



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0018783
(43) 공개일자 2012년03월05일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/01 (2006.01) C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01) C12N 15/866 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7028692</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2010년04월30일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년11월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/055943</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/125201
국제공개일자 2010년11월04일</p> <p>(30) 우선권주장
09159287.3 2009년05월01일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
레드바이오텍 아게
스위스 체하-8952 쉘리에렌 바기스트라세 23</p> <p>(72) 발명자
존 코리네
스위스 체하-8810 호르겐 라이티스트라세 59
샤우프 크리스티안
스위스 체하-8820 배텐스빌 쉘로스베르크스트라세 44
벨리니츠 자비네
스위스 체하-8902 우르도르프 임 스투에다커 4</p> <p>(74) 대리인
백덕열</p> |
|---|---|

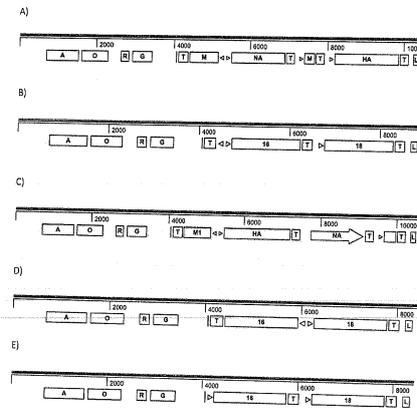
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 다중 유전자 벡터에 의해 암호화된 재조합 바이러스-유사 입자

(57) 요약

본 발명은 재조합 DNA 및 세포 배양 생산 수법을 기본으로 하여 백신, 진단 도구 및 R&D 도구로서 사용하기 위한 신규 바이러스-유사 입자를 개시한다. 본 발명의 재조합 바이러스-유사 입자는 (a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 대하여 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 상이한 에피토프를 몇 개, 특히 2 이상 포함하는 폴리펩티드 사슬에 의해 조립된다. 이들 에피토프는 입자 표면 상에서 표시된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 대하여 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 2 이상의 상이한 에피토프 또는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 3 이상의 상이한 에피토프 또는 에피토프를 포함하는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 3

제 1항에 있어서, 4 이상의 상이한 에피토프 또는 에피토프를 포함하는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 4

제 1항에 있어서, 6, 9 또는 12개 에피토프 또는 에피토프를 포함하는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 에피토프는 3 이상의 상이한 바이러스 균주 또는 혈청형으로부터 얻는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, B- 및/또는 T-세포 에피토프를 더 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 완전 바이러스-유사 표면을 형성하는 단백질 및 경우에 따라 캡시드 및/또는 뉴클레오포어 단백질을 더 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 형광 단백질, 입자의 정제 목적에 유용하거나 또는 라벨을 부착하는데 유용한 단백질, 및/또는 수송 과정에 필요한 단백질성 구조를 더 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 인플루엔자 바이러스인 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 인간 유두종 바이러스인 재조합 바이러스-유사 입자.

청구항 11

(a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 대하여 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 상이한 에피토프 또는 상이한 단백질을 암호화하는 2 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 12

제 11항에 있어서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 재조합 바이러스-유사 입자를 암호화하는 벡터.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 배큘로바이러스 벡터인 벡터.

청구항 14

제 11항에 있어서, 서열번호: 1 내지 5로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 15

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

제 1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 재조합 바이러스-유사 입자를 포함하는 백신.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 상이한 바이러스 균주로부터의 에피토프(epitope)를 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자(virus-like particles), 및 이들을 암호화하는 벡터에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이오의약품, 나노기술 및 재료 과학에서 상이한 특징에서 소형 천연 생분자를 이용하는 것에 대한 관심이 증대하고 있다. 바이러스 시뮬레이터(simulators), 바이러스 캡시드(capsids) 또는 바이러스-유사 입자는 규칙적인 구조, 이들의 균일한 입자 크기, 이들의 안정성, 생산의 용이성 및 조작 가능성으로 인하여 아주 매력적이다. 바이러스-유사 입자는 동적 구조를 보유하며, 이들의 인테리어는 접근가능하며, 더우기 그 피막(coat)은 변형가능하다. 용도에 따라서 상기 바이러스-유사 입자는 엔빌로프(envelope)를 갖거나 갖지 않을 수 있고 또 바이러스 시뮬레이터로서 선택될 수 있다. 이들 실시형태는 새로운 생물학적 개체(entities) 또는 표적으로서, 백신으로서, 항체 생산용 항원으로서, 연구 도구로서, 진단 도구로서, 약물 전달 및 생체접속물(bioconjunction)로서 사용될 수 있다. 이들 바이러스 시뮬레이터는 다수 바이러스의 엔빌로프 및/또는 캡시드 단백질의 자가 조립(self-assembly)에 의해 형성된다. 그 크기는 특정 바이러스의 형태에 따라서 22-150 nm로 다양하다. 바이러스 시뮬레이터는 이들이 유전자 물질 혼입 없이도 조립될 수 있기 때문에 비-감염성이다. 용도에 따라서 외래 유전자 물질이 본 명세서에 기재된 바이러스 시뮬레이터에 포함될 수 있다.

[0003] 이들 바이러스 시뮬레이터의 유망한 적용은 에피토프(epitope)의 반복적, 고밀도 표시가 강한 면역 반응을 유발하기 때문에 다양한 질병에 대하여 백신을 생산하는 것이다. 소형 크기의 입자는 수지상 세포(dendritic cells)의 흡수에 이롭다. 키메라 바이러스 시뮬레이터는 선택적, 다중 에피토프, 다중 단백질, 다중 혈청형, 다중 균주, 또는 다중 종 프레젠테이션(presentation)에서 다양한 가능성을 제공한다.

[0004] 바이러스성 발현 벡터, 더욱이 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 비롯한 다양한 종의 효모 및 대장균(*Echerichia coli*) 및 기타 세균에 의해 안정적으로 또는 일시적으로 형질감염(transfected)되거나 또는 형질도입(transduced)된 배큘로바이러스(baculovirus)/곤충 세포 계, 다양한 포유동물 세포주를 포함하는 바이러스 시뮬레이터를 제조하기 위한 다수의 발현 계가 존재한다.

[0005] 백신접종(vaccination)은 감염성 질병으로부터 보호하기 위한 충분한 면역성을 생성하는가에 따라 달라진다. 가장 흔히 사용되는 약독화된(attenuated) 바이러스 백신은 면역화 이후에 숙주에서 바이러스의 제한된 복제에 의존한다. 그러나 이러한 종류의 백신접종은 일부 환자에서는 심각한 반응을 유발할 수 있다. 따라서 서브유닛 백신으로서 바이러스-유사 입자(VLP)의 개발은 이러한 입자가 일반적 DNA 또는 RNA 게놈을 결여하고 있지만 천연 바이러스의 진정한 입체형태(conformation)를 갖기 때문에 유리하다.

[0006] 백신접종은 예컨대 계절성 또는 유행성 인플루엔자 발생 위험에 대한 가장 강력하고 또 비용 효과적인 방해 대

책 중의 하나이다. 인플루엔자가 가장 무서운 바이러스성 질병의 하나인 주요 이유는 에어로졸로 전파되기 쉽고 또 유약한 인간에게서 특히 심각한 질병을 초래하기 때문이다. 현재 허가받은 계절성 백신은 부분적으로 보호성 일 뿐이고, 또 유정란 방식(egg-based) 생산은 아주 시간소모적이고 비용집약적이다. 이 전략은 백신에 의해 매칭이 잘 안되거나 또는 매칭이 전혀 안되는 유행성 균주가 예기치 않게 발생시에 취약하다. 조류 인플루엔자 또는 다른 기원의 인플루엔자 균주의 출현 위험으로 인하여, 새로운 백신 접근법이 필요하다.

[0007] 다른 요지로서 HCV, HIV, 에볼라 등과 같은 몇 개의 중요한 바이러스 분야에서의 연구는 생물안정성 문제로 인하여 매우 어렵다. 지금까지 바이러스 진입과 바이러스 이동성(trafficking) 연구에 대하여 극히 소수의 모델만이 존재하고 있다. 진단 도구는 적절한 비-감염성 바이러스 모델의 부족으로 인하여 이들 바이러스의 계보를 기본으로 하고 있다.

[0008] 현재 시판중인 인간 인플루엔자 백신은 이들의 유일한 또는 주요 바이러스성 항원으로서 헤마글루티닌을 함유한다. 이들의 생산은 부화된 계란 상에서 성장한, 또는 더 최근에는, 조직 배양 포유동물 세포에서 생긴 바이러스로부터 출발한다. 계란에서 생산은 고 수율의 재조합 바이러스 균주의 선택을 필요로 하며, 이는 수용력에서 제한되고, 시간 소모적이며(6-8주) 또 고비용이다. 그밖에, 백신접종된 사람들 중에서 계란 단백질에 대한 알레르기를 유발하는 문제가 생길 수 있다. 비-치명적인 조류 균주를 이용하여서만 상기 생산이 가능하다. 유정란 방식의 생산의 가장 중요한 결점 중의 하나는 수용력이 제한되는 점이다. 유행성의 경우, 계절성 인플루엔자 백신의 생산은 장기적으로는 더 많은 치명적 결과를 초래할 수 있는 유행성 인플루엔자 백신 생산을 위해 중지되어야 한다.

[0009] 바이러스성 질병에 대한 백신은 전통적으로 약독화된 바이러스 균주 또는 감염성 바이러스의 불활성화에 의존한다. 생물안정성 수준(예컨대 BL3/BL4)으로 인하여 생산 가능성을 억제하는 고 병원성 또는 출혈성 바이러스에 대한 적절한 환경이 필요하다. 인간 유두종 바이러스와 같은 일부 바이러스의 경우 약독화는 충분하지 않을 것인데 이는 상기 바이러스가 시험관 내(*in vitro*)에서는 증식될 수 없기 때문이다. 인간 유두종 바이러스(HPV)-유사 입자계 백신을 생성하는 능력 (Gardasil, Cervarix)은 여성에서 경부암을 방지하는 특징을 변경하였다.

[0010] 조류 인플루엔자 또는 다른 기원의 균주 출현의 위험으로 인하여, 향상된 보호를 초래할 수 있는 신규 백신 개발이 필요하다.

발명의 내용

[0011] **발명의 요약**

[0012] 본 발명은 (a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 2 이상의 상이한 에피토프 또는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자에 관한 것이다. 이들 재조합 바이러스-유사 입자는 백신으로서 유용하며, 또 본 발명은 또한 이들 백신에도 관한 것이다.

[0013] 또한 본 발명은 (a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 상이한 에피토프 또는 상이한 단백질을 암호화하는 2 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 이들 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1: 다중 에피토프 바이러스-유사 입자를 발현하는 벡터 작제물을 나타내는 개략도.

- (A) (서열번호: 1) H1N1 바이러스성 균주뿐만 아니라 H3N2 (HA, NA) 바이러스성 균주로부터 얻은 상이한 에피토프(M1, M2)를 함유하는 다가 인플루엔자 A 바이러스 시물레이터.
- (B) (서열번호: 2) 혈청형 HPV16 및 HPV18로부터 얻은 에피토프(L1)를 함유하는 키메라 인간 유두종 바이러스-유사 입자.
- (C) (서열번호: 3) 인플루엔자 B/플로리다 단리물로부터 얻은 매립된 에피토프(HA, NA, M1, M2)를 갖는 발현 벡터 작제물
- (D) (서열번호: 4) 상이한 프로모터의 제어하에 있는 HPV16 및 HPV18 혈청형의 에피토프(L1)의 발현을 위한 벡터 작제물.

(E) (서열번호: 5) 프로모터 p10이 결실된 것을 제외하고는 (B)와 동일한 벡터 작제물.

