫자의 ELISPOT 카운트를 제공하였다(도 11B).

<263> HPV-특이적 $CD8^+$ T 세포는 E7-발현 종양으로 공격에 대한 보호 기능을 하는 것으로 확립되어 있다(Frazer, 2004, Nature Reviews, 4:46). 이런 이유로, 식물-생산된 E7 후보 백신에 의해 유도된 면역 반응의 항-종양 활성은 백신접종된 생쥐를 TC-1 세포로 공격함으로써 평가하였다. 어쥬번트의 존재에서, LicKM-E7과 LicKM-E7GGG는 각각, 100%의 동물에서 종양 보호를 유도하는 반면, 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG는 각각, 80%와 60%의 생쥐에서 보호를 유도하였다(도 11C). 어쥬번트의 부재에서 LicKM-E7로 면역된 동물 중에서 80%가 보호되었다(도 11C). 어쥬번트의 부재에서 LicKM-E7GGG 또는 대장균(*E. coli*)-생산된 항원으로 면역된 동물 중에서 20%가 보호되었다(도 11C). LicKM으로 면역된 동물에서는 어떤 보호도 관찰되지 않았다(도 11C).

<264> HPV16 E7-발현 종양에 대한 LicKM-E7과 LicKM-E7GGG의 치료 활성을 검사하기 위하여, E7-발현 TC-1 세포로 접종된 동물은 LicKM, LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG로, 또는 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG로 차후에 면역하였다. LicKM으로 면역된 모든 동물은 4 주 이내에 종양이 발생한 반면, LicKM-E7 또는 LicKM-E7GGG + 어쥬

번트로 치료된 동물은 전체 연구 기간(10 주) 동안 종양이 발생하지 않았다. 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG + 어쥘번트로 면역화(immunization)는 각각, 40%와 60%의 동물에서 종양 성장을 저해하였다(도 11D). 어쥘번트의 부재에서, LicKM 융합체는 종양 성장을 저해하였는데, LicKM-E7GGG(60%)보다 LicKM-E7(80%)이 투여된 동물에서 더욱 높은 보호가 관찰되고, 대장균(*E. coli*)-생산된 E7 또는 E7GGG로 치료된 동물 중에서 20%는 종양이 발생하지 않았다(도 11D).

<265> HPV-연관된 질환의 발병으로부터 보호는 세포-매개된 면역 반응에 상당 부분 기인한다. DTH 반응은 특히, Th1 타입 사이토킨이 관여하는 항원-특이적인 사이토킨 매개된 염증을 대표하는 것으로 생각된다. LicKM-E7이 E7-발현 종양에 대하여 LicKM-E7GGG보다 우수한 치료 활성을 나타냈기 때문에, LicKM-E7 또는 대장균(*E. coli*)-생산된 E7로 백신접종된 생쥐 내에서 E7에 대한 DTH 반응을 평가하였다. 항원-특이적인 DTH 반응은 어쥘번트의 부재에도 불구하고, LicKM-E7 단백질로 백신접종된 생쥐에서 관찰되었다(표 1). 이러한 반응은 대장균(*E. coli*)-생산된 E7로 백신접종된 생쥐에서 관찰되는 반응을 초과하였다. LicKM로 면역된 생쥐는 현저한 귀 부종(ear swelling)을 나타내지 않았는데, 이는 LicKM 담체 분자(carrier molecule)가 염증 반응을 유도하지 않는다는 것을 증명한다.

표 1

<266> 지연형 과민반응

	Δ 귀 두께* ± 표준 편차	
	48 시간	72 시간
LicKM	2.5±0.7	1.0±0.7
대장균(<i>E. coli</i>) E7	2.3±1.5	4.6±2.5
LicKM-E7	5.0±2.7	10±2.3
LicKM-E7+Quil A	6.5±0.7	7.0±0.1

<267> * 귀 부종은 군당 5마리 생쥐로부터 공격된 귀와 공격되지 않은 대조 귀 사이에 두께에서 차이(Δ)의 평균으로 보고되었다(mm 귀 두께 x 10⁻²).

도면의 간단한 설명

- <10> 도 1. pET32 플라스미드의 지도. 좌측 상부는 T7 프로모터 및 표적 항원을 클로닝하는데 이용되는 변형된 플라스미드가 부재하는 T7 종결인자 사이의 영역을 표시한다.
- <11> 도 2. 변형된 pET 32 벡터로부터 pET-PRACS-Lic-KDEL과 pET-PRACS-Lic-VAC 구조체의 생산.
- <12> 도 3. pBI121 벡터 조직의 개요도.
- <13> 도 4. β-글루쿠로니다아제(GUS) 유전자의 절제와 TMV 유래된 플라스미드의 추가 이후에, pBI 벡터로부터 pBID4 플라스미드의 유도의 개요 조직.
- <14> 도 5. 리케나아제 서열에서 BglIII와 HindIII 부위 사이에 E7과 E7GGG의 융합 및 pBID4 벡터 내에서 차후 클로닝의 개요도.
- <15> 도 6A-D. 항-리케나아제 항체(6A,C) 또는 항-6HIS-E7 항체(6B,D)를 이용한, E7 구조체를 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤된 식물의 웨스턴 분석.
- <16> 도 7A-D. 항-리케나아제 항체(7A,C) 또는 항-6HIS-E7 항체(7B,D)를 이용한, E7 구조체를 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤된 식물의 웨스턴 분석.
- <17> 도 8. 항-리케나아제 항체를 이용한, E7(8A,8B) 또는 E7GGG(8C,8D) 구조체를 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤된 식물의 리케나아제 활성 분석.
- <18> 도 9A-D. (9A) 항-리케나아제 항체를 이용한, E7GGG 구조체를 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 침윤된 식물의 웨스턴 분석. (9B-D) 정제 절차를 통한 분리로부터 단백질 분획물의 Coomassie 염색 분석.
- <19> 도 10. pBID4-Lic-E7-KDEL(라인 1-9)과 pBID4-Lic-E7GGG-KDEL 구조체(라인 10, 11)를 포함하는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로 형질전환된 니코티아나 벤삼미아나(*Nicotiana benthamiana*) 잎 외식

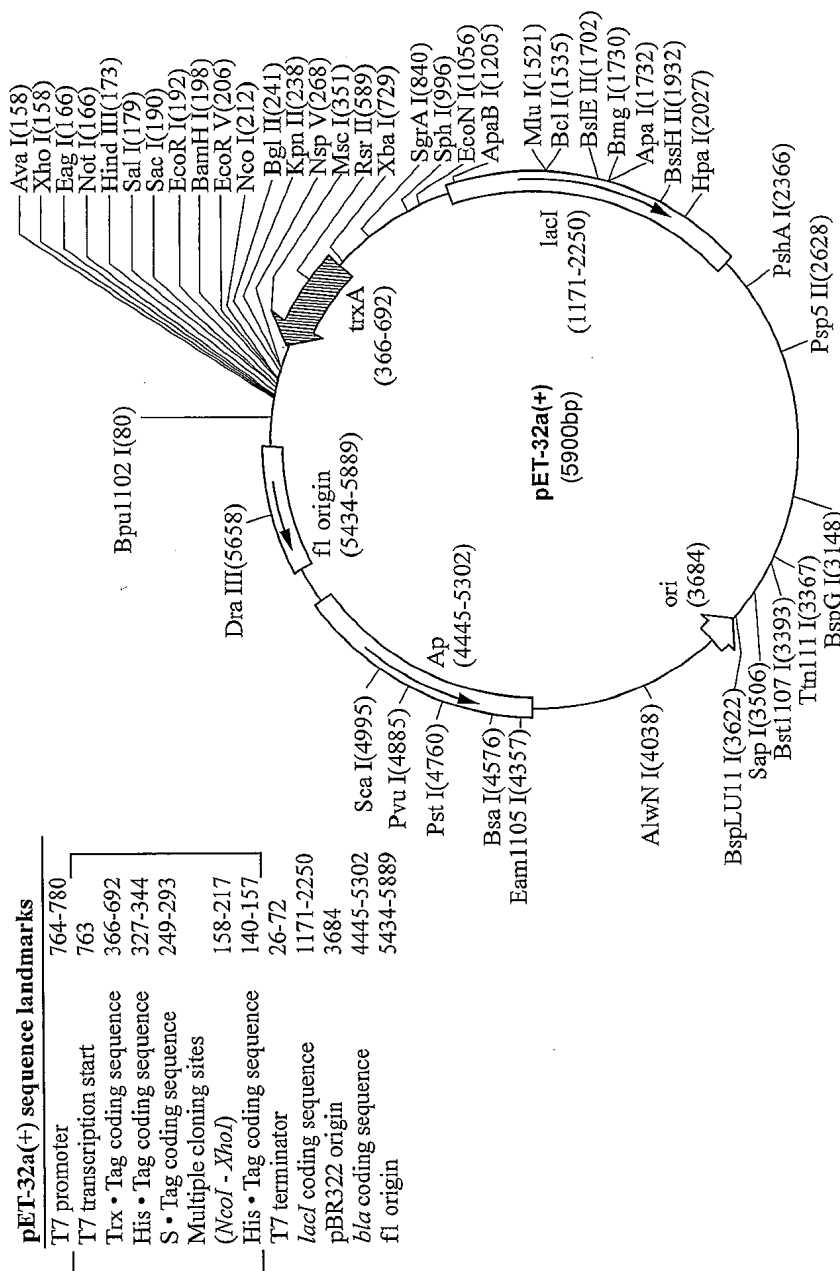
체로부터 획득된 유전자도입 뿌리로부터 추출물; 레인 12 = 150 ng 리케나아제(양성 대조); 레인 13 = pBID4-Lic-E±±7-KDEL 구조체를 포함하는 아그로박테리움 리조제네스(*Agrobacterium rhizogenes*)로 진공 침윤된 니코티아나 벤싸미아나(*Nicotiana benthamiana*) 잎으로부터 가공되지 않은 추출물 상에서 수행된 Zymogram 분석.

