



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월22일

(11) 등록번호 10-1514473

(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01) *C12N 15/863* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7023308

(22) 출원일자(국제) 2008년01월29일

심사청구일자 2012년11월20일

(85) 번역문제출일자 2009년11월09일

(65) 공개번호 10-2010-0019432

(43) 공개일자 2010년02월18일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/051031

(87) 국제공개번호 WO 2008/138648

국제공개일자 2008년11월20일

(30) 우선권주장

07360019.9 2007년05월15일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

US6410298 B1

US20050075303 A1

(73) 특허권자

트랜스진 에스.에이.

프랑스, 에프-67400 이즈기르쉬 꼬랑팡스파당, 부르발 콩띠에르 당테르나쉬, 파르끄 텡노바띠옹

(72) 발명자

실베스트르, 나탈리

프랑스, 에프-67120 엘제르생, 뒤 데 이리, 6

쉬미뜨, 도리

프랑스, 에프-67115 플로브생, 뒤 아리스피드 브리앙, 6

(74) 대리인

한인열

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 다중 유전자 발현용 벡터

(57) 요약

본 발명은 40 또는 그 이상의 연속적인 뉴클레오타이드 부분에서 약 80% 또는 80% 이상의 상동성을 나타내는 적어도 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자를 발현하는 벡터로서, 상기 제1의 핵산 분자 및/또는 상기 제2의 핵산 분자는 75% 미만으로 상동성을 감소시키기 위하여 변형되는 벡터를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호: 9~15와 서열번호: 66~69의 어느 하나로 정의되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 실질적으로 분리된 핵산 분자와 관련된 다. 또한, 본 발명은 이러한 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포와 약학적 조성물뿐만 아니라, 치료 또는 예방 목적의 이들의 사용을 제공한다.

명세서

청구범위

청구항 1

제1의 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자와 제2의 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자를 포함하는 벡터로서,

상기 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자는 40 이상의 연속된 뉴클레오티드들에서 80% 이상의 상동성을 나타내는 제1의 원 (native) 핵산 서열과 제2의 원 핵산 서열로부터 각각 얻어지고,

상기 상동성을 75% 미만으로 감소시키기 위하여, 상기 벡터 내에 포함된 상기 제1의 핵산 분자, 상기 제2의 핵산 분자, 또는 제1의 핵산 분자 및 상기 제2의 핵산 분자 모두는 변형되며 (modified),

상기 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자는 관련된 HPV 혈청형들로부터 얻은 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상동성을 75% 미만으로 감소시키기 위하여, 상기 제1의 핵산 분자 또는 제2의 핵산 분자 또는 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자 모두의 코돈 이용 패턴 (pattern)은 적어도 40 이상의 연속된 뉴클레오티드의 상동성 부분(들)에서 변형되는 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 코돈 이용 패턴은 뉴클레오티드 수준에서 변형되고, 상기 변형은 아미노산 수준에서 사일런스인 (silent) 벡터.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 코돈 이용 패턴은 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자 간의 상동성 부분이 8 보존 뉴클레오티드들 미만으로 제한되는 방식으로 변형되는 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 코돈 이용 패턴은 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자 간의 상동성 부분이 5 보존 뉴클레오티드들 미만으로 제한되는 방식으로 변형되는 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 벡터는 아데노 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 아데노 바이러스 벡터는 복제-결손인 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 벡터는 폭스 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 폭스 바이러스 벡터는 코펜하겐 종, 와이어스 종, NYVAC 및 고도로 약독화된 변형 양카라 (MVA) 종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 백시니아 바이러스로부터 얻어지는 벡터.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자는 HPV-16, HPV-18, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-70 및 HPV-85로 이루어지는 군으로부터 선택된 고 위험 파필로마 바이러스로부터 독립적으로 얻어지는 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자는 E1, E2, E6 및 E7로 이루어지는 군으로부터 선택된 초기 파필로마 바이러스 폴리펩티드를 코딩하는 벡터.

청구항 12

제1항에 있어서, 관련된 생물체들로부터 얻은 상기 동일한 폴리펩티드는 E2 폴리펩티드인 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 관련된 HPV 혈청형들은 HPV-16, HPV-18, HPV-33 및 HPV-52인 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 벡터는 HPV-16 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자, HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자, HPV-33 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제3의 핵산 분자 및 HPV-52 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제4의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 HPV-16 E2 폴리펩티드는 서열번호: 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HPV-18 E2 폴리펩티드는 서열번호: 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HPV-33 E2 폴리펩티드는 서열번호: 70으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HPV-52 E2 폴리펩티드는 서열번호: 71로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 제1의 핵산 분자는 서열번호: 12로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 13으로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 제3의 핵산 분자는 서열번호: 67로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 제4의 핵산 분자는 서열번호: 69로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 17

제1항에 있어서, 관련된 생물체들로부터 얻은 상기 동일한 폴리펩티드는 E6 폴리펩티드, E7 폴리펩티드 또는 E6와 E7 폴리펩티드들 모두인 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제1의 핵산 분자는 HPV-16 E6 폴리펩티드를 코딩하고, 상기 제2의 핵산 분자는 HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하며, 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 14로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 제1의 핵산 분자는 HPV-16 E7 폴리펩티드를 코딩하고, 상기 제2의 핵산 분자는 HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하며, 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 15로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 벡터는 MVA 벡터이고, 상기 제1의 핵산 분자는 백시니아 7.5K 프로모터의 조절하에 놓여지고, 상기 제2의 핵산 분자는 백시니아 H5R 프로모터의 조절하에 놓여지고, 상기 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자 모두는 상기 MVA 벡터의 결실 III으로 삽입되는 벡터.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 벡터는 MVA 벡터이고, 상기 제1의 핵산 분자는 백시니아 7.5K 프로모터의 조절하에 놓여지고, 상기 제2의 핵산 분자는 백시니아 H5R 프로모터의 조절하에 놓여지고, 상기 제1의 핵산 분자와 제2의 핵

산 분자 모두는 상기 MVA 벡터의 결실 III으로 삽입되는 벡터.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 벡터는 HPV-16 E6 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자, HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자, HPV-16 E7 폴리펩티드를 코딩하는 제3의 핵산 분자 및 HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하는 제4의 핵산 분자를 포함하고, 상기 제1의 핵산 분자, 제2의 핵산 분자, 제3의 핵산 분자 및 제4의 핵산 분자는 75% 이상의 상동성을 나타내는 40 이상의 연속된 뉴클레오티드들의 부분을 포함하지 않는 벡터.

청구항 23

서열번호: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 66, 67, 68 또는 69로 표시되는 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 24

제23항에 따른 핵산 분자 또는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 25

치료적으로 효과적인 양의 제23항에 따른 핵산 분자; 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 벡터; 또는 제23항에 따른 핵산 분자 또는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 벡터를 포함하는 숙주세포, 및 약학적으로 허용가능한 운반체를 포함하는, 감염성 질환, 암 또는 면역 결핍 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 조성물은 인간에서 전신 또는 점막 투여를 위한 하나 이상의 어쥬번트(들)을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 어쥬번트는 이미다조퀴놀린 화합물인 약학적 조성물.

청구항 28

제25항에 있어서, 파필로마 바이러스에 의한 감염과 관련된 증상의 예방 또는 치료를 위한, 약학적 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 파필로마 바이러스 지속성 감염, 또는 파필로마 바이러스 전-악성 및 악성 병변의 예방 또는 치료를 위한, 약학적 조성물.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 조성물은 프라임 부스트(prime boost) 치료 방식에 따라 투여되고, 상기 조성물은 개체에서 면역 반응을 프라임 (prime) 시키거나; 또는 부스트 (boost)시키거나; 또는 프라임시키고 부스트시키는데 이용되는, 약학적 조성물.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 동일한 생명체 또는 밀접하게 관련된 생명체들로부터 얻어진 흥미로운 다중 뉴클레오타이드 서열을 독립적으로 발현시키기 위하여 조작된 재조합 벡터에 관한 것이다. 본 발명은 치료 또는 예방 목적을 위하여 다양한 원핵생물뿐만 아니라 진핵생물 인 비트로 시스템 또는 동물 또는 인간 개체에서 서로 상보성을 나타내는 다중 뉴클레오타이드 서열을 발현시키기 위한 재조합 핵산 기술의 분야와 관련된다. 특히, 본 발명은 파필로마 바이러스와 헤파티티스 바이러스와 같은 감염성 생명체에 의하여 유발되는 병리학적 상태의 치료 또는 예방을 위한 면역치료의 분야에 유용하다.

배경 기술

[0002]

재조합 DNA 기술은 배양된 숙주 세포 또는 살아있는 생명체에서 뉴클레오타이드 서열을 발현하는 것을 가능하게

하였다. 몇 가지의 플라스미드 DNA와 바이러스성 벡터가 얻어졌고, 백신화, 유전자 치료, 면역 치료 및 배양된 세포에서의 발현을 포함하는 다양한 목적에 적용되었다. 아데노바이러스 벡터와 폭스바이러스 벡터와 같은 벡터들은 광범위한 숙주 세포들에서 다중 뉴클레오타이드 서열을 발현하는 잠재성과 거대한 클로닝 공간을 갖는 이점을 갖는다. 다중 뉴클레오타이드 서열의 발현은 (예를 들어, 체액성 면역과 세포성 면역을 결합하는) 코딩된 폴리펩티드에 의하여 제공되는 치료 효용성을 향상시키는데 유익할 수 있다. 원하는 뉴클레오타이드 서열 각각을 발현시키기 위하여 분리되어 조작된 복수의 재조합 벡터를 생산하는 것 보다, 적어도 생산 단계 및 조절 허가(regulatory approval)를 촉진시키기 위하여 단일 재조합 벡터를 생산하는 것이 이로우 수 있다.

[0003] 예를 들어, 파필로마 바이러스 감염에 있어서, 예를 들어, HPV-16과 KPV-18과 같은 다중 감염의 위험에 놓인 개체에서 특히 숙주의 면역 반응을 넓히거나 강화시키기 위하여, 몇 가지 파필로마 바이러스 유전형들(genotypes)로부터 면역원 폴리펩티드들을 발현시키는 것이 흥미로울 수 있다. 그러나, 뉴클레오타이드 서열을 코딩하는 상기 면역원 폴리펩티드들은 상관된 HPV 유전형 간에 높은 상동성을 나타낸다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 수준에서 전체적으로 63%의 상동성을 나타내는 HPV-16 E6와 HPV-18 E6 서열은, 그림에도 불구하고, 단일 벡터로부터 HPV-16과 HPV-18 유전자의 발현을 위태롭게 할 수 있는 75%를 넘는 매우 높은 상동성의 특정 지역을 포함한다.

[0004] 더구나, 바이러스 오리진의 폴리펩티드를 발현하는 경우, 상동성 뉴클레오타이드 서열들이 전체적인 바이러스 게놈으로부터 나타날 수 있다. 바이러스는 동일한 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 내부 번역 개시 또는 리딩 프레임 시프트, 즉, 동일한 DNA 서열이 하나의 리딩 프레임 이상으로 번역되는 것과 같은 생물학적 메커니즘을 통한 두 개의 다른 단백질을 코딩하는 것이 오히려 빈번하게 일어난다. 예를 들어, HPV-16 게놈에 있어서, 인접한 E1과 E2 유전자는 다른 리딩 프레임으로 번역되는 59 뉴클레오타이드가 오버래핑되어 있다. 다시 말하면, E1 유전자의 마지막 59 뉴클레오타이드는 E2 유전자의 첫 59 뉴클레오타이드와 오버래핑되어 있다.

[0005] 그러나, 벡터에서 상동성 서열의 존재는, 벡터 생산 단계 중에 상동성 서열 간에 발생하는 재조합 발생(event)에 기인하는 유전자 서열의 손실을 이끄는, 특히 벡터의 안정성에 나쁜 영향을 주는 것으로 기대된다. 그러므로, 단일 벡터에서 HPV-16 E1과 E2 유전자들의 발현은 상동성 재조합 발생을 강력하게 일으키고, 마침내는 E1과 E2 상동성 서열 간에 포함되는 서열의 손실을 야기하는 59 뉴클레오타이드의 공통 부분의 존재와 관련된다. 또한, 이러한 원하지 않는 상동성 재조합 발생은 동일한 벡터에서 HPV-16과 HPV-18 유전자 서열을 발현시킬 때 발생할 수 있다. 이러한 불안정성 문제는, 특히 인간 임상 적용을 위한 벡터 스톡(stock)을 불안정하게 할 수 있다.

[0006] 이러한 측면에 있어서, W092/16636은 재조합 발생의 가능성을 감소시키기 위하여, 재조합 벡터에 상동성 뉴클레오타이드 서열들을 각각에 대하여 반대 방향으로 삽입시키는 것을 제안하고 있다. 그러나, 이러한 전략은 백시니아 바이러스와 연관되며, 아데노 바이러스와 같은 다른 재조합 벡터들에 대하여는 설명하고 있지 못하다. 더구나, 프로모터 간섭(promoter interference) 가능성과 구조적 제한(construction constraint)때문에, 반대 방향으로의 배열은 항상 가능한 것도 아니다.

발명의 상세한 설명

[0007] 원 상태(native context)에 있어서, 높은 상동성 부분들을 포함하는, 동일한 것으로부터 또는 관련된 생명체로부터 얻어진 뉴클레오타이드 서열들을 숙주 세포 또는 개체에서 발현할 수 있는 재조합 벡터들을 생산하는 기술이 요구되어 진다. 본 발명은 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)을 이용하여, 코딩되는 아미노산 서열을 변화시키지 않거나, 크게 변화시키지 않으면서도, 상동성 뉴클레오타이드 서열들의 어느 한쪽 또는 양쪽을 수식 전보다 상동성이 적어지게 변화시키는 재조합 발생의 가능성을 최소화시키기 위하여 디자인된 신규한 전략을 제공하여 이러한 요구를 충족시킨다. 본 발명은 상동성 서열들 사이에서, 특히 벡터 생산 단계에서 발생하며, 이들 사이에 포함된 뉴클레오타이드 서열의 손실을 이끌 수 있는 상동성 재조합의 결실 효과를 회피하는 것을 가능하게 한다. 본 발명의 벡터는 원 상태에서 59 뉴클레오타이드의 100%의 상동 부분을 공유하는 E1 및 E2 파필로마 바이러스 유전자를 발현하는데 있어서 놀라운 정도로 효과적이고, 벡터 생산 단계 동안 놀라운 정도로 안정된 것으로 알려졌다. 또한, 본 발명의 벡터는 밀접하게 관련된 HPV- 16 및 HPV- 18 유전자형으로부터 얻어진 E6 및 E7 유전자를 발현하는데 있어서도 놀라운 정도로 효율적인 것으로 알려졌다.

[0008] 여러 기술적 문제점들은 청구항들에 의해 정의된 발명을 구현한 구체예로서 해결된다.

[0009] 본 발명의 또 다른 측면과 특성 및 이점들은 하기 기술된 본 발명의 바람직한 구체예들에 의해 명확해 질 것이다. 이들 구체예들은 개시의 목적으로 제공된다.

[0010] 따라서, 본 발명의 첫 번째 측면에 있어서, 본 발명은 제1의 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자와 제2의

폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공하며,

- [0011] - 상기 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자들은 40 또는 그 이상의 연속된 뉴클레오티드 부분에서 약 80%, 또는 80% 이상의 상동성을 보이는 제1의 원(native) 핵산 서열 및 제2의 원 핵산 서열로부터 각각 얻어지고,
- [0012] - 벡터를 구성하는 상기 제1의 핵산 분자 및/또는 제2의 핵산 분자는 상기 상동성을 75% 미만으로 감소시키도록 수식(modified)된다.
- [0013] 본 명세서 전체에서 사용된 표현 "하나"는 문맥상 다른 의미로 사용되지 않는한 참조된 조성물 또는 과정의 "최소한 하나", "최소한 첫 번째", "하나 또는 그 이상", "다수"를 의미하는 것으로 사용되었다. 예를 들어, "하나의 세포"는 그 혼합물을 포함하는 다수의 세포들을 포함한다.
- [0014] 본 명세서에서 사용된 표현 "및/또는"은 "및", "또는" 및 "상기 용어에 의해 연결되는 요소 전체 또는 일부의 조합"의 의미를 포함한다. 예를 들어, "제1의 핵산 분자 및/또는 제2의 핵산 분자"는 제1의 핵산 분자 또는 제2의 핵산 분자, 또는 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자 모두를 의미한다.
- [0015] 본 명세서에서 표현 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위에서 5% 이내, 바람직하게는 4% 이내, 보다 바람직하게는 2% 이내를 의미한다.
- [0016] 본 명세서에서 생산물, 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 "포함한다"는 표현은 생산물이나 조성물, 방법 등이 참조된 성분이나 단계를 포함하되 다른 요소를 배제하지는 않는다는 것을 의미하기 위해 사용되었다. "본질적으로 구성된다"는 표현은 본질적인 의미를 가지는 다른 성분 또는 과정을 배제하는 것을 가리키는 것으로 사용된다. 따라서, 본질적으로 인용된 성분들로 구성되는 성분은 소량의 오염 물질이나 의약적으로 수용가능한 매개체를 배제하지는 않는다. "구성된다"는 표현은 다른 성분이나 과정의 사소한 요소 이상을 배제하는 것을 의미한다. 예를 들어, 어떠한 아미노산 서열로 "구성된" 폴리펩티드라 함은 상기 폴리펩티드가 인용된 아미노산 서열 이외의 다른 아미노산 서열은 포함하지 않음을 의미한다. 어떠한 아미노산 서열로 "본질적으로 구성된" 폴리펩티드라 함은 인용된 아미노산 서열이 소수의 아미노산 잔기, 즉 1 내지 약 50 정도의 잔기만을 부가적으로 포함하며 존재함을 의미한다. 어떠한 아미노산 서열을 "포함하는" 폴리펩티드라 함은 인용된 아미노산 서열이 폴리펩티드의 최종 아미노산 서열의 최소한 일부분임을 의미한다. 이러한 폴리펩티드는 수백 개에 달할 수 있는 부가적인 아미노산 잔기들을 다소 포함할 수 있다. 이러한 부가적인 아미노산 잔기들은 여러 작용을 하며 특히 폴리펩티드 트래픽킹(trafficking)에서 역할을 할 수 있고, 폴리펩티드 생성이나 정제를 촉진하며, 반감기를 증가시킨다. 이들은 핵산 서열을 위해서도 동일하게 적용할 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 사용된 표현 "벡터"는 숙주 세포 또는 개체 내에서 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자를 전달하고 발현시킬 수 있는 작용 인자이다. 이 벡터는 비염색체성이거나 (예를 들어, 에피솜(episome)), 통합되거나 (숙주 염색체에 통합되기 위하여), 자체적으로 복제될 수도 아닐 수도 있으며, 다중 또는 낮은 사본(low copy)이거나, 이중 나선 또는 단일 나선이거나, 원 형태(naked) 또는 다른 분자와의 복합체 (예를 들어, 다른 지질 또는 폴리머와 복합되어 리포솜(liposome), 리포플렉스(lipoplex) 또는 나노 입자와 같은 특정 구조를 형성하는 벡터, 바이러스 캡시드에 패키징된 벡터, 및 고체 입자 상에 고정된 벡터 등)일 수 있다. 용어 "벡터"의 정의는 또한 특정 숙주 세포로의 바람직한 타겟팅을 허용하기 위해 수식된 벡터들까지를 포함한다. 타겟팅된 벡터의 특징적 성질은 그 표면에 세포 특이적 마커 (예를 들어, HPV 감염 세포), 조직 특이적 마커 또는 종양 특이적 마커와 같은 표면 노출(surface-exposed) 성분을 인식하고 이에 결합되는 리간드가 존재한다는 것이다. 리간드는 벡터의 표면에 존재하는 폴리펩티드(예를 들어, W094/10323 와 W002/96939에 기술된 아테노 바이러스 섬유, 펜톤(penton), pIX, 또는 EP 1 146 125에 기술된 백시니아 p14 유전자 생산물)에 유전공학적으로 삽입될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 맥락과 관련하여, 용어 "핵산", "핵산 분자", "폴리뉴클레오티드" 및 "뉴클레오티드 서열"은 교차적으로 사용되어 임의의 길이를 가지는 폴리데옥시리보뉴클레오티드 (DNA) 또는 폴리리보뉴클레오티드 (RNA) 분자의 폴리머, 또는 이들의 임의의 조합으로 정의된다. 이러한 정의는 단일 또는 이중 나선의, 선형 또는 원형의 자연적으로 발생하거나 합성된 폴리뉴클레오티드를 모두 포함한다. 또한, 이러한 폴리뉴클레오티드는 핵산의 *인 비보(in vivo)* 안정성을 증가시키고, 이의 전달을 향상시키거나, 또는 숙주 개체로부터의 제거율(clearance rate)을 감소시키기 위해 화학적 변이들 (예를 들어, WO 92/03568; US 5,118,672)뿐만 아니라 자연적으로 발생하지 않는 뉴클레오티드들 (예를 들어, 메틸화 뉴클레오티드와 US 5,525,711, US 4,711,955 또는 EPA 302 175에 기술된 것과 같은 뉴클레오티드 유사물)을 포함한다. 변이가 존재하는 경우에는 중합의 이전 또는 이후에 적용될 수 있다.

- [0019] 본 명세서에서 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 9 또는 그 이상의 펩티드 결합으로 결합된 아미노산을 포함하는 아미노산 잔기 폴리머를 가리키는 것으로 교차적으로 사용되었다. 이 폴리머는 선형 또는 분기된 형태이거나 원형일 수 있다. 본 발명의 문맥에 있어, "폴리펩티드"는 L 스테레오아미노머 (원 발생 형태) 또는 D 스테레오아미노머인 아미노산을 포함하며, [메타]-알라닌, 오르니틴(ornithine), 또는 메티오닌 설폭사이드(methionine sulfoxide)와 같은 20개의 통상의 자연적으로 발생하는 아미노산 이외의 아미노산, 또는 알파-아미노, 알파-카르복실 또는 사이드체인(side-chain)에서 예를 들어, 메틸, 포르밀, 아세틸, 글리코실, 포스포릴 등을 부가하여 수식된 하나 또는 그 이상의 아미노산 등을 포함할 수 있다. 일반적인 기술을 따르면, 아미노산 폴리머의 길이가 긴 경우 (예를 들어, 50이 넘는 아미노산 잔기들)에는 바람직하게는 폴리펩티드 또는 단백질로 지칭된다. 결과적으로, "펩티드"는 길이에 있어 약 9 내지 약 50의 아미노산을 가지는 단편을 지칭하다. 본 발명의 문맥에 있어, 펩티드는 바람직하게는 원 발생 형태의 (또는 원래의) 단백질의 선택된 영역, 예를 들어, 에피토프를 포함하는 이들의 면역원 단편을 포함한다.
- [0020] 본 명세서에서 정의된 용어 "폴리펩티드"는 수식된 폴리펩티드뿐만 아니라 원 폴리펩티드까지를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "원"은 자연계의 소스로부터 회수된 물질을 의미하며 인공적으로 수정되거나 실험실에서 사람에게 의해 변경된 물질과 구분된다. 예를 들어, 원 폴리펩티드는 야생 형태의 생명체 또는 세포의 게놈에 존재하는 유전자에 의해 코딩된다. 반대로, 수식된 폴리펩티드는 원 폴리펩티드와 달라지도록 실험실에서 수식된 핵산 분자에 의해 코딩되며, 이는 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 아미노산을 삽입, 제거 또는 치환하거나 이들 가능한 방법들의 조합을 통해 이루어진다. 여러 단계의 수식이 예상되는 경우에는, 이들은 연속적인 잔기들 및/또는 비연속적인 잔기들과 관련될 수 있다. 본 발명에 의하여 구상된 수식의 예는 자연 폴리펩티드에서 보여지는 생물학적 활성의 변화를 가져올 수 있다. 주어진 생물학적 활성을 위해 중요한 아미노산들은 구조 및 기능 분석에 의해 일반적인 방법으로 알아낼 수 있으며 본 발명의 분야에 숙련된 사람은 이러한 생물학적 활성을 감소시키거나 제거할 수 있는 변이의 종류를 결정할 수 있을 것이다. 이러한 변이는 현장 환경에 적절한 돌연변이 생성과 같은 일반적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 다른 방법으로, 자동화된 공정에서 화학적 합성을 통해 수식된 폴리펩티드를 코딩하는 합성된 핵산 분자를 생성할 수 있다 (예를 들어, 실시예 부분에 기술된 상호 겹치는 올리고뉴클레오타이드로부터 조합될 수 있다).
- [0021] 본 명세서에서 사용된 "얻어졌다"는 표현은 물질이 자연계의 소스로부터 발견되거나, 분리되거나, 정제되거나, 유도되었음을 의미한다. "분리되었다"는 것은 원래의 자연적 환경으로부터 제거되었음을 의미한다. "정제된다"는 것은 물질이 원래는 상호 연관되어 있는 하나 이상의 다른 성분으로부터 실질적으로 자유로움을 나타낸다. "유도된다"는 것은 원 물질과 비교하여 하나 또는 그 이상이 변형된 것을 나타낸다(특히, 치환, 결실 및/또는 삽입 등과 같은 변형). 분리, 정제 및 변형 기술들은 해당 분야에서 일반적인 것이며 목표하려는 물질에 따라 달라진다(예를 들어, 핵산 분자의 클로닝은 제한 효소를 이용하여, PCR 또는 화학적 합성을 통해 자연계의 소스를 사용하여 수행할 수 있다).
- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 "상동성"은 일반적으로 백분율로 표시되며 최소한 40개의 연속된 뉴클레오타이드들(예를 들어, 약 40, 45, 50, 55, 57, 58, 59, 60, 70 또는 그 이상의 연속된 뉴클레오타이드들)의 영역에서 상호간에 주어진 정도의 동일성을 보유하는 뉴클레오타이드 서열들을 나타낸다. "최소한 80%"라 함은 대략 80% 또는 80% 보다 큰 것을 나타낸다 (예를 들어, 80% 보다 큰 어떤 값, 유리하게는 최소한 85%, 다소 바람직하게는 최소한 87%, 바람직하게는 최소한 90%, 좀 더 바람직하게는 최소한 95%, 더욱더 바람직하게는 최소한 97% 내지 100%의 서열 상동성). "75% 보다 작다"라고 함은 75 보다 작은 임의의 값을 의미한다(예를 들어, 대략 74, 72, 70, 68, 65, 62, 60% 또는 그보다 작은 값). 두 개의 뉴클레오타이드 서열들 간의 상동성 비율은 각 서열들에 의해 공유되는 동일한 위치들의 갯수의 함수이며, 최적의 배열을 위해 도입될 필요가 있는 간격들의 갯수와 각 간격의 길이를 고려해야 한다. 뉴클레오타이드 서열들 간의 상동 비율을 결정하기 위하여, GCG Wisconsin 팩키지, BLAST(Basic Local alignment Search Tool) 프로그램과 같은 본 발명 분야의 다양한 컴퓨터 프로그램 및 수학적 알고리즘을 사용할 수 있으며 이들은 국립 바이오 기술 정보 센터(National Center for Biotechnology Information: NCBI)에서 공개적으로 이용 가능하고 여러 인쇄 매체(예를 들어, Altschul 등, 1990, J. Mol. Biol. 215, 403~410)에 기술되어 있다.
- [0023] 출발점으로서, 수식 이전에, 80% 또는 80% 이상의 상동성 비율, 즉 "상동성" 부분들을 공유하는 40 또는 그 이상의 연속된 뉴클레오타이드들의 하나 또는 그 이상의 부분들을 나타내기 위해, 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자 사이의 서열 얼라인먼트가 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 상동성 비율을 75% 이하(예를 들어, 약 74, 72, 70, 68, 65, 62, 60% 또는 그 이상)로 감소시키기 위해서, 최소한 상기 40 또는 그 이상 부분(예를 들어, 약 40, 45, 50, 55, 57, 58, 59, 60, 70 또는 그 이상)의 상동성 연속 뉴클레오타이드에서 제1의 핵산 분자 또는

제2의 핵산 분자 또는 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자 모두의 코돈 사용 패턴은 수정될 수 있다 (예를 들어, 코돈 사용 패턴의 축퇴화를 통해).