상기 벡터는 polh, p10 및 p_{XIV} 초후기(very late) 배콜로바이러스 프로모터, vp39 배콜로바이러스성 후기(late) 프로모터, vp39polh 배콜로바이러스성 후기/초후기 하이브리드 프로모터, pca/polh, pcna, et1, p35, egt, da26 배콜로바이러스성 초기(early) 프로모터; CMV, SV40, UBc, EF-1, RSVLTR, MT, P_{DS47}, Ac5, P_{GAL} 및 P_{ADH}로부터 선택된 2개의 프로모터 P1 및 P2(◁,▷)를 함유한다. 터미네이터 서열 T1 및 T2 (T)는 SV40, HSVtk 또는 BGH(소 성장 호르몬)로부터 선택된다. 또한 상기 벡터는 MultiBacbacmid 생성을 위한 트랜스포손 부위 TnL 및 TnR(L,R), 부위 특이적 동종 재조합(플라스미드 융합)을 위한 loxP 부위(LP), 복제개시점(O), 암피실린(A) 및 겐타마이신(G) 내성 유전자 및 규정된 제한 부위를 함유한다.

도 2: 발현된 키메라 인플루엔자 바이러스-유사 입자의 분석.

(A) 분비된 VLP(A, 라인 2) 뿐만 아니라 세포내(intracellular) VLP(서열번호: 1로부터 제조됨, A, 라인 1)의 입체구조는 단백질 HA (H3), NA (H3) 및 M2 (H1)에 대한 특정 항체를 사용한 면역블롯팅(immunoblotting)에 의해 확인된다. 라인 3 = 래더(ladder), 단백질 크기(kDa). 에피토프들은 공존화(co-localized)에 있고, 이는 이들이 1개 입자 내에 조립되는 것을 의미한다.

(B) 우라닐 아세테이트에 의한 네가티브 염색을 이용한 전자현미경에 의한 키메라 인플루엔자 바이러스-유사 입자(서열번호: 3으로부터 제조됨)의 가시화. 에피토프 HA를 나타내는 스파이크를 볼 수 있다. 입자의 크기는 50-80 nm 범위이다.

도 3: 서열번호:1로부터 제조된 분비된 다중 에피토프 인플루엔자 바이러스-유사 입자의 크로마토그래피 정제 및 분석.

(A) 겔 여과 정제의 크로마토그램. 제1 피크(1)는 바이러스-유사 입자(VLP)를 함유한다. 나머지 피크(2-6)는 오염 단백질을 나타낸다.

(B) 쿠마씨-염색된 SDS-PAGE. 바이러스-유사 입자의 다중 에피토프는 VLP 함유 피크의 개시를 나타내는 제1 피크(1)(라인 1), 중간(라인 2) 및 마지막(라인 3)으로부터의 상이한 분획을 분석하는 것에 의해 확인된다. 래더 [kDa]는 제1 라인의 좌측에 표시된다. 에피토프의 검출은 화살표로 표시된다.

(C) 항-HA 항체를 사용하여 쿠마씨-염색된 겔에 따른 웨스턴 블롯 분석.

도 4: 천연-유사 인플루엔자 바이러스-유사 입자(VLP)의 작용화.

정제된 VLP(서열번호: 3으로부터 제조됨)의 2중 연속 희석 시리즈(1:2 내지 1:2048)는 표준 혈구응집 에세이에 의해 분석한다. 50 μL 정제된 입자 용액은 96-웰 플레이트 상에 코팅하여 적혈구 세포(적혈구)와 함께 배양하였다. 인플루엔자 VLP(1, 상부 부분)는 투여량 의존적 방식으로 적혈구 세포를 응집시킬 수 있다. 최고 희석은 1:1024이다. 대조적으로 대조군 (C)로 사용된 PBS는 웰의 중간에 "점"으로 보이는 적혈구의 침전만을 초래한다.

도 5: 다중 에피토프 인플루엔자 바이러스-유사 입자의 생체내(In vivo) 평가

서열번호: 3으로부터 제조된 정제된 VLP 50 ng(마우스 1-5) 또는 100 ng(마우스 6-10) 그리고 대조군으로서 PBS(마우스 11-12)에 의해 마우스를 면역화시킨다. 프라임 주사(prime injection)한 후(주사한 지 3주 후) 항체 역가를 흰색 박스로서 표시하고, 추가면역(boost injection)한 후(주사한 지 6주 후)의 역가는 흑색 박스로서 표시한다. 상기 역가는 마우스 혈청(y-축)의 희석도로서 표시된다. VLP는 항체 면역 반응을 효과적으로 자극한다. 최선의 결과는 100 μL (마우스 6-10)에 의해 면역화를 실시할 때 얻어지며, 투여량 의존적 면역반응을 나타낸다. 추가 면역 후 항-VLP 항체량의 분명한 증가가 관찰된다. 예상된 바와 같이, 대조용 동물(마우스 11-12)은 면역반응을 나타내지 않는다.

도 6: 혈구응집 억제 에세이에 의한 다중 에피토프 인플루엔자 VLP에 대한 특정 면역반응의 확인.

ELISA 시험은, 특정 항-HA 항체의 존재를 분석하기 위하여, 주사한 지 6주 후에 취한 혈청을 사용하여 실시하였다. 서열번호: 3으로부터 제조된 다중 에피토프 바이러스-유사 입자를 96-웰 플레이트에 코팅하고, 혈청과 혼합한 다음 30분 동안 배양하였다. 혈청은 2중 연속 희석(1:2 내지 1:1024)으로 시험하였다. 배양 후, 적혈구를 부가하고 30분 더 배양하였다. 다중 에피토프 바이러스-유사 입자에 결합하는 상이한 마우스로부터 얻은 특정 항-인플루엔자-HA 항체는 희석 1:128(1) 및 희석 1:256(2)까지 적혈구 응집 억제를 초래하며, 이는 웰의 중간에 적혈구 침전(점)으로 볼 수 있다. 대조용 마우스(C)의 혈청 샘플에서는 아무런 혈구응집 억제도 관찰되지 않는다.

다.

도 7: 50 mL 생물배양기를 사용한 최선의 발현 조건의 스크리닝.

1-2 x 10⁶ 세포/mL의 초기 세포량(TOI, 1 또는 2), 바이러스 접종물(MOI, 0.01-2) 및 수집 시간(감염 후 일수, d2-d6)은 도트 블롯 분석에 의해 결정하였다.

(A) 대조군으로 사용되는 1개의 에피토프 L1 만을 갖는 발현 작제물의 최선의 발현 변수의 결정. 특정 항-HPV18 항체(Abcam)에 의한 검출.

(B) 상이한 혈청형(서열번호: 2)으로부터 얻은 2개의 에피토프를 갖는 다중 에피토프 발현 작제물의 최선의 발현 변수의 결정. 2개의 에피토프 HPV16 L1 및 HPV18 L1에 대한 특정 항-HPV16-항체(Camvir, Santa Cruz) 및 항-HPV18-항체 (Abcam)의 검출.

도 8: 서열번호: 2로부터 제조된 다중 에피토프 인간 유두종 바이러스-유사 입자의 크로마토그래피 정제 및 분석.

(A) DEAE-세파로오스 컬럼을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피의 크로마토그램.

유동(flow through)(1), 세척(2) 및 용출 피크(3-5)는 숫자(1-5)로 표시한다. 용출 완충액의 증가된 이온 강도는 선[%]으로 도시된다. 3 = 300 mM NaCl에 의한 용출, 4 = 420 mM NaCl에 의한 용출, 5 = 680 mM NaCl에 의한 용출.

(B) 쿠마씨-염색된 SDS-PAGE. 바이러스-유사 입자의 다중 에피토프의 존재는 크로마토그램의 상이한 부분을 분석하는 것에 의해 확인하였다. 레인 1 = 래더 [kDa], 레인 2 = 정제 이전의 VLP, 레인 3 = 세척 단계, 레인 4 = 300 mM NaCl에 의한 용출, 레인 5 = 420 mM NaCl에 의한 용출, 레인 6 = 500 mM NaCl에 의한 용출, 레인 7 = 680 mM NaCl에 의한 용출. 에피토프는 화살표(L1)로 표시한다.

(C) 화살표(L1)로 표시되는 2개의 에피토프에 대한 특정 항체를 사용하는 쿠마씨-염색된 겔에 의한 웨스턴 블롯 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 백신, 진단 도구 및 R&D 도구로서 유용한 재조합 DNA를 기본으로 하는 신규 바이러스-유사 입자의 제조 및 그 제조를 위한 세포 배양 수법을 목적으로 한다. 본 발명의 입자는 있을 수 있는 유행성 인플루엔자 발생을 박멸하기에 적합한 백신에 대한 요구를 만족시킨다. 본 발명의 재조합 바이러스-유사 입자는 (a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 상이한 에피토프 또는 상이한 단백질을 몇 개, 특히 2 이상, 예컨대 2개, 3개, 4개 또는 5개를 혼입하거나, 또는 3의 배수, 예컨대 6개, 9개 또는 12개를 포함하는 폴리펩티드 사슬에 의해 조립된다. 이들 에피토프는 입자 표면 상에 표시된다. 상이한 균주, 혈청형 및/또는 상이한 숙주에 특이적인 바이러스로부터 에피토프의 선택은 예컨대 2009년 4월 돼지 인플루엔자 발생시 관찰된 것과 같이 천연에서 생기는 바이러스의 천연적 변화를 모방한 다작용성 바이러스-유사 입자를 초래한다. 종래 기술의 바이러스-유사 입자는 단일 단백질로 이루어지거나 또는 동일 바이러스성 균주로부터 유도된 3개 이하의 상이한 에피토프를 포함한다. 본 발명의 입자는 곤충 세포, 박테리아 세포 및 포유동물 세포와 같은 숙주 세포에서 생산을 위해 사용되는 바이러스성 또는 플라스미드계일 수 있는 단일 DNA 벡터에 의해 암호화된다. 바람직한 실시형태로서, DNA 벡터는 배칼로바이러스 벡터이고 또 숙주 세포는 곤충 세포이다.

[0016] 본 발명의 에피토프는 4 내지 1000개 아미노산, 바람직하게는 6 내지 100개 아미노산으로 이루어진 면역원성 펩티드이고, 또 바람직하게는 중성화 에피토프이다. 중성화 에피토프는, 면역원성 반응의 결과로서 항체에 의해 결합될 때 그러한 중성화 에피토프를 갖는 바이러스의 중성화를 초래하는 에피토프이다. 본 명세서에서 의미하는 에피토프는 반복적일 수 있고, 또 대형 단백질, 특히 항원의 일부, 바이러스성 표면 단백질의 일부 또는 바이러스성 막 단백질의 일부일 수 있다. 바이러스성 표면 단백질 또는 바이러스성 막 단백질에 혼입된 이러한 에피토프가 바람직하다. 본 발명에 따른 바이러스-유사 입자의 목적하는 용도가 연구 개발용 도구, 진단 도구 또는 바이러스 시뮬레이터이라면, 상기 에피토프는 완전 바이러스-유형 표면을 제공하는 완전 바이러스성 단백질의 일부인 것이 중요하다.

[0017] 본 발명의 상이한 바이러스성 균주는 예를 들어, 인플루엔자 바이러스의 상이한 균주, 예를 들어 인플루엔자 바이러스 A 균주 H1N1, H5N1, H9N1, H1N2, H2N2, H3N2 또는 H9N2, 또는 인플루엔자 바이러스 B 또는 인플루엔자

바이러스 C이다.