<20>

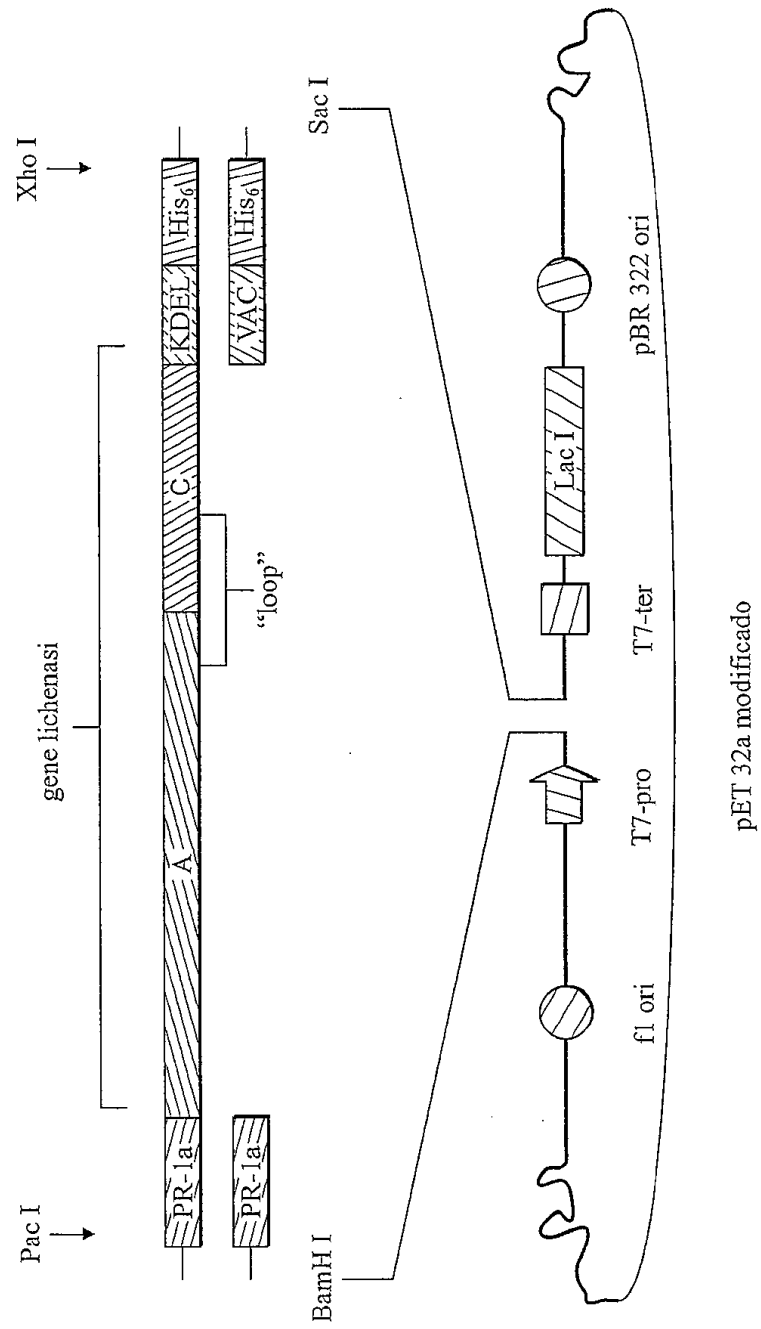
도 11 A-D. 식물-생산된 백신 후보의 특성화와 효능. (HA) E7-특이적인 혈청 IgG 반응. 데이터는 405 nm에서, 1:500 희석된 혈청의 흡광도(optical density) 수치로서 표시된다. 개별 동물로부터 데이터는 평균 수치와 함께 도시된다. (11B) 백신 접종된 생쥐로부터 비장세포(splenocyte)의 ELISPOT 분석. 데이터는 2×10^5 개 비장세포에 대해 반점(spot)의 평균수 ± SD로서 표시된다. 회색과 검은색 칼럼은 각각, 특이적인 CTL E7 펩티드로 자극되거나 자극되지 않은 세포를 지칭한다. (11C) TC-1-유도된 종양에 대한 예방적 백신 접종. 데이터는 종양-없는 생쥐의 비율로서 표시된다. (HD) TC-1-유도된 종양에 대한 치료적 백신 접종. 데이터는 종양-없는 생쥐의 비율로서 표시된다.