[0024]

메티오닌(methionine)과 트립토판(tryptophane) 잔기들이 각각 독특한 핵산 트리플렛(즉, 코돈)에 의해 코딩되는 반면에, 다른 코돈들은 18개의 다른 아미노산(유전 코드의 축퇴(degeneracy))의 코딩을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 아미노산은 다음의 코돈들에 의해 코딩된다: 알라닌(alanine) (Ala 또는 A)은 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU에 의해 코딩된다; 시스테인(cysteine) (C 또는 Cys)은 코돈 UGC 및 UGU에 의해 코딩된다; 아스파라긴산(D 또는 Asp)은 코돈 GAC 와 GAU에 의해 코딩된다; 글루탐산(E 또는 Glu)은 코돈 GAA와 GAG에 의해 코딩된다; 페닐알라닌(F 또는 Phe)은 코돈 UUC 와 UUU에 의해 코딩된다; 글리신(G 또는 Gly)은 코돈 GGA, GGC, GGG, 와 GGU에 의해 코딩된다; 히스티딘(H 또는 His)은 코돈 CAC 와 CAU에 의해 코딩된다; 이소류신(I 또는 Ile)은 코돈 AUA, AUC 와 AUU에 의해 코딩된다; 리신(K 또는 Lys)은 코돈 AAA 와 AAG에 의해 코딩된다; 류신(L 또는 Leu)은 코돈 UUA, UUG, CUA, CUC, CUG 와 CUU에 의해 코딩된다; 메티오닌(M 또는 Met)은 코돈 AUG에 의해 코딩된다; 아스파라긴(N 또는 Asn)은 코돈 AAC 와 AAU에 의해 코딩된다; 프롤린(P 또는 Pro)은 코돈 CCA, CCC, CCG 와 CCU에 의해 코딩된다; 글루타민(Q 또는 Gln)은 코돈 CAA 와 CAG에 의해 코딩된다; 아르기닌(R 또는 Arg)은 코돈 AGA, AGG, CGA, CGC, CGG 와 CGU에 의해 코딩된다; 세린(S 또는 Ser)은 코돈 AGC, AGU, UCA, UCC, UCG 와 UCU에 의해 코딩된다; 트레오닌(T 또는 Thr)은 코돈 ACA, ACC, ACG 와 ACU에 의해 코딩된다; 발린(V 또는 Val)은 코돈 GUA, GUC, GUG 와 GUU에 의해 코딩된다; 트립토판(W 또는 Trp)은 코돈 UGG에 의해 코딩된다; 티로신(Y 또는 Tyr)은 코돈 UAC 와 UAU에 의해 코딩된다.

[0025]

상기 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자 내에 존재하는 하나 또는 그 이상의 상동 부분 내의 상동성 비율을 감소시키는 것은 유전자 코드의 축퇴를 이용하여 제1의 핵산 분자 및/또는 제2의 핵산 분자 내의 코돈 사용 패턴을 변경시킴으로써 성취될 수 있다. 코돈 사용 패턴의 변경은 일반적으로 하나 또는 그 이상의 "원" 코돈을 다른 코돈으로 대체함으로써 수행된다. 예를 들어, Arg로 코딩한 AGA 코돈을 Arg으로 코딩한 CGC 코돈으로 대체함으로써 코돈의 3 위치 중 2 위치에서의 상동성 비율이 낮아지게 된다. 상동성은 부분 치환에 의해 충분히 감소하므로 원 코돈 모두를 축퇴시킬 필요는 없다. 또한, 코돈 사용 패턴의 수정은 핵산 분자 전체에 대하여 수행되거나 또는 수식 이전에 존재하는 상동성 부분으로 한정될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명의 문맥에 있어, 축퇴화는 제1의 핵산 분자에서 수행되고 상동성 부분으로 제한된다. 바람직하게는, 코돈 사용 패턴은 뉴클레오타이드 수준에서 수정되고 아미노산 수준에서는 나타나지 않는데, 즉 가능한 경우에, 각각의 "원" 코돈은 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈으로 대체되어 이러한 수정이 코딩된 폴리펩티드에서는 번역되지 않게 된다. 좀더 바람직하게는, 가능한 경우에, 코돈 사용 패턴은 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자 사이의 상동성 부분이 9 미만으로 또는 8 연속 뉴클레오타이드들로, 유용하게는 7 미만의 연속한 뉴클레오타이드들로, 바람직하게는 6 연속 뉴클레오타이드들로, 그리고 좀더 바람직하게는 5 미만의 연속한 뉴클레오타이드들로 제한되도록 수식된다. 코돈 사용 패턴의 수식은 본 발명 기술 분야에 숙련된 사람에게 알려진 여러 방법으로 수행될 수 있으며, 현장 환경에 적합한 돌연변이화(mutagenesis) (예를 들어, Sculptor™ 인 비트로(*in vitro*) 돌연변이 시스템, Amersham, Les Ulis, France), PCR 돌연변이화, DNA 셔플링(shuffling) 및 화학적 합성 기술(예를 들어, 합성 핵산 분자의 생성).

[0026]

본 발명에 따른 벡터가 2개를 초과하는 핵산 분자를 포함하는 경우에는, 벡터에 포함되고, 연속 뉴클레오타이드로서 다른 핵산 분자가 얻어질 수 있는 최소한 하나의 다른 원 핵산 서열을 가지는 뉴클레오타이드의 40 또는 그 이상 부분에서 약 80% 또는 80%를 초과하는 상동 비율을 보이는 원 핵산 서열에서 얻어지는 어떠한 핵산 분자도 수식되어 상동성 비율을 75% 미만으로, 즉 벡터에 포함되는 어떠한 핵산 분자들의 쌍도 75% 이상의 동일 비율을 보이는 연속 뉴클레오타이드의 40 또는 그 이상의 부분을 포함하지 않도록 하게 된다.

[0027]

80% 또는 80%를 초과하는 상동성을 보이는 하나 또는 그 이상의 부분들을 나타내기 위해 핵산 분자가 얻어지는 각 (쌍의) 원 서열들의 서열 배열이 사용될 수 있다. 그리고, 최소한 상동 부분의 상동성 비율을 75% 미만으로 감소시키기 위해 하나 또는 그 이상의 원 서열들의 서열이 특히 코돈 사용을 축퇴시킴으로써 수식된다. 결국에는, 벡터에 포함되는 어떤 핵산 분자도 상기 벡터의 다른 핵산 분자와 75%를 초과하는 동일 비율을 보이는 40 또는 그 이상(예를 들어, 45, 50, 55, 57, 58, 59, 60, 70 또는 그 이상) 부분의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 없다.

[0028]

상기 기술한 바와 같이, 벡터를 구성하는 핵산 분자에 의해 코딩된 폴리펩티드는 원 폴리펩티드와 같은 아미노산 서열을 가질 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 특히, 최소한 벡터에 포함되는 핵산 분자의 상동 부분에서 상동성을 감소시키기 위한 코돈 사용의 축퇴를 위한 변이와 함께, 벡터에 포함되는 상기 핵산 분자는 또한 코딩

된 폴리펩티드의 아미노산 서열의 수식을 초래하거나 초래하지 않을 수 있는 부가적인 변이를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 벡터는 비바이러스 벡터(예를 들어, 플라스미드 DNA)뿐만 아니라 바이러스 벡터까지를 포함한다. 적절한 비바이러스 벡터는 pREP4, pCEP4 (Invitrogen), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840), pVAX 및 pgWiz와 같은 플라스미드를 포함한다 (Gene Therapy System Inc; Himoudi 등, 2002, J. Virol. 76, 12735~12746). 본 명세서에서 "바이러스 벡터"는 본 발명의 분야에서 인식되는 의미로 사용된다. 이는 완전한 바이러스 계통, 이의 일부분, 또는 하기 기술된 수식된 바이러스 계통과 이로부터 생성되는 바이러스 입자(예를 들어, 감염 바이러스 입자를 생산하기 위해 바이러스 캡시드에 패키징된 바이러스 벡터)까지를 포함하여 최소한 하나의 바이러스 유래 요소를 가지는 임의의 벡터를 나타낸다. 본 발명의 바이러스 벡터들은 복제 능력을 가지거나, 또는 복제 능력 결핍을 위해 이 능력이 제거되거나 또는 복제 능력이 손상될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "복제 능력"은 특정 숙주 세포 (예를 들어, 종양 세포) 내에서 우수하게 또는 선택적으로 복제할 수 있도록 조작된 복제 선택적이고 조건적으로 복제할 수 있는 바이러스 벡터들을 포함한다. 바이러스 벡터는 다양한 다른 바이러스들로부터, 특히 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스 (AAV), 수두 바이러스, 간염 바이러스, 홍역 바이러스 및 포미(foamy) 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된 바이러스로부터 얻을 수 있다.

[0030] 하나의 구체예에서, 본 발명의 벡터는 아데노 바이러스 벡터이다(리뷰에 관하여는 다음을 참조: "유전자 치료를 위한 아데노 바이러스 벡터", 2002, Ed D. Curiel, J. Douglas, Academic Press). 이는 어떠한 인간 또는 동물의 아데노 바이러스로부터도 유도될 수 있다. 어떠한 혈청형 및 하위군들도 본 발명의 문맥에 맞게 채용될 수 있다. 보다 많은 특정한 하위군 A (예를 들어, 혈청형 12, 18 및 31), 하위군 B (예를 들어, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34 및 35), 하위군 C (예를 들어, 혈청형 1, 2, 5 및 6), 하위군 D (예를 들어, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39 및 42-47), 하위군 E (혈청형 4), 및 하위군 F (혈청형 40 및 41) 이 인용될 수 있다. 인간 아데노 바이러스 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) 및 35 (Ad35)가 특별히 바람직하다. 이러한 아데노 바이러스는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Md.)에서 구할 수 있으며, 많은 출판물들이 이들의 서열, 조직 및 제조 방법을 기술하고 있어 기술자들이 이들을 응용할 수 있다(예를 들어, US 6,133,028; US 6,110,735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels 등, 2003, J. Virol. 77, 8263~8271 참조).

[0031] 본 발명의 아데노 바이러스 벡터는 복제 능력을 가질 수 있다. 복제 능력을 가지는 아데노 바이러스 벡터들의 많은 예가 본 발명의 분야에 숙련된 사람들에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, Hernandez-Alcoceba 등, 2000, Human Gene Ther. 11, 2009~2024; Nemunaitis 등, 2001, Gene Ther. 8, 746~759; Alemany 등, 2000, Nature Biotechnology 18, 723~727; W000/24408; US 5,998,205, W099/25860, US 5,698,443, W000/46355, W000/15820 및 W001/36650).

[0032] 다른 경우에 있어, 본 발명의 아데노 바이러스 벡터는 복제 능력이 결핍된 벡터이다(예를 들어, W094/28152 참조). 바람직한 복제 결핍 아데노 바이러스 벡터는 E1-결핍(E1-defective) (예를 들어, US 6,136,594 및 US 6,013,638)으로 E1 결핍이 위치 약 459에서 3328까지, 또는 위치 약 459에서 3510까지 연장된다(인간 아데노 바이러스 5형 서열에 대한 참조: GeneBank, accession number M 73260, 및 Chroboczek 등, 1992, Virol. 186, 280~285). 클로닝 능력 및 안정성은 아데노 바이러스 계통의 부가 부분(예를 들어, Lusky 등, 1998, J. Virol. 72, 2022~2032에 기술된 것과 같은 비필수적인 E3 영역 또는 다른 필수적인 E2, E4 영역)을 제거함으로써 더욱 향상될 수 있다.

[0033] 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는, Chartier 등 (1996, J. Virol. 70, 4805~4810)에 기술된 바와 같이, 본 발명의 아데노 바이러스 벡터의 어느 위치에도 독립적으로 삽입될 수 있으며, 삽입 영역의 원 전사 방향에 대해 센스 및/또는 안티센스 방향으로 독립적으로 위치할 수 있다. 예를 들어, 이들은 E1 영역을 대신하여 삽입되거나, 다른 경우에는 하나가 E1 영역을 대신하여 삽입되고 다른 하나는 E3 영역을 대신하여 삽입된다.

[0034] 다른 구체예에서, 본 발명의 벡터는 수두 바이러스 벡터이다 (참조예: Cox 등 "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press). 폭스비리데(poxviridae), 특히 카나리폭스(canarypox) (예를 들어, W095/27780에 기술된 ALVAC), 파울폭스(fowlpox)(예를 들어, Paoletti 등, 1995, Dev. Biol. Stand. 84, 159~163에 기술된 TROVAC) 또는 백시니아 바이러스 등으로부터 얻을 수 있으며 바람직한 것은 마지막에 인용된 것이다. 적절한 백시니아 바이러스 코펜하겐 종 (Goebel 등, 1990, Virol. 179, 247~266 및 517~563; Johnson 등, 1993, Virol. 196, 381~401), 와이어스 종, NYVAC (W092/15672 및 Tartaglia 등, 1992, Virology 188, 217~232 참조) 및 고도로 완화되어 수식된 앙카라 종(Ankara (MVA) strain) (Mayr 등, 1975,

Infection 3, 6~16)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이러한 벡터 및 그 제조 방법은 본 발명의 분야에 숙달한 사람이 구할 수 있는 여러 문헌에 기술되어 있다(예를 들어, Paul 등, 2002, Cancer gene Ther. 9, 470~477; Piccini 등, 1987, Methods of Enzymology 153, 545~563; US 4,769,330; US 4,772,848; US 4,603,112; US 5,100,587 및 US 5,179,993). 본 발명에서 사용된 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는 재조합 수두 바이러스가 활동적이고 감염력을 가지도록 하기 위해 바람직하게는 수두 바이러스 게놈의 비본질적인 유전자좌(locus)에 삽입될 수 있다. 비본질적인 영역은 코딩되지 않는 유전자간 영역이거나 활동성 저하나 제거가 바이러스 성장이나 복제 또는 감염력에 큰 영향을 미치지 않는 임의의 유전자이다. 결핍된 기능이 바이러스 입자 생성 시 전달 공급되는 경우라면, 예를 들어, 수두 바이러스 게놈에서 제거된 것에 해당하는 보완서열을 가지는 헬퍼 세포주를 이용하여, 본질적인 바이러스 유전자좌에 삽입하는 것도 생각할 수 있다.

[0035] 코펜하겐 백시니아 바이러스를 사용할 때, 상기 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는 바람직하게는 티미딘 키나아제(thymidine kinase)(tk) 유전자 (Hruby 등, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411~3415; Weir 등, 1983, J. Virol. 46, 530~537)에 삽입된다. 그러나, 다른 삽입 위치도 또한 적절하며, 예를 들어, 헤마글루티닌(hemagglutinin) 유전자 내부(Guo 등, 1989, J. Virol. 63, 4189~4198), K1L 유전자좌 내부, u 유전자 내부(Zhou 등, 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185~2190) 또는 자발적 또는 조작된 결핍이 문헌에 보고된 백시니아 바이러스 게놈의 왼쪽 말단(Altenburger 등, 1989, Archives Virol. 105, 15~27 ; Moss 등 1981, J. Virol. 40, 387~395 ; Panicali 등, 1981, J. Virol. 37, 1000~1010; Perkus 등, 1989, J. Virol. 63, 3829~3836; Perkus 등, 1990, Virol. 179, 276~286 ; Perkus 등, 1991, Virol. 180, 406~410) 등을 들 수 있다.

[0036] MVA를 사용할 때, 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자가 D4R 유전자좌뿐만 아니라 MVA 게놈에서 발생하는 결핍의 밝혀진 I 내지 VII의 어디에나 삽입될 수 있으나(Antoine 등, 1998, Virology 244, 365~396), 결핍 II 및/또는 III으로의 삽입이 바람직하다(Meyer 등, 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031~1038; Sutter 등, 1994, Vaccine 12, 1032~1040).

[0037] 가끔 수두 바이러스를 사용하는 경우, 티미딘 키나아제 유전자 내의 삽입이 고려될 수도 있지만, 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자를 ORF 7 와 9 사이에 위치하는 유전자간 영역에 도입하는 것이 바람직하다(예를 들어, EP 314 569 및 US 5,180,675 참조).

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 최소한 제1의 및 제2의 핵산 분자는 병리학적 조건을 보이거나 병리학적 조건을 보이기에 민감한 개체에서 치료적 또는 예방적 활동을 제공할 수 있는 폴리펩티드를 독립적으로 코딩한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "개체"는 척추동물을 나타내며, 상세하게는 포유류의 일원이며 특정하게는 애완동물, 농장 동물, 스포츠용 동물 및 사람을 포함하는 영장류이다. 이러한 폴리펩티드는 바람직하게는 면역성 폴리펩티드와 반-종양 폴리펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0039] "면역원성" 폴리펩티드는 이 폴리펩티드가 발현될 개체에서 면역 시스템을 유도하거나, 자극하거나, 발전 또는 촉진시킬 수 있는 폴리펩티드를 나타낸다. 이러한 면역 반응은 체액성 또는 세포성 또는 체액성 및 세포성 모두일 수 있다. 세포성 반응은 T-헬퍼 세포 및/또는 CTL 반응 및/또는 사이토킨(cytokine) 생산의 촉진을 유도하는 반면에 체액성 반응은 문제가 되는 폴리펩티드에 대하여 항체 생성을 유도한다. 전형적으로, 폴리펩티드의 면역 유전적 성질은 인 비트로 또는 인 비보로 통해 해당 분야에 표준적인 다양한 시험으로써 측정할 수 있다 (면역 반응의 시작과 활성화를 위한 기술들의 일반적인 기재가 이용 가능하며, 예를 들어, Coligan 등, Current Protocols in Immunology의 최종판; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health 등이 있다). 예를 들어, 색상측정(colorimetric), 형광측정(fluorometric) 또는 방사측정(radioactive) 등을 통해 탐지할 수 있으며 적절한 기술들에는 ELISA, 웨스턴 블랏, 방사면역시험(radioimmunoassay) 및 면역 침전시험(immunoprecipitation assay) 등이 포함된다. 세포성 면역성의 측정은 CD4+ 및 CD8+ T-세포에서 유도된 세포(예를 들어, ELISpot의 정량 IFN γ -생성 세포)를 포함하는 활성화된 이펙터(effector) 세포에서 분비된 사이토킨 프로필을 측정하여 면역 이펙터 세포의 활성 상태를 결정하고(예를 들어, 고전적인 [³H] 티미딘 포획(uptake)에 의한 T 세포 확산 시험), 민감하게 된 개체에서의 항원에 특정한 T 림프구 시험을 통해(예를 들어, 세포 독성 시험에서 펩티드-특이적 분해(lysis)) 수행될 수 있다. 폴리펩티드의 면역 유전적 성질은 또한 ELISpot에 의한 적절한 동물 모델, 테트라머-기반 분석 기술 또는 T 세포-매개에 의한 면역 분석을 위한 기타 표준적 기술들에 의해 측정될 수 있다. 적절한 면역성 폴리펩티드들은 간염 B 바이러스 (HBV) (예를 들어, EP 414 374; EP 304 578 또는 EP 198 474에 기술된 S, preS2 또는 preS1-폴리펩티드); 간염 C 바이러스 (HCV) (예를 들어, Core (C), 외피(envelop) 당단백질 E1, E2, 비구조적 폴리펩티드 NS2, NS3, NS4, 또는 NS5 또는 이들의 임의의

조합); 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) (예를 들어, gp120 또는 gp160), 및 파필로마 바이러스(하기에 예시됨)로부터 얻을 수 있다.

[0040]

"항-종양" 폴리펩티드는 종양 세포에서 억제 또는 종양 확산의 순감소를 제공할 수 있는 폴리펩티드를 나타낸다. 이러한 폴리펩티드의 항종양 특성은 적절한 동물 모델 또는 치료된 개체에서 일정 기간 동안 실제 종양 크기의 감소를 통해 결정할 수 있다. 방사성 방법(예를 들어, 단일 포톤 및 양전자 방출에 의한 컴퓨터 단층 촬영; 일반적인 방법은 "Nuclear Medicine in Clinical Oncology" Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, New York, 1986 참조)을 포함하여 종양 크기를 측정하기 위해 초음파 방법("Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors", Kossoff와 Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, New York, 1984 참조)을 포함하여 다양한 방법이 사용될 수 있으며, 종래의 이미지 시약(예를 들어, 갈륨-67 구연산)을 채용하는 방법, 면역학적 방법 (예를 들어, 방사성 동위원소에 의한 특이적 종양 마커에 관계된 단일 클론 항체 식별) 등이 있다. 다른 방법으로, 폴리펩티드의 항종양 특성이 종양 마커의 감소에 기반하여 결정될 수 있다. 예로써, 전립선암 탐지를 위한 PSA 및 결장암과 특정 유방암 탐지를 위한 CEA 등이 있다. 또한, 폴리펩티드의 항종양 특성은 적절한 동물 모델로써, 예를 들어, 대표적인 인간 암 세포주를 투여한 마우스를 이용하여 결정할 수 있다. 감지할 수 있는 종양이 진전된 후에는, 마우스에 본 발명의 벡터를 투여하여 종양 성장율의 감소와 생존 기간의 증가를 관찰할 수 있다. 부가적으로, 다양한 인 비트로 방법을 이용하여 인 비보 종양 억제를 예측할 수 있다. 적절한 항종양 폴리펩티드는 종양-유도 가능성을 가지는 바이러스로부터의 바이러스 폴리펩티드(예를 들어, 파필로마 바이러스)를 포함하여, MUC-1 (WO92/07000; Acres 등, 2005, Exp. Rev. Vaccines 4(4)), BRCA-1, BRCA-2 (Palma 등, 2006, Critical Reviews in Oncology/haematology 27, 1~23), 암배항원 CEA (Conroy 등, 1995, Gene Ther; 2, 59~65), MAGE (WO99/40188; De Plaen 등, 1994, Immunogenetics 40, 360~369), MART-1, gp 100 (Bakker 등, 1994, J. Exp. Med. 179, 1005~9), PRAME, BAGE, Lage (또는 NY Eos 1으로 알려진) SAGE, HAGE (WO99/53061), GAGE (Robbins와 Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunol. 8, 628~36) 및 전립선 특이적 항체 (PSA) (Ferguson 등, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 3114~9; WO98/12302, WO98/20117, WO00/04149)와 같은 종양 관련 항체(TAA)를 포함한다.

[0041]

본 발명의 또 다른 구체예에서, 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는 동일한 생명체 또는 밀접하게 관련된 생명체로부터 얻어졌다.

[0042]

본 명세서에서 사용된 표현 "생명체"는 보다 고등의 진핵생물뿐만 아니라 바람직하게는 병리학적 가능성을 가지는 미생물까지를 포함한다. 표현 "미생물"은 균류, 박테리아, 원생동물 및 바이러스를 나타낸다. 바이러스의 대표적인 예는 제한 없이 다음을 포함한다: HIV (HIV-1 또는 HIV-2), 인간 헤르페스 바이러스(예를 들어, HSV1 또는 HSV2), 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바르 바이러스(Epstein Barr virus) (EBV), 간염 바이러스(예를 들어, 간염 A 바이러스(HAV), HBV, HCV 및 간염 E 바이러스), 플라비 바이러스(flavi virus)(예를 들어, 황열(Yellow Fever) 바이러스), 바리셀라 조스터(varicella-zoster) 바이러스(VZV), 파라믹소 바이러스(paramyxovirus), 합포성 폐염 바이러스(respiratory syncytial virus), 파라인플루엔자(parainfluenza) 바이러스, 홍역 바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 파필로마 바이러스 (상기 정의됨). 적절한 박테리아의 대표적인 예는 제한 없이 다음을 포함한다: 나이세리아(Neisseria) (예를 들어, N. 고노리어(N. gonorrhea)와 N. 메닝기티디스(N. meningitidis)); 보테텔라(Bordetella) (예를 들어, B. 퍼투시스(pertussis), B. 파라퍼투시스(parapertussis)와 B. 브롱키셉티카(bronchiseptica), 마이코박테리아(Mycobacteria) (예를 들어, M. 투베르쿨로시스(tuberculosis), M. 보비스(bovis), M. 레프리카(leprae), M. 아빔(avium), M. 파라투베르쿨로시스(paratuberculosis), M. 스메그마티스(smegmatis)); 레지오넬라(Legionella) (예를 들어, L. 뉴모필라(pneumophila)); 대장균(Escherichia) (예를 들어, 엔테로톡식(enterotoxigenic) 대장균, 엔테로헤모리직(enterohemorrhagic) 대장균, 엔테로파소제닉(enteropathogenic) 대장균); 시젤라(Shigella) (예를 들어, S. 소나이(sonnei), S. 다이센테리(dysenteriae), S. 플렉스네리(flexnerii)); 살모넬라(Salmonella) (예를 들어, S. 타이피(typhi), S. 파라티피(paratyphi), S. 콜레라이수스(choleraesuis), S. 엔테리티디스(enteritidis)); 리스테리아(Listeria) (예를 들어, L. 모노사이토젠스(monocytogenes)); 헬리코박터(Helicobacter) (예를 들어, H. 필로리(pylori)); 슈도모나스(Pseudomonas) (예를 들어, P. 에루기노사(aeruginosa)); 스태필로코커스(Staphylococcus) (예를 들어, S. 아우레우스(aureus), S. 에피데르미디스(epidermidis)); 엔테로코커스(Enterococcus) (예를 들어, E. 패칼리스(faecalis), E. 패시움(faecium)); 바실러스(Bacillus) (예를 들어, B. 안트라시스(anthraxis)); 코리네박테리움(Corynebacterium) (예를 들어, C. 디피테리예(diphtheria)), 및 클라미디아(Chlamydia) (예를 들어, C. 트라코마티스(trachomatis), C. 뉴모니아(pneumonia), C. 시타시(psittaci)). 기생충의 대표적인 예는 제한 없이 플라즈모디움(Plasmodium) (예를 들어, P. 팔시파럼(falciparum)); 톡소플라스마(Toxoplasma) (예를 들어, T. 곤디(gondii)); 레쉬마니아(Leshmania) (예를 들어,

L. 메이저(major)); 뉴모시스티스(Pneumocystis) (예를 들어, P. 카리니(carinii)); 및 취조스토마(Schistosoma) (예를 들어, S. 만소니(mansonii))를 포함한다. 균류의 대표적인 예는 제한 없이 칸디다(Candida) (예를 들어, C. 알비칸스(albicans))와 아스페르지루스(Aspergillus)를 포함한다. 고등 진핵생물은 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류이다.

[0043] "동일한 생명체"는 공통된 조상에서 유래되어 동일한 진화 경로를 따른 생명체로 정의된다. 대표적인 예는 같은 혈청형 또는 유전형질을 가지는 바이러스들의 다양한 분리물들을 포함한다. 예를 들어, HPV-16의 두 분리물이 이러한 카테고리로 분류된다. "밀접하게 관련된 생명체"는 공통된 조상으로부터 기원되나, 진화동안 분화된 생명체를 말한다. 대표적인 예로는 다른 혈청형 또는 유전형질을 갖는 바이러스를 포함한다. 예를 들어, HPV-16과 HPV-18이 이 카테고리로 분류된다.