- [0018] 본 발명의 상이한 혈청형은 예를 들어, 인간 유두종 바이러스(HPV)의 상이한 항혈청, 예를 들어 혈청형 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 48, 52, 58, 62, 66, 68, 70, 73 및 82뿐만 아니라 원암(proto-oncogenic) 유형 HPV 5, 8, 14, 17, 20 및 47로부터의 항혈청 또는 유두종 관련 유형 HPV 6, 11, 13, 26, 28, 32 및 60으로부터의 항혈청이다.
- [0019] 상이한 숙주에 대하여 특이적인 바이러스 균주는 상응하는 숙주에 특히 특이적인 균주이며, 또 예를 들어 인간 인플루엔자 바이러스 균주, 돼지 인플루엔자 바이러스 균주 및 조류 인플루엔자 바이러스 균주이다. 이와 관련하여, 어떤 숙주에 대하여 특이적인 것은 상기 바이러스가 1개 숙주로부터 동일 유형의 다른 숙주로 쉽게 전달될 수 있지만, 상이한 유형의 숙주에게는 전달되지 않는 것을 의미한다. 예를 들어, 조류 바이러스 균주는 조류에서 다른 조류로 쉽게 전달될 수 있지만, 기타 동물 또는 인간에게는 전달되지 않는다.
- [0020] 바람직한 실시형태로서 상이한 균주, 혈청형 및/또는 상이한 숙주에 대하여 특이적인 바이러스로부터 얻은 에피토프를 포함하는 상기 입자는, 더 넓은 면역 반응을 유도하기 위하여, B- 및/또는 T-세포 에피토프와 조합된다.
- [0021] 다른 바람직한 실시형태로서 상기 바이러스-유사 입자는 완전 바이러스-유사 표면을 형성하는 단백질로 이루어지며, 경우에 따라 캡시드 및 뉴클레오포어(nucleopore) 단백질을 더 포함한다. 본 발명의 바이러스-유사 입자는 형광 단백질, 입자의 정제 목적에 유용하거나 또는 라벨을 부착하는데 유용한 단백질, 및 수송 과정 및 안정성에 필요한 단백질성 구조를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 명세서에 기재된 폴리펩티드 및 바이러스-유사 입자는 특정 유전자 도구 및 처리 엔지니어링 도구를 이용하는 것에 의해 실제 백신 제조 과정과 비교하여 더 단시간 내에 또 비제한적인 양으로 생성된다. 예를 들어 멀티백(MultiBac) 기술(WO 2005/085456호; I. Berger et al., Nature Biotechnology 22, 1583, 2004), 폴리백(Polybac) 기술(WO 2007/054250호), 또는 유전자 합성과 같은 현대의 분자 생물학 방법에 의해 소망하는 바이러스성 유전자를 조립하는 능력은 코딩(coding) DNA 벡터의 신속한 조립을 허용한다. 이들 기술의 이용은 본 발명의 바이러스-유사 입자 및 백신을 개발, 제조 또는 투여하는 동안 원래의, 위험할 수 있는 바이러스의 물리적 전달을 필요로 하지 않는다. 본 발명의 입자를 작제하기 위하여, 감염된 개체로부터 얻은 뉴클레오티드 서열을 사용하는 것이 충분하다. 이것은 유전자 변형된 바이러스를 씨드-균주(seed-strain) 바이러스로 필요로 하는 백신을 제조하기 위한 전통적인 유정란 방식과 가장 대별되는 것이다. 본 발명의 입자는 고 생산능을 허용하는 현대의 일회용 조직 배양 수법을 이용하여 제조된다. 바칼로바이러스성 벡터 및 곤충 세포를 숙주 세포로서 사용하는 바람직한 실시형태에서 상기 제조 과정은 신속하게 준비될 수 있고, 또 생산 시간도 짧으며, 즉 유정란 방식과 비교하여 수개월이 아닌 수주 범위 내이다. 또한, 일회용 조직 배양시설의 작성은, 유정란 방식 시설을 세팅하는 것과 비교하여, 시간 소모가 적고 또 비용도 덜 든다. 따라서 전체 집단에 대하여 다량의 백신이 제조될 수 있고 또 단시간 구조 내에서 재생산될 수 있으며, 또 몇 개의 상이한 유형의 백신, 예컨대 계절성 인플루엔자 백신 및 유행성 인플루엔자 백신이 동시에 용이하게 제조될 수 있다. 유정란 방식 제조 공장의 수용 한계로 인한 1개 또는 다른 백신에 대한 보건 당국에 의한 어려운 결정은 필요하지 않을 것이다.
- [0023] 본 발명은 (a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프를 포함하는 상이한 에피토프 또는 상이한 단백질을 2 이상, 예컨대 2개, 3개, 4개 또는 5개, 또는 3의 배수, 예컨대 6개, 9개 또는 12개 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자에 관한 것이다. 3 이상의, 바람직하게는 4개 또는 그 이상의 상이한 에피토프 또는 에피토프를 포함하는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자가 바람직하다. 3의 배수, 예컨대 6개, 9개 또는 12개의 상이한 에피토프 또는 에피토프를 포함하는 상이한 단백질을 포함하는 재조합 바이러스-유사 입자가 또한 바람직하다. 상기 에피토프는 2개의 상이한 균주, 혈청형 또는 상이한 숙주에 특이적인 바이러스 균주로부터 선택되거나, 또는 3개의 상이한 균주, 혈청형 또는 상이한 숙주에 대해 특이적인 바이러스 균주로부터 선택되거나, 또는 4개의 상이한 균주 또는 혈청형으로부터 선택된다. 3개의 상이한 균주 또는 혈청형으로부터 선택된 몇 개의 에피토프를 포함하는 바이러스-유사 입자가 바람직하다. 2개 또는 3개의 상이한 숙주에 대하여 특이적인 바이러스 균주로부터 얻은 몇 개의 에피토프를 포함하는 바이러스-유사 입자가 또한 바람직하다.
- [0024] 또한 본 발명은 (a) 동일 바이러스의 상이한 바이러스성 균주로부터 및/또는 (b) 동일 바이러스의 상이한 혈청형으로부터 및/또는 (c) 상이한 숙주에 특이적인 상이한 바이러스성 균주로부터 선택되는 에피토프 또는 에피토프를 포함하는 상이한 단백질을 코딩하는 상이한 폴리뉴클레오티드를 2 이상, 예컨대 2개, 3개, 4개 또는 5개,

또는 3의 배수, 예컨대 6개, 9개 또는 12개 포함하는 벡터에 관한 것이다. 여기서 사용된 "폴리뉴클레오티드"는 12 내지 3'000개 뉴클레오티드의 사슬을 나타낼 수 있고, 또 일반적으로 표시되는 올리고뉴클레오티드를 포함하며, 또 상술한 상이한 바이러스성 공급원으로부터 얻은 바이러스성 유전자 또는 오픈 리딩 프레임, 특히 바이러스성 표면 단백질 또는 바이러스성 막 단백질을 암호화하는 유전자 또는 오픈 리딩 프레임일 수 있다.

- [0025] 상기 언급한 바람직한 바이러스-유사 입자를 코딩하는 벡터가 바람직하다.
- [0026] 서열번호: 1 내지 5로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터가 가장 바람직하다.
- [0027] 바람직한 실시형태로서, 본 발명의 바이러스-유사 입자는 다음을 포함한다:
- [0028] (1) 2개 또는 3개의 상이한 균주의 동일 유형의 표면 단백질 또는 동일 바이러스의 항원;
- [0029] (2) 상이한 바이러스성 균주, 예컨대 인플루엔자 바이러스 균주 H5N1 및 H1N1로부터 얻은 2 이상의 상이한 표면 단백질의 혼합물;
- [0030] (3) 상이한 숙주에 대하여 특이적인 바이러스, 예컨대 돼지, 인간 및/또는 조류 숙주에 대하여 특이적인 인플루엔자 바이러스로부터 얻은 상이한 표면 단백질의 혼합물.
- [0031] 본 발명의 바이러스-유사 입자에 포함되는 에피토프에 대한 공급원으로 간주되는 바이러스는 예를 들어, 인플루엔자 바이러스, HPV, HIV, CMV, Dengue, HCV 및 뉴캐슬병 바이러스이다. 에피토프는 다른 바이러스로부터 및 세균으로부터 유도될 수 있다. 특히 바람직한 것은 인플루엔자 바이러스이다. 인간 유두종 바이러스 (HPV)도 마찬가지로 바람직하다.
- [0032] 고려되는 벡터는 DNA 벡터이고, 또 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터일 수 있다. 이러한 벡터를 조립하는 방법은 종래 기술의 분자 생물학의 표준 방법이다. 바람직한 방법은 WO 2005/085456호 및 I. Berger et al., Nature Biotechnology 22, 1583, 2004에 기재된 멀티백 방법, 또는 WO 2007/054250호에 기재된 바와 같은 폴리백 방법이며, CAP™ 기술 및 종래 기술의 유전자 합성 기술과 조합된다. 이들 기술은 상이한 숙주 세포에서 발현하기에 적합한 다중 유전자 공동-발현 DNA 벡터 조립을 허용한다. 본 발명의 바람직한 DNA 벡터는 배칼로바이러스 벡터이다.
- [0033] 본 발명의 벡터의 발현을 위해 사용되는 숙주 세포는 원핵생물(예컨대 대장균(*E.coli*)) 또는 진핵생물 발현 세포주일 수 있다. 바람직한 배칼로바이러스 벡터의 발현을 위해 곤충 세포주가 바람직하다. 곤충 세포주의 예는 예컨대, SF9, SF21, Hi-5, Express Sf+, 및 S2 슈나이더(Schneider) 세포이다. 진핵생물에서 발현을 위해, 포유동물 세포가 바람직하고, 특히 인간 세포, 예컨대 HeLa, Huh7, HEK293, HepG2, BHK, CHO, MT-2, 골수 섬유아 세포, 일차 신경 세포, 또는 배아 세포가 바람직하다. 효모에서 발현을 위해 에스. 세레비시아에(*S. cerevisiae*), 에스. 폼베(*S. pombe*), 씨. 알비칸스(*C. albicans*), 또는 피.파스토리스(*P. pastoris*) 세포가 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 숙주 세포의 배양 및 증식은 특정 숙주 세포에 대해 적절한 조건을 제공하는 임의 용기, 생물배양기 또는 일회용 유닛에서 실시될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 바이러스-유사 입자는 백신으로서 사용될 수 있다. 또한 이들은 진단 도구에서 항원, 항체 생성을 위한 항원, 및 연구 개발 도구를 위한, 예컨대 바이러스 진입 연구 및 바이러스-숙주 상호작용 연구를 위한 바이러스 시뮬레이터로서 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 백신은 종래 기술에 공지된 바와 같이, 점도 조절 화합물, 안정화 화합물 및/또는 면역원성을 증가시키는 보조제를 경우에 따라 더 함유하는 수용액 중에 재조합 바이러스-유사 입자를 함유한다.
- [0037] 특별한 실시형태로서 H3N2 인플루엔자 바이러스-유사 입자는 Berger et al., Nature Biotechnology, 2004, WO2005/085456호 및 WO 2007/054250호 및 CAP™ 기술에 기재된 방법을 이용하여 작성한다. H1N1 인플루엔자 균주 A/Puerto Rico/834의 적어도 1개의 M1 및 M2 유전자는 PCR 증폭에 의해 인플루엔자 A/Brisbane10/2007의 HA 유전자 및 인플루엔자 A/Brisbane10/2007의 NA 유전자와 함께 전달 벡터 pFL(WO 2007/054250호, 도 1)에 클로닝된다. 이 작제물은 DNA 서열화에 의해 확인된다.
- [0038] 다른 특별한 실시형태로서, 혈청형 HPV16 및 HPV18 또는 2, 4, 6, 11, 31, 33-35, 39, 40-45, 51-53, 55-59, 62, 66, 68, 70, 73, 및 77 균주로부터 선택된 항원형의 적어도 1개 L1 유전자를 도입하기 위하여 동일 클로닝 수법을 이용하여 전달 벡터 벡터 pFL(도 1)에 클로닝한다.