도면

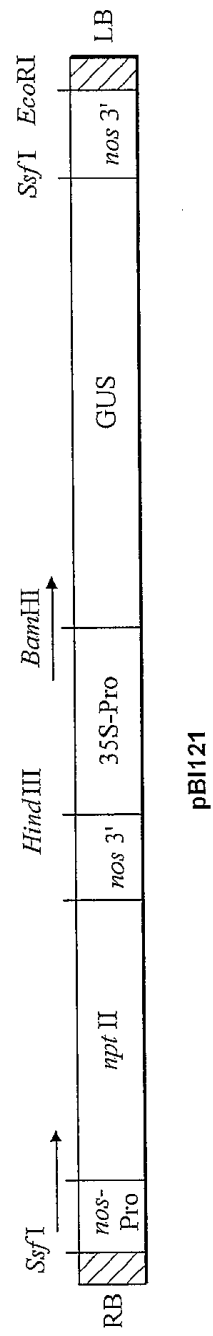
도면1



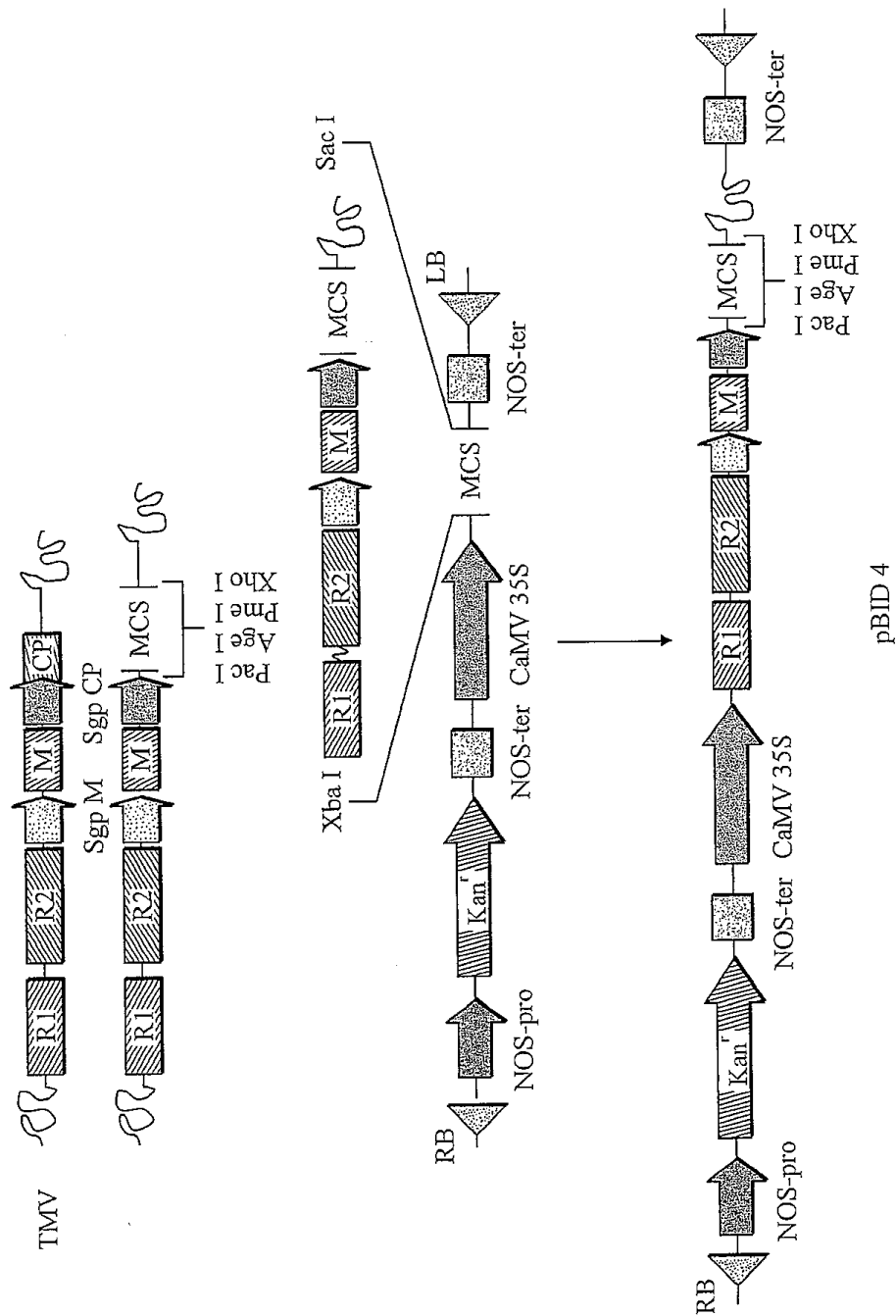
도면2



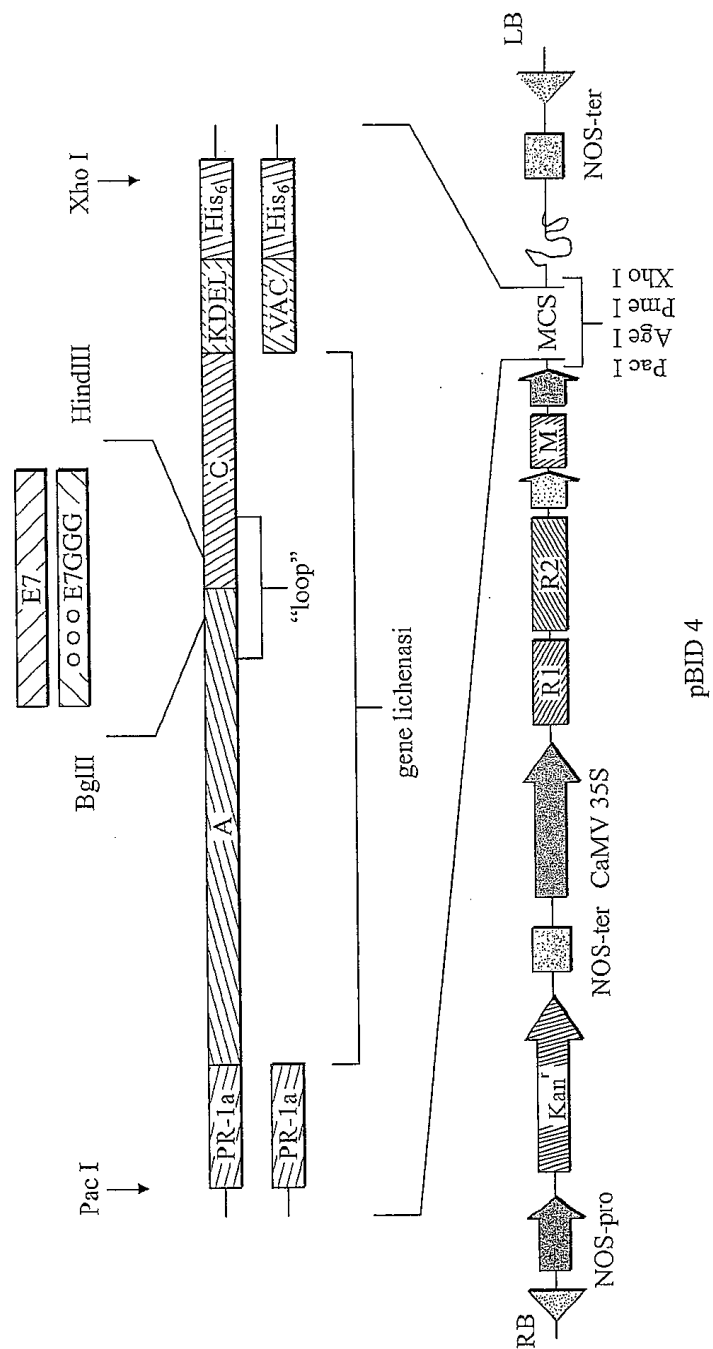
도면3



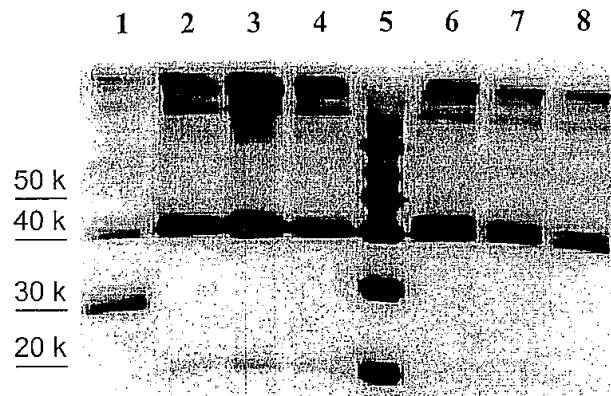
도면4



도면5



도면6a

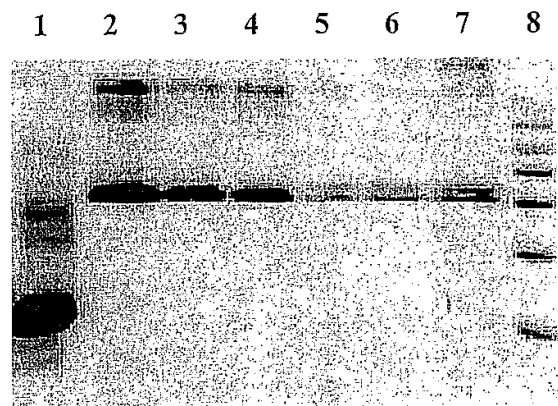


(pAb α -lichenase):

(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)

- 1) Lichenase 30ng
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (plant 1)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (plant 2)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (plant 3)
- 5) Marker
- 6) pBID4-Lic-E7-VAC (plant 1)
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (plant 2)
- 8) pBID4-Lic-E7-VAC (plant 3)

도면6b

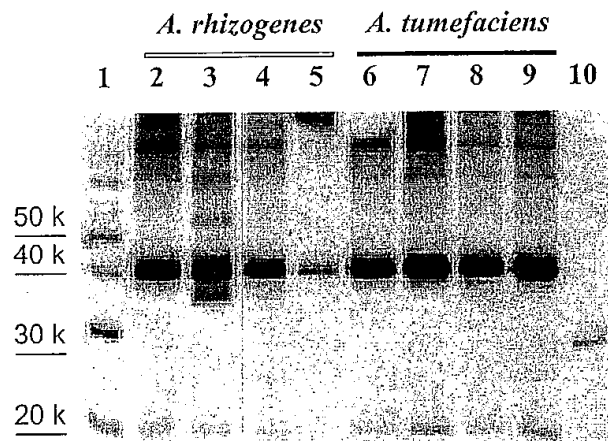


(pAb α -His₆E7):