[0044] 바람직한 구체예에서, 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자가 얻어지는 목적이 되는 생명체는 파필로마 바이러스이고 각각은 파필로마 바이러스 폴리펩티드를 코딩한다. "파필로마 바이러스"는 파필로마 바이러스 하위 패밀리에 속하는 바이러스로서 이 용어는 인간 파필로마 바이러스 (HPV)뿐만 아니라 인간 외로부터 유래하는 동물 파필로마 바이러스를 포함하며 가축, 말, 토끼, 양, 개, 인간 이외의 영장류 및 설치류를 포함하여 정의되지만 반드시 이에 한정되지는 않는다. 현재 100개 이상의 HPV 유전형이 발견되었으며 (Van Ranst 등, 1992, J. Gen. Virol. 73, 2653; De Villiers 등, 2004, Virology 324, 17~27), 이는 그 종양 발생 가능성에 따라 "저위험" (LR) 및 "고위험" (HR) 혈청형으로 분류된다. HR이 악성으로 진행되는 악성 종양을 일으키는 반면에 LR HPV는 감염된 개체에 양성 종양을 유발시킨다.

[0045] 일반적으로 설명하면, 파필로마 바이러스들은 단백질 캡시드로 둘러싸인 약 7900 기반의 쌍으로된 이중 나선의 원형 DNA를 가진다 (예를 들어, Pfister, 1987, *The papovaviridae: The Papillomaviruses*, Salzman과 Howley edition, Plenum Press, New York, p 1~38 참조). 이들의 게놈은 3개의 기능 영역으로 구성되는데, 이는 초기 (E), 말기 (L) 및 장기 제어 (LCR) 영역을 말한다. LCR은 인핸서(enhancer)와 프로모터와 같은 전사 조절 서열을 포함한다. 초기 영역이 바이러스 복제, 전사 및 세포성 변환을 제어하는 핵에서 주로 발견되는 조절 단백질 (E1-E7)을 코딩하는데 반하여, 말기 영역은 구조적 L1 및 L2 단백질을 코딩하는데 이들 단백질은 각각 메이저 또는 마이너 캡시드 단백질이다. 좀더 상세하게는, E1 단백질은 ATP-의존 헬리카아제성을 가지는 DNA 결합 인산 단백질이다(Desaintes와 Demeret, 1996, Semin. Cancer Biol. 7, 339~347; Wilson 등, 2002, 바이러스 유전자 24, 275~290). E2 단백질은 바이러스 유전자 전사를 조절하고 DNA 복제를 제어하는 다기능 DNA 결합 인산 단백질이다 (Bechtold 등, 2003, J. Virol. 77, 2021~8). E4-코딩 단백질은 세포질 케라틴 네트워크를 결합하고 교란하며 바이러스 성숙을 담당한다. E5 단백질을 위한 기능은 아직 논란이 되고 있으며 그 발현은 가끔 바이러스 숙주 염색체로의 통합 과정에서 소실된다. HR HPV 유전자형의 E6 및 E7-코딩 유전자 생성물은 감염된 세포의 종양성 변환에 관련되며 이는 이들 바이러스 단백질들이 세포성 종양 억제제 또는 유전 생성물 p53과 레티노블라스토마(retinoblastoma :Rb)에 각각 결합되기 때문인 것으로 추정된다(Kanda 등, 1988, J. Virol. 62, 610~3; Vousden 등, 1988, Oncogene Res. 3, 1~9; Bedell 등, 1987, J. Virol. 61, 3635~40) (리뷰는 Howley, 1996, 파필로마 바이러스와 그 복제, p 2045~2076. B.N. Fields, D. M. Knipe와 P.M. Howley (ed), Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven Press, New York, N.Y.를 참조). 원 HPV-16 E6 폴리펩티드가 p53에 결합하는데 관련되는 아미노산 잔기는 잔기 118 내지 122 (+1는 첫번째 Met 잔기 또는 바람직하게는 두번째 Met 잔기에 사용되는 잔기로부터 시작하여 잔기 111 내지 115로부터이다) (Crook 등, 1991, Cell 67, 547~556)로 명확하게 정의되며, 원 HPV-16 E7 폴리펩티드에서 Rb로의 결합에 관련된 것들은 잔기 21 내지 26로부터 시작한다(Munger 등, 1989, EMBO J. 8, 4099~4105; Heck 등, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442~4446).

[0046] 바람직하게는, 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는 HPV-16, HPV-18, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-70 및 HPV-85로 구성되는 군에서 선택되는 고위험 파필로마 바이러스로부터 독립적으로 얻어진다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 "파필로마 바이러스 폴리펩티드"는 관련 분야에서 알려진, 파필로마 바이러스 게놈/소스로부터 얻어진 핵산 분자에 의해 코딩된 폴리펩티드를 나타낸다. 상기에서 표현 "폴리펩티드"와 관련하여 정의된 바와 같이, "파필로마 바이러스 폴리펩티드"는 원 또는 수식된 파필로마 바이러스 폴리펩티드와 이로부터 형성된 펩티드를 모두 포함한다. 파필로마 바이러스의 소스는 기탁 기관, 상업용 카탈로그 또는 문헌의 기술에서 얻을 수 있는 재조합 물질뿐만 아니라 생물학적 샘플들(예를 들어, 파필로마 바이러스에 노출된 개체로부터 수집된 생물학적 샘플, 조직부, 생체 표본 및 조직 배양물), 배양된 세포 (예를 들어, ATCC에서 얻을 수 있는 CaSki 세포)들을 제한 없이 포함한다. 다수의 파필로마 바이러스 게놈의 뉴클레오티드 서열과 코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열이 문헌에 기재되어 있으며 전문 데이터뱅크에서 사용할 수 있는데, 예를 들어, Genbank가

있다. 일반적인 정보로서, HPV-16 게놈이 Genbank에 accession number NC 01526와 K02718로 기술되어 있으며; HPV-18은 NC 001357과 X05015; HPV-31은 J04353; HPV-33은 M12732; HPV-35은 NC 001529; HPV-39은 NC 001535; HPV-45은 X74479; HPV-51은 NC 001533; HPV-52은 NC 001592; HPV-56은 X74483; HPV-58은 D90400; HPV-59은 NC 001635; HPV-68은 X67160과 M73258; HPV-70은 U21941; 그리고 HPV-85은 AF131950의 accession number로 기술되어 있다.

[0048]

제1의 핵산 분자 및/또는 제2의 핵산 분자에 의해 코딩된 파필로마 바이러스 폴리펩티드들은 초기, 말기 또는 이들의 조합일 수 있다. 말기 폴리펩티드가 L1 또는 L2일 수 있는 반면에 초기 파필로마 바이러스 폴리펩티드는 E1, E2, E4, E5, E6 및 E7을 포함한다. 매우 많은 수의 파필로마 바이러스 혈청형의 초기 및 말기 폴리펩티드의 뉴클레오티드와 아미노산 서열들이 본 발명 분야에 숙련된 사람들이 사용 가능한 문헌에 기술되어 있다.

[0049]

바람직하게는, 최소한 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자들은 E1, E2, E6 및 E7로 구성된 군으로부터 선택된 초기 폴리펩티드를 독립적으로 코딩한다. 예시를 위한 목적으로, 원 HPV-16 E1, E2, E6 및 E7 폴리펩티드의 아미노산 서열들은 각각 서열번호: 1~4로 주어진다. 그러나, 본 발명은 이러한 표본적인 서열들에 제한되지 않는다. 실제로 뉴클레오티드와 아미노산 서열들은 다른 파필로마 바이러스 분리물 사이에서 다양하며 이러한 원 유전적 다양성은 하기 기술된 원 변이된 것들과 함께 본 발명의 범위에 포함된다. 적절한 파필로마 바이러스 폴리펩티드 변이의 표본적 예시가 이후에 기술되지만(예를 들어, 서열번호: 5~8 및 64~65), 본 발명의 분야에 숙련된 사람이라면 본 명세서에 기술된 변형을 채용할 수 있을 것이다(예를 들어, 다른 파필로마 바이러스 유전자형에서 서열 비교에 의해 유래되는 폴리펩티드 등).

[0050]

본 발명에서 사용하기에 적절한 파필로마 바이러스 E1 폴리펩티드는 바이러스 복제를 자극하기 위해 결핍된 변이들을 포함하며 이는 바이러스 복제를 자극하기 위한 능력이 E1 폴리펩티드에 해당하는 것보다 통계적으로 매우 낮음을 의미한다 (예를 들어, 75% 미만, 유용하게는 50% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 그리고 좀더 바람직하게는 5% 미만). 일반적인 설명으로서, 바이러스 복제의 자극을 담당하는 도메인은 E1의 중앙 부분에 위치한다 (예를 들어, Hugues와 Romanos, 1993, Nucleic Acids Res. 21, 5817~23 참조). 복제 결핍 E1 폴리펩티드의 대표적인 예가 본 발명 분야에 숙련된 사람이 이용가능한 문헌에 기술되어 있는데, 예를 들어, Yasugi 등, (1997, J. Virol. 71, 5942~51)이 있다. 본 발명의 문맥에서 바람직한 변형은 Gly 잔기를 HPV-16 E1 폴리펩티드의 482 위치에서 다른 잔기(바람직하게는 Asp 잔기) (예를 들어, 서열번호: 5 참조)로 치환하거나, Gly 잔기를 HPV-18 E1 폴리펩티드의 489 위치에서 또 다른 잔기(바람직하게는 Asp 잔기 (예를 들어, 서열번호: 6 참조)로 치환하는 것을 포함한다.

[0051]

본 발명에서 사용하기에 적절한 E2 폴리펩티드는 원 E2 폴리펩티드에 비교하여 전사 활성 및/또는 복제 활성이 결핍된 것을 포함한다(예를 들어, 75% 미만, 유용하게는 50% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 그리고 더욱 바람직하게는 5% 미만). 일반적인 설명으로서, 전사 활성화와 복제 자극을 담당하는 도메인은 E2의 N-말단 부분에 위치하며(Seedorf 등, 1985, Virology, 145,181~185; Kennedy 등, 1991, J. Virol. 65, 2093~2097; Cole 등, 1987, J. Mol. Biol. 193, 599~608 ; McBride 등, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 510~514) 복제 및 전사 E2 활성은 표준적인 방법(예를 들어, Sakai 등, 1996, J. Virol. 70, 1602~1611)을 통해 쉽게 결정된다. 본 발명에서 사용하기에 적절한 결핍 E2 변이체는 본 발명 분야에 숙련된 사람이 이용가능한 문헌에 기술되어 있는데, 예를 들어 Demeret 등 (1995, Nucleic Acids Res. 23, 4777~4784), Sakai 등 (1996, J. Virol. 70, 1602~1611), Brokaw 등 (1996, J. Virology 70, 23~29) 및 Ferguson 등 (1996, J. Virology 70, 4193~4199) 등이 있다. 본 발명의 문맥에 있어 바람직한 변형은 Glu 잔기를 HPV-16 E2의 39위치에서 바람직하게는 Ala 잔기(E39A)로 치환하는 것 및/또는 Ile 잔기를 73 위치에서 바람직하게는 Ala 잔기(I73A) (예를 들어, 서열번호: 7 참조)로 치환하는 것을 포함한다. 예시의 목적으로, Glu 및 Ile 잔기는 HPV-16 E2의 39 및 73 위치에 위치하며 이는 각각 HPV-18 E2의 43 및 77 위치의 Glu 및 Ile 잔기에 해당한다(예를 들어, 서열번호: 8 참조).

[0052]

본 발명에서 사용하기에 적절한 E6 폴리펩티드는 세포성 종양 억제 유전자 산물 p53으로의 결합이 결핍된 비종양 변이체를 포함한다. 대표적인 예로서 비종양 E6 폴리펩티드가 문헌에 기술되어 있는데 예를 들어, Pirn 등 (1994, Oncogene 9, 1869~1876), 및 Crook 등 (1991, Cell 67, 547~556)이 있다. 본 발명의 문맥에 있어 바람직한 변이는 HPV-16 E6에서 잔기 118 내지 122 (CPEEK)의 결실(예를 들어, 서열번호: 64) 또는 HPV-18 E6에서 잔기 113 내지 117 (NPAEK)의 결실을 포함한다.

[0053]

본 발명에서 사용하기에 적절한 E7 폴리펩티드는 세포성 종양 억제 유전자 산물 Rb로의 결합이 결핍된 비종양 변이체를 모두 포함한다. 비종양 E7 폴리펩티드의 대표적인 예들이, 예를 들어, Munger 등 (1989, EMBO J. 8, 4099~4105), Heck 등 (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442~4446) 및 Phelps 등 (1992, J. Virol. 66,

2148~2427) 등에 기술되어 있다. 이와 관련한 바람직한 변이는 HPV-16 E7에서 잔기 21 내지 26의 결실(DLYCYE) (예를 들어, 서열번호: 65) 또는 HPV-18 E7 에서 잔기 24 내지 28의 결실(DLLCH)을 포함한다.

[0054]

나아가, 최소한 제1의 핵산 분자 및/또는 제2의 핵산 분자에 의해 코딩된 폴리펩티드 (예를 들어, 파필로마 바이러스 폴리펩티드)는 과정, 안정성 및/또는 코딩된 폴리펩티드의 용해성이 유용한 부가적인 변형들을 더 포함할 수 있으며, 예를 들어, 가능한 절단(cleavage) 부분의 억제, 가능한 글리코실 부분의 억제 및/또는 발현 세포 표면에서의 표현 등이 있다. 예를 들어, 코딩된 폴리펩티드는 발현 세포의 플라스마 멤브레인 내에 앵커링되기 위한 적절한 신호를 포함할 수 있다. 실제로, 멤브레인 표현으로 MHC class I 및/또는 MHC class II 표현이 개선되며 이는 숙주의 면역 시스템 인식에 도움이 되는 것으로 이미 밝혀져 있다(예를 들어, W099/0388 참조). 원 초기 파필로마 바이러스 폴리펩티드들(E1, E2, E6 및 E7)은 핵 단백질이기 때문에 (전형적인 핵 위치 신호를 명확히 식별할 수는 없다고 해도), 면역학적 가능성을 개선하고 숙주 개체의 치료 효율을 높이기 위하여 이들을 멤브레인에 부착하는 것이 유용할 수 있다.

[0055]

폴리펩티드의 발현 숙주 세포 표면에서의 효과적인 멤브레인 표현은 폴리펩티드를 시그널 펩티드와 멤브레인 앵커링 펩티드에 융합함으로써 수행될 수 있다. 이러한 펩티드들은 본 발명의 분야에서 알려져 있다. 요약하면, 시그널 펩티드는 일반적으로 멤브레인에서 표현되거나 분비된 폴리펩티드의 N-말단에 존재하며 이로부터 소포체 망상 조직 (ER)으로의 움직임을 시작한다. 이들은 15 내지 35의 본질적으로 소수성(hydrophobic) 아미노산들로서 이후에 특정 ER-위치하는 엔도펩티다아제(endopeptidase)에 의해 제거되어 숙성된 폴리펩티드를 생성한다. 멤브레인에 앵커링하는 펩티드들은 원래는 보통 고도의 소수성이며 폴리펩티드들을 세포 멤브레인에 부착하는데 도움이 된다(예를 들어, Branden과 Tooze, 1991, 단백질 구조 입문 p. 202~214, NY Garland 참조). 본 발명의 문맥에 맞게 사용할 수 있는 시그널 펩티드 및 멤브레인 앵커링 펩티드의 선택은 매우 방대하다. 이들은 분비되거나 멤브레인에 앵커링된 폴리펩티드(예를 들어, 세포성 또는 바이러스 폴리펩티드)로부터 독립적으로 얻을 수 있으며 래비스(rabies) 당단백질, HIV 바이러스 외피(envelope) 당단백질 또는 홍역 바이러스 F 단백질 또는 합성물 등이 있다. 시그널 펩티드에서 번역을 시작하기 위한 바람직한 삽입 위치는 코돈의 N-말단 하류 부분이고, 멤브레인 앵커링 펩티드의 바람직한 삽입 위치는 C-말단, 예를 들어 정지 코돈의 바로 위이다. 필요하다면, 시그널 펩티드 및/또는 멤브레인 앵커링 펩티드를 코딩된 폴리펩티드에 연결하기 위하여 링커 펩티드가 사용될 수 있다.

[0056]

본 발명에서 사용하기 적절한 멤브레인 앵커링된 결핍 E1 폴리펩티드의 대표적인 예는 서열번호: 5 (HPV-16 SS-E1^{*}-TMR 폴리펩티드를 정의하며 실시예 부분에 예시됨) 및 서열번호: 6(HPV- 18 SS-E1^{*}-TMF 폴리펩티드를 정의하며 실시예 부분에 예시됨)으로 주어진다. 본 발명에서 사용하기에 적절한 대표적인 멤브레인 앵커링된 결핍 E2 폴리펩티드의 예는 서열번호: 7 (HPV-16 SS-E2^{*}-TMR 폴리펩티드 정의하며 실시예 부분에 예시됨) 및 서열번호: 8 (HPV-18 SS-E2^{*}-TMR 폴리펩티드를 정의하며 실시예 부분에 예시됨)로 주어진다. 본 발명에서 사용하기에 적절한 대표적인 멤브레인 앵커링 및 비종양 E6 및 E7 폴리펩티드의 예는 각각 서열번호: 64 (HPV-16 SS-E6^{*}-TMF 폴리펩티드 정의하며 실시예 부분에 예시됨) 및 서열번호: 65 (HPV- 16 SS-E7^{*}-TMR 폴리펩티드 정의하며 실시예 부분에 예시됨)로 주어진다.

[0057]

특별히 바람직한 구체예에서, 최소한 제1의 핵산 분자와 제2의 핵산 분자는 동일한 HPV 혈청형으로부터 얻어진 두 개의 다른 파필로마 바이러스 폴리펩티드를 코딩한다.

[0058]

본 구체예의 바람직한 측면에서, 제1의 핵산 분자는 E1 폴리펩티드를 코딩하며, 제2의 핵산 분자는 E2 폴리펩티드를 코딩하며, 또는 그 반대도 가능하다. 바람직하게는, E1 및 E2-코딩 핵산 분자들은 HPV-16 또는 HPV-18로부터 얻어진다. 바람직하게는, 제1의 핵산 분자는 서열번호: 5에 나타난 아미노산 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하며, 제2의 핵산 분자는 서열번호: 7에 나타난 아미노산 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 다르게는, 제1의 핵산 분자는 서열번호: 6에 나타난 아미노산 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하며, 제2의 핵산 분자는 서열번호: 8에 나타난 아미노산 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0059]

원 상태에 있어서 (예로서, HPV-16 또는 HPV-18 게놈), E1-코딩 서열의 3' 부분은 E2-코딩 서열의 5' 부분과 59 뉴클레오티드에 걸쳐 오버래핑된다. 100% 상동성인 이들 59 뉴클레오티드들의 존재는 E1 및 E2-코딩 핵산 분자들을 모두 발현하는 벡터의 안정성에 나쁜 영향을 주는 것으로 기대된다. 상동성 재조합은 동일 부분들 사이에

서 일어날 수 있으며, 이는 그 사이에 포함된 뉴클레오타이드 서열들의 손실을 일으킨다.

[0060]

본 발명에 따라, E1 및 E2-코딩 핵산 분자들에서 수식 전에 존재하는 59 뉴클레오타이드들의 오버래핑 부분간의 100% 상동성은, 핵산 분자들 중 하나에서 코돈 사용 패턴을 축퇴시킴에 의해 75% 미만으로 감소될 수 있다. 축퇴된 서열들의 대표적인 예를 서열번호: 9에 나타내었으며, 여기에서 E1/E2 오버래핑 59 뉴클레오타이드들에서의 상동성이 69%로 감소되며 (도 1에 나타냄), HPV-16 E1 및 E2 폴리펩티드들을 코딩하는 본 발명의 바람직한 벡터는 서열번호: 9에 나타난 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 동일한 전략을 HPV-18 E1 및 E2-코딩 서열들에 존재하는 오버래핑 부분에 적용할 수 있다. 그러한 축퇴된 서열들은 원 오버래핑하는 59 뉴클레오타이드들 대신 E1-코딩 제1의 핵산 분자에 도입될 수 있다 (예로서, 각각 서열번호: 10 및 11).

[0061]

따라서, 본 발명의 바람직한 벡터는 서열번호: 10에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제1의 핵산 분자 (이는 서열번호: 5의 HPV-16 E1 폴리펩티드를 코딩한다) 및 서열번호: 12에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제2의 핵산 분자 (이는 서열번호: 7의 HPV-16 E2 폴리펩티드를 코딩한다)를 포함한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 벡터는 서열번호: 11에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제1의 핵산 분자 (이는 서열번호: 6의 HPV-18 E1 폴리펩티드를 코딩한다) 및 서열번호: 13에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제2의 핵산 분자 (이는 서열번호: 8의 HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩한다)를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 MVA 벡터로, 제1의 (E1-코딩) 핵산 분자가 백시니아 7.5K 프로모터의 조절 하에 위치하며, 제2의 (E2-코딩) 핵산 분자가 백시니아 H5R 프로모터의 조절 하에 위치하고, 상기 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자들은 모두 상기 MVA 벡터의 결실 III에 삽입된다.

[0062]

본 발명은 HPV-16 E1 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자, HPV-16 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자, HPV-18 E1 폴리펩티드를 코딩하는 제3의 핵산 분자 및 HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제4의 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기에서 상기 제1의 핵산 분자, 제2의 핵산 분자, 제3의 핵산 분자 및 제4의 핵산 분자들은 75% 또는 그 이상의 상동성 비율을 나타내는 40개 이상의 연속된 뉴클레오타이드 부분을 포함하지 않는다. 바람직하게는, 상기 HPV-16 E1 폴리펩티드는 서열번호: 5에 나타난 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HPV-16 E2 폴리펩티드는 서열번호: 7에 나타난 아미노산 서열을 포함하고, 상기 HPV-18 E1 폴리펩티드는 서열번호: 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하고, 및/또는 상기 HPV-18 E2 폴리펩티드는 서열번호: 8에 나타난 아미노산 서열을 포함한다.

[0063]

원 상태에 있어서, HPV-16 및 HPV-18 E1-코딩 서열들은 80% 또는 그 이상의 상동성 서열을 나타내는 40 개 이상의 연속된 뉴클레오타이드의 몇몇 부분들을 포함한다. 이는 HPV-16 및 HPV-18 E2-코딩 서열의 경우에도 동일하다. 또한, 인접하는 E1 및 E2-코딩 서열들은 HPV-16 및 HPV-18 게놈에서 약 59 뉴클레오타이드의 부분에 걸쳐 오버래핑된다. 이와 관련하여, 상기 HPV-18 E1 및 E2-코딩 핵산 분자 서열들의 HPV-16 카운터파트(counterpart)와의 상동성, 특히 두 혈청형 모두가 공유하는 상동성 부분에서의 상동성이 75% 미만으로 감소되도록, 상기 HPV-18 E1 및 E2-코딩 핵산 분자 서열들을 수식하는 것이 권장된다. 이러한 목적을 위하여, HPV-16 및 HPV-18 E1 및 E2 유전자들의 뉴클레오타이드 서열들은 열라인될 수 있으며, 상동성이 8, 7, 6 또는 바람직하게는 5 개의 연속된 뉴클레오타이드 미만으로 감소되도록 뉴클레오타이드 수준에서 수식되게 설계할 수 있다. 또한, HPV-18 E1 서열은 HPV-18 E2 서열의 5' 말단과 오버래핑되는 59 뉴클레오타이드 부분과의 상동성이 75% 미만으로 감소되도록 하기 위하여 더욱 수식될 수 있다. 바람직하게는, 코돈 사용은 수식되지만, 여기에서 정의된 것과 같은 생성 수식들, 예로서 효소 기능 결함을 초래하는 수식들을 제외하고는, 이러한 수식들은 아미노산 수준에서는 번역되지 않는다. 제3의 핵산 분자 및 제4의 핵산 분자로서 적당하게 사용될 수 있는 "축퇴된" HPV-18 E1- 및 HPV-18 E2-코딩 뉴클레오타이드 서열들의 대표적인 예들을 서열번호: 11 및 서열번호: 13에 각각 나타내었다. 본 발명의 바람직한 벡터는 서열번호: 10에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제1의 핵산 분자 (서열번호: 5에 나타난 HPV-16 E1 폴리펩티드를 코딩함), 서열번호: 12에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제2의 핵산 분자 (서열번호: 7에 나타난 HPV-16 E2 폴리펩티드를 코딩함), 서열번호: 11에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제3의 핵산 분자 (서열번호: 6에 나타난 HPV-18 E1 폴리펩티드를 코딩함) 및 서열번호: 13에 나타난 뉴클레오타이드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 제4의 핵산 분자 (서열번호: 8에 나타난 HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩함)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 벡터는 MVA 벡터이며, 상기 제1의 핵산 분자, 제2의 핵산 분자, 제3의 핵산 분자 및 제4의 핵산 분자들은 상기 MVA 벡터의 결실 III 내로 도입되며, 상기 제1의 및 제3의 (E1-코딩) 핵산 분자들은, 각각 백시니아

p7.5K 프로모터의 조절 하에, 반대 방향으로 위치되며, 상기 제2의 및 제4의 (E2-코딩) 핵산 분자들은, 각각 백시니아 pH5R 프로모터의 조절 하에, 반대 방향으로 위치된다.

[0064] 또 다른 특히 바람직한 구체예에서, 적어도 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는 밀접하게 관련된 생명체들로부터 얻어진 동일한 폴리펩티드, 예로서 HPV-16, HPV-18, HPV-33 및/또는 HPV-52와 같은 밀접하게 관련된 HPV 혈청형들을 코딩한다.

[0065] 본 구체예의 제1의 측면에서, 밀접하게 관련된 생명체들로부터 얻어진 동일한 폴리펩티드는 바람직하게는 E2 폴리펩티드이다. 코딩된 E2 폴리펩티드들은 바람직하게는, 여기 정의된 것과 같이, 메브레인-앵커링된 바이러스 복제에 대해 결합이 있도록 수식된다. 원 상태에 있어서, 각종 유전형의 E2-코딩 서열들은, 특히 가장 보존된 부분들에서, 뉴클레오티드 수준에서 높은 정도의 상동성을 나타낸다. 이들 상동성 서열들의 존재는 둘 이상의 (예로서, 3, 4 또는 그 이상) E2 유전자들, 예로서 HPV-16, HPV-18, HPV-33 및 HPV-52와 같은 HR HPV로부터의 E2 유전자들을 공발현하는 벡터의 안정성에 나쁜 영향을 주는 것으로 기대된다. 상동성 재조합은 이들 상동성 유전자 서열들 사이에서 일어날 수 있으며, 이는 그들 사이에 포함된 뉴클레오티드 서열들의 손실을 일으켜, 유전자 사일런싱(gene silencing)을 일으킨다.

[0066] 본 발명에 따른, 본 발명의 벡터 내에 포함된 E2 폴리펩티드들을 코딩하는 상기 핵산 분자는, 특히 상동성이 높은 부분에서 상동성이 75% 미만으로 감소되도록 코돈 사용 패턴을 축퇴시킴에 의해 수식될 수 있다. E2 폴리펩티드들을 코딩하는 축퇴된 핵산 분자의 대표적인 예들을 서열번호: 13, 66, 67, 68 및 69에 나타내었다. 보다 구체적으로, 서열번호: 13은 멤브레인에 발현된 결합 HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩하며, 이 뉴클레오티드 서열은 그의 E2-코딩 카운터파트와의 상동성이 8 또는 7 개의 연속적인 뉴클레오티드 미만으로 감소되도록 설계되었다. 서열번호: 66 및 67 은 모두 복제-결합 HPV-33 E2 폴리펩티드를 코딩하며 (이는 또한 서열번호: 67에서 멤브레인에 발현된다), 이 뉴클레오티드 서열들은 그의 다른 E2-코딩 카운터파트와의 상동성이 8 또는 7 개의 연속적인 뉴클레오티드 미만으로 감소되도록 설계되었다. 서열번호: 68 및 69 는 모두 복제-결합 HPV-52 E2 폴리펩티드를 코딩하며 (이는 또한 서열번호: 69에서 멤브레인에 발현된다), 이 뉴클레오티드 서열들은 그의 다른 E2-코딩 카운터파트들과의 상동성이 8 또는 7 개의 연속적인 뉴클레오티드 미만으로 감소되도록 설계되었다. 그러나, 본 발명은 이들 예시적인 서열들에 한정되지 않으며, 상기 정의된 것과 같은, E2 파필로마 바이러스 폴리펩티드들을 코딩하는 축퇴된 핵산분자의 다른 형태들이, 이러한 원리에 따라 설계될 수 있다.