[0039] 실험 부분

[0040] 대장균 세포에서 증식을 허용하는 멀티백(MultiBac) 또는 YFPMultiBac(WO 2005/085456호)로 불리는 배칼로바이러스성 벡터 및 CAPTM 기술과 통상의 계(Fitzgerald et al., Nature Methods, 3, 1021, 2006)를 이용하여 재조합 AcNPV(오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 다각체병(nuclear polyhedrosis) 바이러스, 배칼로바이러스)의 생성하였다. 10 ng의 다중 유전자 벡터를 DH10MultiBac 및/또는 DH10YFPMultiBac 반응능(competent) 세포에서 형질전환시켰다. 포지티브 클론은 청색/백색 스크리닝 및 PCR에 의해 선택하였다. 상응하는 MultiBac bacmid DNA는 Birnboim & Doly 방법을 이용하여 단리하였다. 재조합 AcNPV는 1 µg의 다중 유전자 MultiBac bacmid를 본 발명에 따른 제조 수순에 따라 형질감염 시약 Fugene(Roche 제조)을 사용하여 0.9x10⁶ Sf21 (Invitrogen) 세포에서 형질감염시키는 것에 의해 생성하였다. 바이러스 증폭은 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다(Fitzgerald et al., Nature Methods, 3, 1021, 2006). 모든 재조합 AcNPV의 역가는 Bac-to-Bac-Manual (Invitrogen)에 기재된 플라크 에세이에 의해 결정하였다. 감염다중도(multiplicity of infection, MOI), 세포수(TOI) 및 수확시간(TOH)와 같은 단백질 생산 변수는 소규모 발현 연구에 의해 분석하였다.

[0041] 실시예 1: 발현 벡터 작제물의 생성

[0042] 다양한 작제물을 제조하기 위하여 WO 2005/085456호에 기재된 방법에 따라서 전달 벡터 pFL(WO 2005/085456호 및 CAPTM 기술)에 존재하는 증식 모듈(multiplication module) M을 사용하였다. 에피토프의 DNA는 원래 바이러스로부터 바이러스성 RNA를 단리한 다음 역전사와 PCR(인플루엔자 바이러스 에피토프의 경우)와 조합하여 얻거나 또는 유전자 합성(Geneart 컴패니에 의해 제공)에 의해 얻었다. 역전사는 제조 수순에 따라 RevertAidTM H Minus First strand cDNA Synthesis kit (Fermentas)를 이용하여 실시하였다. cDNA (2 µL)를 PCR 반응에 대한 주형으로 사용하였다. 제조자의 수순을 기초로 하여 하기 조건을 이용한다. 50 µL 전체 부피 반응의 경우 0.2 mM dNTP (NEB), 1.2% DMSO, 0.5 µM 역방향 프라이머 및 정방향 프라이머(Microsynth), 10 µL 5x Phusion GC 반응 완충액 및 2U Phusion Hot Start 폴리머라제(Finnzyme)를 사용하였다. 다유전자 조립의 경우, 적절한 제한 부위(BstZ17I, SpeI, PmeI, AvrII)를 PCR을 이용하여 도입하였다. PCR 단편을 제한 효소로 절단한 다음 결찰시키고 또 형질전환 처리시켜 증식 모듈을 전달 벡터로 통합시켰다. 결찰은 500 ng 선형화된 전달 벡터(pFL), 4 µL PCR 생성물 및 1U T4-DNA-리가제(Fermentas)를 사용하여 4°C에서 철야로 실시하였다. 플라스미드를 생성하기 위하여 4 µL 결찰 용액을 50 µL 수용성 DH5a 세포에 부가하고 또 얼음상에서 30분간 배양하였다. 42°C에서 30초 동안 열충격처리시키고 또 4°C에서 2분간 냉각 쇼크 처리한 후, 200 µL LB 배지를 부가하고 또 37°C 및 220 rpm에서 1시간 동안 배양하였다. 80 µL의 세포 현탁액을, 적절한 항생물질, 이 경우, 100 µg 암피실린 및 100 µg 겐타마이신을 함유하는 LB 한천 플레이트 상에 플레이팅하였다. 모든 에피토프가 전달 벡터에 도입될 때까지 전체 과정을 반복하였다.

[0043] 인플루엔자 에피토프는 H3N2/Brisbane10/2007 균주로부터 선택된 유전자 HA 및 NA로부터 선택한 반면에, M1 및 M2로부터의 에피토프는 H1N1/Puerto Rico/834 균주로부터 선택하였다. M1 에피토프는 프로모터 p10에 의해 제어되며, 그 외 모든 에피토프는 다각체 프로모터 polh에 의해 제어되었다. 모든 에피토프는 동일 벡터 작제물(도 1A, 서열번호: 1) 상에 존재한다. 인플루엔자 B/플로리다/2006 단리물을 선택하여 유전자 HA, NA, M1 및 M2(도 1C, 서열번호: 3)으로부터 얻은 다중 에피토프와 함께 작제물을 생성하였다. 인간 유두종바이러스 에피토프는 암 관련 혈청형 HPV16 및 HPV18로부터 얻은 유전자 L1로부터 선택하며 또 1개 벡터 작제물에서 통일시켰다. 양쪽 에피토프는 다각체 프로모터 polh(도 1B, 서열번호: 2)에 의해 제어된다. 발현 수율을 향상시키기 위하여 p10 프로모터를 다른 작제물에서 결실시켰다(도 1E, 서열번호: 5). 다른 작제물에서 HPV16 에피토프는 p10 프로모터에 의해 제어되는 반면에, 다각체 프로모터 polh는 HPV18 에피토프에 대해 선택되었다(도 1D, 서열번호: 4).

[0044] 실시예 2: 재조합 배칼로바이러스의 생성

[0045] 이 바이러스는 그 표면 상에 에피토프를 나타내는 바이러스-유사 입자 또는 바이러스 시뮬레이터를 생성하기 위한 다중 에피토프를 함유한다. 상기 바이러스-유사 입자는 상이한 적용을 위해, 예컨대 인플루엔자 분야에서 백신으로서 사용될 수 있다. AcNPV-유도된 배칼로바이러스는 2008/2009-VLP 백신접종 캠페인을 위해 WHO에 의해 추천된 바이러스성 균주로부터 얻은 복수의 상이한 에피토프를 함유한다. 전달 벡터의 모든 유전자는 부위 특이적 재조합에 의해 WO 2005/085456호에 따른 수순에 따라서 MultiBac 세포에 전위(transposed)된다.

[0046] 10 ng 전달 벡터를 100 µL MultiBac 반응능 세포에 부가하고 또 4°C에서 30분간 배양하였다. 42°C에서 45초간

열충격 및 4°C에서 2분간 냉각 쇼크 처리 후, 400 μ l LB 배지를 부가하고 또 세포 용액을 37°C 및 220 rpm에서 4시간 동안 배양하였다. 상이한 희석물을 다양한 항생물질 내성을 함유하는 적절한 LB 한천 플레이트 상에 플레이팅하였다. 청색/백색 및 PCR 스크리닝을 기본으로 하여 몇 개의 정확한 MultiBac 클론을 선택하였다. 상용하는 MultiBac bacmid DNA는 Birnboim & Doly 방법을 이용하여 단리하였다. Sf9 또는 Sf21와 같은 곤충 세포를 초기 감염시키기 위하여 적어도 4개의 MultiBac bacmid 클론을 선택하여 재조합 AcNPV-유도된 배칼로바이러스를 생성하였다. 이것은 제조자의 수순에 따라서 형질감염 시약 Fugene(Roche 제조)를 사용하여 0.9×10^6 Sf21 (Invitrogen) 세포에서 1 μ g의 다중 유전자 MultiBac bacmid의 형질감염에 의해 생성되었다. 바이러스 증폭은 이전에 기재된 바와 같이 실시하였다(Fitzgerald et al., Nature Methods, 3, 1021, 2006; Bac-to-Bac-Manual, Invitrogen). 상기 바이러스를 증폭시켜 부피를 팽창시키고 또 Bac-to-Bac-매뉴얼 (Invitrogen)에 따른 플라크 에세이에 의해 측정된 감염성 역가를 증가시켰다. 최선의 발현 작제물은 50 mL의 소규모의 발현 실험에 이어 브라드포드 에세이(ADV, Cytoskeleton)에 의한 단백질 수율을 결정하는 것에 의해 결정되었다. 최고의 발현은 복수의 상이한 에피토프(도 2A)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 더욱 확인된다.

[0047] 실시예 3: 곤충 세포에서 다중 에피토프 인플루엔자 바이러스-유사 입자의 생산 및 정제

[0048] 최고의 발현 작제물을 결정한 후 세포주, 세포량(TOI), 재조합 바이러스 접종물의 양(감염다중도, MOI) 및 수집 시간(TOH)과 같은 바이오기술적 생산 변수는 50 mL 생물배양기에서 결정하였다. 상이한 TOI, MOI 및 TOH의 매트릭스는 Eibl, Riesen 및 John (Bioforum 03/2009)에 따라 또 Friesen J.(Bachelor thesis, University of Applied Science, Esslingen, Germany)에 따라 설계하였다. 분비된 또는 세포내 다중 에피토프 바이러스-유사 입자의 발현은 매일 샘플을 취하면서 6 내지 8일간 관찰하였다. 세포내 입자(예컨대 HPV)의 경우 세포 펠릿을 50 mM TrisCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1% TritonX100 을 사용하여 용균시키고 또 4°C 및 8000 x g에서 10분간 원심분리시켰다. 상청액에 존재하는 바이러스-유사 입자의 에피토프는 도트-블롯 장치(Biometra 제조)를 이용한 다음 특정 항체를 사용한 웨스턴 블로팅에 의해 더 확인하였다. 최고 수율을 초래하는 조건은 3 내지 4일 사이의 수집 시간을 선호하는 발현 변수로서 정의된다. 이들 정의된 변수에 따르면 상기 바이러스-유사 입자는 가을 조밤나방 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포 Sf9 및 Sf21에서 셰이커 플라스크 또는 웨이브 컬티백(wave cultibags) 중에서 생산되었다. 다중 에피토프의 경우 인플루엔자 바이러스-유사 입자 발현 Sf21 세포는 다음 조건으로 선택한다: 1.5×10^6 세포/mL, MOI 0.05 및 감염된지 4일 후 수집시간. 이 세포를 이산화탄소 및 우태아혈청 보충 없이 27°C에서 증식시켰다. 정의된 수집 시간에 따르면, 분비된 바이러스-유사 입자는 4°C, 500-1000 x g에서 20분간 원심분리하는 것에 의해 수집하였다. 상기 입자를 함유하는 상청액 부피는 100 kDa의 컷오프를 갖는 카세트(Sartocon-Slice 200, Sartorius 및 CentramateOS, PALL)를 사용하여 탄젠트 유동 여과에 의한 정제를 위해 감소시켰다. 바이러스-유사 입자의 정제는 측정가능한 크로마토그래피 방법 및 수크로오스 구배 초원심분리에 의해 실시하였다.

[0049] 상기 크로마토그래피 정제는 양이온 교환, 음이온 교환 및 겔 여과 크로마토그래피를 이용하는 다단계 정제이다. 그 상청액을 50 mM 포스페이트 완충액, pH 7.4 중, FPLC-계(AEKTA purifier, GE Healthcare)에 접속된 CantoQ 컬럼에 로딩하였다. 상기 입자는 50 mM 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7.4를 사용한 선형 구배로 염 농도를 증가시키는 것에 의해 용출시켰다. 입자 함유 분획을 모으고 또 겔 여과 크로마토그래피(서열번호: 1로부터 VLP, 도 3)에 의해 더 정제하였다. 정제는 50 mM 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.4 완충액에서 HighLoad Superdex 200 pg 컬럼을 이용하여 실시하였다. 모든 크로마토그래피 단계는 SDS-PAGE에 이어, 쿠마씨 염색 및 면역블로팅에 의해 분석하였다.

[0050] 실시예 4: 정제된 인플루엔자 바이러스-유사 입자의 분석

[0051] 상이한 에피토프의 존재를 확인하기 위하여, 정제 물질을 SDS-PAGE에 이어 쿠마씨 염색 또는 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 150 μ l의 상이한 크로마토그래피 분획을 4-12% Bis-Tris NuPAGE 겔(Invitrogen) 상에 로딩하고, 150 V에서 15분간 또 175 V에서 45분간 흘리고, SimplyBlueSafestain (Invitrogen)을 사용하여 쿠마씨 염색하였다.