(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)

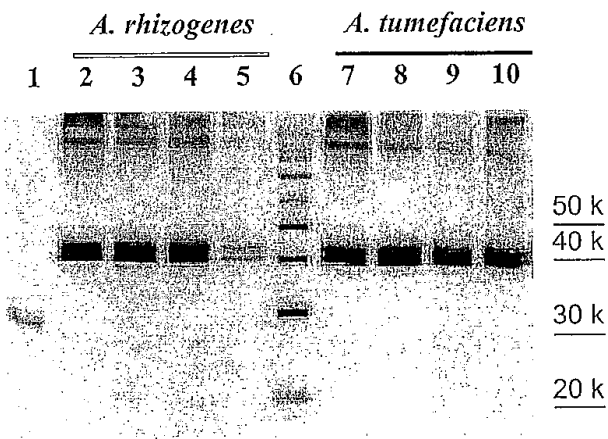
- 1) His₆E7 60ng
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (plant 1)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (plant 2)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (plant 3)
- 5) pBID4-Lic-E7-VAC (plant 1)
- 6) pBID4-Lic-E7-VAC (plant 2)
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (plant 3)
- 8) Marker

도면6c



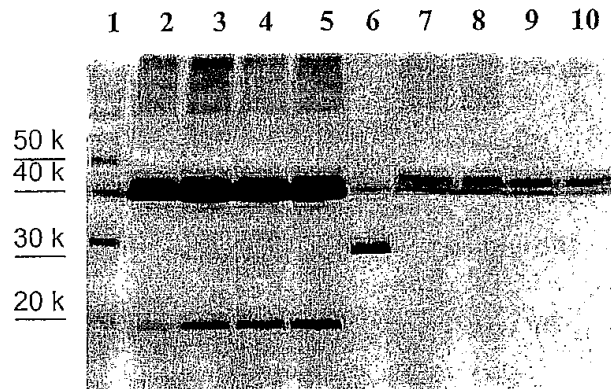
- 1) Marker
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (4 days)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (5 days)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (6 days)
- 5) pBID4-Lic-E7-KDEL (7 days)
- 6) pBID4-Lic-E7-KDEL (4 days)
- 7) pBID4-Lic-E7-KDEL (5 days)
- 8) pBID4-Lic-E7-KDEL (6 days)
- 9) pBID4-Lic-E7-KDEL (7 days)
- 10) Lichenase 30 ng

도면6d



- 1) Lichenase 30 ng
- 2) pBID4-Lic-E7-VAC (4 days)
- 3) pBID4-Lic-E7-VAC (5 days)
- 4) pBID4-Lic-E7-VAC (6 days)
- 5) pBID4-Lic-E7-VAC (7 days)
- 6) Marker
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (4 days)
- 8) pBID4-Lic-E7-VAC (5 days)
- 9) pBID4-Lic-E7-VAC (6 days)
- 10) pBID4-Lic-E7-VAC (7 days)

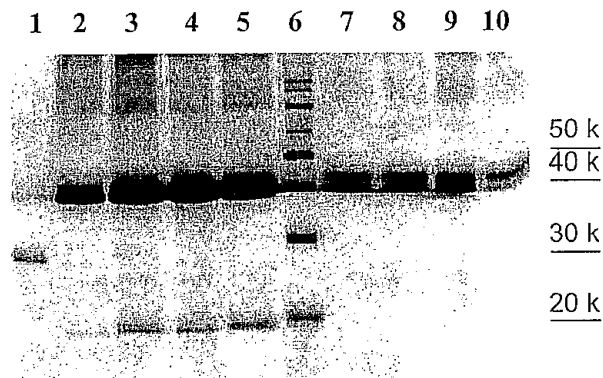
도면7a



(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)

- 1) Marker
- 2) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (day 4)
- 3) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (day 5)
- 4) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (day 6)
- 5) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL (day 7)
- 6) Lichenase 30ng
- 7) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (day 4)
- 8) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (day 5)
- 9) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (day 6)
- 10) pBID4-Lic-E7GGG-VAC (day 7)

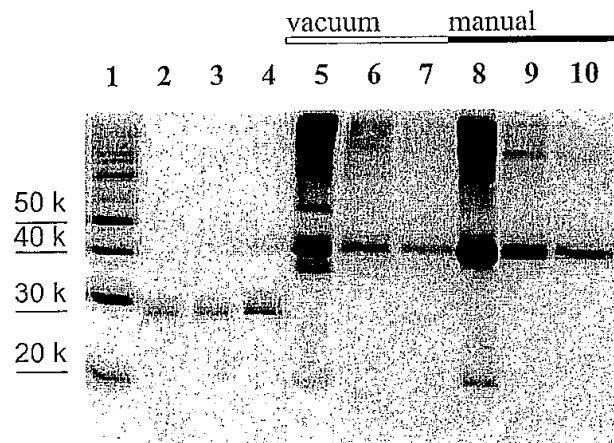
도면7b



(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)

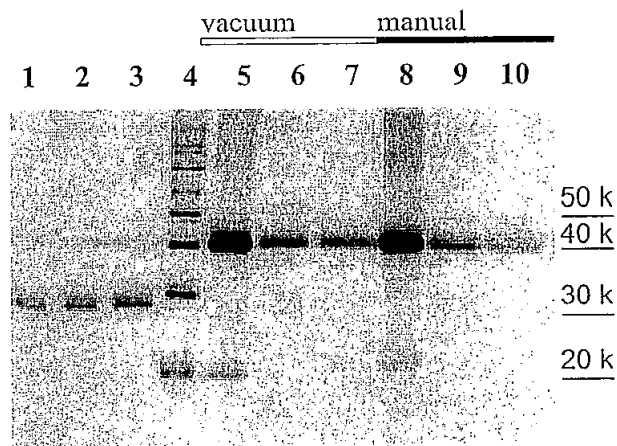
- 1) Lichenase 30ng
- 2) pBID4-Lic-E7-KDEL (day 4)
- 3) pBID4-Lic-E7-KDEL (day 5)
- 4) pBID4-Lic-E7-KDEL (day 6)
- 5) pBID4-Lic-E7-KDEL (day 7)
- 6) Marker
- 7) pBID4-Lic-E7-VAC (day 4)
- 8) pBID4-Lic-E7-VAC (day 5)
- 9) pBID4-Lic-E7-VAC (day 6)
- 10) pBID4-Lic-E7-VAC (day 7)

도면7c



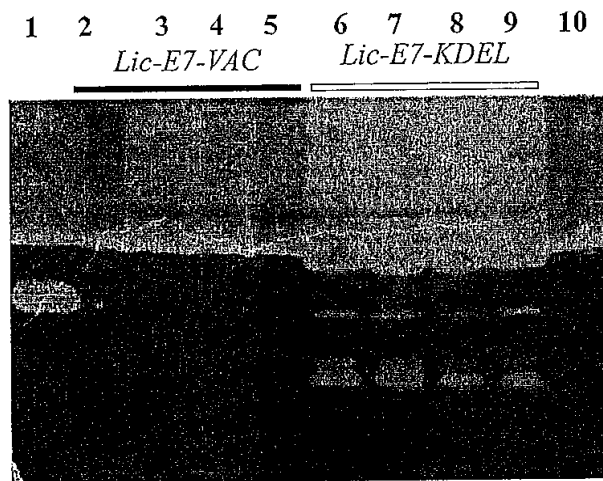
- 1) Marker
- 2) Lichenase 10 ng
- 3) Lichenase 25ng
- 4) Lichenase 50ng
- 5) pBID4-Lic-E7-KDEL (1µl of extract)
- 6) pBID4-Lic-E7-KDEL(1:250)
- 7) pBID4-Lic-E7-KDEL(1:500)
- 8) pBID4-Lic-E7-KDEL (1 µl of extract)
- 9) pBID4-Lic-E7-KDEL(1:250)
- 10) pBID4-Lic-E7-KDEL(1:500)