[0067] 본 발명의 바람직한 벡터는, 본 발명에서 정의된 것과 같은 HPV-16 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자 (예로서, 서열번호: 7에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 멤브레인-발현 및 복제-결합 E2 폴리펩티드), 본 발명에서 정의된 것과 같은 HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자(예로서, 서열번호: 8에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 멤브레인-발현 및 복제-결합 E2 폴리펩티드), 본 발명에서 정의된 것과 같은 HPV-33 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제3의 핵산 분자 (예로서, 서열번호: 70에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 멤브레인-발현 및 복제-결합 E2 폴리펩티드), 및 본 발명에서 정의된 것과 같은 HPV-52 E2 폴리펩티드를 코딩하는 제4의 핵산 분자 (예로서, 서열번호: 71에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 멤브레인-발현 및 복제-결합 E2 폴리펩티드)를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 상기 제1의 핵산 분자는 서열번호: 12에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 그를 포함하고; 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 13에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 그를 포함하고; 상기 제3의 핵산 분자는 서열번호: 67에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 그를 포함하고; 및/또는 상기 제4의 핵산 분자는 서열번호: 69에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 그를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 MVA 벡터이고, 상기 4개의 E2-코딩 핵산 분자들은 결실 III에 위치된다. 보다 더욱 바람직하게는, 상기 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자들은 백시니아 H5R 프로모터의 조절 하에 있으며, 서로 역의 방향으로 위치되는 반면, 제3의 및 제4의 핵산 분자들은 백시니아 p7.5K 프로모터의 조절 하에 있으며, 서로 역의 방향으로 위치된다.

[0068] 본 구체예의 또 다른 측면에서, 밀접하게 관련된 생명체들로부터 얻어진 동일한 폴리펩티드는 바람직하게는, E6 폴리펩티드, E7 폴리펩티드 또는 E6 및 E7 폴리펩티드들 모두이다. E6 및 E7은 독립적으로 또는 융합 폴리펩티드로서 발현될 수 있다. 코딩된 E6 및/또는 E7 폴리펩티드들은 바람직하게는, 여기에서 정의된 것과 같이 뱀브레인-앵커되고 비-종양성이 되도록 수식된다.

[0069] 원 상태에 있어서, HPV-16 및 HPV-18 원 E6 서열들은 뉴클레오티드 수준에서 63%의 상동성을 갖는 반면, HPV-16 및 HPV-18 원 E7 서열들은 서로 57% 상동성이다. 그러나, 두 경우 모두에서, HPV-16 및 HPV-18 원 서열들은 80% 이상의 상동성을 나타내는 40개 이상의 뉴클레오티드들의 일부 부분들을 공유한다 (도 2 참조). 이들 상동성 부분들의 존재는 HPV-16 및 HPV-18 E6 및/또는 E7 유전자들을 공발현하는 벡터의 안정성에 나쁜 영향을 주는

것으로 기대된다. 상동성 재조합은 이들 상동성 부분들 사이에서 일어날 수 있으며, 그들 사이에 포함된 뉴클레오티드 서열들의 손실을 일으켜, 그에 따라 유전자 사일런싱을 일으킨다.

[0070]

본 발명에 따라, HPV-16 및/또는 HPV-18 E6 및 E7 폴리펩티드들을 코딩하는 핵산 분자들은, 특히 상동성 부분들에서 상동성이 75% 미만으로 감소되도록 코돈 사용 패턴을 축퇴함에 의해 수식될 수 있다. HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하는 축퇴된 핵산 분자의 대표적인 예를 서열번호: 14에 나타내었으며; HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하는 축퇴된 수식 핵산 분자의 대표적인 예는 서열번호: 15에 나타내었다. 보다 구체적으로, 서열번호: 14 및 서열번호: 15 는, HPV-18 멤브레인-앵커되고 비-중양성인 E6 및 E7 폴리펩티드들을 코딩하는 한편, HPV-16 카운터파트와의 상동성이 8, 7, 6 또는 바람직하게는 5 개 미만의 연속적인 뉴클레오티드로 감소되도록 설계된다. 그러나, 상기 정의된 것과 같은 E6 및/또는 E7 파필로마 바이러스 폴리펩티드들을 코딩하는 축퇴된 핵산 분자들의 또 다른 형태들이 이러한 원리에 따라 설계될 수 있다.

[0071]

본 발명의 바람직한 벡터는 여기에서 정의된 것과 같은 HPV-16 E6 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자 (예로서, 멤브레인-앵커되고 비중양성) 및 여기에서 정의된 것과 같은 HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자 (예로서, 멤브레인-앵커되고 비중양성)를 포함하며, 여기에서 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 14에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 그를 포함한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 벡터는 여기에서 정의된 것과 같은 HPV-16 E7 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자 (예로서, 멤브레인-앵커되고 비중양성) 및 여기에서 정의된 것과 같은 HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자 (예로서, 멤브레인-앵커되고 비중양성)를 포함하고, 여기에서 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 15에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 그를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 MVA 벡터로, 상기 제1의 핵산 분자가 백시니아 7.5K 프로모터의 조절 하에 위치되고, 상기 제2의 핵산 분자가 백시니아 H5R 프로모터의 조절 하에 위치되며, 상기 제1의 및 제2의 핵산 분자 모두 상기 MVA 벡터의 결실 III에 삽입된다.

[0072]

또한, 본 발명은 HPV-16 E6 폴리펩티드와 HPV-16 E7 폴리펩티드와의 융합물을 코딩하는 제1의 핵산 분자 및 HPV-18 E6 폴리펩티드와 HPV-18 E7 폴리펩티드의 융합물을 코딩하는 제2의 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것으로, 상기 제1의 및 제2의 핵산 분자는 약 75% 이상의 상동성 비율을 나타내는 40 개 이상의 연속된 뉴클레오티드 부분을 포함하지 않는다.

[0073]

또한, 본 발명은 HPV-16 E6 폴리펩티드를 코딩하는 제1의 핵산 분자, HPV-18 E6 폴리펩티드를 코딩하는 제2의 핵산 분자, HPV-16 E7 폴리펩티드를 코딩하는 제3의 핵산 분자 및 HPV-18 E7 폴리펩티드를 코딩하는 제4의 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것으로, 여기에서 상기 제1의, 제2의, 제3의 및 제4의 핵산 분자는 75% 이상의 상동성 비율을 나타내는 40 개 이상의 연속된 뉴클레오티드들의 부분을 포함하지 않는다. 바람직하게는, 상기 제2의 핵산 분자는 서열번호: 14로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하고 및/또는 제4의 핵산 분자는 서열번호: 15로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 MVA 벡터로, 제1의 핵산 분자 및 제2의 핵산 분자는 백시니아 7.5K 프로모터의 조절 하에 각각 역으로 배향되어 위치되며, 제3의 핵산 분자 및 제4의 핵산 분자는 백시니아 H5R 프로모터의 조절 하에 각각 역으로 배향되고, 상기 제1의, 제2의, 제3의 및 제4의 핵산 분자는 상기 MVA 벡터의 결실 III에 삽입된다.

[0074]

또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 실질적으로 분리된 서열번호: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 66, 67, 68 또는 69 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지거나 또는 그를 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0075]

본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 벡터에 포함된 제1의 및 제2의, 그리고 존재하는 경우, 제3의 및 제4의 핵산 분자는 숙주 세포 또는 개체에서 코딩된 폴리펩티드들의 발현에 적당한 형태로 존재하며, 이는 그들이 그들의 발현에 필요한 조절 서열들의 조절 하에 위치된다는 것을 의미한다.

[0076]

여기 사용된 것과 같은, "조절 서열들"이라는 용어는 소정의 숙주 세포에서 핵산 분자의 발현을 가능하게 하거나, 그에 기여하거나 또는 그를 조절하는 임의의 서열을 의미하는 것으로, 핵산 또는 그의 유도체 (즉, mRNA) 중 하나의 숙주 세포 내로의 복제, 복사(duplication), 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성 및/또는 수송을 포함한다. 본 발명의 맥락에서, 상기 조절 서열들은 발현될 핵산 분자에 "작동가능하게 연결"되며, 이는, 이들이 숙주 세포 또는 개체에서의 발현을 가능하게 하는 기능적 관계로 위치된다는 것을 의미한다. 그러한 조절 서열들은 본 기술 분야에서 공지이다 (예로서, Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego 참조). 조절 서열들의 선택은 벡터 유형, 숙주 세포, 원하는 발현 수준 등과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있음을 본 기술 분야의 당업자들은 이해할 것이다.

- [0077] 프로모터가 특히 중요하며, 본 발명은 여러 유형의 숙주 세포들에서 상기 핵산 분자의 발현을 지시하는 구성 (constitutive) 프로모터들 및 특정 숙주 세포들에서만 발현을 지시하거나 (예로서, 조직-특이적 조절 서열들), 또는 특별한 경우들 또는 외생 인자들 (예로서, 온도, 영양소 첨가물, 호르몬 또는 기타 리간드에 의해)에 반응하여 발현을 지시하는 것들의 이용을 포괄한다. 진핵생물계에서의 구성적 발현에 적당한 프로모터들은 바이러스성 프로모터들, 예컨대 SV40 프로모터, 사이토메갈로 바이러스 즉시 초기 프로모터 (cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter) 또는 인핸서 (Boshart 등, 1985, Cell 41, 521-530), 아데노바이러스 초기 및 후기 프로모터들, 헤르페스 심플렉스 (herpes simplex) 바이러스의 티미딘 키나아제 (TK) 프로모터 (HSV)-I 및 레트로바이러스성 긴-말단 반복부들 (예로서 MoMuLV 및 라우스 육종 바이러스 (Rous sarcoma virus (RSV) LTRs), 또한 세포성 프로모터들, 예컨대 포스포글리세로키나아제 (phosphoglycerol kinase (PGK)) 프로모터 (Hitzeman 등, 1983, Science 219, 620-625; Adra 등, 1987, Gene 60, 65-74)를 포함한다. 포스 바이러스성 (poxviral) 벡터에서 상기 핵산 분자의 발현을 이끄는 데 유용한 적당한 프로모터들은 백시니아 바이러스의 7.5K, H5R, TK, p28, p11 또는 K1L 프로모터들을 포함한다. 선택적으로, Chakrabarti 등 (1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond 등 (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) 및 Kumar 및 Boyle (1990, Virology 179, 151-158)에 기재된 것들과 같은 합성 프로모터 및 초기 및 후기 포스바이러스성 프로모터들간의 키메라성 (chimeric) 프로모터들이 사용될 수 있다.
- [0078] 유도성 (inducible) 프로모터들은 외생적으로 공급된 화합물들에 의해 조절되며, 제한됨이 없이 다음을 포함한다: 아연-유도성 메탈로티오닌 (zinc-inducible metallothionein (MT)) 프로모터 (Mc Ivor 등, 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), 덱사메타손 (Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, T7 폴리머라아제 프로모터계 (WO 98/10088), 엑디손 (ecdysone) 곤충 프로모터 (No 등, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351), 테트라사이클린-억제성 프로모터 (Gossen 등, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551), 테트라사이클린-유도성 프로모터 (Kim 등, 1995, J. Virol. 69, 2565-2573), RU486-유도성 프로모터 (Wang 등, 1997, Nat. Biotech. 15, 239-243 및 Wang 등, 1997, Gene Ther. 4, 432-441), 라파마이신-유도성 (rapamycin-inducible) 프로모터 (Magari 등, 1997, J. Clin. Invest. 100, 2865-2872) 및 대장균으로부터의 lac, TRP, 및 TAC 프로모터들.
- [0079] 본 발명의 맥락에서 사용되는 조절 서열들은 또한 치료가 필요한 특이적 조직에서의 상기 핵산 분자들의 발현을 이끌기 위하여 조직-특이적일 수 있다. 적당한 프로모터들은 종양 세포들에서 우선적으로 발현되는 유전자들로부터 취할 수 있다. 그러한 유전자들은 예로서 디스플레이(display) 및 비교되는 게놈 혼성화에 의해 확인할 수 있다(예로서 US 5,759,776 및 5,776,683 참조).
- [0080] 본 기술 분야의 당업자들은 본 발명의 벡터에 포함된 핵산 분자의 발현을 제어하는 조절 성분들이, 숙주 세포 또는 개체 내로의, 적절한 개시, 전사의 조절 및/또는 종료 (예로서, polyA 전사 종료 서열들), mRNA 수송 (예로서 핵 위치 시그널 (nuclear localization signal) 서열들), 가공 (예로서, 스플라이싱 시그널들), 안정화 (예로서, 인트론 및 비-코딩 5' 및 3' 서열들), 및 번역 (예로서 삼조 (tripartite) 리더 서열들, 리보솜 결합 자리들, 신-달가모(Shine-Dalgarno) 서열들 등)을 위한 추가 성분들을 더 포함할 수 있음을 알 것이다.
- [0081] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기-기재된 벡터를 포함하는 감염성 바이러스 입자들을 제공한다. 감염성 바이러스 입자들의 제조를 위한 알려진 여러 방법들을 여기에서 상세하게 기재하지는 않을 것이다. 전형적으로, 그러한 바이러스 입자들은 다음 단계들을 포함하는 공정에 의해 생산될 수 있다: (a) 바이러스 벡터를 적절한 세포주 내로 도입하는 단계, 및 (b) 상기 세포주를 상기 감염성 바이러스 입자 생산을 가능하게 하는 적당한 환경 하에서 배양하여, 상기 세포주의 배양물로부터 제조된 감염성 바이러스 입자들을 회수하고, 상기 회수된 감염성 바이러스 입자를 임의로 정제하는 단계.
- [0082] 상기 바이러스 벡터가 결함이 있는 경우, 감염성 입자들은 대개 상보성 세포주 내에서 생산되거나 또는 비-기능성 바이러스 유전자를 인-트랜스 (*in trans*) 공급하는 헬퍼 바이러스를 사용하여 생산된다. 예로서, 상보적 E1-결실 아데노바이러스성 벡터들에 적당한 세포주들은 293 세포 (Graham 등, 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72), PER-C6 세포 (Fallaux 등, 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917) 및 HER96 세포를 포함한다. 포스바이러스 벡터들의 번식에 적당한 세포들은 조류 세포들로, 유정란으로부터 얻어진 병아리 배로부터 제조된 일차 병아리 배 섬유아세포들 (primary chicken embryo fibroblasts (CEF))이 가장 바람직하다. 상기 생산자 세포들은, 적절한 온도, pH 및 산소량 조건 하에서, 통상의 발효 생물반응기 (bioreactor), 플라스크 및 페트리 접시에서 배양될 수 있다.
- [0083] 감염성 바이러스 입자들은 배양 상등액으로부터 또는 용균 후 세포들로부터 회수될 수 있다. 이들은 표준 기술

들 (예로서 W096/27677, W098/00524, W098/22588, W098/26048, W000/40702, EP1016700 및 W000/50573에 기재된 것과 같은 크로마토그래피, 초원심분리)에 따라 더욱 정제될 수 있다.

[0084] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 핵산 분자, 벡터들 또는 감염성 바이러스 입자들을 포함하는 숙주 세포들을 제공한다. 여기 사용된 "숙주 세포"라는 용어는 본 발명의 벡터 또는 감염성 바이러스 입자 및 그러한 세포들의 자손의 수령자이거나 또는 수령자여왔던 임의의 세포로 정의된다. 이 용어는 분리된 세포, 세포들의 군, 및 예로서 조직 또는 기관 내의 세포들의 특정 조직체를 포괄하는 것으로 넓게 이해되어야 한다. 그러한 세포들은 일차, 형질변환되거나 또는 배양된 세포들일 수 있다.

[0085] 본 발명의 맥락에서 숙주 세포들은 원핵세포들 (예로서, 대장균, 바실러스, 리스테리아), 효모와 같은 하등 진핵 세포들 (예로서, 사카로마이세스 세레비시에, 사카로마이세스 폼베 (*Saccharomyces pombe*) 또는 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*)), 및 곤충 세포들, 식물 및 고등 진핵 세포들과 같은 기타 진핵 세포들을 포함하며, 특히 포유동물 세포들 (예로서 인간 또는 인간이 아닌 세포들)이 바람직하다. 적당한 숙주 세포들의 대표적인 예들은 이에 제한됨이 없이 다음을 포함한다: BHK (새끼 햄스터 신장) 세포, MDCK 세포 (마딘-다비 (Madin-Darby) 개 신장 세포주), CRFK 세포 (크랜델 (Crandell) 고양이 신장 세포주), CV-1 세포 (아프리카 원숭이 신장 세포주), COS (예로서, COS-7) 세포, 중국 햄스터 난자 (CHO) 세포들, 마우스 NIH/3T3 세포들, HeLa 세포들 및 Vero 세포들. "숙주 세포"라는 용어는 상기 언급된 것과 같은 본 발명의 복제-결합 벡터의 (예로서 아데노바이러스 벡터) 적어도 하나의 결합 기능을 보완할 수 있는 상보성 세포들을 포괄한다.

[0086] 숙주 세포들은 본 발명의 벡터 또는 감염성 입자들에 포함된 핵산 분자들에 의해 코딩된 폴리펩티드들을, 재조합 수단들에 의해, 제조하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 기술들은 본 기술 분야에서 공지이다 (예로서, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-2002; 및 Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 최신판, Cold Spring Harbor Laboratory Press 참조).

[0087] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 핵산 분자, 벡터, 감염성 바이러스 입자 또는 숙주 세포를 포함하는 조성물 (여기에서 "활성제"로서도 언급됨) 또는 그들의 임의의 조합을 제공한다. 유리하게는, 상기 조성물은 치료적 유효량의 상기 활성제(들) 및 약학적으로 허용가능한 비히클을 포함하는 약학 조성물이다.

[0088] 여기에서 사용된 것과 같은 "약학적으로 허용가능한 비히클"이라는 표현은, 약학 투여에 적합한, 임의의 모든 담체들, 용매들, 희석제들, 부형제들, 어쥬번트들, 분산 매질들, 코팅들, 향균 및 항진균제들, 및 흡수 지연제들 등을 포함하고자 하는 것이다. 여기 사용된 것과 같은 "치료 유효량"이라는 표현은 개체에서 치료 또는 예방하고자 하는 병리학적 상태와 일반적으로 관련된 하나 이상의 증상들을 경감시키기에 충분한 도스(dose)를 말한다. 예방 용도와 관련하여서는, 상기 표현은 개체에서 병리학적 상태의 확립을 예방 또는 지연시키기에 충분한 도스를 의미한다. 예로서, 치료 유효량은 치료된 개체에서의 면역 반응을 유도 또는 증진시키기 충분한 양, 또는 병리학적 사태의 진전을 경감, 개선, 안정화, 역전, 완화 또는 지연시키기에 (예로서, 개체에서 병변 또는 종양의 크기 감소 또는 퇴행, 감염된 개체에서 바이러스성 감염의 역전) 충분한 양일 수 있다.

[0089] 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 사용된 투여량(dosage) 및 농도에서 비독성인 담체 및/또는 희석제를 하나 이상 포함한다. 그러한 담체 및/또는 희석제는 바람직하게는 전신 또는 점막 투여용 단위 투여량 또는 다중-도스 형태 중 한 형태의 조성물을 조제하는데 일반적으로 사용되는 것으로부터 선택된다. 적당한 담체는 용매, 예로서, 물, 에탄올, 폴리올 (예로서, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유하는 분산 매질, 식물성 오일 또는 그의 적당한 혼합물들일 수 있다. 희석제는 바람직하게는 등장성, 저장성 또는 약간 고장성이며, 비교적 낮은 이온 강도를 갖는다. 적당한 희석제들의 대표적인 예들은 멸균수, 생리학적인 식염수 (예로서, 염화나트륨), 링거액, 글루코오스, 트레할로스 또는 사카로오스액, 헹크 용액 (Hank's solution) 및 기타 생리학적인 균형 염 용액을 포함한다 (예로서, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 최신판, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins 참조). 본 발명의 조성물의 pH는, 인간 또는 동물에서의 이용에 적절하도록, 바람직하게는 생리학적인 또는 약간 염기성 pH (약 pH 7.5 내지 약 pH 9 사이로, 특히 바람직하게는 pH 약 8 또는 8.5)로 적당히 조절 및 버퍼화한다. 적당한 버퍼들은 포스페이트 버퍼 (예로서 PBS), 바이카보네이트 버퍼 및/또는 트리스 (Tris) 버퍼를 포함한다.

[0090] 본 발명의 조성물은 다양한 형태, 예로서 동결, 고체 (예로서, 건조 분말화 또는 동결건조 형태), 또는 액상 (예로서, 수용액)일 수 있다. 활성제와 임의의 추가적인 바람직한 성분(들)의 고체 조성물은 그의 미리 멸균-여과된 용액을 진공 건조 및 동결 건조에 투입하여 얻을 수 있다. 바람직한 경우, 이는 사용 전에 적당한 비히클을 첨가하여 재구성하도록 기성화된 멸균 앰플 내에 저장될 수 있다.

- [0091] 특히 바람직한 조성물은 (특히 활성제가 아데노바이러스성 벡터인 경우), 1M 사카로오스, 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 54 mg/l Tween 80, 10 mM Tris pH 8.5 중에 제형화된다. 또 다른 바람직한 조성물은 10 mg/ml 만니톨, 1 mg/ml HSA, 20 mM Tris, pH 7.2 및 150 mM NaCl 중에 제형화된다. 이러한 제형들은 본 발명의 조성물을, 동결 (예로서, -70℃, -40℃, -20℃), 또는 냉장 (예로서, 4℃) 온도에서 적어도 두 달의 기간에 걸쳐 안정성을 보존하는데 특히 적당하다.
- [0092] 상기 조성물은, 예로서 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 멸균성, 안정성, 인간 또는 동물 개체 내로의 방출 또는 흡수의 변경 또는 유지를 포함하는 바람직한 약학적 또는 약물동력학적 성질들을 제공하기 위하여, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제들도 함유할 수 있다. 안정화 성분들의 대표적인 예들은 바람직한 용해도, 안정성 및 반감기의 성질들을 얻기 위하여 사용될 수 있는, 폴리소르베이트 80, L-아르기닌, 폴리비닐피롤리돈, 트레할로스 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리머들을 포함한다 (Davis 등, 1978, *Enzyme Eng.* 4, 169-173; Burnham 등, 1994, *Am. J. Hosp. Pharm.* 51, 210-218). 점도 개선제들은 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 소르비톨 및 텍스트란을 포함한다. 상기 조성물은 점막 장벽을 통한 또는 특정 기관에서의 침투 또는 수송을 촉진하기 위한, 본 기술분야에서 알려진 물질들도 함유할 수 있다. 예로서, 질 투여에 적합한 조성물은 결국은 점막들의 공극 크기를 증가시키는데 유용한 하나 이상의 흡수 증진제들을 포함할 수 있다.
- [0093] 부가적으로, 본 발명의 조성물은 인간에서 전신 또는 점막 투여에 적당한 하나 이상의 어쥬번트(들)을 포함할 수 있다. "어쥬번트"라는 용어는 특정 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있는 능력을 갖는 화합물을 의미한다. 어쥬번트는 항원의 위치에 또는 그에 가깝게 전달될 수 있다. 체액성 면역의 증진은 전형적으로, 항원에 대해 상승된 항원 역가에서의 현저한 증가 (대개 10 배보다 큼)에 의해 표시된다. 세포성 면역의 증진은 예로서, 양성 피부 시험, 세포독성 T-세포 분석, IFN γ 또는 IL-2에 대한 ELISPOT 분석에 의해 측정될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 어쥬번트는, 특히 TLR-7, TLR-8 및 TLR-9와 같은 톨-유사(toll-like) 수용체들 (TLR)을 통해 활성제에 대한 면역성을 자극할 수 있다. 유용한 어쥬번트들의 대표적인 예들은, 이에 제한되지 않지만, 명반, 프로인드 완전 및 불완전 어쥬번트 (IFA)와 같은 광유 에멀션, 지당질 또는 그의 유도체 (Ribi 등, 1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, p407-19), QS21과 같은 사포닌류 (Sumino 등, 1998, *J. Virol.* 72, 4931-9; WO 98/56415), 이미퀴모드 (Imiquimod)와 같은 아미다조퀴놀린 화합물들 (Suader, 2000, *J. Am Acad Dermatol.* 43, 56-S11), 1H-이미다조 (4, 5-c) 퀴놀론--4-아민 유도체 (Aldara™) 및 관련 화합물 (Smorlesi, 2005, *Gene Ther.* 12, 1324-32), CpG와 같은 시토신 포스페이트 구아노신 올리고데옥시뉴클레오타이드 (Chu 등, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1623; Tritel 등, 2003, *J. Immunol.* 171: 2358-2547) 및 IC-31와 같은 양이온 펩티드류 (Kritsch 등, 2005, *J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci* 822, 263-70)를 포함한다.
- [0094] 본 발명의 핵산 분자, 벡터, 감염성 분자 또는 조성물은, 전신, 국소 및 점막 투여를 포함하는 각종 투여 방법들에 의해 투여될 수 있다. 전신 투여는 예로서 피하, 경피, 근육내, 정맥, 복강내, 혈관내, 동맥내 주사에 의한 임의의 수단에 의해 수행될 수 있다. 주사들은 통상적인 주사와 바늘, 또는 본 기술 분야에서 사용가능한 임의의 기타 적당한 장치들을 이용하여 이루어질 수 있다. 점막 투여는 경구, 코, 기관지내, 폐내, 질내 또는 직장내 경로에 의해 수행될 수 있다. 국소 투여는 경피 수단 (예로서, 패치 등)을 사용하여 수행될 수 있다. 근육내 또는 피하 투여는 활성제로서 바이러스 벡터들 및 감염성 입자들을 이용하는 경우 특히 바람직하다.
- [0095] 적절한 투여량은 특정 활성제의 약물동력학적 특성, 개체의 연령, 건강 및 체중, 치료될 병리학적 상태(들), 증상의 성질 및 정도, 병행치료의 종류, 치료의 빈도, 예방 또는 치료에 대한 필요성 및/또는 원하는 효과와 같은 알려진 인자들에 따라 다를 수 있다. 투여량은 선택된 특정 투여 경로에 따라 다르게 계산될 수도 있다. 치료에 적당한 투여량을 결정하는데 필요한 정밀한 계산은, 관련 상황에 비추어, 실시자에 의해 기계적으로 이루어진다. 일반적인 지침으로, 아데노바이러스 입자들의 경우 적당한 투여량은 약 10^5 내지 약 10^{13} iu, 바람직하게는 약 10^7 내지 약 10^{12} iu 이고, 바람직하게는 약 10^8 내지 약 10^{11} iu의 범위에서 변화한다. 백시니아 바이러스 입자들의 경우 적당한 투여량은 약 10^4 내지 약 10^{10} pfu, 바람직하게는 약 10^5 내지 10^9 pfu 이고, 바람직하게는 약 10^6 내지 약 5×10^8 pfu에서 변화한다. 벡터 플라스미드들은 10 μ g 내지 20 mg 사이, 바람직하게는 100 μ g 내지 2mg 사이의 도스로 투여될 수 있다.
- [0096] 또한, 투여는 몇 시간, 일 및/또는 주에 걸쳐, 단일 도스 또는 선택적으로 표준 프로토콜, 투여량 및 섭생에 따른 다중 도스로 이루어질 수 있다. 또한, 투여는 볼러스(bolus) 주사 또는 연속 주입에 의할 수 있다. 예로서, 개체는 상기 기재된 핵산 분자, 벡터, 감염성 입자 또는 조성물의 적어도 2 (예로서 2 내지 10)회의 투여로 치

료될 수 있다. 바람직하게는, 첫 번째 시리즈의 투여는 몇 일 내지 4 주까지 변화하는 기간 내에 순차적으로 수행되고, 이어서 두 번째 시리즈의 투여는 (예로서 1 또는 2 회의 투여) 첫 번째 시리즈의 마지막 투여 이후 1 내지 6 달 내에 수행된다. 두 번째 시리즈의 각각의 투여사이의 기간은 몇 일 내지 4 주일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 첫 번째 시리즈의 투여는 주 간격으로 3 회의 순차적인 투여를 포함하고, 두 번째 시리즈의 투여는 첫 번째 시리즈 후 4 내지 6 달 내에 1 회의 투여를 포함한다. 일반적인 지침으로서, MVA 벡터를 이용하는 경우, 바람직한 투여 경로는 10^6 내지 5×10^8 pfu 사이에 포함되는 도스의 MVA 입자들의 도스를 피하투여하는 것이다.