[0052] 면역블로팅의 경우 반 건조 장치(BioRAD)를 이용하여 단백질을 19 V에서 40분간 니트로셀룰로오스 막(BioRAD)으로 전달하였다. 5% 비-지방-건조-밀크-TrisCl-Tween20(0.1%) 용액을 사용하여 30분간 비특이적 결합 부위를 블로킹한 후, 상기 막을 HA, NA 및 매트릭스 단백질에 대한 항체와 함께 4°C에서 철야로 배양하였다. 이 막을 TrisCl-Tween20 (0.1%) 완충액을 사용하여 수회 세척하였다. 일차 항체의 공급원에 따라서 2차 항체는 알칼리성 포스파타아제 또는 고추냉이-퍼옥시다아제와 연결된 항-마우스 또는 항-토끼를 검출에 사용하였다. 이들 단백질의 공존화는 1개의 발현 벡터 및 1개의 배칼로바이러스(도 3B, 서열번호: 1로부터)로부터 유도된 조립물과 생산

을 도시한다. 이러한 공존화는 유전자 HA, NA 및 매트릭스 단백질 M1 및 M2 (이들의 막 앵커 포함)을 함유하는 발현 작제물에 대해 도시될 수 있다.

[0053] 실시예 5: 인플루엔자 바이러스-유사 입자(VLP)의 작용성

[0054] VLP가 혈구응집소 단백질(HA)을 자신의 표면에 정확하게 통합하는지를 분석하기 위하여, 닭의 적혈구 세포(RBC)를 사용하여 표준 혈구 응집 에세이를 실시하였다(도 4, 서열번호: 3으로부터 얻은 VLP). 정제된 VLP의 이중 연속 희석은 V-형성된 96 웰 플레이트 중, PBS (1x)를 사용하여 실시하였다. 동량의 적혈구(1% 용액)를 부가하고 또 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 웰의 저부에서 RBC 응집물의 출현은 혈구 응집의 부족을 나타낸다. 역가는 RBC를 응집시키는 정제된 VLP 용액의 최고 희석의 역으로서 나타낸다. 얻어진 결과는 VLP가 닭의 적혈구를 응집시킬 수 있음을 나타내며 또 VLP 표면 상에서 HA의 존재를 간접적으로 나타낸다. 음성 대조군(PBS)은 어떠한 응집도 나타내지 않는다.

[0055] 실시예 6: 인플루엔자 VLP의 생체내 평가

[0056] VLP(서열번호: 3으로부터 제조됨)의 면역원성(면역계의 자극)은 0주 및 3주에 각각 최초 및 추가면역 스케줄로 피하로 면역화된 2그룹의 마우스를 사용하여 생체내에서 시험하였다. 면역화는 현탁액 중 50 또는 100 μ l (50 또는 100 ng)의 VLP를 사용하여 실시하였다. VLP 단독의 면역 반응의 품질을 결정하기 위하여, 보조제는 사용하지 않았다. 마우스를 3주 및 6주에 출혈시키고 또 혈청을 분석하여 면역화된 VLP에 대한 항체 반응을 조사하였다. 얻어진 결과는 VLP가 항체 면역 반응을 자극하는데 효과적임을 나타내었다. 면역화가 100 μ l에 의해 실시될 때 최고의 결과를 얻었으며, 이는 투여량 의존적 면역반응을 나타낸다. 추가 면역 후, 항-VLP 항체량의 분명한 증가가 관찰되었다. 예상한 바와 같이, 자연적 동물은 아무런 면역반응을 나타내지 않았다.

[0057] 면역반응의 특이성을 재확인하기 위하여, 6주에 혈구응집 억제 시험을 실시하여 특정 항-HA 항체의 존재를 분석하였다. 결과는 특정 항-인플루엔자-HA 항체가 희석 128 (마우스 6) 및 희석 256 (마우스 8)까지는 적혈구 응집을 억제할 수 있음을 나타낸다. 자연적 마우스의 혈청 샘플을 사용한 경우에는 혈구응집 억제가 관찰되지 않는다. 새롭게 생성된 다중 에피토프 인플루엔자-VLP는 투여량 의존적 방식으로 면역계를 자극할 수 있다. 면역계가 추가면역에 의해 재자극되면, 상기 면역반응은 적어도 15배 증가한다. 유도된 면역반응의 특이성은 ELISA 및 혈구응집 시험에 의해 분석하였다.

[0058] 실시예 7: 인간 유두종바이러스 에피토프를 갖는 다중 에피토프 바이러스-유사 입자의 다양한 세포주에서 생산 및 정제

[0059] 세포주, 세포량(TOI), 재조합 바이러스 접종물의 양(감염 다중도, MOI) 및 수집 시간(TOH)과 같은 바이오기술적 생산 변수는 Eibl et al.(Bioforum 3/2009)에 따른 50 mL 생물배양기(도 7)에서 결정하였다. 이들 특정된 변수에 따르면 상기 바이러스-유사 입자는 가을 조밤나방 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포 Sf9 및 Sf21에서 웨이커 플라스크 또는 웨이브 컬티백 중에서 생산되었다. 다중 에피토프의 경우 유두종 바이러스-유사 입자는 2×10^6 세포/mL, MOI 0.5 및 감염후 3일의 수집 시간을 이용하는 Sf21세포에서 서열번호: 2로부터 발현되었다. 상기 세포들을, 이산화탄소 및 우태아혈청 보충 없이, 27°C에서 증식시켰다. 소정 수집 시간(감염된 후 3일)에 세포내 바이러스-유사 입자는 4°C, 500-1000 x g에서 20분간 원심분리에 의해 수집하였다. 이들 세포는 저장액 포스페이트 완충액을 사용한 다음 초음파에 의해 용균시켰다. 4°C 및 2000 x g에서 원심분리 단계 후 상청액을 수집하였다. 바이러스-유사 입자의 정제는 측정가능한 크로마토그래피 방법 및 수크로오스 구배 초원심분리에 의해 실시하였다. 크로마토그래피 정제는 양이온 교환, 음이온 교환 및 겔 여과 크로마토그래피를 사용하는 다단계 정제이다. 이 상청액은 50 mM 포스페이트 완충액, pH 7.4 중 FPLC-계(AEKTA purifier, GE Healthcare)에 연결된 CptoDEAE 컬럼 상에 로딩하였다. 50 mM 포스페이트, 1 M NaCl, pH 7.4를 사용하는 선형 구배로 염 농도 증가에 의해 입자를 용출시켰다(도 8A). 입자 함유 분획을 모으고 또 히드록시아파타이트 컬럼을 이용하여 더 정제하였다. 20 mM 포스페이트 완충액, pH 7.0에서 결합한 다음 500 mM 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.0를 사용하여 선형 구배 용출시켰다. 다중 에피토프 입자를 연마하기 위하여 겔 여과 크로마토그래피를 실시하였다. HighLoad Superdex 200 pg 컬럼을 이용하여 50 mM 포스페이트, 150 mM NaCl, pH 7.4 완충액에서 정제를 실시하였다. 모든 크로마토그래피 단계는 SDS-PAGE에 이어 쿠마씨 염색 및 면역블롯팅에 의해 분석하였다.

[0060] 실시예 8: 정제된 키메라 인간 유두종 바이러스-유사 입자의 정제

[0061] 정제된 물질 중에서 상이한 에피토프의 존재를 확인하기 위하여, 서열번호: 2로부터 제조한 VLP는 SDS-PAGE에 이어 쿠마씨 염색(도 8B) 및 웨스턴 블롯(도 8C)에 의해 분석하였다. 면역블롯팅의 경우 상이한 혈청형의 L1 단

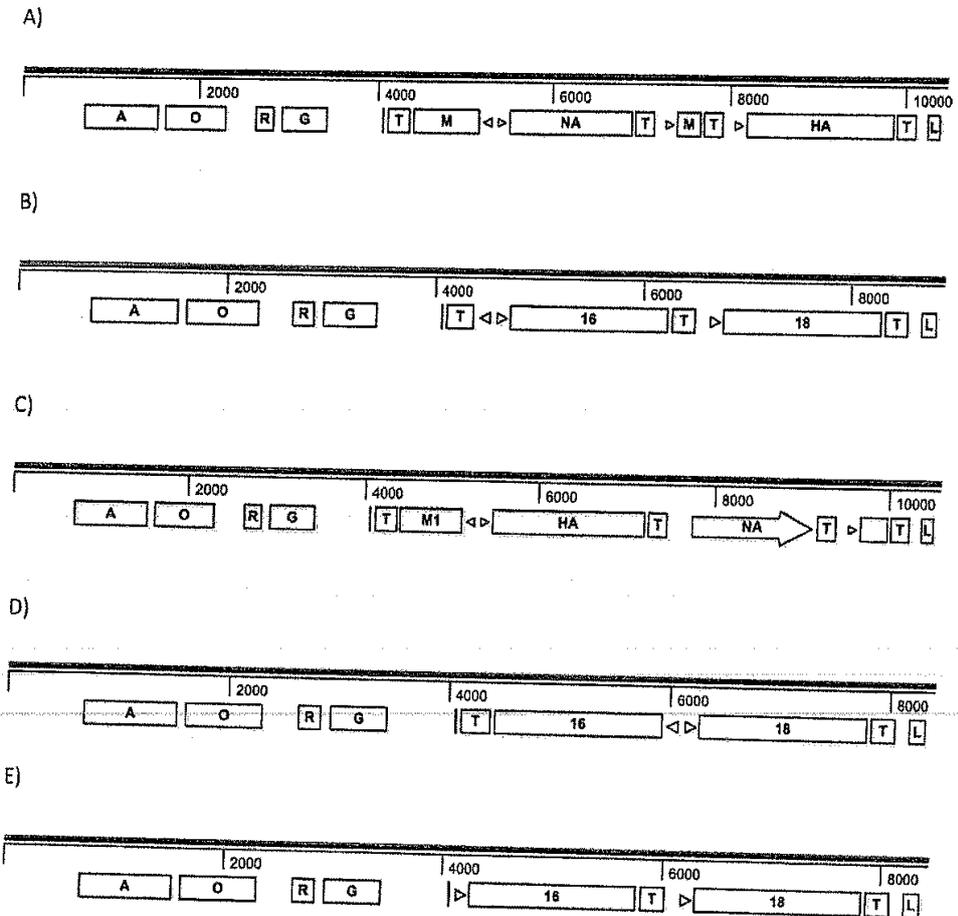
백질에 대한 항체를 사용하였다. 150 μ l의 상이한 크로마토그래피 분획을 4-12% Bis-Tris NuPAGE 겔 (Invitrogen) 상에 로딩하고, 150 V에서 15분간 또 175 V에서 45분간 흘려주고 또 SimplyBlueSafestain(Invitrogen)을 사용하여 쿠마제 염색하였다. 면역블롯팅의 경우 반 건조 장치(BioRAD)를 이용하여 19 V에서 40분간 니트로셀룰로오스 막(BioRAD)으로 단백질을 전달하였다. 5% 비-지방-건조-밀크-TrisCl-Tween20 (0.1%) 용액을 사용하여 30분 동안 비특이적 결합 부위를 블로킹한 후, 상기 막을 L1 에피토프에 대한 항체와 함께 4°C에서 철야로 배양하였다. HPV16 검출에는 Camvir 항체(SantaCruz)가 사용되었고 또 HPV18 검출에는 항-HPV18ab(Abcam)가 사용되었다. 상기 막을 TrisCl-Tween20 (0.1%) 완충액으로 수회 세척하였다. 이 막을 검출을 위해 알칼리성 포스파타아제와 접속된 항-마우스 항체와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 에피토프는 BCIP/NPT 용액에 의해 검출하였다. 이들 단백질의 공존화는 1개 발현 벡터 및 1개 배칼로바이러스로부터 유도된 복합체형성(assembly) 및 생산을 나타낸다.