도면7d



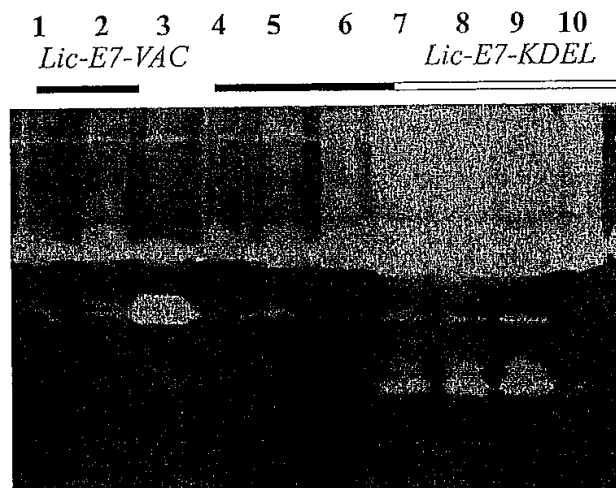
- 1) Lichenase 10 ng
- 2) Lichenase 25ng
- 3) Lichenase 50ng
- 4) Marker
- 5) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1 μ l of extract)
- 6) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1:250)
- 7) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1:500)
- 8) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1 μ l of extract)
- 9) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1:250)
- 10) pBID4-Lic-E7GGG-KDEL(1:500)

도면8a



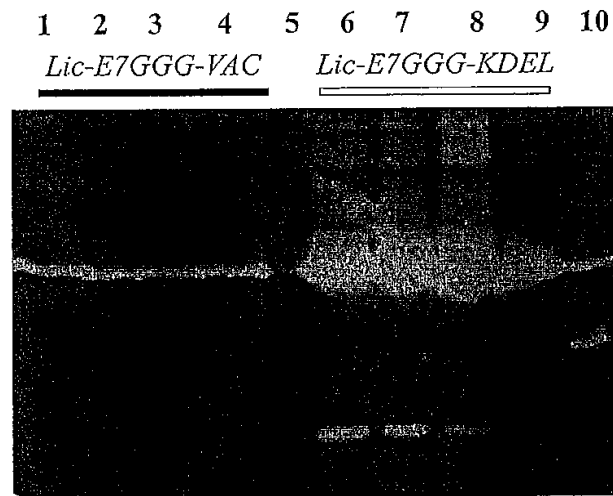
- 1) Lichenase 50 ng (27 kD)
- 2) plant 1
- 3) plant 2
- 4) plant 3
- 5) plant 4
- 6) plant 1
- 7) plant 2
- 8) plant 3
- 9) plant 4
- 10) "spill over"

도면8b



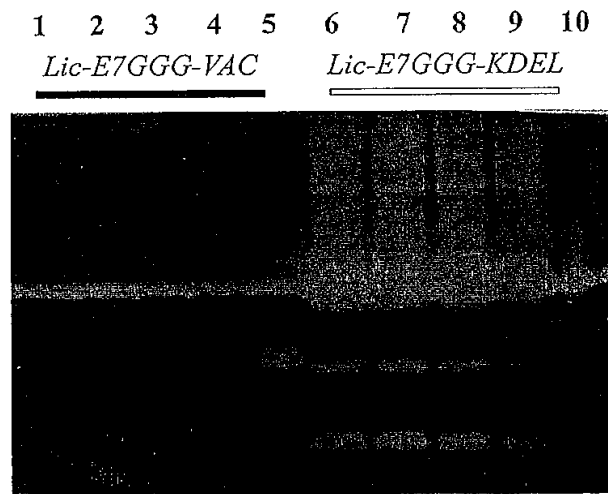
- 1) plant 1
- 2) plant 2
- 3) Lichenase 50 ng (27 kD)
- 4) plant 3
- 5) plant 4
- 6) plant 1
- 7) plant 2
- 8) plant 3
- 9) plant 4
- 10) "spill over"

도면8c



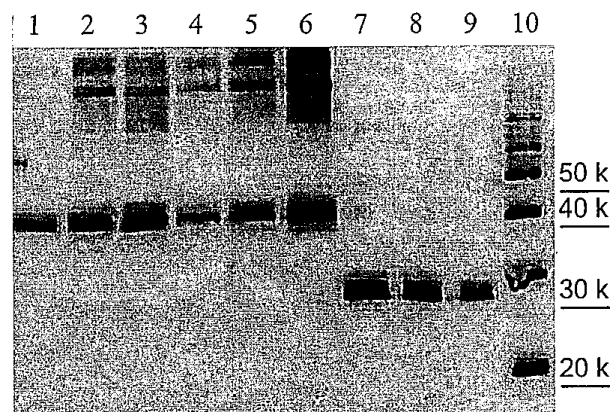
- 1) plant 1
- 2) plant 2
- 3) plant 3
- 4) plant 4
- 5) blank
- 6) plant 1
- 7) plant 2
- 8) plant 3
- 9) plant 4
- 10) Lichenase 50ng (27 kD)

도면8d



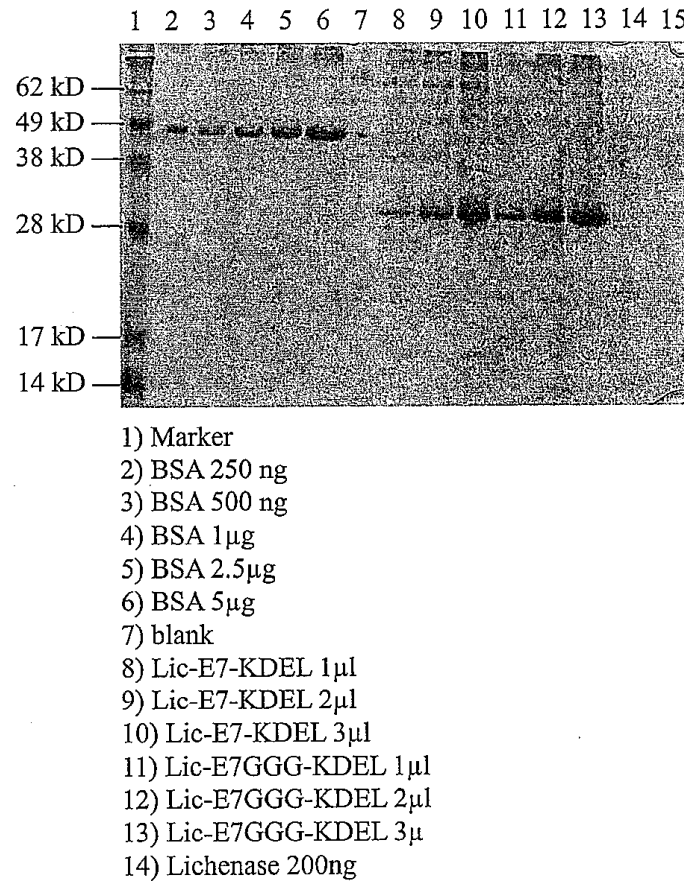
- 1) plant 1
- 2) plant 2
- 3) plant 3
- 4) plant 4
- 5) Lichenase 50 ng (27 kD)
- 6) plant 1
- 7) plant 2
- 8) plant 3
- 9) plant 4
- 10) "spill over"

도면9a

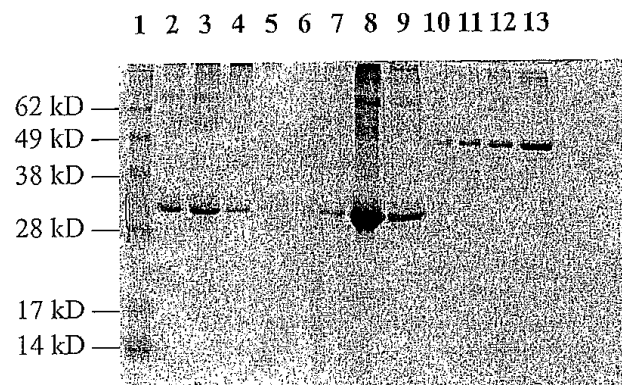


- 1) Lic-E7GGG-KDEL 1 μ l 1:10
- 2) Lic-E7GGG-KDEL 0.5
- 3) Lic-E7GGG-KDEL purified 1 μ
- 4) Lic-E7-KDEL 1 μ l 1:10
- 5) Lic-E7-KDEL 0.5 μ l
- 6) Lic-E7-KDEL 1 μ l
- 7) Lichenase 60ng (27 kD)
- 8) Lichenase 40ng
- 9) Lichenase 20ng
- 10) Marker