[0097] 본 발명의 핵산 분자, 벡터, 감염성 입자, 숙주 세포 또는 조성물은, 유전 질환, 선천성 질환 및 후천성 질환들을 포함하는 각종 병리학적 상태들의 치료 또는 예방을 위해 개체에 도입될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자, 벡터, 감염성 입자, 숙주 세포 또는 조성물의, 그러한 병리학적 상태들의 치료 또는 예방을 위한 약물 제조에의 이용에 관한 것이다. 본 발명은 감염성 질환들 (예로서, 바이러스 및/또는 세균 감염), 암 및 면역 결핍 질환들을 치료 또는 예방하는데 특히 적절하다. 여기 사용된 "암"이라는 용어는 퍼진 또는 국제화된 종양, 전이, 암성 폴립들(polyps) 및 전-종양 병변들 (preneoplastic lesions) (예로서, 신생물형성)을 포함하는 원치않는 세포 증식에서 기인하는 임의의 암성 상태를 포괄한다.

[0098] 본 발명의 맥락에서 고려되는 감염성 질환들은 상기 기재된 것과 같은 병원성 미생물들에 의한 감염과 관련된 임의의 상태를 포괄한다. 본 발명의 맥락에서 고려되는 암들은 이에 제한되지는 않지만, 다음을 포함한다: 신경 교아세포종 (glioblastoma), 육종, 흑색종, 마스토사이토마 (mastocytoma), 암종 및 유방암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암 (특히 파필로마바이러스 감염과 관련된 것들), 폐암 (예로서, 대세포, 소세포, 편평상피 및 아테노-암종들 포함), 신장암, 방광암, 간암, 결장암, 항문암, 췌장암, 위암, 위장암, 구강암, 후두암, 뇌 및 CNS암, 피부암 (예로서, 흑색종 및 비-흑색종), 혈액암 (림프종, 백혈병, 특히 고형 덩어리로 진행된 경우), 뼈암, 망막아종 및 갑상선암.

[0099] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 지속적 (persistent) 감염과 같은 파필로마바이러스 (특히 HR HPV)에 의한 감염, 전-악성 및 악성 병변과 관련된 상태의 예방 또는 치료 처리에 사용된다. "지속적 감염"이라는 표현은 바이러스 근절이 달성되지 않은 감염된 개체에서 파필로마 바이러스 감염의 자각증상이 없는 상태를 의미한다. 전형적으로 어떤 임상적 징후도 관찰되지 않는다. 전-악성 병변의 예들은, 이에 제한되지는 않지만, CIN (경부 상피 내 신생물), 음문 상피내 신생물 (VIN), 항문 상피내 신생물 (AIN), 음경 상피내 신생물 (PIN) 및 질 상피내 신생물 (VaIN)과 같은 각종 조직들에서 검출될 수 있는 낮은, 중간 또는 높은 수준의 상피내 신생물을 포함한다. 악성 병변의 예들은 이에 제한되지는 않지만, 자궁경부 암종, 항문 암종, 질암, 음경암 및 구강암을 포함한다. 파필로마 바이러스 폴리펩티드들을 코딩하는 본 발명의 핵산 분자, 벡터, 감염성 입자, 숙주 세포 또는 조성물은 특히 전-악성, 특히 CIN2/3 병변들, 또는 악성 병변들, 특히 자궁경부 암종 치료용이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 지속적 감염과 같은 간염 바이러스 (예로서, HBV 또는 HCV)에 의한 감염, 만성 또는 전격성 (fulgurant) 간염 및 간암과 관련된 상태의 예방 또는 치료 처리에도 사용될 수 있다.

[0100] 활성제는 단독으로, 또는 바람직한 경우 통상적인 치료 방식들 (예로서, 방사선, 화학치료 및/또는 수술)과 함께 사용될 수 있다. 통상적인 치료 방식들은, 표준 약제들, 투여량 및 섭생을 사용하는 표준 프로토콜들에 따라 동물 또는 인간 개체에 전달되며, 그러한 방식들은 본 발명의 활성제(들)의 투여 전, 동안, 및/또는 후에 수행될 수 있다. 예로서, HCV 감염과 관련된 상태들의 치료를 위하여, 본 발명의 방법 또는 용도는 바람직하게는, 예로서 HCV-관련 간세포암종들의 치료에 통상적으로 사용되는 프로테아제 저해제들 (예로서, Vertex 의 VX950와 같은 세린 프로테아제 저해제들), 폴리머라아제 저해제들, 헬리카제 저해제들, 항섬유화제들 (antifibrotics), 뉴클레오시드 유사체들, TLR 아고니스트들, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 항-HCV 항체들, 면역 조절제들, 치료용 백신 및 항종양제 (예로서, 아드리아마이신 또는 간동맥에서 화학색전술 (chemioembolisation)에 의해 일반적으로 투여되는 아드리아마이신 리피드 및 스폰젤 (spongel)의 화합물)와 연합된다. 특히 적당한 조합은, 바람직하게는 본 발명의 활성제(들)의 투여 전 24 내지 48 주 동안, 폐길화(pegylated) IFN- α (IFN- α 2a 또는 IFN- α 2b) 및/또는 리바비린 (ribavirin)을 이용한 치료를 포함한다. 파필로마 바이러스 감염과 관련된 상태들의 치료를 위하여, 본 발명의 방법 또는 이용은, 루프 전기절제수술 (loop electrosurgical excision)과 같은 탈격(ablative) 절차들과 연합될 수 있다. 본 발명에 따른 방법 또는 이용은 시토카인 (예로서, IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, IFN γ)과 같은 면역증강제(들) 또는 자살 유전자 생성물 (예로서, Caruso 등, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-28에 기재된 HSV-I의 티미딘키나아제; WO 99/54481에 기재된 FCU-I) 또는 그러한 폴리펩티드(들)을 발현하는 벡터(들)과 함께 실시될 수도 있다.

- [0101] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법 또는 이용은 프라이밍 부스트 (prime boost) 치료 방식에 따라 실시되며, 이는 프라이머 조성물(들) 및 부스터 조성물(들)의 순차적인 투여를 포함한다. 전형적으로, 상기 프라이밍(priming) 및 부스팅 조성물은, 적어도 하나의 항원성 도메인을 공통으로 포함하거나 또는 코딩하는 상이한 비히클들을 이용한다. 본 발명의 방법 또는 이용은 프라이밍 조성물의 1 내지 10 회 투여 후, 부스팅 조성물의 1 내지 10 회 투여를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 주사 간격은 1일 내지 12 달이다. 바람직한 방식은 3 내지 10일에서 변화하는 기간 (예로서, 1주)에 의해 독립적으로 구분된 프라이머의 3 또는 4 회의 순차적인 투여들 후, 마지막 프라이머를 투여한 지 1 내지 수 주 후 부스터의 1 또는 2 회 투여(들)를 포함한다. 또한, 프라이밍 및 부스팅 조성물들은 동일한 자리에 또는 다른 자리에, 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 예로서, 폴리펩티드를 기초로 한 조성물은 점막 경로에 의해 투여될 수 있는 반면, 벡터들을 기초로 한 조성물은 바람직하게는 주사되는데, 예로서 MVA 벡터의 경우 피하 주사, DNA 플라스미드 및 아데노바이러스 벡터의 경우 근육내 주사로 투여될 수 있다. 본 발명의 벡터, 감염 입자 또는 조성물은 치료된 개체에서 면역반응을 프라이밍하거나 부스트하는데 사용될 수 있거나 또는 프라이밍 및 부스트 모두를 위해 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 프라이밍은 본 발명의 플라스미드 벡터를 이용하여 수행되고, 부스팅은 본 발명의 백시니아 바이러스 감염 입자를 이용하여 수행된다. 또 다른 구체예에서, 프라이밍은 본 발명의 아데노바이러스 감염 입자를 이용하여 수행되고, 부스팅은 본 발명의 백시니아 바이러스 감염 입자를 이용하여 수행된다. 또 다른 구체예에서, 프라이밍은 본 발명의 백시니아 바이러스 감염 입자를 이용하여 수행되고, 부스팅은 본 발명의 아데노바이러스 감염성 입자를 이용하여 수행된다.
- [0102] 본 발명은 예시적인 방법으로 기재되었으며, 사용된 용어는 단어들의 성질을 한정하기보다는 설명을 위한 것임을 이해하여야 한다. 본 발명의 많은 변경 및 변화들이 상기 교시의 관점에서 가능하다는 것이 명백하다. 따라서, 첨부된 청구의 범위의 범주 내에서, 본 발명은 여기 특이적으로 기재된 것과 상이한 방식으로 시행될 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0103] 상기 인용된 특허, 간행물 및 데이터베이스 기재사항들의 개시는 모두 여기에 참조로서, 그들 전체가 그러한 개별적인 특허, 간행물 또는 기재사항들 각각이 참조로 포함되어짐을 특이적 및 개별적으로 나타낸 것과 같이 동일한 정도로, 특이적으로 포함된다.

실시예

- [0108] 다음의 실시예는 본 발명을 설명하기 위하여 제공된다.
- [0109] 다음에 설명된 구축물들은 Maniatis 등 (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY)에 설명된 일반적인 유전공학 및 분자 클로닝 기술 또는 상업적인 키트가 사용되는 경우 제조사의 추천에 따라 수행되었다. PCR 증폭 기술은 당업자에 알려져 있다 (예를 들어, PCR protocols - A guide to methods and applications, 1990, published by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press 참조). 앰피실린 저항 유전자를 운반하는 재조합 플라스미드는 100 µg/ml의 항생물질이 공급된 한천 또는 액체 배지 상에서 대장균 C600 (Stratagene), BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557~580) 및 NM522에서 복제되었다. 재조합 백시니아 바이러스의 구축물은 상기 인용된 문헌과 Mackett 등 (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415~7419) 및 Mackett 등 (1984, J. Virol. 49, 857~864)의 분야에서의 일반화된 기술에 따라 수행되었다. 대장균의 선택 유전자 *gpt* (산틴 구아닌 포스포리보실트랜스페라아제)(Falkner와 Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849~1854)는 재조합 백시니아 바이러스의 선발을 촉진시키기 위하여 사용되었다.
- [0110] **실시예 1: HPV-16 E1과 E2 유전자를 발현하는 MVA 벡터 (MVATG17410)의 구축**
- [0111] a) HPV-16 E2 유전자를 코딩하는 재조합 MVA 벡터 (MVATG17408)의 구축
- [0112] *HPV16 E2 유전자의 클로닝*
- [0113] HPV-16 E2를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열들을 CaSki 세포 (ATCC CRL-1550)로부터 분리된 게놈 DNA로부터 클로닝하였다. E2 유전자를 프라이머 OTG16809 (서열번호: 16)과 OTG16810 (서열번호: 17)를 사용하여 증폭시켰다. 결과의 단편을 *Bam*HI 과 *Eco*RI 으로 절단하고, 동일한 제한효소에 의하여 절단된 pGEX2T (Amersham Biosciences)에 삽입하여, pTG17239를 얻었다. 클로닝된 E2 유전자의 서열은 HPV16 E2 원형(prototype) 서열 (Genbank NC-01526에서 설명됨)과 비교하여 5개의 돌연변이를 나타내었다. 두 개의 돌연변이는 사일런스이며, 나머지 세 개의 비-사일런스 돌연변이 (T210I, S219P, K310T)를 QuickChange Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene)를 사용하여 모으고, pTG17268을 얻었다.

- [0114] HPV-16 E2 폴리펩티드의 수식
- [0115] E2*로 명명된 HPV-16 E2 변종 (E39A와 I73A)을 얻기 위하여, pTG17268에 통합된 E2 뉴클레오티드 서열을 특정부위 돌연변이 유발(site directed mutagenesis)로 수식하였다. 보다 구체적으로, E2 복제 기능을 위치 39의 Glu 기를 Ala 기로 치환하여 제거시키고, 트랜스활성(transactivation) 기능을 위치 73의 Ile 기를 Ala 기로 치환하여 제거시켰다. 결과의 플라스미드 pTG17318은 HPV-16 E2*를 코딩하는 수식된 서열을 포함한다.
- [0116] 발현 숙주 세포의 플라스마 멤브레인 표면에서 HPV-16 E2*의 제시를 지정하기 위하여, HPV-16 E2*는 그것의 N-말단에서 펩티드 시그널과 융합하고, 그것의 C-말단에서 래비 바이러스의 당단백질(PG 중; Genebank ay009097)로부터 유래된 펩티드-앵커링 서열과 융합하여 추가적으로 수식되었다. SS-E2*-TMR로 명명되는 펩티드-제시 E2 결손 변종을 코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호: 12)은 다음의 프라이머들을 사용한 트리플 PCR에 의하여 리어셈블리되었다: OTG17500 (서열번호: 18), OTG17501 (서열번호: 19), OTG17502 (서열번호: 20), OTG17503 (서열번호: 21), OTG17504 (서열번호: 22) 및 OTG17505 (서열번호: 23). 리어셈블리된 서열은 pBS-유래 벡터(Stratagene)로 삽입되어, pTG17360를 얻었고, 다음으로 백시니아 트랜스퍼 플라스미드 다운스트림 pH5R 프로모터(vaccinia transfer plasmid downstream the pH5R promoter) (Rosel 등, 1986, J Virol. 60, 436-449)로 클로닝되어, pTG17408를 얻었다.
- [0117] 트랜스퍼 플라스미드는 뉴클레오티드 서열의 삽입이 MVA 게놈의 결실 III에서 상동성 재조합에 의하여 트랜스퍼되는 것을 가능하게 디자인되었다. 그것은 플라스미드 pTG1E (Braun 등, 2000, Gene Ther. 7, 1447-57에서 설명됨)로부터 기원이 된 것으로, 상기 플라스미드 내로 MVATGN33.1 DNA (Sutter와 Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-51)로부터 PCR에 의하여 얻어진 서열인, MVA 결실 III를 둘러싸는 플랭킹 서열 (BRG3와 BRD3)을 클로닝시켰다. 또한, 상기 트랜스퍼 플라스미드는 늦은 초기 백시니아 바이러스 합성 프로모터(early late vaccinia virus synthetic promoter) p11K7.5 (R. Wittek에 의하여 제공됨, University of Lausanne)의 조절하에 아쿠오레아 빅토리아 증강 녹색 형광 단백질(Aequorea victoria enhanced Green Fluorescent protein) (eGFP gene, pEGP-C1로부터 분리됨, Clontech)와 대장균 산틴-구아닌 포스포리보실트랜스페라아제 유전자(Escherichia coli xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene) (gpt gene) 간의 융합을 포함한다. 산틴-구아닌 포스포리보실트랜스페라아제의 합성은 GPT⁺ 재조합 MVA가 미코페놀산, 산틴, 및 하이포산틴을 포함하는 선택 배지에서 플라크를 형성하는 것을 가능하게 하고 (Falkner 등, 1988, J. Virol. 62, 1849-54), eGFP가 재조합 MVA 플라크의 시각화하는 것을 가능하게 한다. 선택 마커 eGFP-GPT는 동일한 방향으로 두 상동성 서열 간에 놓여진다. 클론 선택이 이루어지면, 선택 마커는 선택 없이 몇 번의 패시지로 쉽게 제거되어, eGFP-GPT 재조합 MVA의 증식을 가능하게 한다.
- [0118] HPV-16 SS-E2*-TMR 유전자를 발현하는 재조합 MVA의 구축
- [0119] MVATG 17408 바이러스의 생산은 MVATGN33.1 (0.1pfu/cell의 MOI)로 감염된 프라이머리 치킨 암브리오스 피브로블라스트(CEF)에서 상동성 재조합에 의하여 수행되며, (표준 칼슘 포스페이트 DNA 침전에 따라) pTG17408로 트랜스펙션하였다. 바이러스 선택은 미코페놀산, 산틴 및 하이포산틴을 함유하는 선택 배지에서 3회의 플라크 정제로 수행하였다. 위에서 언급된 바와 같이, 선택 마커는 비-선택 배지에서 패시지에 의하여 제거되었다. 부계(parental) MVA에 의한 오염의 부재는 PCR에 의하여 확인되었다.
- [0120] E2 발현의 분석을 웨스턴-블랏으로 수행하였다. CEF를 MOI 0.2에서 MVATG17408로 트랜스펙션시키고, 24시간 후, 세포들을 수거하였다. 웨스턴-블랏 분석을 상업적 모노클로날 안티-E2 항체 TVG271 (abeam)을 사용하여 수행하였다. 55kDa의 뚜렷한 분자량을 갖는 단백질의 발현이 검출되었으며, E2*-TMR의 이론적인 분자량은 48.9kDa이다. 엔도글리코시다아제 F로 세포 추출물의 처리 후, 재조합 단백질의 크기의 감소가 관찰되었으며, 이는 MVATG17408로부터 발현된 E2* TMR 폴리펩티드가 N-당화되었음을 나타낸다.
- [0121] b) HPV-16 E2 유전자 (MVATG17409)와 오버래핑된 부분에서 축퇴된 HPV-16 E1 유전자를 코딩하는 재조합 MVA의 구축
- [0122] HPV-16 E1 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 CaSki 세포 DNA (ATCC CRL-1550)으로부터 클로닝하였다. 보다 상세하게는, E1 유전자를 E1a(뉴클레오티드 1~1102)와 E1b(뉴클레오티드 1001~1950)의 두 부분으로 증폭하였다. E1a 단편을 증폭시키기 위하여 프라이머 OTG 16811 (서열번호: 24)와 OTG 16814 (서열번호: 25)가 사용되

있고, *Bam*H I 과 *Eco*R I 으로 절단하여, 동일한 제한효소로 처리된 pGEX2T에 삽입되어 pTG17240를 얻었다. E1b 단편은 OTG16813 (서열번호: 26)와 OTG 16812 (서열번호: 27)를 사용하였고, pGEX2T로 삽입하기 전에 *Bam*H I 과 *Eco*R I 으로 절단하여, pTG17241를 얻었다. 서열은 HPV-16 E1 원형 서열 (Genbank NC-01526에 설명)과 비교하여 4개의 돌연변이를 나타내었다. 하나의 돌연변이는 사일런스이고, E1a (K130Q, N185T 및 T220S)에 존재하는 세 개의 비-사일런스 돌연변이는 특정부위 돌연변이 유발로 교정하였다. 완전한 E1 유전자를 *Bsr*G I 과 *Eco*R I 으로 처리된 pTG 17241에 교정된 E1a 단편을 클로닝하여 리어셈블리하였다. 결과의 플라스미드를 pTG17289로 명명하였다.

[0123] HPV-16 게놈에 있어서, E1 유전자의 마지막 59 뉴클레오티드는 E2 유전자의 첫 59 뉴클레오티드와 동일하였다. E1과 E2-코딩 MVA 벡터의 생산 단계 동안의 불안정성의 문제를 피하기 위하여, E1-코딩 서열의 상기 부분을 E2-코딩 서열과의 서열 상동성을 감소시키기 위하여 코돈 이용 수식(codon usage modification)으로 수식하였다. 축퇴된 서열(서열번호: 9)을 축퇴된 프라이머 OTG17408 (서열번호: 28)와 OTG17409 (서열번호: 29)를 사용하여 E1 유전자의 3' 말단의 증폭에 의하여 얻었다. 증폭된 단편을 *Nsi* I 과 *Bgl* II 로 절단하고, 동일한 제한효소로 절단된 pTG 17289에 삽입하여 pTG17340를 얻었다.

[0124] 또한, HPV-16 E1의 위치 482에서 Gly 잔기를 Asp 잔기로 치환함으로써 (G482D; 또한, 본 발명에서 E1^{*}로 명명) 코딩된 E1 폴리펩티드의 복제 기능을 폐지하기 위하여, HPV-16 축퇴된 E1 서열을 특정부위 돌연변이 유발로 돌연변이시켜, pTG17373를 얻었다.

[0125] 또한, 래비스 바이러스 (ERA 분리물; Genebank N^o M38452)의 당단백질로부터 유래된 시그널 및 메브레인-앵커링 펩티드로 융합함으로써, 세포막 표면에 코딩된 폴리펩티드를 발현시키기 위하여, HPV-16 E1deg^{*} 서열을 수식하였다. SS-E1deg^{*}-TMR 서열 (서열번호: 10)을 다음의 프라이머 OTG17560 (서열번호: 30), OTG17561 (서열번호: 31), OTG17562 (서열번호: 32), OTG17563 (서열번호: 33), OTG17564 (서열번호: 34) 및 OTG17565 (서열번호: 35)를 사용하여 트리플 PCR로 재구축하였다. 결과의 단편을 pBS-유래 벡터 (Stratagene)에 삽입하고, pTG17404를 얻었다. 다음으로 SS-E 1deg^{*}-TMR 서열을 백시니아 프렌스퍼 플라스미드의 p7.5K 프로모터 다운스트림에 클로닝하여 (Cochran 등, 1985, J. Virol. 54, 30~7), pTG17409를 얻었다.

[0126] MVATG17409 바이러스의 생산은 상기 설명된 바와 같이 상동성 제조법에 의하여 CEF에서 수행하였다.

[0127] c) 재조합 MVA 코딩 HPV-16 E1과 E2 유전자 (MVATG 17410)의 구축

[0128] p7.5K 프로모터에 의하여 조정되는 SS-E1deg^{*}-TMR 서열을 pTG17409로부터 분리하여, pTG17408에 삽입하고, pTG17410를 얻었다.

[0129] MVATG17410 바이러스의 생산은 상기 설명된 바와 같이 상동성 제조법에 의하여 CEF를 수행하였다.

[0130] **실시예 2: HPV-18 E1과 E2 유전자 (MVATG17582)를 코딩하는 MVA 벡터의 구축**

[0131] HPV-18 E1과 E2 유전자를 합성 유전자로 재구축하고, (i) 원 HPV-16과 HPV-18 서열에 의하여 공유되는 상동성 부분 간의 상동성이 75% (HPV-16과 HPV-18 E1 및 E2 유전자를 열라인하고, 5 보존적 뉴클레오티드 미만으로 상동성을 감소시키기 위하여 올리고뉴클레오티드를 디자인하였다) 미만으로 감소되고, (ii) 원 HPV-18 E1 서열의 3' 말단과 HPV-18 E2 서열의 5' 말단의 양쪽에 존재하는 59 뉴클레오티드의 부분 간의 75% 미만으로 상동성을 감소시키며, (iii) HPV-18 E1과 E2 유전자 생산물 (E1: G489D, E2: E43A 및 I77A)의 효소적 작용을 폐지하는 돌연변이를 유도하기 위하여, 올리고뉴클레오티드를 디자인하였다.

[0132] HPV-18 degE1^{*} 서열을 50 올리고뉴클레오티드를 어셈블링하여 재구축하고, pBS 벡터로 클로닝하여 pTG 17473를 얻었다. 다음으로, E1 서열을 프라이머 OTG15315 (서열번호: 36), OTG17881 (서열번호: 37), OTG17882 (서열번호: 38), OTG17883 (서열번호: 39), OTG17884 (서열번호: 40) 및 OTG17885 (서열번호: 41)를 사용하여 트리플 PCR로 미즐즈 바이러스 F 당단백질로부터의 시그널링 클론 (SS-18E1deg^{*}-TMF)과 융합시켰다. 결과의 단편 (서열번호: 11)을 p7.5K 프로모터 조절하의 MVA 트랜스퍼 벡터로 클로닝하여 pTG17521를 얻었다.

[0133] HPV-18 degE2^{*} 서열을 26 올리고뉴클레오티드로 어셈블링하여 재구축하고, pBS 벡터에 클로닝하여 pTG17498를 얻었다. 래비스 바이러스 (ERA 종; Genbank n^o M38452)의 당단백질의 시그널 및 메브레인-앵커링 펩티드와의 융합을 프라이머 OTG17875 (서열번호: 42), OTG17876 (서열번호: 43), OTG17877 (서열번호: 44), OTG17878 (서

열번호: 45), OTG17879 (서열번호: 46) 및 OTG17880 (서열번호: 47)를 사용하여 트리플 PCR로 수행하였다. SS-18 E2*-TMR 카세트를 MVA 트랜스퍼 플라스미드 다운스트림의 pH5R 프로모터에 삽입하고, pTG17552를 얻었다. 마지막으로, p7.5K-SS-E1deg*-TMF 카세트를 pTG17521로부터 분리하고, pTG17552에 삽입하여 pTG17582를 얻었다.

[0134] 재조합 MVATG17521, MVATG17552 및 MVATG17582의 생산을 상기 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0135] **실시예 3: HPV-16과 HPV-18 E1 및 E2 유전자 (MVATG17583)를 발현하는 다가(multivalent) MVA 벡터의 구축**

[0136] p7.5K-SS-18E1deg*-TMF 카세트 및 pH5R-SS-18E2*-TMR 카세트를 (p7.5K-SS-16E1deg*-TMR 카세트 및 pH5R-SS-16E2*-TMR를 포함하는) pTG17410에 도입하고, 결과의 트랜스퍼 플라스미드를 pTG17583로 명명하였다. MVATG17583의 생산을 상기 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0137] **실시예 4: HPV16과 HPV18 E6 및 E7 유전자를 발현하는 다가 재조합 바이러스의 구축**

[0138] MVATG 16327는 HPV-16와 HPV-18 E6 및 E7 폴리펩티드의 멤브레인 앵커된 비-종양성 변이종을 발현하는 재조합 MVA 바이러스이다. E6 및 E7 뉴클레오티드 서열은 이들의 종양 특성을 제거하기 위하여 돌연변이화되고 (E6* 및 E7*), 적절한 시그널 및 멤브레인 앵커링 펩티드를 코딩하는 서열 (E6*tm, E7*tm)과 융합된다. 보다 구체적으로는, HPV-18 E7*는 그것의 N-과 C-말단에 미즐즈 바이러스의 F 당단백질의 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드와 각각 융합되고, HPV-16 E6*, HPV-16 E7* 및 HPV-18 E6*은 래비스 바이러스 당단백질로부터 유래된 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드와 융합된다. 나아가, HPV-18 E6 및 E7 뉴클레오티드 서열은 HPV16 카운터파트와의 상동성을 감소시키기 위하여 코돈 이용 수식에 의하여 더 수식된다. 이러한 목적을 위하여, 원 HPV 16과 HPV 18 유전자의 서열을 얼라인하고, 5 보존 뉴클레오티드 미만의 상동성으로 감소시키기 위하여 코돈 축퇴를 수행하였다. 벡터에서, HPV-16과 HPV-18 E6 서열은 각각 반대 방향으로 p7.5K 프로모터의 조절하여 놓이고, HPV-16과 HPV-18 E7 서열은 H5R 프로모터에 의하여 작동되며, 모든 발현 카세트는 MVA 게놈의 절단 III 부위로 삽입된다.