[0062] 실시예 9: 키메라 인간 유두종 바이러스-유사 입자(VLP)의 작용성

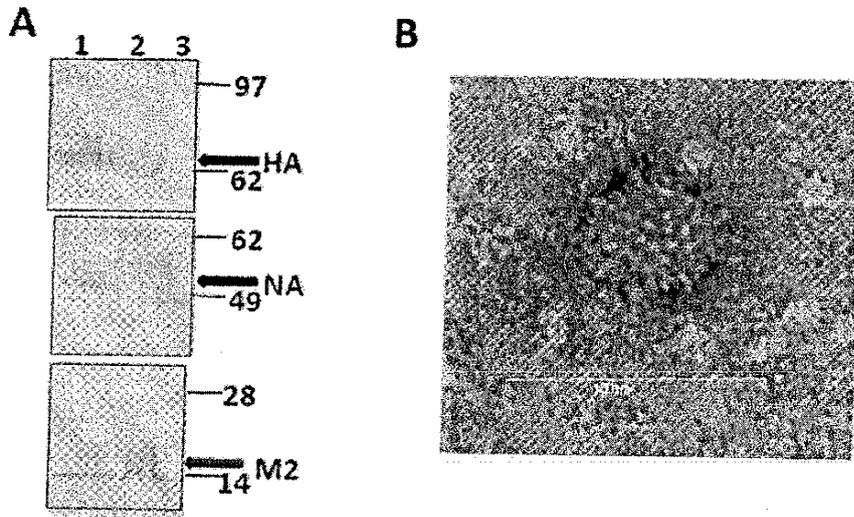
[0063] 서열번호: 2로부터 제조된 인간 유두종 바이러스-유사 입자가 정확하게 L1 단백질의 표면에 통합되는지를 분석하기 위하여, 표준 ELISA 에세이를 실시하였다. 정제된 VLP의 이중 연속 희석은 V-형성된 96 웰 플레이트에서 PBS(1x)를 사용하여 실시하였다. 동량의 혈청형 특정 항체(농도: 1:1000)를 부가하고 또 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. L1 단백질에 대한 항체의 적합한 결합은 고주냉이 퍼옥시다아제 및 화학발광 검출 계와 함께 이차 항체를 사용하여 검출하였다. 얻어진 결과는 항체가 재조합 발현된 에피토프에 투여량 의존적 방식으로 결합됨을 나타낸다. 음성 대조군(PBS)은 아무런 결합을 나타내지 않았다.

도면

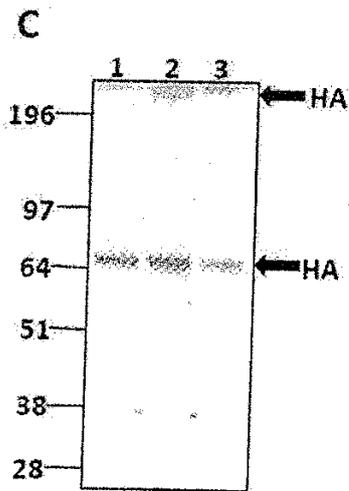
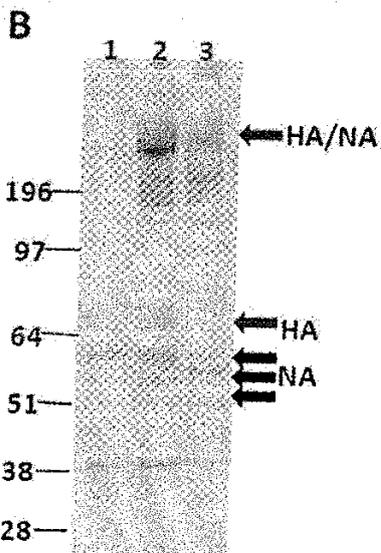
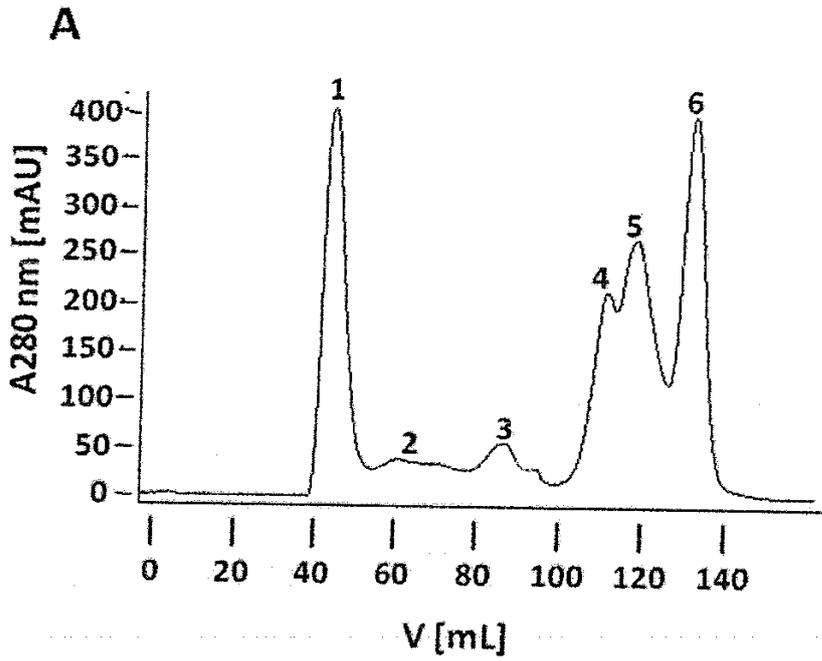
도면1