도면9b



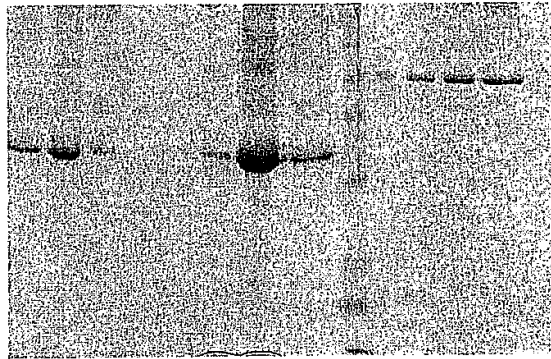
도면9c



- 1) Marker
- 2) Lic-E7-KDEL Ni-NTA purified, 1µl
- 3) Lic-E7-KDEL Ni-NTA purified, 5µl
- 4) Lic-E7-KDEL dialysed, 1µl
- 5) "flow through"
- 6) washing
- 7) elution 1 (Q-column)
- 8) elution 2 (Q-column)
- 9) elution 3 (Q-column)
- 10) BSA 250 ng
- 11) BSA 500 ng
- 12) BSA 1µg
- 13) BSA 3µg

도면9d

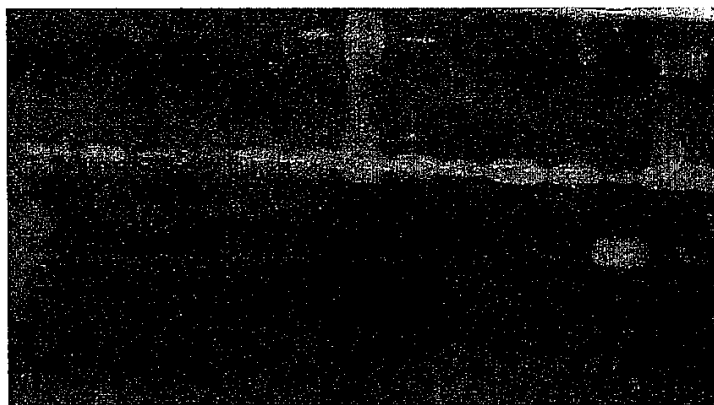
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



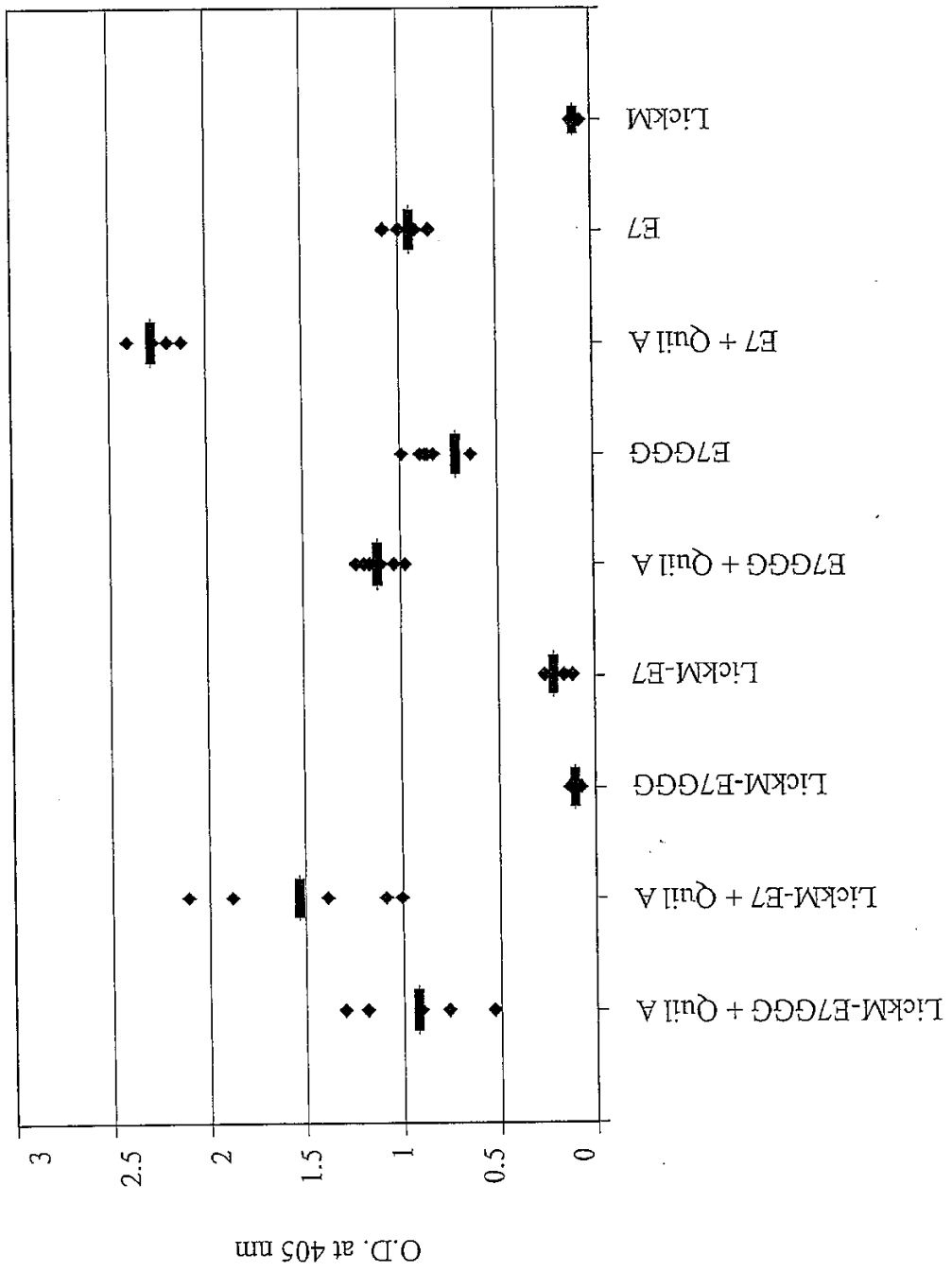
- 1) Lic-E7GGG Ni-NTA purified, 1 μ l
- 2) Lic-E7GGG Ni-NTA purified, 5 μ l
- 3) Lic-E7GGG dialysed 1 μ l
- 4) "flow through"
- 5) washing
- 6) elution 1 (Q-column)
- 7) elution 2 (Q-column)
- 8) elution 3 (Q-column)
- 9) Marker
- 10) BSA 250 ng
- 11) BSA 500 ng
- 12) BSA 1 μ g
- 13) BSA 3 μ g

도면10

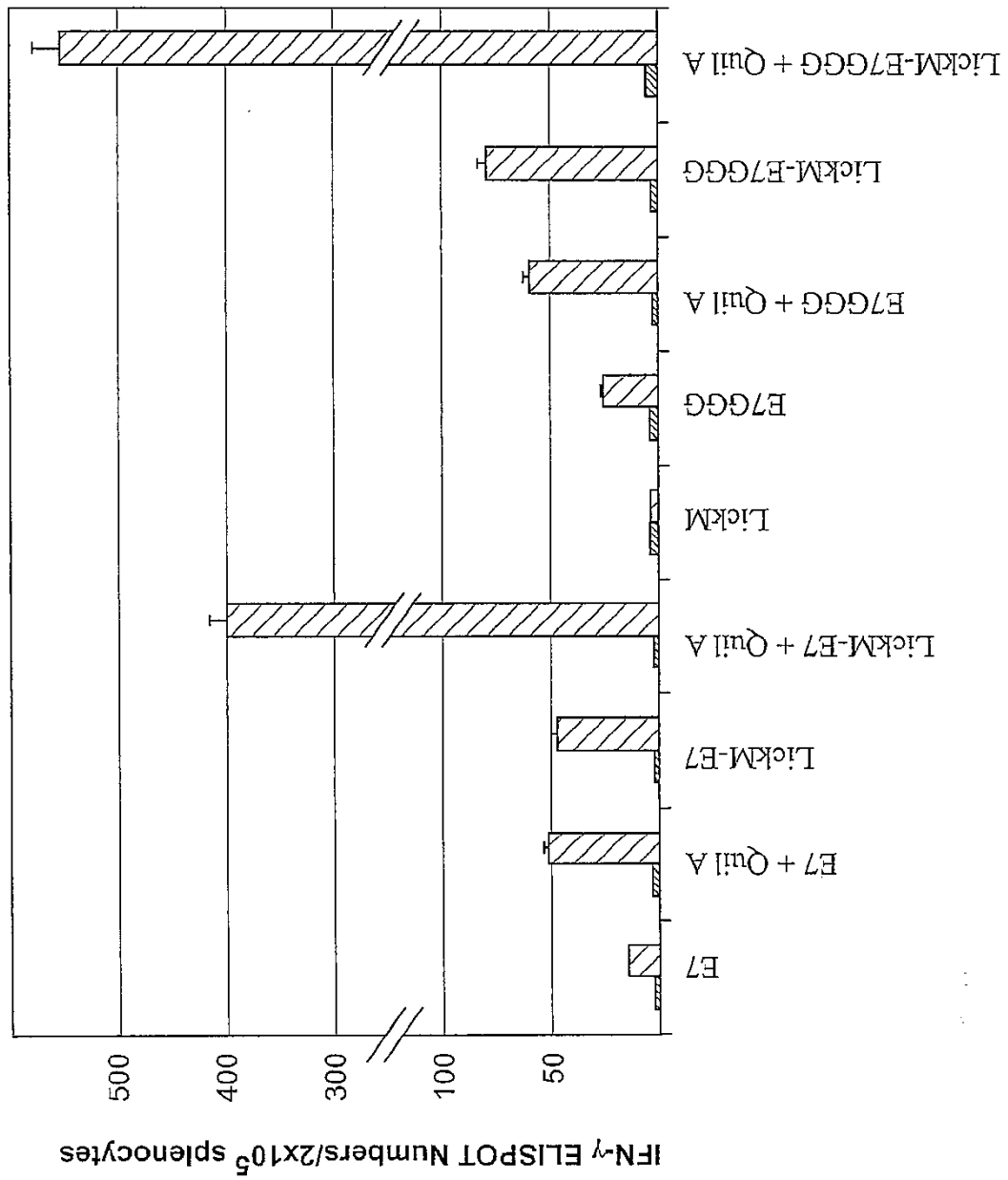
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