[0139] a) HPV-16 E7*tm 발현 카세트의 구축

[0140] HPV-16 E7 유전자를 Caski 세포로부터 분리하고, W099/03885에서 설명된 바와 같이, 비-종양성인 멤브레인-발현 E7 폴리펩티드 (16E7*tmR)를 코딩하기 위하여 수식하였다. 비-종양성 돌연변이를 아미노산 잔기 21-26 (Δ DLICYE)의 결실과 E7* 돌연변이된 서열을 래비스 바이러스 당단백질로부터 클로닝된 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드를 코딩하는 서열 (ERA 종; Genbank accession number M38452)과 상기 돌연변이된 서열의 5'과 3' 말단에서 각각 융합하여 멤브레인에 발현시켜 수행하였다. 결과의 서열을 초기-후기 pH5R 프로모터의 조절하에 클로닝하고 (Rosel 등, 1986. J. Virol. 60, 436-9), 상기 카세트를 pBS 유래 벡터에 도입하여 pTG16161을 얻었다.

[0141] b) HPV-16 E6*tm과 HPV-18 E6*tm 발현 카세트의 클로닝

[0142] W099/03885에서 설명된 바와 같은 비-종양성인 멤브레인 발현 E6 폴리펩티드를 코딩하기 위하여 HPV-16 E6 유전자가 분리되고, 수식되었다. 비-종양성 돌연변이를 아미노산 잔기 118-122 (Δ CPEEK)의 결실과 E6*-돌연변이된 서열을 래비스 바이러스 당단백질로부터 유래된 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드를 코딩하는 서열 (PG 종; Genbank accession number ay009097)에 상기 돌연변이된 서열의 5' 및 3' 말단 각각에 융합하며 멤브레인 발현 함으로써 수행하였다. 이것은 BamHI 부위에 의하여 분리된 시그널 펩티드 및 멤브레인-앵커링 펩티드 서열을 포함하는 벡터에 E6*-돌연변이된 서열을 삽입함으로써 수행하였고, pTG 16097를 얻었다.

[0143] 합성 HPV-18 E6 서열을 올리고뉴클레오티드 OTG15174 (서열번호: 48), OTG15175 (서열번호: 49), OTG15176 (서열번호: 50), OTG15177 (서열번호: 51), OTG15178 (서열번호: 52), OTG15179 (서열번호: 53), OTG15180 (서열번호: 54) 및 OTG15181 (서열번호: 55)을 어셈블링하여 생산하였다. 상기 올리고뉴클레오티드는, 아미노산 잔기 113-117 (비-종양성 돌연변이 Δ NPAEK)을 코딩하는 코돈의 결실을 도입하고, HPV-16 E6 유전자 (축퇴된 서열)와의 상동성을 감소시키기 위한 코돈 이용을 축퇴시키기 위하여 디자인되었다. 결과의 합성 서열을 그것의 5' 및 3' 말단에서 래비스 바이러스 당단백질 유전자로부터 유래된 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드를 코딩하는 서열과 각각 융합하여 서열번호: 14로 표시되는 pTG16160를 얻었다. HPV-16 E6*tmR 및 HPV-18 degE6*tmR 서열을 각각 p7.5K 프로모터의 조절하에서 반대 방향으로 삽입하였다. 다음으로 카세트를 pTG16161에 도입하고, pTG

16215를 생산하였다.

[0144] c) HPV-18 E7^{*}tmF 발현 카세트의 클로닝

[0145] 합성 HPV-18 E7 서열을 올리고뉴클레오타이드 OTG14773 (서열번호: 56), OTG14774 (서열번호: 57), OTG14775 (서열번호: 58), OTG14776 (서열번호: 59), OTG14777 (서열번호: 60) 및 OTG14778 (서열번호: 61)를 어셈블링하여 생산하였다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 아미노산 잔기 24~28 (비-종양성 돌연변이 ΔDLLCH)를 코딩하는 코돈의 결실을 도입하고, HPV-16 E7 유전자 (축퇴된 서열)와의 상동성을 감소시키기 위한 코돈 이용을 축퇴시키기 위하여 디자인되었다. 다음으로, 결과의 합성 서열을 그것의 5' 및 3' 말단에서 미즐즈 바이러스의 F 유전자로부터 클로닝된 시그널 및 맴브레인-앵커링 펩티드에 대한 코딩 서열 (EP 0305229에서 설명)과 융합시켰다. 결과의 서열 (서열번호: 15)을 pH5R 프로모터의 조절하에서 클로닝하고, 상기 카세트를 pBS 유래 벡터에 도입하여 pTG 16015를 얻었다.

[0146] d) 트랜스퍼 플라스미드 pTG 16327의 구축

[0147] 트랜스퍼 플라스미드 pTG6019 (W099/03885의 실시예 2에서 설명)는 MVA 결실 III에 인접한 상동성 서열을 포함한다. 이것은 다음과 같이 수식되었다. A synthetic polylinker, obtained by hybridation of 프라이머 OTG15040 (서열번호: 62)과 OTG15041 (서열번호: 63)의 혼성화에 의하여 얻어진 합성 폴리링커를 *Bam*HI 과 *Sac*I 으로 절단된 pTG6019에 도입하고, pTG 16007를 얻었다. 초기-후기 pH5R 프로모터의 조절하에 놓인 대장균 *gpt*를 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 *Sac*I -*Sac*I 단편을 pTG14033 (EP 1 146 125의 실시예 2에서 설명)으로부터 분리하고, *Sac*I 절단에 의하여 pTG 16007로 도입하여 pTG16093를 얻었다. 산틴-구아닌 포스포리브실트랜스페라아제의 합성은 GPT⁺ 재조합 MVA가 미코페놀산, 산틴, 및 하이포산틴을 함유하는 선택 배지에서 플라크를 생성시키는 것을 가능하게 한다 (Falkner 등, 1988. J.Virol. 62, 1849~54). 선택 마커 *GPT*를 동일한 방향으로 두 상동성 서열 간에 두었다. 클론 선택이 이루어지면, 선택 마커는 선택 없이, 몇몇 패시지에 의하여 제거되고, GTP 재조합 MVA의 성장을 가능하게 한다.

[0148] *Hind*III-*Sma*I 단편을 함유하는 HPV-18 degE7^{*}TMF 발현 카세트를 pTG16015로부터 분리하고, 동일한 제한효소로 처리한 pTG 16093에 도입하여, pTG16105를 얻었다. 보다 구체적으로는, pTG16215를 *Sal*I 과 *Eco*R I 으로 처리하고, T4 DNA 중합효소로 처리하여, 결과의 단편을 포함하는 HPV-16 E7^{*}tmR, HPV-16 E6^{*}tmR 및 HPV-18 degE6^{*}TMR 발현 카세트를 *Sma*I 으로 절단된 pTG16105에 도입하여 pTG16327를 얻었다 (도 2).

[0149] e) MVATG16327의 생산

[0150] MVATG16327의 생산을 프라이머리 치킨 엠브리오스 피브로블라스트 (CEF)에서 상동성 재조합으로 수행하였다. 이러한 목적을 위하여, pTG 16327를 0.1pfu/cell의 MOI에서 MVATGN33.1로 이전에 감염된 CEF 상에서 표준 칼슘 포스페이트 DNA 침전법에 따라 트랜스펙션시켰다. 바이러스 선택을 미코페놀산, 산틴 및 하이포산틴을 함유하는 선택 배지의 존재 하의 CEF 상에서 3회의 플라크 정제로 수행하였다. 다음으로, 선택 마커를 비-선택 배지에서 패시지로 제거시켰다. 부계 MVA의 의한 오염의 부재를 PCR로 확인하였다.

[0151] 유전자 발현의 분석을 웨스턴-블랏으로 수행하였다. CEF를 MOI 0.2에서 MVATG16327로 감염시키고, 24시간 후, 세포들을 수거하였다. 웨스턴-블랏 분석을 HPV-16과 HPV-18 E6 및 E7 단백질에 대한 토끼 폴리클로날 항체를 각각 사용하여 수행하였다. 결과는 모든 HPV 폴리펩티드가 MVATG16327로부터 정확하게 발현되었다.

[0152] f) MVATG16327의 유전적 안정성 연구

[0153] MVATG16327의 5 패시지가 10⁻² pfu/cell와 10⁻⁴ pfu/cell의 MOI에서 감염된 CEF 상에서 수행되었다. 유전적 안정성을 연구 스톱의 5회 패시지로부터 분리된 100 바이러스 클론으로 평가하였다. 두 가지 방법이 사용되었다: 발현 카세트의 구조를 결정하기 위한 PCR 증폭 및 웨스턴 블랏에 의한 항원 검출. PCR 분석의 결과는 흥미로운 20 발현 카세트를 함유하는 클론이 99%임을 보여주었다. 면역 검출은 네 가지 항원: HPV-16와 HPV-18 E6*tm 및 E7*tm 폴리펩티드가 발현된 클론이 97%임을 보여주었다.

[0154] 이러한 분석은 MVATG 16327로부터 유래된 97%의 클론이 5 패시지 후 형성되었으며, 이러한 구축물의 우수한 유전적 안정성을 보여준다.

[0155] 실시예 5: HPV-16, HPV-18, HPV-33 및 HPV-52 E2 유전자를 발현하는 다가 MVA 벡터의 구축

[0156] HPV-33 E2 폴리펩티드를 코딩하는 합성 유전자를 Genearth (Regensburg, Germany)에서 합성하였다. 합성

서열은, (i) HPV-16, HPV-18 및 HPV-52로부터의 E2 유전자와 75% 미만의 상동성으로 감소시키고 (만약 가능하다면, 상동성 부분이 6 보존 뉴클레오타이드 미만으로 감소된다), (ii) HPV-33 유전자 생산물 (E39A 와 I73A)의 효소적 작용을 폐지시키는 돌연변이를 도입하기 위하여, 디자인되었다.

[0157] 다음으로, HPV-33 degE2^{*} 서열을 레비스 바이러스의 당단백질의 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 (ERA 중, Genbank n° M38452)과 융합하였다. 이것은 프라이머 OTG18962 (서열번호: 72), OTG18963 (서열번호: 73), OTG18964 (서열번호: 74), OTG18965 (서열번호: 75), OTG18966 (서열번호: 76) 및 OTG18967 (서열번호: 77)을 사용한 트리플 PCR로 수행하였다. SS-33degE2^{*}-TMR 폴리펩티드를 코딩하는 결과의 단편 (서열번호: 67)을 p7.5K 프로모터 조절하의 MVA 트랜스포 벡터에 클로닝하고, 바이러스 입자를 상기 설명된 바와 같이 생산하였다.

[0158] HPV-52 E2 폴리펩티드를 코딩하는 합성 유전자를 Geneart (Regensburg, Germany)에서 합성하였다. 합성 서열은, (i) HPV-16, HPV-18 및 HPV-33으로부터의 E2 유전자와 75% 미만의 상동성으로 감소시키고 (만약 가능하다면, 상동성 부분이 6 보존 뉴클레오타이드 미만으로 감소된다), (ii) HPV-52 유전자 생산물 (E39A 와 I73A)의 효소적 작용을 폐지시키는 돌연변이를 도입하기 위하여, 디자인되었다.

[0159] 다음으로, 합성 HPV-52 E2^{*}deg 서열을 프라이머 OTG18968 (서열번호: 78), OTG18969 (서열번호: 79), OTG18970 (서열번호: 80), OTG18971 (서열번호: 81), OTG18972 (서열번호: 82) 및 OTG18973 (서열번호: 83)를 사용한 트리플 PCR로 미즐즈 바이러스 F 단백질의 시그널 및 멤브레인-앵커링 펩티드 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 융합시켰다 (SS-52E2^{*}deg-TMF를 제공).

[0160] SS-52E2^{*}deg-TMF 폴리펩티드를 코딩하는 결과의 단편 (서열번호: 69)를 MVA 트랜스포 플라스미드의 p7.5K 프로모터에 삽입하고, 바이러스 입자를 상기 설명한 바와 같이 생산하였다.

[0161] (pTG17552로부터 분리된) 멤브레인-발현된 효소적 결실 HPV-18 E2 폴리펩티드를 코딩하는 pH5R-SS-18E2^{*}-TMR 카세트, 멤브레인-발현된 효소적 결실 HPV-33 E2 폴리펩티드를 코딩하는 p7.5K-SS-33degE2^{*}-TMR 카세트 및 멤브레인-발현된 효소적 결실 HPV-52 E2 폴리펩티드를 코딩하는 p7.5K-SS-52degE2^{*}-TMF 카세트를 (pH5R-SS-16E2^{*}-TMR 카세트를 포함하는) pTG17408에 도입하고, 바이러스 입자를 상기 설명된 바와 같이 생산하였다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1a는 (a) 원 HPV-16 E1 서열의 말단과 (b) 원 HPV-16 E2 서열의 시작점에 존재하는 59 뉴클레오타이드들 간의 서열 얼라인먼트를 도시화한 것이다.

[0105] 도 1b는 (a) 원 HPV-16 E1 서열의 말단 또는 원 HPV-16 E2 서열의 시작점과 (b) 서열번호: 9에 존재하는 59 뉴클레오타이드들 간의 서열 얼라인먼트를 도시화한 것이다.

[0106] 도 2a는 HPV-16과 HPV-18 E6 코딩 서열 간의 서열 얼라인먼트를 도시화한 것이다.

[0107] 도 2b는 HPV-16 E6 코딩 서열과 서열번호:14 간의 서열 얼라인먼트를 도시화한 것이다.

도면

도면1a

a)
...GCACGAGGACGAGGACAAGGAAAACGATGGTGATTACCTACATTCAAGTGCGTATCTGGTCA
GAACACAAATACTTTG**TGA**

b)
ATGTGTGATTCA**T**TAC**T**TAC**T**TAC**A**GTGCGTAT**C**TGGT**C**AGAACACAA**A**TA**C**TTTGTG**A**AAATG**A**
 GT...

Percent identity: 100

도면1b

a)
...GCACGAGGACGAGGACAAGGAAAACGATGGTGATTACCTACATTCAAGTGCGTATCTGGTCA
GAACACAAATACTTTG**TGA**

b)
ATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATGTGTGT**CAGGACAAAATACTAACACATTATGAAAATGATA**
 GT...

Percent identity: 69.492

도면2a

```

a  ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAG  50
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b  .....ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCCTA  35
      .
a  AAAGTTACCCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACATATACATGATATAA  100
      ||| |||| | | ||||| || ||| | | | | | | | | | | | | | | | |
b  CAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACCTGAACACTTCACTGCAAGACATAG  85
      .
a  TATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATAT  150
      | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b  AAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATTGGAACCTTACAGAGGTATTT  135
      .
a  GACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATA  200
      || ||||| ||| ||||| || | || ||||| || | | | | | | | | | |
b  GAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTTGTGTATAGAGACAGTATACCCCA  185
      .
a  TGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATCTAAAATTAGTGAGTATA  250
      ||||| ||| ||||| || | ||||| || ||||| || | | | | | | | | | |
b  TGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTATCTAGAATTAGAGAATTAA  235
      .
a  GACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC  300
      ||||| ||| | | ||||| || |||| | || | | | | | | | | | | |
b  GACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGGAAAACTAATACTAAC  285
      .
a  AAACCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAACTGTCAAAGCCACT  350
      |  ||| | ||| ||||| ||||| | | || | | | | | | | | | | |
b  ACTGGGTTATACAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCGTT  335
      .
a  GTGTCCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATA  400
      |  ||| | ||||| | ||||| || | |||| | ||||| || | | | | | |
b  GAATCCAGCAGAAAACTTAGACACCTTAATGAAAAACGACGATTTCACA  385
      .
a  ATATAAGGGGTCGGTGGACCGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCA  450
      | ||| | || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
b  ACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCATTCGTGCTGCAACCGAGCA  435
      .
a  AG.....AACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA  477
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b  CGACAGGAACGACTCCAACGACGCAGAGAAACACAAGTATAA  477

```

도면2b

```

a .....ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGG 40
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b ..... ..ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACAC 100
a AGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACTATA 90
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b GGCGACCCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACGAACACTTCACTG 150
a CATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACG 140
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b CAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGTAAGACAGTATTGGAACCTAC 200
a TGAGGTATATGACTTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATG 190
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b AGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGACCTATTTGTGGTGTATCGTGACA 250
a GGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTATTCTAAAATT 240
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b GTATACCCCATGCCGCATGCCATAAGTGTATAGATTTTACTCTAGAATC 300
a AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACA 290
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b AGAGAATTAAGGCACTATTCAGACTCTGTGTACGGAGACACATTGGAAAA 350
a GCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTGTAAATTAGGTGTATTAAGTGTG 340
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b ACTAATAACACTGGGTTATACAATTTATTAATAAGATGCCTGCGGTGCC 400
a AAAAGCCACTGTGTCCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAA 390
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b AGAAACCGTT.....GCTTAGACACCTTAATGAAAAACGA 435
a AGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTCGATGTATGTCTTGTG 440
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b CGATTTCACAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCATTCTGTGCTG 485
a C.....AGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA..... 477
      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
b CAACCGAGCAGCAGGAACGACTCCAACGACGCGAGGGAGACACAAGTAA 535

```

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> TRANSGENE S.A.
SILVESTRE Nathalie
SCHMITT Doris

<120> Vectors for multiple gene expression

<130> TG183 EXT

<150> EP07360019.9

<151> 2007-05-15

<160> 83

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus type 16

<400> 1
 Met Ala Asp Pro Ala Gly Thr Asn Gly Glu Glu Gly Thr Gly Cys Asn
 1 5 10 15
 Gly Trp Phe Tyr Val Glu Ala Val Val Glu Lys Lys Thr Gly Asp Ala
 20 25 30
 Ile Ser Asp Asp Glu Asn Glu Asn Asp Ser Asp Thr Gly Glu Asp Leu
 35 40 45
 Val Asp Phe Ile Val Asn Asp Asn Asp Tyr Leu Thr Gln Ala Glu Thr
 50 55 60
 Glu Thr Ala His Ala Leu Phe Thr Ala Gln Glu Ala Lys Gln His Arg
 65 70 75 80
 Asp Ala Val Gln Val Leu Lys Arg Lys Tyr Leu Gly Ser Pro Leu Ser
 85 90 95
 Asp Ile Ser Gly Cys Val Asp Asn Asn Ile Ser Pro Arg Leu Lys Ala
 100 105 110
 Ile Cys Ile Glu Lys Gln Ser Arg Ala Ala Lys Arg Arg Leu Phe Glu
 115 120 125
 Ser Glu Asp Ser Gly Tyr Gly Asn Thr Glu Val Glu Thr Gln Gln Met
 130 135 140
 Leu Gln Val Glu Gly Arg His Glu Thr Glu Thr Pro Cys Ser Gln Tyr
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys Ser Gln Tyr Ser Ser Gly Ser Gly
 165 170 175
 Gly Glu Gly Val Ser Glu Arg His Thr Ile Cys Gln Thr Pro Leu Thr
 180 185 190
 Asn Ile Leu Asn Val Leu Lys Thr Ser Asn Ala Lys Ala Ala Met Leu
 195 200 205
 Ala Lys Phe Lys Glu Leu Tyr Gly Val Ser Phe Ser Glu Leu Val Arg
 210 215 220
 Pro Phe Lys Ser Asn Lys Ser Thr Cys Cys Asp Trp Cys Ile Ala Ala
 225 230 235 240
 Phe Gly Leu Thr Pro Ser Ile Ala Asp Ser Ile Lys Thr Leu Leu Gln
 245 250 255
 Gln Tyr Cys Leu Tyr Leu His Ile Gln Ser Leu Ala Cys Ser Trp Gly
 260 265 270
 Met Val Val Leu Leu Leu Val Arg Tyr Lys Cys Gly Lys Asn Arg Glu
 275 280 285
 Thr Ile Glu Lys Leu Leu Ser Lys Leu Leu Cys Val Ser Pro Met Cys
 290 295 300
 Met Met Ile Glu Pro Pro Lys Leu Arg Ser Thr Ala Ala Ala Leu Tyr
 305 310 315 320
 Trp Tyr Lys Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser Glu Val Tyr Gly Asp Thr
 325 330 335

Pro Glu Trp Ile Gln Arg Gln Thr Val Leu Gln His Ser Phe Asn Asp
 340 345 350
 Cys Thr Phe Glu Leu Ser Gln Met Val Gln Trp Ala Tyr Asp Asn Asp
 355 360 365
 Ile Val Asp Asp Ser Glu Ile Ala Tyr Lys Tyr Ala Gln Leu Ala Asp
 370 375 380

Thr Asn Ser Asn Ala Ser Ala Phe Leu Lys Ser Asn Ser Gln Ala Lys
 385 390 395 400
 Ile Val Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Arg His Tyr Lys Arg Ala Glu
 405 410 415
 Lys Lys Gln Met Ser Met Ser Gln Trp Ile Lys Tyr Arg Cys Asp Arg
 420 425 430
 Val Asp Asp Gly Gly Asp Trp Lys Gln Ile Val Met Phe Leu Arg Tyr
 435 440 445

Gln Gly Val Glu Phe Met Ser Phe Leu Thr Ala Leu Lys Arg Phe Leu
 450 455 460
 Gln Gly Ile Pro Lys Lys Asn Cys Ile Leu Leu Tyr Gly Ala Ala Asn
 465 470 475 480
 Thr Gly Lys Ser Leu Phe Gly Met Ser Leu Met Lys Phe Leu Gln Gly
 485 490 495
 Ser Val Ile Cys Phe Val Asn Ser Lys Ser His Phe Trp Leu Gln Pro
 500 505 510

Leu Ala Asp Ala Lys Ile Gly Met Leu Asp Asp Ala Thr Val Pro Cys
 515 520 525
 Trp Asn Tyr Ile Asp Asp Asn Leu Arg Asn Ala Leu Asp Gly Asn Leu
 530 535 540
 Val Ser Met Asp Val Lys His Arg Pro Leu Val Gln Leu Lys Cys Pro
 545 550 555 560
 Pro Leu Leu Ile Thr Ser Asn Ile Asn Ala Gly Thr Asp Ser Arg Trp
 565 570 575

Pro Tyr Leu His Asn Arg Leu Val Val Phe Thr Phe Pro Asn Glu Phe
 580 585 590
 Pro Phe Asp Glu Asn Gly Asn Pro Val Tyr Glu Leu Asn Asp Lys Asn
 595 600 605
 Trp Lys Ser Phe Phe Ser Arg Thr Trp Ser Arg Leu Ser Leu His Glu
 610 615 620
 Asp Glu Asp Lys Glu Asn Asp Gly Asp Ser Leu Pro Thr Phe Lys Cys
 625 630 635 640

Val Ser Gly Gln Asn Thr Asn Thr Leu
 645

<210> 2
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus type 16

<400> 2
 Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu
 1 5 10 15

Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu
 35 40 45
 Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val
 50 55 60

Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp
 85 90 95
 Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys
 100 105 110
 His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr
 115 120 125

Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser
 130 135 140
 Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val
 145 150 155 160
 His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu
 165 170 175
 Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val
 180 185 190

Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro
 195 200 205
 Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr
 210 215 220
 Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
 225 230 235 240
 Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
 245 250 255

Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
 260 265 270
 Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
 275 280 285
 Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg
 290 295 300
 Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
 305 310 315 320

Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
 325 330 335
 Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
 340 345 350
 Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile
 355 360 365

<210> 3
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus type 16

<400> 3

```
Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1           5           10           15
Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
          20           25           30
Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
          35           40           45
Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
          50           55           60
```

```
Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65           70           75           80
Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
          85           90           95
Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
          100          105          110
Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
          115          120          125
```

```
Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
          130          135          140
Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
          145          150          155
```

<210> 4

<211> 98

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<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 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> 5

<211> 737

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> HPV-16 membrane-presented and replication-defective E1 polypeptide

<400> 5

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

```
Asp Thr Gly Glu Asp Leu Val Asp Phe Ile Val Asn Asp Asn Asp Tyr
65           70           75           80
Leu Thr Gln Ala Glu Thr Glu Thr Ala His Ala Leu Phe Thr Ala Gln
           85           90           95
Glu Ala Lys Gln His Arg Asp Ala Val Gln Val Leu Lys Arg Lys Tyr
           100          105          110
Leu Gly Ser Pro Leu Ser Asp Ile Ser Gly Cys Val Asp Asn Asn Ile
           115          120          125
```

```
Ser Pro Arg Leu Lys Ala Ile Cys Ile Glu Lys Gln Ser Arg Ala Ala
130          135          140
Lys Arg Arg Leu Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gly Tyr Gly Asn Thr Glu
145          150          155          160
Val Glu Thr Gln Gln Met Leu Gln Val Glu Gly Arg His Glu Thr Glu
           165          170          175
Thr Pro Cys Ser Gln Tyr Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys Ser Gln
           180          185          190
```

```
Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Gly Glu Gly Val Ser Glu Arg His Thr Ile
195          200          205
Cys Gln Thr Pro Leu Thr Asn Ile Leu Asn Val Leu Lys Thr Ser Asn
210          215          220
Ala Lys Ala Ala Met Leu Ala Lys Phe Lys Glu Leu Tyr Gly Val Ser
225          230          235          240
Phe Ser Glu Leu Val Arg Pro Phe Lys Ser Asn Lys Ser Thr Cys Cys
           245          250          255
```

```
Asp Trp Cys Ile Ala Ala Phe Gly Leu Thr Pro Ser Ile Ala Asp Ser
260          265          270
Ile Lys Thr Leu Leu Gln Gln Tyr Cys Leu Tyr Leu His Ile Gln Ser
275          280          285
Leu Ala Cys Ser Trp Gly Met Val Val Leu Leu Leu Val Arg Tyr Lys
290          295          300
Cys Gly Lys Asn Arg Glu Thr Ile Glu Lys Leu Leu Ser Lys Leu Leu
305          310          315          320
```

```
Cys Val Ser Pro Met Cys Met Met Ile Glu Pro Pro Lys Leu Arg Ser
           325          330          335
Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Trp Tyr Lys Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser
```