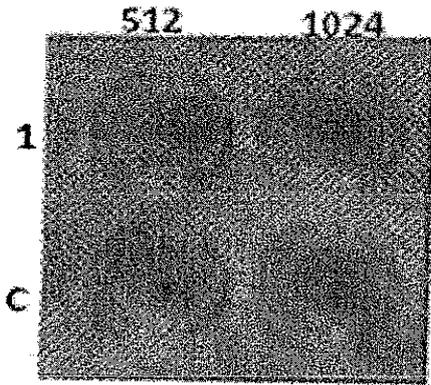
도면2



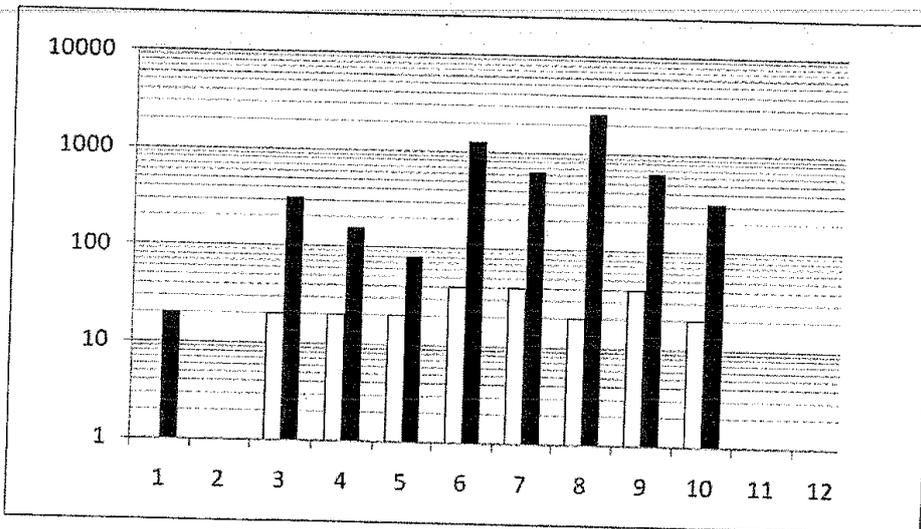
도면3



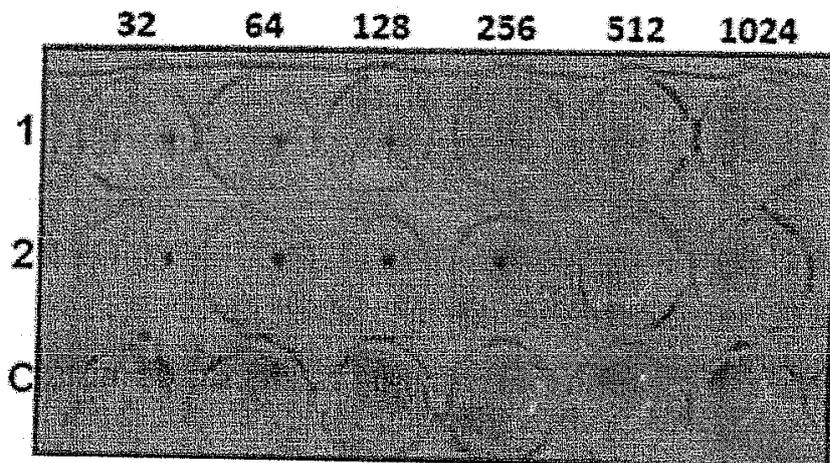
도면4



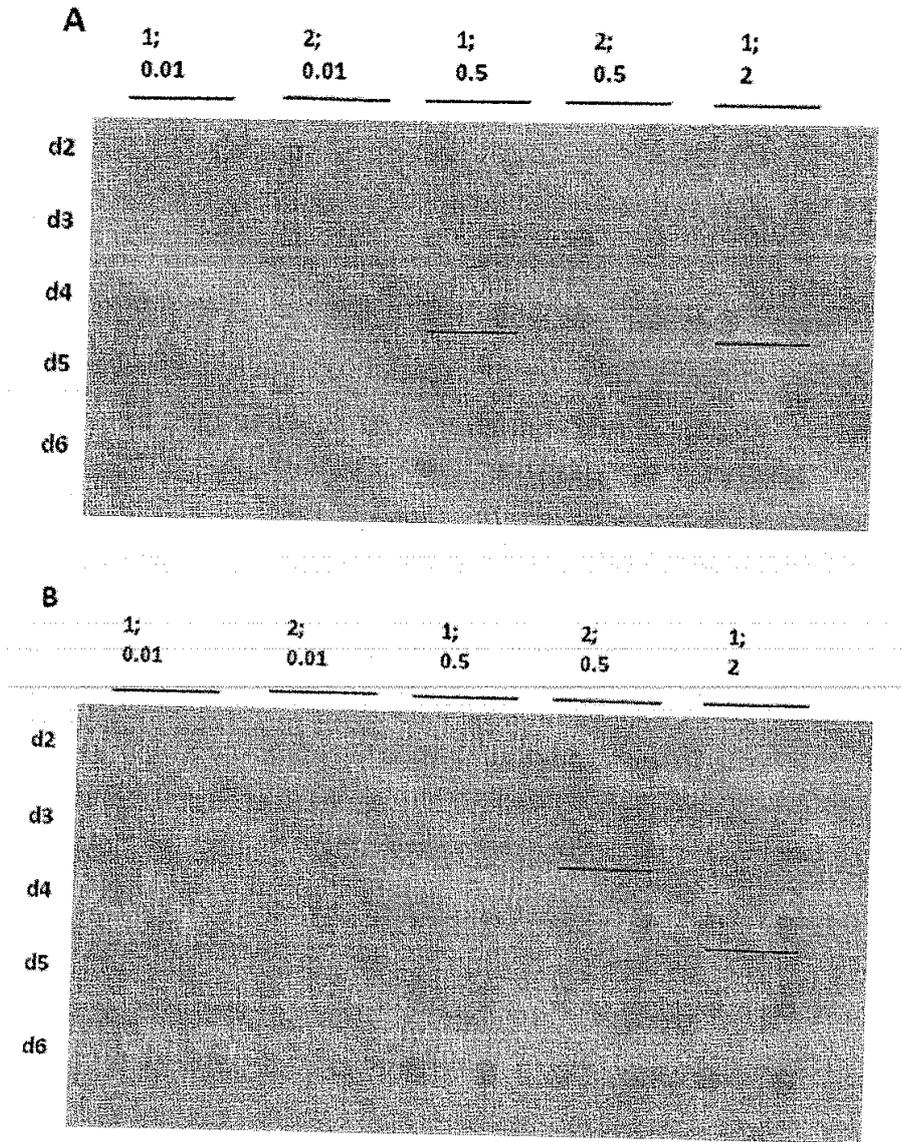
도면5



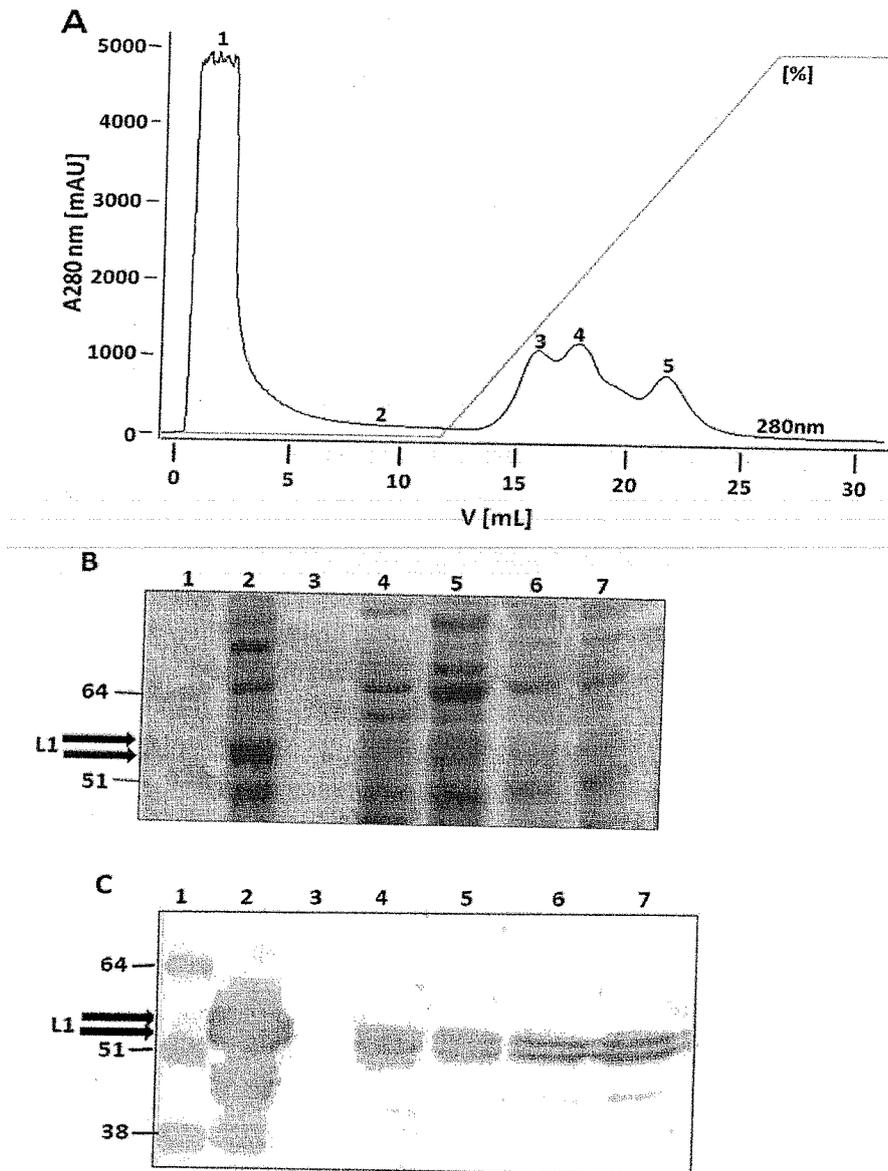
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Redbiotec AG

John, Corinne

Schaub, Christian

Wellnitz, Sabine

<120> Recombinant virus-like particles encoded by multi-gene vector

<130> P371A

<150> EP09159287.3

<151> 2009-05-01

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10482

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> multi-epitope influenza A virus-like particle

<400> 1

```

ttctctgtca cagaatgaaa atttttctgt catctcttcg ttattaatgt ttgtaattga      60

ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc      120
attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt      180
agcgcgccgt cctttcgttt tcttccttc ctttctgcc acgttcgccg gctttccccg      240
tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgccttac ggcacctcga      300
ccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg      360
ttttgcctt ttgacgttgg agtccacgtt cttaatagtg gactcttggt ccaaactgga      420
acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg      480

gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata      540
ttaacgtta caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt      600
tatttttcta aatacattca aatagtatc cgtcatgag acaataacce tgataaatgc      660
ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc      720
ccttttttgc ggcattttgc cttctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa      780
aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg      840
glaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag      900

ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtt ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc      960
gcatacacta ttctcagaat gacttgggtt agtactcacc agtcacagaa aagcatctta      1020
cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg      1080
cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca      1140
acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac      1200
caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat      1260
taactggcga actacttact ctagecttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg      1320

ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata      1380

```

aatctggagc cggtagagcgt gggctctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta 1440
agccctcccc tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 1500
atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaaactg tcagaccaag 1560
tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg 1620
tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 1680
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 1740

taatctgctg ctigcaaaca aaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1800
aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 1860
ctgtttctct agttagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 1920
catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggtctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1980
ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 2040
ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 2100
agcgtgagct atgagaaaag gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 2160

taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgcga cgagggagct tccaggggga aacgcctggt 2220
atctttatag tctgtcggg tttgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 2280
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cgtttcctgg 2340
ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctcgtt atcccctgat tctgtggata 2400
accgtattac gccttttgag tgagctgata ccgctcggc cagccgaacg accgagcgc 2460
gagagtcagt gagcaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 2520
tgtgcggtat ttcacaccgc atagaccagc cgcgtaacct ggcaaaatcg gttacggtt 2580

agtaataaat ggatgccctg cgtaagcggg tgtgggcgga caataaagtc ttaactgaa 2640
caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag acagaatagt tgtaactga 2700
aatcagtcca gttatgctgt gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaact 2760
cttcattttc tgaagtgcaa attgccctc gtattaaaga gggcgtggc caagggcatg 2820
gtaaagacta tattcgcggc gttgtgacaa tttaccgaac aactccgagg ccgggaagcc 2880
gatctcggct tgaacgaatt gttaggtggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcacac 2940
ttcttccgt atgcccact ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaactctg 3000

ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag 3060
cgcggtggca atgccctgcc tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat 3120
ctcactacgc ggetgctcaa acttgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc 3180
ttcttggctg aaggcagcaa gcgcatgaa tgccttacta cggagcaagt tcccaggta 3240

atcggagtcc ggctgatggt gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag 3300
 atcaagagca gcccgatgg atttgacttg gtcagggccg agcctacatg tgcgaatgat 3360
 gcccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcggt 3420

 gctgctgctg aacatcggtg ctgctccata acatcaaaca tcgaccacag gcgtaacgcg 3480
 cttgctgctt ggatgccga ggcatagact gtacaaaaaa acagtcataa caagccatga 3540
 aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc gttcggtcaa ggttctggac cagttgctg 3600
 agcgcatacg ctacttgcac tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgac aactgggttc 3660
 gtgccttcat ccgtttccag ggtgtgctgc acccggaac cttgggcagc agcgaagtcg 3720
 aggcatttct gtctggctg gcgaacgagc gcaaggtttc ggtctccacg catcgtcagg 3780
 cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg cccttgcttc 3840

 aggagatcgg tagacctcg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccgatgaag 3900
 tggttcgcac cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcggccag gactctagct 3960
 atagtcttag tggttggcta cagctttgtt tgtactatca acaggttgaa ctgctgatca 4020
 acagatcctc tacgcccggc cggtaccata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 4080
 tctggtttaa acgtaccctg agtggctatg gcagggcttg ccgccccgac gttggctgcg 4140
 agccctgggc cttcaccga acttgggggt tggggtgggg aaaaggaaga aacgcggcg 4200
 tattggtccc aatggggtct cggtggggta tcgacagagt gccagccctg ggaccgaacc 4260

 ccgctttat gaacaaacga cccaacacc gtgcgtttta ttctgtcttt ttattgccgt 4320
 catagcggg gttccttccg gtattgtctc cttccgtgtt tcagttagcc tccccatct 4380
 cccgtaccg catgctatgc atgcggccgc tcaactgaac cgttgcactc gcaccccat 4440
 tcgtttctga taggcctgca aattttcaag aagatcattt ttcagaccag cactggagct 4500
 aggatgagtc ccaatggttc tcatcgcttg caccatttgc ctagcctgac tagcaacctc 4560
 catggcctct gctgcttct cactcgatcc agccatttgc tccatagcct tagctgtagt 4620
 gctggctaaa accattctgt tctcatgtct gattagtgga ttggttgttg tcaccatttg 4680

 cctatgagac cgatgctggg agtcagcaat ctgttcacag gttgcacata ccaggccaaa 4740
 tgccacttca gtggtcacag cccccatct gttgtatag aggccatag aactggcaag 4800
 tgaccagca gaataactga gtgagatttc tttggcccga tggaatgtta tctccctctt 4860
 gagcttcta tacagtttaa ctgctttgic catgttattt ggatccccgt tcccattaag 4920
 ggcagtttg acaaagcgtc tacgctgcag tctcgtca ctgggcacgg tgagcgtgaa 4980
 cacaaatcct aaaateccct tagtcagagg tgacaggatt ggtcttctct ttagccattc 5040

catgagaacc tcaagatcgg tgttttccc tgcaaagaca tcttcaagtc tctgtgcat 5100

 ctcggtttg agggggcctg acgggatgat agagagaacg tacgtttcga cctcggttag 5160
 aagactcatg gtggatccat cccgggtgat caagtcttcg tcgagtgatt gtaaataaaa 5220
 tgaatttac aglatagtat ttttaattaat atacaaatga tttgataata attcttattt 5280
 aactataata tattgtgttg ggttgaatta aaggtccgta tactagtatc gattcgcgac 5340
 ctactccgga atattaatag atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa 5400
 ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga 5460
 ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atccaccatg aatccaaatc aaaagataat 5520

 aacgattggc tctgtttctc tcaccatttc cacaatatgc ttcttcatgc aaattgcat 5580
 cttgataact actgtaacat tgcatttcaa gcaatatgaa ttcaactccc ccccaaacia 5640
 ccaagtgatg ctgtgtgaac caacaataat agaagaagaa ataacagaga tagtgtatct 5700
 gaccaacacc accatagaga aggaatatg ccccaacta gcagaataca gaaattggtc 5760
 aaagccgcaa tgtgacatta caggatttgc accttttctt aaggacaatt cgattaggct 5820
 ttccgctggt ggggacatct ggggtgacaag agaaccttat gtgtcatgcg atcctgacaa 5880
 gtgttatcaa ttigcccttg gacagggaac aacactaac aacgtgcatt caaatgacac 5940

 agtacgtgat aggaccctt atcggacctt attgatgaat gagttaggtg ttccttttca 6000
 tctggggacc aagcaagtg gcatagcatg gtccagctca agttgtcagc atggaaaagc 6060
 atggctgcat gtttgtataa cgggggatga taaaaatgca actgctagct tcatttacia 6120
 tgggaggctt gtagatagta ttgtttcatg gtccaaagaa atcctcagga cccaggagtc 6180
 agaatgcgtt tgiatcaatg gaacttgtac agtagtaatg actgatggga gtgcttcagg 6240
 aaaagctgat actaaaatc tattcattga ggaggggaaa atcgttcata ctacacatt 6300
 gtcaggaagt gtcagcatg tcgaggagtg ctctgctat cctcgatc ctggtgtcag 6360

 atgtgtctgc agagacaact ggaaaggctc caataggccc atcgtagata taacataaaa 6420
 ggatcatagc actgtttcca gttatgtgtg ttcaggactt gttggagaca caccagaaa 6480
 aaacgacagc tccagcagta gccattgttt ggatcctaac aatgaagaag gtggtcatgg 6540
 agtgaaggc tgggcctttg atgatgaaa tgactgtggt atgggaagaa cgatcagcga 6600
 gaagtgcgc ttaggtatg aaaccttcaa agtcattgaa ggctgggtcca accctaagtc 6660
 caaattgcag ataaataggc aagtcatagt tgacagaggt aataggtccg gttattctgg 6720
 tattttctct gttgaaggca aaagctgcat caatcggtgc ttttatgtgg agttgataag 6780