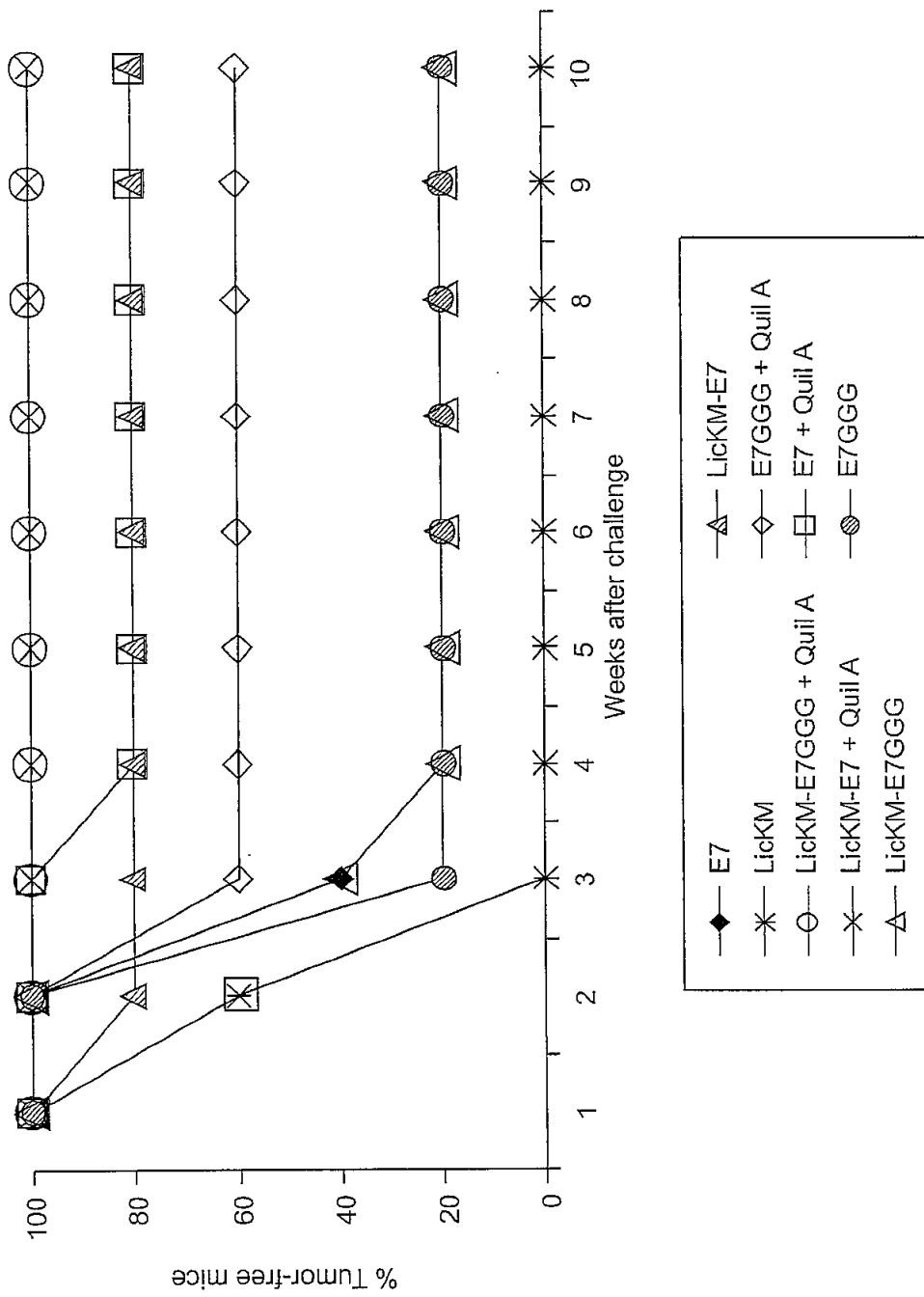
도면11a



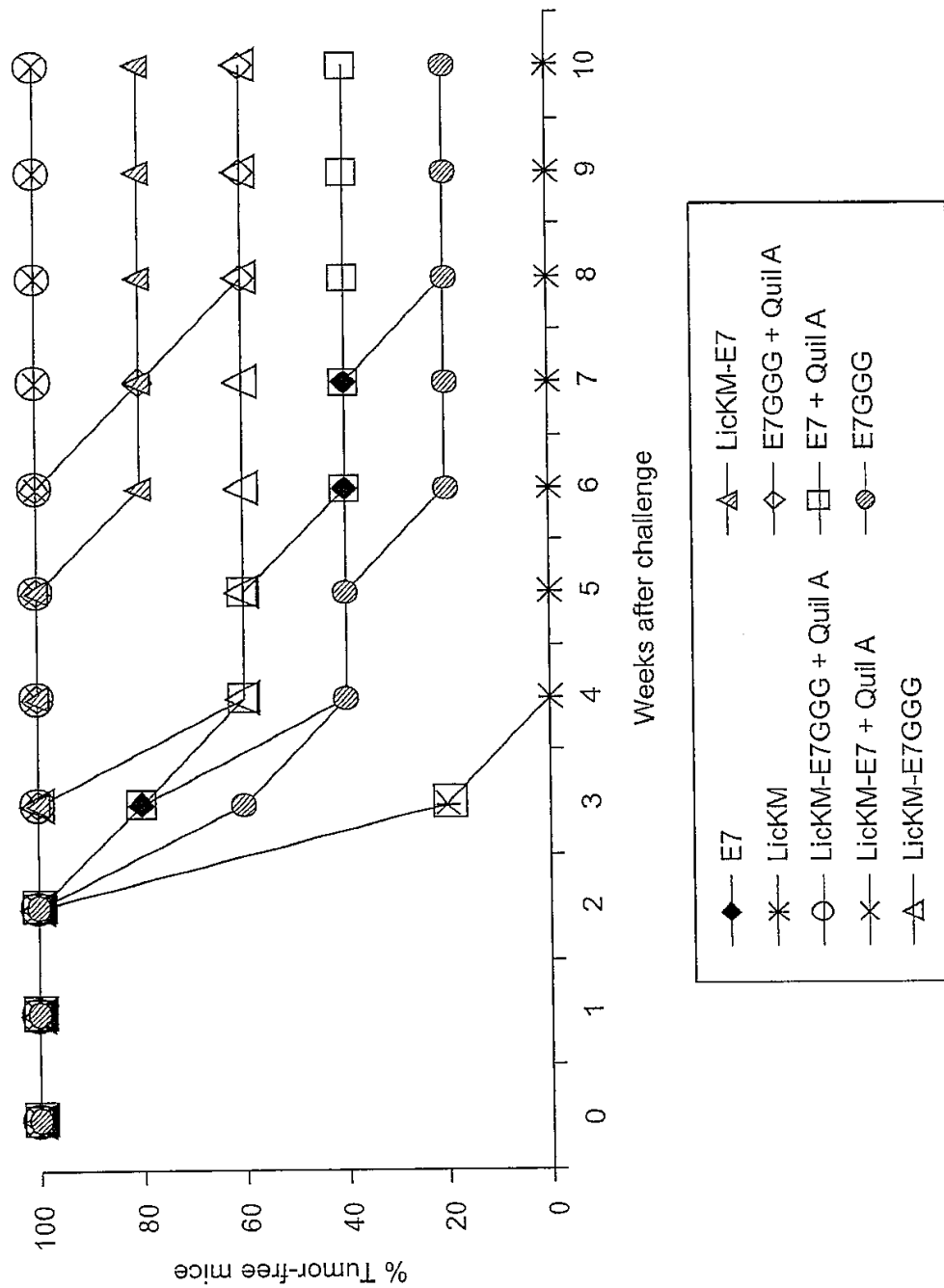
도면11b



도면11c



도면11d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Yusibov, et al.

<120> HPV Antigens, Vaccine Compositions, and Related Methods

<130> 2002645-0115

<140> 11/706,568

<141> 2007-02-13

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 297

<212> DNA

<213> HPV16 E7

<400> 1

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact 60

gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180

tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240

gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accataa 297

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> E7

<400> 2

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

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

50

55

60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 3
<211> 297
<212> DNA
<213> HPV16 E7GGG

<400> 3
atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact 60

ggctctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180

tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240

gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgcccatct gttctcagaa accataa 297

<210> 4
<211> 98
<212> PRT
<213> E7GG

<400> 4

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Gly Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser

20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

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

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 5
<211> 717
<212> DNA
<213> LicKM

<400> 5
ggatccttaa ttaaaatggg aggttcttat ccatataagt ctggtgagta tagaactaag 60

tctttctttg gatattggtt ttatgaagtt aggatgaagg ctgcaaagaa cgttgggaatt 120

gtttcttctt tctttactta tactggacca tctgataaca acccatggga tgagattgat 180

attgagtttc ttggaaagga tactactaag gttcaattca actggtataa gaatggtgtt 240

ggtggaaacg agtatcttca taaccttgga ttgatgctt ctcaagattt tcatacttat 300

ggttttgagt ggagaccaga ttatatgat ttttatgttg atggaaagaa ggtttataga 360

ggtactagaa acattccagt tactcctgga aagattatga tgaatctttg gccaggaatt 420

ggtgttgatg aatggcttgg tagatatgat ggaagaactc cacttcaagc tgagtatgag 480
 tatgttaagt attatccaaa cggtagatct gaattcaagc ttgttgtaa tactccattt 540
 gtgctgttt tctctaactt tgattcttct caatgggaaa aggctgattg ggctaacggt 600
 tctgttttta actgtgtttg gaagccatct caagttactt tttctaacgg aaagatgatt 660
 cttacttttg atagagagta tgtcgacat catcatcatc atcattgact cgagctc 717

<210> 6
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> LicKM

<400> 6

Met Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Lys Ser Gly Glu Tyr Arg Thr Lys Ser
 1 5 10 15

Phe Phe Gly Tyr Gly Tyr Tyr Glu Val Arg Met Lys Ala Ala Lys Asn
 20 25 30

Val Gly Ile Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly Pro Ser Asp Asn
 35 40 45

Asn Pro Trp Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly Lys Asp Thr Thr
 50 55 60

Lys Val Gln Phe Asn Trp Tyr Lys Asn Gly Val Gly Gly Asn Glu Tyr
 65 70 75 80

Leu His Asn Leu Gly Phe Asp Ala Ser Gln Asp Phe His Thr Tyr Gly
 85 90 95