340							345							350						
Glu	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Pro	Glu	Trp	Ile	Gln	Arg	Gln	Thr	Val	Leu					
355							360							365						
Gln	His	Ser	Phe	Asn	Asp	Cys	Thr	Phe	Glu	Leu	Ser	Gln	Met	Val	Gln					
370							375							380						
Trp	Ala	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Val	Asp	Asp	Ser	Glu	Ile	Ala	Tyr	Lys					
385							390							395						
Tyr	Ala	Gln	Leu	Ala	Asp	Thr	Asn	Ser	Asn	Ala	Ser	Ala	Phe	Leu	Lys					
405							410							415						
Ser	Asn	Ser	Gln	Ala	Lys	Ile	Val	Lys	Asp	Cys	Ala	Thr	Met	Cys	Arg					
420							425							430						
His	Tyr	Lys	Arg	Ala	Glu	Lys	Lys	Gln	Met	Ser	Met	Ser	Gln	Trp	Ile					
435							440							445						
Lys	Tyr	Arg	Cys	Asp	Arg	Val	Asp	Asp	Gly	Gly	Asp	Trp	Lys	Gln	Ile					
450							455							460						
Val	Met	Phe	Leu	Arg	Tyr	Gln	Gly	Val	Glu	Phe	Met	Ser	Phe	Leu	Thr					
465							470							475						
Ala	Leu	Lys	Arg	Phe	Leu	Gln	Gly	Ile	Pro	Lys	Lys	Asn	Cys	Ile	Leu					
485							490							495						
Leu	Tyr	Gly	Ala	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Ser	Leu	Phe	Gly	Met	Ser	Leu					
500							505							510						
Met	Lys	Phe	Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Ile	Cys	Phe	Val	Asn	Ser	Lys	Ser					
515							520							525						
His	Phe	Trp	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Asp	Ala	Lys	Ile	Gly	Met	Leu	Asp					
530							535							540						
Asp	Ala	Thr	Val	Pro	Cys	Trp	Asn	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Leu	Arg	Asn					
545							550							555						
Ala	Leu	Asp	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Met	Asp	Val	Lys	His	Arg	Pro	Leu					
565							570							575						
Val	Gln	Leu	Lys	Cys	Pro	Pro	Leu	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Ala					
580							585							590						
Gly	Thr	Asp	Ser	Arg	Trp	Pro	Tyr	Leu	His	Asn	Arg	Leu	Val	Val	Phe					
595							600							605						
Thr	Phe	Pro	Asn	Glu	Phe	Pro	Phe	Asp	Glu	Asn	Gly	Asn	Pro	Val	Tyr					
610							615							620						
Glu	Leu	Asn	Asp	Lys	Asn	Trp	Lys	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Thr	Trp	Ser					
625							630							635						
Arg	Leu	Ser	Leu	His	Glu	Asp	Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Asp	Gly	Asp	Ser					
645							650							655						
Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Cys	Val	Ser	Gly	Gln	Asn	Thr	Asn	Thr	Leu	Tyr					
660							665							670						
Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Met	Leu	Ile	Ile	Phe					
675							680							685						
Leu	Ile	Thr	Cys	Cys	Lys	Arg	Val	Asp	Arg	Pro	Glu	Ser	Thr	Gln	Arg					
690							695							700						
Ser	Leu	Arg	Gly	Thr	Gly	Arg	Asn	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Gln	Ser	Gly					
705							710							715						
Lys	Phe	Ile	Ser	Ser	Trp	Glu	Ser	His	Lys	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr	Arg					
725							730							735						
Leu																				

<210> 6
 <211> 746
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HPV-18 membrane-anchored and replication-defective E1
 polypeptide

<400> 6
 Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Ala Asp Pro Glu
 20 25 30
 Gly Thr Asp Gly Glu Gly Thr Gly Cys Asn Gly Trp Phe Tyr Val Gln
 35 40 45
 Ala Ile Val Asp Lys Lys Thr Gly Asp Val Ile Ser Asp Asp Glu Asp
 50 55 60

 Glu Asn Ala Thr Asp Thr Gly Ser Asp Met Val Asp Phe Ile Asp Thr
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Phe Cys Glu Gln Ala Glu Leu Glu Thr Ala Gln Ala Leu
 85 90 95
 Phe His Ala Gln Glu Val His Asn Asp Ala Gln Val Leu His Val Leu
 100 105 110
 Lys Arg Lys Phe Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asn Ser Pro Leu Gly Glu
 115 120 125

 Arg Leu Glu Val Asp Thr Glu Leu Ser Pro Arg Leu Gln Glu Ile Ser
 130 135 140
 Leu Asn Ser Gly Gln Lys Lys Ala Lys Arg Arg Leu Phe Thr Ile Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Gly Tyr Gly Cys Ser Glu Val Glu Ala Thr Gln Ile Gln Val
 165 170 175
 Thr Thr Asn Gly Glu His Gly Gly Asn Val Cys Ser Gly Gly Ser Thr
 180 185 190

 Glu Ala Ile Asp Asn Gly Gly Thr Glu Gly Asn Asn Ser Ser Val Asp
 195 200 205
 Gly Thr Ser Asp Asn Ser Asn Ile Glu Asn Val Asn Pro Gln Cys Thr
 210 215 220
 Ile Ala Gln Leu Lys Asp Leu Leu Lys Val Asn Asn Lys Gln Gly Ala
 225 230 235 240
 Met Leu Ala Val Phe Lys Asp Thr Tyr Gly Leu Ser Phe Thr Asp Leu
 245 250 255

 Val Arg Asn Phe Lys Ser Asp Lys Thr Thr Cys Thr Asp Trp Val Thr
 260 265 270
 Ala Ile Phe Gly Val Asn Pro Thr Ile Ala Glu Gly Phe Lys Thr Leu
 275 280 285
 Ile Gln Pro Phe Ile Leu Tyr Ala His Ile Gln Cys Leu Asp Cys Lys

290	295	300
Trp Gly Val Leu Ile Leu Ala Leu Leu Arg Tyr Lys Cys Gly Lys Ser		
305	310	315 320
Arg Leu Thr Val Ala Lys Gly Leu Ser Thr Leu Leu His Val Pro Glu		
	325	330 335
Thr Cys Met Leu Ile Gln Pro Pro Lys Leu Arg Ser Ser Val Ala Ala		
	340	345 350
Leu Tyr Trp Tyr Arg Thr Gly Ile Ser Asn Ile Ser Glu Val Met Gly		
	355	360 365
Asp Thr Pro Glu Trp Ile Gln Arg Leu Thr Ile Ile Gln His Gly Ile		
	370	375 380
Asp Asp Ser Asn Phe Asp Leu Ser Glu Met Val Gln Trp Ala Phe Asp		
385	390	395 400
Asn Glu Leu Thr Asp Glu Ser Asp Met Ala Phe Glu Tyr Ala Leu Leu		
	405	410 415
Ala Asp Ser Asn Ser Asn Ala Ala Ala Phe Leu Lys Ser Asn Cys Gln		
	420	425 430
Ala Lys Tyr Leu Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Lys His Tyr Arg Arg		
	435	440 445
Ala Gln Lys Arg Gln Met Asn Met Ser Gln Trp Ile Arg Phe Arg Cys		
	450	455 460
Ser Lys Ile Asp Glu Gly Gly Asp Trp Arg Pro Ile Val Gln Phe Leu		
465	470	475 480
Arg Tyr Gln Gln Ile Glu Phe Ile Thr Phe Leu Gly Ala Leu Lys Ser		
	485	490 495
Phe Leu Lys Gly Thr Pro Lys Lys Asn Cys Leu Val Phe Cys Gly Pro		
	500	505 510
Ala Asn Thr Asp Lys Ser Tyr Phe Gly Met Ser Phe Ile His Phe Ile		
	515	520 525
Gln Gly Ala Val Ile Ser Phe Val Asn Ser Thr Ser His Phe Trp Leu		
	530	535 540
Glu Pro Leu Thr Asp Thr Lys Val Ala Met Leu Asp Asp Ala Thr Thr		
545	550	555 560
Thr Cys Trp Thr Tyr Phe Asp Thr Tyr Met Arg Asn Ala Leu Asp Gly		
	565	570 575
Asn Pro Ile Ser Ile Asp Arg Lys His Lys Pro Leu Ile Gln Leu Lys		
	580	585 590
Cys Pro Pro Ile Leu Leu Thr Thr Asn Ile His Pro Ala Lys Asp Asn		
	595	600 605
Arg Trp Pro Tyr Leu Glu Ser Arg Ile Thr Val Phe Glu Phe Pro Asn		
	610	615 620
Ala Phe Pro Phe Asp Lys Asn Gly Asn Pro Val Tyr Glu Ile Asn Asp		
625	630	635 640
Lys Asn Trp Lys Cys Phe Phe Glu Arg Thr Trp Ser Arg Leu Asp Leu		
	645	650 655
His Glu Glu Glu Glu Asp Ala Asp Thr Glu Gly Asn Pro Phe Gly Thr		
	660	665 670
Phe Lys Leu Arg Ala Gly Gln Asn His Arg Pro Leu Gly Leu Ser Ser		
	675	680 685
Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile		

690	695	700
Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys		
705	710	715
Gly Glu Gln Val Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr		
	725	730
		735
Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val Arg Ser Leu		
	740	745

<210> 7
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HPV-16 membrane-anchored and replication-defective E2
 polypeptide

<400> 7

Met Val Pro Leu Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu		
1	5	10
Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val		
	20	25
		30
Cys Gln Asp Lys Ile Leu Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu		
	35	40
		45
Arg Asp His Ile Asp Tyr Trp Lys His Met Arg Leu Ala Cys Ala Ile		
	50	55
		60
Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val		
65	70	75
		80
Val Pro Thr Leu Ala Val Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ala Glu		
	85	90
		95
Leu Gln Leu Thr Leu Glu Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu		
	100	105
		110
Lys Trp Thr Leu Gln Asp Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro		
	115	120
		125
Thr Gly Cys Ile Lys Lys His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp		
	130	135
		140
Gly Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr		
145	150	155
		160
Ile Cys Glu Glu Ala Ser Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr		
	165	170
		175
Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln		
	180	185
		190
Phe Lys Asp Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val		
	195	200
		205
His Ala Gly Gly Gln Val Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser		
	210	215
		220
Asn Glu Val Ser Ser Pro Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His		
225	230	235
		240
Pro Ala Ala Thr His Thr Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr		

245	250	255
Gln Thr Thr Ile Gln Arg Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro		
260	265	270
Cys His Thr Thr Lys Leu Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro		
275	280	285
Ile Leu Thr Ala Phe Asn Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn		
290	295	300
Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu		
305	310	315
320		
Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala		
325	330	335
Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser		
340	345	350
Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe		
355	360	365
Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe		
370	375	380
Met Ser Ile Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met		
385	390	395
400		
Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu		
405	410	415
Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr		
420	425	430
Ser Gln Ser Gly Lys Phe Ile His Ser Trp Glu Ser Tyr Lys Ser Gly		
435	440	445
Gly Glu Thr Gly Leu		
450		
<210> 8		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> HPV-18 membrane-anchored and replication-defective E2 polypeptide		
<400> 8		
Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu		
1	5	10
15		
Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gln Thr Pro Lys Glu Thr Leu Ser Glu		
20	25	30
Arg Leu Ser Cys Val Gln Asp Lys Ile Ile Asp His Tyr Glu Asn Asp		
35	40	45
Ser Lys Asp Ile Asp Ser Gln Ile Gln Tyr Trp Gln Leu Ile Arg Trp		
50	55	60
Ala Asn Ala Ile Phe Phe Ala Ala Arg Glu His Gly Ile Gln Thr Leu		
65	70	75
80		

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

Asn Thr Glu Pro Thr His Cys Phe Lys Lys Gly Gly Gln Thr Val Gln
130 135 140
Val Tyr Phe Asp Gly Asn Lys Asp Asn Cys Met Thr Tyr Val Ala Trp
145 150 155 160
Asp Ser Val Tyr Tyr Met Thr Asp Ala Gly Thr Trp Asp Lys Thr Ala
165 170 175
Thr Cys Val Ser His Arg Gly Leu Tyr Tyr Val Lys Glu Gly Tyr Asn
180 185 190

Thr Phe Tyr Ile Glu Phe Lys Ser Glu Cys Glu Lys Tyr Gly Asn Thr
195 200 205
Gly Thr Trp Glu Val His Phe Gly Asn Asn Val Ile Asp Cys Asn Asp
210 215 220
Ser Met Cys Ser Thr Ser Asp Asp Thr Val Ser Ala Thr Gln Leu Val
225 230 235 240
Lys Gln Leu Gln His Thr Pro Ser Pro Tyr Ser Ser Thr Val Ser Val
245 250 255

Gly Thr Ala Lys Thr Tyr Gly Gln Thr Ser Ala Ala Thr Arg Pro Gly
260 265 270
His Cys Gly Leu Ala Glu Lys Gln His Cys Gly Pro Val Asn Pro Leu
275 280 285
Leu Gly Ala Ala Thr Pro Thr Gly Asn Asn Lys Arg Arg Lys Leu Cys
290 295 300
Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser
305 310 315 320

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg
325 330 335
Asp Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr
340 345 350
Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe
355 360 365
Leu Asn Thr Val Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr
370 375 380

Met Thr Met Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met
385 390 395 400
Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu
405 410 415
Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr
420 425 430
Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly
435 440 445

Gly Glu Thr Arg Leu
450

<210> 9
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> portion of 59 nucleotides of HPV-16 E1-encoding sequences
 degenerated to decrease homology with the overlapping
 portion in HPV-16 E2-encoding sequences

<400> 9
 atggtgattc attacctaca ttcaagtgcg tatctggcca gaacacaaat actttgtga 59

<210> 10
 <211> 2214
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Nucleotide sequence encoding a membrane-anchored and
 replication-defective HPV-16 E1 polypeptide degenerated
 in the 59 nucleotides portion overlapping with the native
 HPV-16 E2-encoding sequence.

<400> 10
 atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttcccctctg tttcggttaag 60
 tttcctatag ctgacacctg aggtaccaat ggggaagagg gtacgggatg taatggatgg 120
 ttttatgtag aggctgtagt ggaaaaaaaa acaggggatg ctatatcaga tgacgagAAC 180
 gaaaaatgaca gtgatacagg tgaagatttg gtagatttta tagtaaatga taatgattat 240
 ttaacacagg cagaacacaga gacagcacat gcgttggtta ctgcacagga agcaaaacaa 300
 catagagatg cagtacaggt tctaaaacga aagtatttgg gtagtcact tagtgatatt 360
 agtggatgtg tagacaataa tattagtcct agattaaaag ctatatgtat agaaaaacaa 420
 agtagagctg caaaaaggag attatttgaa agcgaagaca gcgggtatgg caatactgaa 480
 gtggaaactc agcagatgtt acaggtagaa gggcgccatg agactgaaac accatgtagt 540
 cagtatatgtg gtggaagtgg ggggtggttg agtcagtaca gtagtggaag tgggggagag 600
 ggtgttagtg aaagacacac tatatgcaa acaccactta caaatatttt aaatgtacta 660
 aaaactagta atgcaaaggc agcaatgtta gcaaaattta aagagttata cgggggtgagt 720
 ttttcagaat tagtaagacc atttaaaagt aataaatcaa cgtgttgcca ttggtgtatt 780
 gctgcatttg gacttacacc cagtatatgt gacagtataa aaacactatt acaacaatat 840
 tggttatatt tacacattca aagtttagca tgttcatggg gaatggttgt gttactatta 900
 gtaagatata aatgtggaaa aaatagagaa acaattgaaa aattgctgtc taaactatta 960
 tgtgtgtctc caatgtgtat gatgatagag cctccaaat tgcgtagtag agcagcagca 1020
 ttatattggt ataaaacagg tatatcaaat attagtgaag tgtatggaga cagccagaa 1080
 tggatacaaa gacaacacgt attacaacat agttttaatg attgtacatt tgaattatca 1140
 cagatggtag aatgggccta cgataatgac atagtagacg atagtgaat tgcataataa 1200
 tatgcacaat tggcagacac taatagtaat gcaagtgcct ttctaaaaag taattcacag 1260
 gcaaaaattg taaaggattg tgcaacaatg tgtagacatt ataacgagc agaaaaaaa 1320
 caaatgagta tgagtcaatg gataaaatat agatgtgata gggtagatga tggaggatgat 1380

tggaagcaaa ttgttatgtt ttttaaggtat caaggtgtag agtttatgtc atttttaact 1440
gcattaaaaa gattttttgca aggcatatct aaaaaaaatt gcatattact atatggtgca 1500
gctaacacag ataatcatt atttggtatg agtttaataa aatttctgca agggctctgta 1560
atatgttttg taaattctaa aagccatttt tggttacaac cattagcaga tgccaaaaata 1620
ggtatgttag atgatgctac agtgccctgt tggaactata tagatgacaa ttttaagaaat 1680

gcattggatg gaaatttagt ttctatggat gtaaagcata gaccattggt acaactaaaa 1740
tgccctccat tattaattac atctaactt aatgctggt cagattctag gtggccttat 1800
ttacataata gattgggtgt gtttacttt cctaataagt ttccatttga cgaaaacgga 1860
aatccagtgt atgagcttaa tgataagaac tggaatcct ttttctcaag gacgtggtcc 1920
agattaagtt tgcacgagga cgaggacaag gaaaacgatg gtgattcatt acctacattc 1980
aagtgcgtat ctggtcagaa cacaaatact ttgtacgtac tgctatcggc aggcacgttg 2040
atgcactaa tgcttatcat ctctctaata acctgctgca agcgggttga taggcccgaa 2100

agtacccaaa ggtccttgag aggtaccgga cgcaacgtat cggtaacgtc gcaaagcggc 2160
aagttcatta gcagttggga gtcgcacaaa tcaggtggag agaccgcct gtga 2214

<210> 11
<211> 2241
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> nucleotide sequence encoding a membrane-anchored and
replication-defective HPV-18 E1 polypeptide degenerated to
decrease homology with E1-encoding HPV-16 sequence

<400> 11
atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcatggcag tactgttaac tctccaaaca 60
cccaccggct aaatccattg gggcgagac ccagaaggca cagacggaga aggcacgggt 120
tgcaacggct ggttctactg acaagctatt gtagacaaga agaccggaga tgaatttct 180
gacgatgagg acgagaatgc aacagacaca gggtcggata tggttgactt cattgataca 240
caaggaacat tttgtgaaca agccgagcta gaaactgctc aggcattgtt ccatgcgcag 300
gaggtccaca atgatgcaca agtgttgcgt gttttaaaag ggaagtttgc aggaggcagc 360
acagaaaaca gtccattagg ggagcggctg gaggtggata cagagttaag cccacggtta 420

caagaaatat ctttaaatag tgggcagaaa aaggctaaga ggcggtgtt tacaatatca 480
gatagtggct acggctgttc tgaggtggaa gcaacacaga ttcaggtaac tacaatggc 540
gaacatggcg gcaatgtatg cagtggcggc agtacggagg ctatagacaa cggaggcaca 600
gagggcaaca acagcagtgt agacggtaca agcacaata gcaatataga aatgtaaat 660
ccacaatgta ccatagcaca attaaaagac ttgttaaaag taaacaataa acaaggagct 720
atgcttgcag tattcaagga cacatatggg ctatcattta cagatttagt tagaaatttc 780
aagagtgcga aaaccacatg tacagactgg gttacagcta tattcggagt aaaccaaca 840

atgcgagaag gatttaagac tctaatacag ccatttatat tgtatgcca tataaatgt 900
ctagactgta agtgggtgtt attaatatta gccctgttgc gttacaagtg cggtaagagt 960
agactaacag ttgctaaagg ttttaagtacg ttgttacacg tacctgaaac ttgcatgtta 1020
attcaaccac ctaagttagc aagtagtgtt gctgcactat actggtacag aactggaatt 1080
tctaacataa gcgaggtaat ggggtgacaca cctgagtggg ttcagagact tactattata 1140
cagcatggaa tagacgatag caatttcgat ttgtcagaaa tggttcagtg ggcatgtgac 1200
aacgagctga cagatgaaag cgatatggca tttgaatacg ccttatttagc tgacagcaac 1260

agcaacgcag ctgcattttt aaagagcaat tgccaagcta aatattttaa agactgtgcc 1320

actatgtgca aacactatag gcgtgccag aaacgacaga tgaatatgtc acagtggatt	1380
cgatttaggt gttcaaaaat agacgaaggg ggagactgga gaccaatagt gcaattcctg	1440
cgataccaac aaatagaatt cataacattc ttaggagcct tgaatcatt cttaaaagga	1500
acccccaaga agaactgttt agtatattgt ggaccagcaa atactgacaa gtcataattc	1560
ggaatgagct ttatacactt tatacaagga gcagttatat cattcgtgaa ctccactagt	1620
cacttctggc tggaaaccgtt aacagacact aaggtggcca tgctagacga cgcaacgacc	1680
acgtgctgga catactttga tacctatatg aggaacgcgt tagacggcaa tccaataagt	1740
attgatagaa aacacaaacc tttaatacag ctttaagtgtc cgccaatact actaaccaca	1800
aataatacgc cagcaaagga taatagatgg ccatacttag aaagtagaat aacagtattt	1860
gaattcccaa atgcattccc gttcgataaa aatggcaacc ctgtatacga aataaacgac	1920
aaaaattgga agtgtttctt tgaaagaaca tggccaaggt tagatttaca tgaagaagaa	1980
gaagatgctg atacagaggg taatccattt ggtactttca aattacgagc tggacagaat	2040
cacaggcctc ttggtttatc gagcactagc atagtctaca tcctgattgc agtgtgtctt	2100
ggagggttga tagggatccc cgctttaata tgttgctgca gggggcgttg taacaaaaag	2160
ggagaacaag ttggtatgtc aagaccaggc ctaaagcctg atcttacggg aacatcaaaa	2220
tcctatgtaa ggtcgtctg a	2241

<210> 12

<211> 1362

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> nucleotide sequence encoding a membrane-anchored and
replication-defective HPV-16 E2 polypeptide

<400> 12

atggtaccac aagcgtgtt acttgtccca ctgcttggtt tctctttatg ttttgaaaa	60
ttcccaatag agactctttg ccaacgttta aatgtgtgtc aggacaaaat actaacacat	120
tatgaaaatg atagtacaga cctacgtgac catatagact attggaaaca catgcgccta	180
gcatgtgcta ttattacaa ggccagagaa atgggattta aacatattaa ccaccaggtg	240
gtgccaacgc tggctgtatc aaagaataaa gcattacaag cagctgaact gcaactaacg	300
ttagaaacaa tatataactc acaatatagt aatgaaaagt ggacattaca agacgttagc	360
cttgaagtgt atttaactgc accaacagga tgtataaaaa aacatggata tacagtggaa	420
gtgcagtttg atggagacat atgcaataca atgcattata caaactggac acatatatat	480
atttgtgaag aagcatcagt aactgttgta gaggttcaag ttgactatta tggttttatat	540
tatgttcacg aaggaatcag aacatatttt gtgcagttta aagatgatgc agaaaaatat	600
agtaaaaaata aagtatggga agttcatgcg ggtggtcagg taatattatg tcctacatct	660
gtgttttagca gcaacgaagt atcctctcct gaaattatta ggcagcactt ggccaaccac	720
cccgccgca cccataccaa agccgtcgcc ttgggcaccg aagaaacaca gacgactatc	780
cagcgaccaa gatcagagcc agacaccgga aacccctgcc acaccactaa gttgttgcac	840
agagactcag tggacagtgc tccaatctc actgcattta acagctcaca caaaggacgg	900
attaactgta atagtaacac tacacccata gtacatttaa aaggtgatgc taatacttta	960
aaatgtttta gatatagatt taaaaagcat tgtacattgt atactgcagt gtcgtctaca	1020
tggcattgga caggacataa tgtaaaacat aaaagtgcaa ttgttacact tacatatgat	1080
agtgaatggc aacgtgacca atttttgtct caagttaaaa taccaaaaac tattacagtg	1140
tctactggat ttatgtctat atatgttctt ctctctgctg gaactttaat agctttaatg	1200
ttaataatat tcttaataac gtgctgtaaa agggtagacc gtccagagtc aactcagcgc	1260

agccttaggg gtactgggag aaatgtttcc gtgacatcac agagtggaaa atttatctcg 1320
tcttgggaat ctcataagag tggaggcgaa acacgtcttt ga 1362

<210> 13
<211> 1362
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> nucleotide sequence encoding a membrane-anchored and
replication-defective HPV-18 E2 polypeptide degeneratde to
reduce homology with native HPV-16 E2-encoding sequence

<400> 13
atggttcctc aggcctctct gtttgtacc cttctggttt ttccattgtg ttttgggaaa 60
ttccctattc agacaccgaa ggaaaccctt tcggaacgat taagttagct gcaagataag 120
atcatagacc actacgagaa cgacagtaaa gacatagaca gccaaataca gtactggcaa 180
ctaatacgtt gggcaaatgc aatattcttt gcagcaaggg aacatggcat acagacatta 240
aatcatcagg tagtcccagc ctataacatt tcgaaaagta aggcacataa agctgccgag 300
ctccaaatgg ccctacaagg ccttgcacaa agtcgataca aaaccgagga ttggactctg 360
caggacacat gcgaggaact atggaatata gaacctactc actgctttaa gaaagggtggc 420

caaaccttac aagtatatct cgacggcaac aaagacaatt gtatgaccta ttagcatgg 480
gacagtgtgt attatatgac tgatgcagga acatgggaca aaaccgtac ctgtgtaagt 540
cacaggggat tgtactacgt aaaggagggg tacaacacgt tttatataga attcaaaagt 600
gaatgtgaga agtatgggaa cacaggtacg tgggaggtac attttgggaa taatgtcatt 660
gattgtaatg actctatgtg cagtaccagt gacgacacgg tctccgtac tcagcttgtt 720
aaacagctac agcacacccc ctaccgtat tccagcaccg tgtccgtggg aaccgcaaag 780
acctacggcc agacgtcggc tgctacacga cctggccact gtggactcgc ggagaagcag 840

cattgtggac ctgtcaaccc acttctcggt gcagctacac ctacaggcaa caacaagaga 900
cgaaaactct gcagtgtgaa tacgacgcct ataatacact tgaagggaga cagaaacagt 960
ttgaagtgtc tacggtacag gttgcgaaaa catagcgacc actatagaga tatatcatcc 1020
acctggcact ggaccggtgc aggcaatgaa aaaacaggaa tactgactgt aacctaccat 1080
agcgaaacac aaagaacaaa attcttaaat actgttgcaa ttccagatag tgtacaaata 1140
ttggtgggat acatgacaat gtatgtatta ctgagtgcag gggccctgac tgccttgatg 1200
ttgataatct tcctgatgac atgttgtaga agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac 1260

aatctcagag ggacagggag ggaggtgtca gtcactcccc aaagcgggaa gatcatact 1320
tcatgggaat cacacaagag tgggggtgag accagactgt ga 1362

<210> 14
<211> 741
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> Nucleotide sequence encoding a membrane-anchored and
non-oncogenic HPV-18 E6 polypeptide degenerated to reduce

homology with the native HPV-16 E6-encoding sequence

<400> 14
atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttcccctctg tttcggttaag 60
tttcctatag gatctatggc gcgctttgag gatccaacac ggcgacccta caagctacct 120
gatctgtgca cggaactgaa cacttcactg caagacatag aaataacctg tgtatattgt 180
aagacagtat tggaacttac agaggtatct gaatttgcat ttaaagacct atttgtggtg 240
tatcgtgaca gtatacccca tgccgcatgc cataagtgtg tagattttta ctctagaatc 300
agagaattaa ggcactattc agactctgtg tacggagaca cattggaaaa actaactaac 360
actgggttat acaattttatt aataagatgc ctgcggtgcc agaaccgtt gcttagacac 420

cttaataaaa aacgacgatt tcacaacata gctgggcact atagaggcca gtgccattcg 480
tgctgcaacc gagcacgaca ggaacgactc caacgacgca gggagacaca agtaagatcc 540
tacgtactgc tatcggcagg cacgttgatc gcaactaatgc ttatcatctt cctaataacc 600
tgctgcaagc ggggtgatag gcccgaaagt acccaaaggc ccttgagagg taccgacgc 660
aacgtatcgg taacgtcgca aagcggaag ttcattagca gttgggagtc gcacaaatca 720
ggtggagaga ccgcctgtg a 741

<210> 15
<211> 585
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> Nucleotide sequence encoding a membrane-anchored and non-oncogenic HPV-18 E7 polypeptide degenerated to reduce homology with the native HPV-16 E7-encoding sequence

<400> 15
atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca 60
cccaccggtc aaatccattg gggcagatct atgcacggac ctaaggcaac actgcaagac 120
attgtattgc atttagagcc ccaaaatgaa attccggttg cacagttaag cgactcagag 180
gaagaaaacg acgagattga cggagttaat catcaacatt taccagcccg acgagctgaa 240
ccacaacgtc acacaatgtt gtgtatgtgc tgtaaatgcg aagccagaat tgagctggta 300
gtagagagct cagcagacga ccttcgagca ttccagcagc tatttctgaa caccctgtcc 360
tttgtctgtc cgtggtgtgc atcccagcag ggatctggtt tatcgagcac tagcatagtc 420

tacatcctga ttgcagtgtg tcttggaggg ttgataggga tccccgcttt aatatgttgc 480
tgcagggggc gttgtaacaa aaaggagaa caagttggtg tgtcaagacc aggcctaaag 540
cctgatctta cggaacatc aaaatcctat gtaaggtcgc tctga 585

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sense primer to amplify HPV-16 E2 sequence from CaSki cells

<400> 16
aaacccggat ccatggagac tctttgcaa cgtt 34

<210> 17
<211> 49
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> antisense primer to isolate HPV-16 E2 sequence from caSki cells

<400> 17
aaacccgaat tcaagcttag atcttcatat agacataaat ccagtagac 49

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer for reassembling HPV16 SS-E2mute-TMR sequence

<400> 18
aaacccggat ccatggtacc acaagcgtg tta 33

<210> 19
<211> 53
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer for reassembling HPV-16 SS-E2mute-TMR sequence

<400> 19
tctctttatg ttttggaataa ttccaatag agactctttg ccaacgttta aat 53

<210> 20
<211> 53
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer for reassembling HPV-16 SS-E2mute-TMR sequence

<400> 20

atttaaactg tggcaaagag tctctattgg gaattttcca aaacataaag aga 53

<210> 21

<211> 49

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer for reassembling HPV-16 SS-E2mute-TMR sequence

<400> 21

cagtgtctac tggatttatg tctatatatg ttcttctctc tgctggaac 49

<210> 22

<211> 49

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer for reassembling HPV-16 SS-E2mute-TMR sequence

<400> 22

gttccagcag agagaagaac atatataagac ataatccag tagacactg 49

<210> 23

<211> 44

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer for reassembling HPV-16 SS-E2mute-TMR sequence

<400> 23

aaaccagat cttcaaagac gtgtttcgcc tccactctta tgag 44

<210> 24
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer for isolating HPV-16 E1 sequence from CaSki cells

<400> 24
 aaacccggat ccatggctga tcctgcaggt acca 34

<210> 25
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer for isolating HPV-16 E1 sequence from CaSki cells

<400> 25
 aaacccgaat tccattatcg taggccatt gtac 34

<210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer for isolating HPV-16 E1 sequence from CaSki cells

<400> 26
 aaacccggat ccgagacacg ccagaatgga ta 32

<210> 27
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer for isolating HPV-16 E1 sequence from CaSki cells

<400> 27

aaacccgaat tcaagcttag atcttcataa tgtgttagta tttgtcctg 50

<210> 28
<211> 88
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer for generating E1 degenerated sequence

<400> 28
aaaccagat cttcacaag ttttgtgtt ctgaccagat acgcacttga atgtaggtaa 60
tgaatcacca tcgttttct tgcctcg 88

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer for generating degenerated HPV-16 E1 sequence

<400> 29
gatgctacag tgcctgttg g 21

<210> 30
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer for reconstituting sequence encoding
HPV-16 SS-E1*deg-TMR

<400> 30
aaacccaagg atccatggta ccgaagccc tgcta 35

<210> 31
<211> 52
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> primer for reconstituting sequence encoding
HPV-16 SS-E1*deg-TMR

<400> 31

ttccctctg ttccggaag tttcctatag ctgacctgc aggtaccaat gg 52

<210> 32

<211> 52

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer for reconstituting sequence encoding
HPV-16 SS-E1*deg-TMR

<400> 32

ccattgttac ctgcaggatc agctatagga aactaccga aacagagggg aa 52

<210> 33

<211> 50

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG17563 for reconstituting sequence encoding
HPV-16 SS-E1

<400> 33

tatctgttca gaacacaaat actttgtacg tactgtatc ggcaggcacg 50

<210> 34

<211> 50

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG17564 for reconstituting sequence encoding
HPV-16 SS-E1*deg-TMR

<400> 34

cgtgcctgcc gatagcagta cgtacaaagt atttgtgttc tgaccagata 50

<210> 35
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer oTG17565 for reconstituting sequence encoding
 SS-E1*deg-TMR

<400> 35
 aaaccctaaag atcttcacag gcgggtctct ccacctgatt tg 42

<210> 36
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer oTG15315 for reconstituting sequence encoding
 HPV-18 SS6E1*deg-TMF

<400> 36
 ggggagatct atgggtctca aggtgaacgt ctc 33

<210> 37
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer oTG17881 for reconstituting sequence encoding
 HPV-18 SS-E1*deg-TMF

<400> 37
 gtgccttctg ggtctgcgcc ccaatggatt tgaccggtg 39

<210> 38
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer oTG17882 for reconstituting sequence encoding

HPV-18 SS-E1*deg-TMF

<400> 38
ggtcaaattcc attggggcgc agaccagaa ggcacag 37

<210> 39
<211> 42
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer oTG17883 for reconstituting sequence encoding
HPV-18 SS-E1*deg-TMF

<400> 39
cagaatcaca ggcctcttgg tttatcgagc actagcatag tc 42

<210> 40
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer oTG17884 for reconstituting sequence encoding
HPV-18 SS-E1*deg-TMF

<400> 40
gctagtgtc gataaaccaa gagcctgtg attctgtcc 39

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer oTG17885 for reconstituting sequence encoding HPV-18
SS-E1*deg-TMF

<400> 41
gggggcggcc gctcagagcg accttacata gg 32

<210> 42
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG17875 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 SS-E2*deg-TMR

<400> 42
 ggggagatct atggttcctc aggtctcct g 31

<210> 43
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG17876 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 SS-E2*deg-TMR

<400> 43
 gttttgggaa attccctatt cagacaccga aggaaaccc 39

<210> 44
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> antisense primer oTG17877 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 SS-E2*deg-TMR

<400> 44
 gtttccttcg gtgtctgaat agggaatttc caaaacaca atg 43

<210> 45
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG17878 for reconstituting sequence

encoding HPV-18 SS-E2*deg-TMR

<400> 45
gtgggataca tgacaatgta tgtattactg agtgcaggg 39

<210> 46
<211> 38
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> antisense primer oTG17879 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 SS-E2*deg-TMR

<400> 46
ctgcactcag taatacatatc attgtcatgt atcccacc 38

<210> 47
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> antisense primer oTG17880 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 SS-E2*deg-TMR

<400> 47
gggggcgcc gctcacagtc tggctcac 29

<210> 48
<211> 83
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sense primer oTG15174 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E6*deg

<400> 48
ggggagatct atggcgcgct ttgaggatcc aacacggcga ccctacaagc tacctgatct 60
gtgcacggaa ctgaacactt cac 83

<210> 49
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG15175 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 E6*deg

<400> 49
 gtattggaac ttacagaggt attgaattt gcatttaaag acctatttgt ggtgtatcgt 60
 gacagtatac cccatgccgc atgc 84

<210> 50
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG15176 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 E6*deg

<400> 50
 aggcaactatt cagactctgt gtacggagac acattggaaa aactaactaa cactgggtta 60
 tacaatttat taataagatg cctgc 85

<210> 51
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG15177 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 E6*deg

<400> 51
 ccttaatgaa aaacgacgat ttcacaacat agctgggcac tatagaggcc agtgccattc 60
 gtgctgcaac cg 72

<210> 52
 <211> 76
 <212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense primer oTG15178 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E2*deg

<400> 52

ggggagatct tacttgtgtc tccctgcgtc gttggagtcg ttctgtcgt gtcggttgc	60
agcacgaatg gcactg	76

<210> 53

<211> 78

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense primer oTG15179 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E6*deg

<400> 53

gttgtgaaat cgtcgttttt cattaagtg tctaagcaac ggtttctggc accgcaggca	60
tcttattaat aaattgta	78

<210> 54

<211> 82

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense primer oTG15180 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E6*deg

<400> 54

cacagagtct gaatagtgcc ttaattctct gattctagag taaaaatcta tacacttatg	60
gcatgcgga tgggtatgac tg	82

<210> 55

<211> 86

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense primer oTG15181 for reconstituting sequence

encoding HPV-18 E6*deg

<400> 55
 caaatacctc tgtaagttcc aatactgtct tacaatatac acaggttatt tctatgtctt 60
 gcagtgaagt gttcagttcc gtgcac 86

<210> 56
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG14773 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 E7*deg

<400> 56
 aaaccagat ctatgcacgg acctaaggca aactgcaag acattgtatt gcatttagag 60
 ccccaaaatg 70

<210> 57
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> antisense primer oTG14774 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 E7*deg

<400> 57
 aatctcgtcg ttttcttctt ctgagtcgct taactgtgca accggaattt cattttgggg 60
 ctctaaatgc aataca 76

<210> 58
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sense primer oTG14775 for reconstituting sequence
 encoding HPV-18 E7*deg

<400> 58
 actcagagga agaaaacgac gagattgacg gagttaatca tcaacattta ccagcccgac 60

gagctgaacc acaacg 76

<210> 59
<211> 76
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> antisense primer oTG14776 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E7*deg

<400> 59
ctagctcaat tctggcttcg catttacagc acatacaca cattgtgtga cggtgtggtt 60
cagctcgtcg ggctgg 76

<210> 60
<211> 76
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sense primer oTG14777 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E7*deg

<400> 60
taaattgcgaa gccagaattg agctagtagt agagagctca gcagacgacc ttcgagcatt 60
ccagcagcta tttctg 76

<210> 61
<211> 79
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> antisense primer oTG14778 for reconstituting sequence
encoding HPV-18 E7*deg

<400> 61
aaaccgcgat ccctgctggg atgcacacca cggacagaca aaggacaggg tgttcagaaa 60
tagctgctgg aatgctcga 79

<210> 62

<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer sens polylinker

<400> 62
cctgcagaag cttcccgggg 20

<210> 63
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> anstisense primer polylinker

<400> 63
gatcccccg gaagcttctg caggagct 28

<210> 64
<211> 243
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> HPV-16 membrane-presented and non-oncogenic E6 variant
(SS-16E6*-TMF)

<400> 64
Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
1 5 10 15
Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Met His Gln Lys
20 25 30
Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro
35 40 45
Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu
50 55 60

Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe
65 70 75 80
Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala
85 90 95
Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg
100 105 110
His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn

115	120	125
Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro		
130	135	140
Leu Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly		
145	150	155
Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg		
165	170	175
Arg Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ser Ser Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu		
180	185	190
Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys		
195	200	205
Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val Gly Met Ser		
210	215	220
Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val		
225	230	235
Arg Ser Leu		240

<210> 65
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> HPV-16 membrane-presented and non-oncogenic E7 variant
 (SS-16E7*-TMR)

<400> 65

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

	165	170	175
His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu			
180	185		
<210> 66			
<211> 1062			
<212> DNA			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> nucleotide sequence encoding a replication-defective HPV-33 E2 polypeptide (degenerated sequence)			
<400> 66			
atggaggaaa tatcagcacg cttgaatgca gtccaagaga aaattctaga tctttacgaa	60		
gcagataaaa ctgattttacc atctcaaatt gaacactgga aattgatacg catggcctgc	120		
gctttattgt atacagccaa acagatgggc ttttcacatt tatgtacca agtggtagct	180		
tctttgttag catccaaaac caaagcgttt caagtagcgg aactacagat ggcattagag	240		
acattaagta aatcacagta tagcacaagc caatggacgt tgcaacagac aagcttagag	300		
gtttggcttt gtgaaccacc aaaatgtttt aaaaagcaag gagaacagat aactgtgcaa	360		
tatgacaatg acaaaaaaaaa taccatggac tatactaact ggggtgaaat atacattata	420		
gaggaagata catgtactat ggttacaggg aaagtagatt atataggtat gtattacata	480		
cataactgtg aaaaggtata ctttaaatat ttttaaggagg atgctgcca atactctaaa	540		
acacaaatgt ggggaagtcca tgtaggtggc caggttattg tttgccctac gtctatatct	600		
agcaatcaaa tatccactac tgagactgct gacatacaga cagacaacga taaccgacca	660		
ccacaagcag cggccaaacg acgacgacct gcagacacta ctgacaccgc ccagcccctt	720		
acaaagctgt tctgtgcaga ccccgcttg gataatagaa cagcacgtac agcaactaac	780		
tgcacaaata agcagcggac tgtgtgtagt tctaactgtg caccaatagt gcatttgaaa	840		
ggcgaatcaa atagcttaaa gtgtttgaga tacagattaa aaccttataa agagttgtac	900		
agtcttatgt cttcaacttg gcaactggact agtgacaaca aaaatagtaa aaatggcata	960		
gtaaccgtga catttgaac tgaacagcaa caacaaatgt tcttgggtac cgtaaagata	1020		
cctcctactg tgcagataag taccggattc atgaccttat aa	1062		
<210> 67			
<211> 1326			
<212> DNA			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> nucleotide sequence encoding a membrane-presented and replication-defective HPV-33 E2 polypeptide (SS-33E2*-TMR) (degenerated sequence)			
<400> 67			
atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggctt tttccctctg tttcggtaac	60		
tttcttatag aggaatatc agcagccttg aatgcagtc aagagaaaat tctagatctt	120		

tacgaagcag ataaaactga ttaccatct caaatgaac actggaaatt gatacgcatg	180
gcctgcgctt tattgtatag agccaaacag atgggctttt cacatttatg tcaccaagtg	240
gtaccttctt tgttagcatc caaaaccaa gcgtttcaag tagcggaact acagatggca	300
ttagagacat taagtaaac acagtatagc acaagccaat ggacgttgca acagacaagc	360
ttagaggttt ggctttgtga accacaaaa tgttttaaaa agcaaggaga aacagtaact	420
gtgcaatatg acaatgacaa aaaaaatacc atggactata ctaactgggg tgaaatatac	480
attatagagg aagatacatg tactatggtt acagggaag tagattatat aggtatgtat	540
tacatacata actgtgaaaa ggtatacttt aaatatttta aggaggatgc tgccaaatac	600
tctaaaacac aaatgtggga agtccatgta ggtggccagg ttattgtttg ccctacgtct	660
atatctagca atcaaatatc cactactgag actgctgaca tacagacaga caacgataac	720
cgaccaccac aagcagcggc caaacgacga cgacctgcag aactactga caccgccag	780
ccccttaca agctgttctg tgcagacccc gccttggata atagaacagc acgtacagca	840
actaactgca caaataagca gcggactgtg tgtagtctta acgttgcacc aatagtgcac	900
ttgaaggcgc aatcaaatag cttaaagtgt ttgagataca gattaaaacc ttataaagag	960
ttgtacagtt ctatgtcttc aacttggcac tggactagtg acaacaaaa tagtaaaat	1020
ggcatagtaa ccgtgacatt tgttaactgaa cagcaacaac aaatgttctt gggtaccgta	1080
aagatacttc ctactgtgca gataagtacc ggattcatga ccttatacgt actgctatcg	1140
gcaggcacgt tgatcgact aatgcttacc atcttctaa taacctgtcg caagcgggtt	1200
gataggcccg aaagtacca aagtccttg agaggaccg gacgcaact atcggtaacg	1260
tcgcaaagcg gcaagttcat tagcagttgg gagtcgcaca aatcaggtgg agagaccgc	1320
ctgtga	1326

<210> 68

<211> 1107

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> nucleotide sequence encoding a replication-defective
HPV-52 E2 polypeptide (52degE2*) (degenerated sequence)

<400> 68

atggaatcga taccggcagc gttaaacgct gtgcaggaaa agatactcga tctatatgag	60
gctgacagca atgatctaaa cgcacaaatc gagcattgga agttgactcg aatggcttgt	120
gttttgtttt ataaagcaaa ggaactggga ataactcata taggcatca agtagtcct	180
ccaatggcag tgtctaaggc aaaggcctgc caagccgagc agcttcaatt ggctttggag	240
gcattgaaca aaactcaata cagtacagat ggctggacct tacagcaaac aagtctagaa	300
atgtggcgtg cagagccaca aaaatacttc aagaagcacg ggtacacaat aacagtccaa	360
tacgataatg ataaaaacaa cactatggat tacacaaatt ggaaggaaat ttatttactt	420
ggtagagtgt aatgcacaat tgtagaagga caagtggatt actatgggtt atactattgg	480
tgtgatggag aaaaaatcta ttctgtaaaa tttagtaacg acgcaaagca atatttgtta	540
acaggagtct gggagggtgca cgtgggcggt caagtaatcg tgtgtccagc atcggatca	600
agtaacgagg ttctactac agaacagct gtccacctat gcaccgaaac ctccaagacc	660
tccgcagtgt ccgtgggtgc caaagacaca cacctacaac caccacagaa gcgacgtcga	720
ccagatgtca cagattccag aaacaccaag taccccaaca accttttgcg gggacaacaa	780
tccgttgaca gcactacagc gggactcgtg actgccactg agtgactaa taaaggtcgg	840
gttgccacata caacttgtac tgctcctatt attcacctaa aggggtgaccc caacagcttg	900
aaatgcctaa ggtatagggt aaaacacat aaaagtttat atgttcaaat ttcattcag	960

tggcattgga cgagtaatga atgtacaaat aataaactag gtattgtaac aataacgtac	1020
agtgatgaga cacagcgta acagttttta aaaactgtca aaatcccaaa tacctgcaa	1080
gttatacaag gtgtcatgtc attgtaa	1107

<210> 69
 <211> 1374
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> nucleotide sequence encoding a membrane-presented and replication-defective HPV-52 E2 polypeptide (SS-52E2*-TMF) (degenerated sequence)

<400> 69	
atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca	60
cccaccggtc aaatccattg gggcgaatcg ataccggcac ggttaaacgc tgtgcaggaa	120
aagatactcg atctatatga ggctgacagc aatgatctaa acgcacaaat cgagcattgg	180
aagttgactc gaattggcttg tgttttgttt tataaagcaa aggaactggg aataactcat	240
ataggccatc aagtagtgcc tccaatggca gtgtctaagg caaaggcctg ccaagccgca	300
gagcttcaat tggcttttga ggcatgtaac aaaactcaat acagtacaga tggctggacc	360
ttacagcaaa caagtctaga aatgtggcgt gcagagccac aaaaatactt caagaagcac	420
gggtacacaa taacagtcca atacgataat gataaaaaca aactatgga ttacacaaat	480
tgggaagaaa tttattttact tggtagtgt gaatgcacaa ttgtagaagg acaagtggat	540
tactatgggt tatactattg gtgtgatgga gaaaaaatct atttcgtaaa atttagtaac	600
gacgcaaagc aatatttgtt aacaggagtc tgggaggtgc acgtgggcgg tcaagtaac	660
gtgtgtccag catcgggtatc aagtaacgag gtttctacta cagaacacgc tgtccaccta	720
tgcaccgaaa cctccaagac ctccgcagtg tccgtgggtg ccaagacac acacctacaa	780
ccaccacaga agcgacgtcg accagatgtc acagattcca gaaacaccaa gtaccccaac	840
aaccttttgc ggggacaaca atccgttgac agcactacac ggggactcgt aactgccact	900
gagtgacta ataaaggctg ggttgacat acaacttgta ctgctcctat tattcaccta	960
aagggtgacc ccaacagctt gaaatgccta aggtataggg taaaaacaca taaaagttaa	1020
tatgttcaaa tttcatctac gtggcattgg acgagtaatg aatgtacaaa taataaacta	1080
ggtattgtaa caataacgta cagtgtatgac acacagcgtc aacagttttt aaaaactgtc	1140
aaaatcccaa ataccgtcca agttatacaa ggtgtcatgt cattgggttt atcgagcact	1200
agcatagtct acatcctgat tgcagtgtgt cttggagggt tgatagggat ccccgcttta	1260
atattgttct gcaggggcg tttgaacaaa aaggggagaac aagttggat gtcaagacca	1320
ggcctaaagc ctgatcttac gggaacatca aaatcctatg taaggctgct ctga	1374

<210> 70
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> membrane-presented and replication-defective HPV-33 E2

polypeptide (SS-33E2*-TMR)

<400> 70

```

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

Leu Tyr Thr Ala Lys Gln Met Gly Phe Ser His Leu Cys His Gln Val
65           70           75           80
Val Pro Ser Leu Leu Ala Ser Lys Thr Lys Ala Phe Gln Val Ala Glu
           85           90           95
Leu Gln Met Ala Leu Glu Thr Leu Ser Lys Ser Gln Tyr Ser Thr Ser
           100          105          110
Gln Trp Thr Leu Gln Gln Thr Ser Leu Glu Val Trp Leu Cys Glu Pro
           115          120          125

Pro Lys Cys Phe Lys Lys Gln Gly Glu Thr Val Thr Val Gln Tyr Asp
           130          135          140
Asn Asp Lys Lys Asn Thr Met Asp Tyr Thr Asn Trp Gly Glu Ile Tyr
145          150          155          160
Ile Ile Glu Glu Asp Thr Cys Thr Met Val Thr Gly Lys Val Asp Tyr
           165          170          175
Ile Gly Met Tyr Tyr Ile His Asn Cys Glu Lys Val Tyr Phe Lys Tyr
           180          185          190

Phe Lys Glu Asp Ala Ala Lys Tyr Ser Lys Thr Gln Met Trp Glu Val
           195          200          205
His Val Gly Gly Gln Val Ile Val Cys Pro Thr Ser Ile Ser Ser Asn
           210          215          220
Gln Ile Ser Thr Thr Glu Thr Ala Asp Ile Gln Thr Asp Asn Asp Asn
225          230          235          240
Arg Pro Pro Gln Ala Ala Ala Lys Arg Arg Arg Pro Ala Asp Thr Thr
           245          250          255

Asp Thr Ala Gln Pro Leu Thr Lys Leu Phe Cys Ala Asp Pro Ala Leu
           260          265          270
Asp Asn Arg Thr Ala Arg Thr Ala Thr Asn Cys Thr Asn Lys Gln Arg
           275          280          285
Thr Val Cys Ser Ser Asn Val Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu
           290          295          300
Ser Asn Ser Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Lys Glu
305          310          315          320

Leu Tyr Ser Ser Met Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys
           325          330          335
Asn Ser Lys Asn Gly Ile Val Thr Val Thr Phe Val Thr Glu Gln Gln
           340          345          350
Gln Gln Met Phe Leu Gly Thr Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile
           355          360          365
Ser Thr Gly Phe Met Thr Leu Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu

```

370 375 380

Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val
 385 390 395 400
 Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn
 405 410 415
 Val Ser Val Thr Ser Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser
 420 425 430
 His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
 435 440

<210> 71
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> membrane-presented and replication-defective HPV-52 E2
 polypeptide (SS-52E2*-TMF)

<400> 71

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

Met Ala Cys Val Leu Phe Tyr Lys Ala Lys Glu Leu Gly Ile Thr His
 65 70 75 80
 Ile Gly His Gln Val Val Pro Pro Met Ala Val Ser Lys Ala Lys Ala
 85 90 95
 Cys Gln Ala Ala Glu Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ala Leu Asn Lys Thr
 100 105 110
 Gln Tyr Ser Thr Asp Gly Trp Thr Leu Gln Gln Thr Ser Leu Glu Met
 115 120 125

Trp Arg Ala Glu Pro Gln Lys Tyr Phe Lys Lys His Gly Tyr Thr Ile
 130 135 140
 Thr Val Gln Tyr Asp Asn Asp Lys Asn Asn Thr Met Asp Tyr Thr Asn
 145 150 155 160
 Trp Lys Glu Ile Tyr Leu Leu Gly Glu Cys Glu Cys Thr Ile Val Glu
 165 170 175
 Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Trp Cys Asp Gly Glu Lys
 180 185 190

Ile Tyr Phe Val Lys Phe Ser Asn Asp Ala Lys Gln Tyr Cys Val Thr
 195 200 205
 Gly Val Trp Glu Val His Val Gly Gly Gln Val Ile Val Cys Pro Ala

210 215 220
 Ser Val Ser Ser Asn Glu Val Ser Thr Thr Glu Thr Ala Val His Leu
 225 230 235 240
 Cys Thr Glu Thr Ser Lys Thr Ser Ala Val Ser Val Gly Ala Lys Asp
 245 250 255

 Thr His Leu Gln Pro Pro Gln Lys Arg Arg Arg Pro Asp Val Thr Asp
 260 265 270
 Ser Arg Asn Thr Lys Tyr Pro Asn Asn Leu Leu Arg Gly Gln Gln Ser
 275 280 285
 Val Asp Ser Thr Thr Arg Gly Leu Val Thr Ala Thr Glu Cys Thr Asn
 290 295 300
 Lys Gly Arg Val Ala His Thr Thr Cys Thr Ala Pro Ile Ile His Leu
 305 310 315 320

 Lys Gly Asp Pro Asn Ser Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Val Lys Thr
 325 330 335
 His Lys Ser Leu Tyr Val Gln Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser
 340 345 350
 Asn Glu Cys Thr Asn Asn Lys Leu Gly Ile Val Thr Ile Thr Tyr Ser
 355 360 365
 Asp Glu Thr Gln Arg Gln Gln Phe Leu Lys Thr Val Lys Ile Pro Asn
 370 375 380

 Thr Val Gln Val Ile Gln Gly Val Met Ser Leu Gly Leu Ser Ser Thr
 385 390 395 400
 Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly
 405 410 415
 Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly
 420 425 430
 Glu Gln Val Gly Met Ser Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly
 435 440 445

 Thr Ser Lys Ser Tyr Val Arg Ser Leu
 450 455

<210> 72
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> priler oTG18962 for reconstituting sequence encoding
 SS-33E2*-TMR

<400> 72
 cccaaaggat ccaccatggt accgcaagcc ctgcta

36

<210> 73
 <211> 52
 <212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18963 for reconstituting sequence encoding
SS-33E2*-TMR

<400> 73

ttccctcttg tttcggttag tttcctatag aggaaatata agcacgcttg aa

52

<210> 74

<211> 52

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18964 for reconstituting sequence encoding
SS-33E2*-TMR

<400> 74

ttcaagcgtg ctgatatttc ctctatagga aacttaccga aacagagggg aa

52

<210> 75

<211> 49

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18965 for reconstituting sequence encoding
SS-33E2*-TMR

<400> 75

gataagtacc ggattcatga ccttatacgt actgctatcg gcaggcacg

49

<210> 76

<211> 49

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18966 for reconstituting sequence encoding
SS-33-E2*-TMR

<400> 76
cgtgcctgcc gatagcagta cgtataaggt catgaatccg gtacttatc 49

<210> 77
<211> 56
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer oTG18967 for reconstituting sequence encoding
SS-33E2*-TMR

<400> 77
aaaacccgc atgcgcggcc gcaagctatc acaggcgggt ctctccacct gatttg 56

<210> 78
<211> 37
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer oTG18968 for reconstituting sequence encoding
SS-52E2*-TMF

<400> 78
aaacccgaga tctacatgg gtctcaaggt gaacgtc 37

<210> 79
<211> 46
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer oTG18969 for reconstituting sequence encoding
SS-52E2*-TMF

<400> 79
cccaccgtc aaatccattg gggcgaatcg ataccggcac ggttaa 46

<210> 80
<211> 46
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18970 for reconstituting sequence encoding
SS-52E2*-TMF

<400> 80

ttaaccgtgc cggatcgcg tgcgcccaat ggatttgacc ggtggg

46

<210> 81

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18971 for reconstituting sequence encoding
SS-52E2*-TMF

<400> 81

gttatacaag gtgtcatgct attgggttta tcgagcacta gca

43

<210> 82

<211> 43

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18972 for reconstituting sequence encoding
SS-52E2*-TMF

<400> 82

tgctagtgcg cgataaaccc aatgacatga caccttgat aac

43

<210> 83

<211> 53

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer oTG18973 for reconstituting sequence encoding
SS-52E2*-TMF

<400> 83

aagcttgcta gccaccggtg gggccgcggc cgctcagagc gaccttacat agg

53