Phe Glu Trp Arg Pro Asp Tyr Ile Asp Phe Tyr Val Asp Gly Lys Lys
 100 105 110

Val Tyr Arg Gly Thr Arg Asn Ile Pro Val Thr Pro Gly Lys Ile Met
115 120 125

Met Asn Leu Trp Pro Gly Ile Gly Val Asp Glu Trp Leu Gly Arg Tyr
130 135 140

Asp Gly Arg Thr Pro Leu Gln Ala Glu Tyr Glu Tyr Val Lys Tyr Tyr
145 150 155 160

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

Ala Val Phe Ser Asn Phe Asp Ser Ser Gln Trp Glu Lys Ala Asp Trp
180 185 190

Ala Asn Gly Ser Val Phe Asn Cys Val Trp Lys Pro Ser Gln Val Thr
195 200 205

Phe Ser Asn Gly Lys Met Ile Leu Thr Leu Asp Arg Glu Tyr Val Asp
210 215 220

His His His His His His
225 230

<210> 7
<211> 822
<212> DNA
<213> Engineered LickM

<400> 7
ggatccttaa ttaaaatggg atttgttctc ttttcacaat tgccttcatt tcttcttgtc 60

tctacacttc tcttattcct agtaatatcc cactcttgcc gtgccccaaa tggaggttct 120

tatccatata agtctgggtga gtatagaact aagtctttct ttggatatgg ttattatgaa 180

gttaggatga aggctgcaaa gaacgttgga attgtttctt ctttctttac ttatactgga 240

ccatctgata acaacccatg ggatgagatt gatattgagt ttcttgaaa ggatactact 300

aaggttcaat tcaactggta taagaatggt gttggtggaa acgagtatct tcataacctt 360

ggatttgatg ctctcaaga ttttcatact tatggttttg agtggagacc agattatatt 420

gatttttatg ttgatggaaa gaaggtttat agaggtacta gaaacattcc agttactcct 480

ggaaagatta tgatgaatct ttggccagga attggtgttg atgaatggct tggtagatat 540

gatggaagaa ctccacttca agctgagtat gagtatgtta agtattatcc aaacggtaga 600

tctgaattca agcttggtgt taatactcca ttgttgctg ttttctctaa ctttgattct 660

tctcaatggg aaaaggctga ttgggctaac ggttctgttt ttaactgtgt ttggaagcca 720

tctcaagtta ctttttctaa cggaaagatg attcttactt tggatagaga gtatgtcgac 780

catcatcatc atcatcataa ggatgaactt tgactcgagc tc 822

<210> 8
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Engineered LickM

<400> 8

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Gln Asn
 20 25 30

Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Lys Ser Gly Glu Tyr Arg Thr Lys Ser Phe
 35 40 45

Phe Gly Tyr Gly Tyr Tyr Glu Val Arg Met Lys Ala Ala Lys Asn Val

50

55

60

Gly Ile Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly Pro Ser Asp Asn Asn
65 70 75 80

Pro Trp Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly Lys Asp Thr Thr Lys
85 90 95

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Lys Asn Gly Val Gly Gly Asn Glu Tyr Leu
100 105 110

His Asn Leu Gly Phe Asp Ala Ser Gln Asp Phe His Thr Tyr Gly Phe
115 120 125

Glu Trp Arg Pro Asp Tyr Ile Asp Phe Tyr Val Asp Gly Lys Lys Val
130 135 140

Tyr Arg Gly Thr Arg Asn Ile Pro Val Thr Pro Gly Lys Ile Met Met
145 150 155 160

Asn Leu Trp Pro Gly Ile Gly Val Asp Glu Trp Leu Gly Arg Tyr Asp
165 170 175

Gly Arg Thr Pro Leu Gln Ala Glu Tyr Glu Tyr Val Lys Tyr Tyr Pro
180 185 190

Asn Gly Arg Ser Glu Phe Lys Leu Val Val Asn Thr Pro Phe Val Ala
195 200 205

Val Phe Ser Asn Phe Asp Ser Ser Gln Trp Glu Lys Ala Asp Trp Ala
210 215 220

Asn Gly Ser Val Phe Asn Cys Val Trp Lys Pro Ser Gln Val Thr Phe
225 230 235 240

Ser Asn Gly Lys Met Ile Leu Thr Leu Asp Arg Glu Tyr Val Asp His

245

250

255

His His His His His Lys Asp Glu Leu
260 265