gggaagaaaa gaggaactg aagtcttgig gacctcaaac agtattgttg tgttttggg 6840
 cacctcaggt acatatggaa caggctcatg gcctgatggg gcggacatca atctcatgcc 6900
 tatataagta ctagaggatc ataatcagcc ataccacatt tgtagagggt ttacttgctt 6960
 taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttggtt 7020
 ttaacttggt tattgcagct tataatgggt acaataaag caatagcatc acaaattca 7080
 caaataaagc attttttca ctgcattcta gttgtgggtt gtccaaactc atcaatgat 7140
 cttatcatgt ctggatctga tcactgcttg agcctagaag atccggctgc taacaaagcc 7200

 cgaaaggaag ctgagttggc tgctgtggct agcttatcta gaaatattaa tagatcatgg 7260
 agataattaa aatgataacc atctcgcaa taaataagta ttttactggt ttcgtaacag 7320
 ttttgaata aaaaaaccta taaatattcc ggattattca taccgtcca ccatcgggcg 7380
 caccatgagt ctctaacgg aggtcgaaac gcctatcaga aacgaatggg ggtgcagatg 7440
 caacggttca agigatcctc tcactattgc cgcaaatatc attgggatct tgcacttgac 7500
 attgtggatt ctgatcgtc ttttttcaa atgcatttac cgtcgttta aatcggact 7560
 gaaaggaggg cttctacgg aaggagtgcc aaagtctatg agggaagaat atcgaaagga 7620

 acagcagagt gctgtgatg ctgacgatgg tcattttgtc agcatagagc tggagtaagt 7680
 actagaggat cataatcagc cataccacat ttgtagagggt tttacttgct ttaaaaaacc 7740
 tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttgtt gtttaactgt 7800
 ttattgcagc ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag 7860
 ctttttttc actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg 7920
 tctggatctg atcactgctt gagcctagaa gatccggctg ctaacaaagc cggaaaggaa 7980
 gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactatcat aaccggaata ttaatagatc 8040

 atggagataa ttaaaatgat aaccatctcg caaataaata agtattttac tgttttcgta 8100
 acagttttgt aataaaaaa cctataaata ttccggatta ttcataccgt cccaccatcg 8160
 ggccgggac caccatgaag actatcattg ctttgagcta cattctatgt ctggttttca 8220
 ctcaaaaact tcccggaat gacaacagca eggcaacgct gtgccttggg caccatgcag 8280
 taccaaacgg aacgatagtg aaaacaatca cgaatgacca aattgaagtt actaatgcta 8340
 ctgagctggt tcagagtcc tcaacagggt aaatatgcca cagtcctcat cagatccttg 8400
 atggagaaaa ctgcacacta atagatgctc tattgggaga cctcagtgat gatggcttcc 8460

 aaaaagaaga atgggacctt tttgtgaac gcagcaaagc ctacagcaac tgttacctt 8520
 atgatgtgcc ggattatgcc tcccttaggt cactagtgc ctcacggc acactggagt 8580
 ttaacaatga aagcttcaat tggactggag tcactcaaaa cggaacaagc tctgcttgca 8640

taaggagatc taataacagt ttcttttagta gattgaattg gttgaccac ttaaaattca 8700
 aataccagc attgaacgtg actatgcaa acaatgaaa atttgacaaa ttgtacattt 8760
 ggggggttca ccacccgggt acggacaatg accaaatctt cccgtatgct caagcatcag 8820
 gaagaatcac agtctctacc aaaagaagcc acaaaactgt aatcccgaat atcggatcta 8880

 gaccagagt aaggaatata cccagcagaa taagcatcta ttggacaata gtaaaaccgg 8940
 gagacatact ttgattaac agcacaggga atctaattgc tcctaggggt tacttcaaaa 9000
 tacgaagtgg gaaaagctca ataatgagat cagatgcacc cattggcaaa tgcaattctg 9060
 aatgcatcac tccaacgga agcattccca atgacaaacc attccaaaat gtaaacagga 9120
 tcacatacgg ggctgtccc agatatgtta agcaaacac tctgaaattg gcaacaggga 9180
 tgcgaaatgt accagagaaa caaactagag gcataattgg cgcaatcgcg ggtttcatag 9240
 aaaatggttg ggagggaaatg gtggatggtt ggtacggtt caggcatcaa aattctgagg 9300

 gaataggaca agcagcagat ctcaaagca ctcaagcagc aatcgatcaa atcaatggga 9360
 agctgaatag gttgatcggg aaaaccaacg agaaattcca tcagattgaa aaagaattct 9420
 cagaagtcca agggagaatt caggaccttg agaaatatgt tgaggacacc aaaatagatc 9480
 tctggtcata caacgcggag cttctgtttg ccttgagaa ccaacataca attgatctaa 9540
 ctgactcaga aatgaacaaa ctgtttgaaa aaacaaagaa gcaactgagg gaaaatgctg 9600
 aggatatggg caatggttgt ttcaaaatat accacaaatg tgacaatgcc tgcataggat 9660
 caatcagaaa tggaaactat gaccacgatg tatacagaga tgaagcatta aacaaccggt 9720

 tccagatcaa gggcgttgag ctgaagtcag gatacaaaga ttggatccta tggatttctt 9780
 ttgccatata atgttttttg ctttgtgttg ctttgttggg gttcatcatg tgggcctgcc 9840
 aaaaaggcaa cattaggtgc aacatttgca tttagtact agaggatcat aatcagccat 9900
 accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cetgaacctg 9960
 aaacataaaa tgaatgcaat tgtttgtgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac 10020
 aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt 10080
 tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatctgac actgcttgag 10140

 cctagaagat cggctgcta acaaagcccg aaaggaagct gattggctg ctgccaccgc 10200
 tgagcaataa ctatcatac ccctaggaga tccgaaccag ataagtgaaa tctagtcca 10260
 aactattttg tcatttttaa ttttcgtatt agcttacgac gctacacca gttcccatct 10320
 attttgcac tcttcctaa ataactcta aaaactccat tccaccct cccagttccc 10380
 aactattttg tccgccaca gcggggcatt tttcttctg ttatgttttt aatcaaacat 10440
 cctgccaact ccatgtgaca aaccgtcatc ttcggctact tt 10482

<210> 2

<211> 8917

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> multi-epitope human papilloma virus-like particle

<400> 2

ttctctgtca cagaatgaaa attttctgt catctcttcg ttattaatgt ttgtaattga	60
ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc	120
attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt	180
agcgcctcct cctttcgctt tcttccttc ctttctgcc acgttcgccg gctttccccg	240
tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga	300
ccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgcctt gatagacggt	360
ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt cttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga	420
acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg	480
gcctatttgt taaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata	540
ttaacgctta caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt	600
tatttttcta aatacattca aatattgata cgctcatgag acaataaacc tgataaatgc	660
ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gccttattc	720
ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa	780
aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg	840
gtaagatcct tgagagtttt gcccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag	900
ttctgctatg tggcgcggta ttateccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc	960
gcatacacta ttctcagaat gacttgggtt agtactcacc agtcacagaa aagcatctta	1020
cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aaccatgagt gataaactg	1080
cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca	1140
acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac	1200
caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat	1260
taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg	1320
ataaagttagc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata	1380
aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta	1440
agccctcccc tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa	1500

atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaaactg tcagaccaag 1560
 ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg 1620

 tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccetta acgtgagttt tegtccact 1680
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 1740
 taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1800
 aagagctacc aactcctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata 1860
 ctgttcttct agttagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 1920
 catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgct 1980
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 2040

 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 2100
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 2160
 taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgc caagggagct tccaggggga aacgcctggt 2220
 atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 2280
 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccctttta cggttcctgg 2340
 ccttttgctg gccttttct cactgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata 2400
 accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcggc cagccgaac accgagcga 2460

 gcgagtcagt gagcagggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 2520
 tgtgcggtat ttacaccgc atagaccagc cgcgtaacct ggcaaatcg gttacggttg 2580
 agtaataaat ggatgcctg cgtaagcggg tgtgggcgga caataaagtc ttaaaactgaa 2640
 caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag acagaatagt tgtaaactga 2700
 aatcagtcga gttatgctg gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaaact 2760
 cttcattttc tgaagtcaa attgccctc gtattaaaga gggcgtggc caaggcatg 2820
 gtaaagacta tattcgccg gttgtgacaa ttaccgaac aactccgcg cgggaagcc 2880

 gatctcggt tgaacgaatt gttagtggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcacac 2940
 ttcttcccgt atgcccact ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaactctg 3000
 ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag 3060
 cgcggtggca atgcccctcc tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat 3120
 ctcaactacg ggctgctcaa acttgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc 3180
 ttcttggctg aaggcagcaa gcgcgatgaa tgtcttacta cggagcaagt tcccaggta 3240

atcggagtcc ggctgatggt gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag 3300

 atcaagagca gcccgcatgg atttgacttg gtcagggccg agcctacatg tgcgaatgat 3360
 gcccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg ccttgcctgcg taacatcggt 3420
 gctgctgcgt aacatcggtg ctgctccata acatcaaca tcgaccacg gcgtaacgcg 3480
 cttgctgctt ggatgccga ggcatagact gtacaaaaa acagtcataa caagccatga 3540
 aaaccgccac tgcgcggtta ccaccgctgc gttcgggtcaa ggttctggac cagttgcgtg 3600
 agcgcatacg ctacttgcac tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc 3660
 gtgccttcat cgtttccac ggtgtgcgtc acccggcaac cttgggcagc agcgaagtgc 3720

 aggcatttct gtcttgctg gcgaacgagc gcaaggtttc ggtctccacg catcgtcagg 3780
 cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg cccttgcttc 3840
 aggagatcgg tagacctcgg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccgatgaag 3900
 tggttcgcac cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcggccag gactctagct 3960
 atagtcttag tggttggcta cagctttgtt tgtactatca acaggttgaa ctgctgatca 4020
 acagatcctc tacgcggccg ccgtaccata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 4080
 tctggtttaa acgtaccctg agtggtctatg gcagggcttg ccgccccgac gttggctgcg 4140

 agccctgggc cttcaccga acttgggggt tggggtgggg aaaaggaaga aacgcgggcg 4200
 tattggtccc aatggggtct cgggtggggt tgcacagagt gccagccctg ggaccgaacc 4260
 ccgcgtttat gaacaaacga cccaacacc gtgcgtttta ttctgtcttt ttattgccgt 4320
 catagcggg gttccttccg gtattgtctc cttccgtgtt tcagttagcc tccccatct 4380
 cccggtaccg catgctatgc atatccggg tgatcaagtc ttcgtcagat gattgtaaat 4440
 aaaatgtaat ttacagtata gtattttaat taatatacaa atgatttgat aataattctt 4500
 atttaactat aatataattg gttgggttga attaaaggtc cgtatactag tatcgattcg 4560

 cgacctactc cggaatatta atagatcatg gagataatta aaatgataac catctcgaac 4620
 ataaataagt attttactgt tttcgtaca gttttgtaat aaaaaaacct ataaatattc 4680
 cggattattc ataccgtccc accatcgggc gcggatccgc caccatgtcc ctgtggctgc 4740
 cctccgagge taccgtgtac ctgcccccg tgccccgtgc caagtggtg tccaccgacg 4800
 agtacgtggc tcgtaccaac atctactacc acgctggcac ctccccctgc ctggctgtgg 4860
 gtcacccta ctccccatc aagaagccca acaacaaca gatcctgggtg cccaaggtgt 4920
 ccggcctgca gtaccgtgtg ttccgtatcc acctgcccga cccaacaag ttcggtttcc 4980

ccgacacctc ctictacaac cctgacaccc agcgcctcgt gtgggcttgc gtgggcgtgg 5040
 aggtcggccg tggccagccc ctgggtgtcg gtatctccgg tcacccctg ctgaacaagc 5100
 tggacgacac cgagaacgct tccgcttacg ctgctaacgc tgggtgtcgac aaccgcgagt 5160
 gcatctccat ggactacaag cagaccagc tgtgcctgat cggttgcaag ccccccacg 5220
 gcgagcactg gggcaagggt tccccctgca ccaacgtggc tgtgaacccc ggcgactgcc 5280
 cccctctcga gctgatcaac accgtgatcc aggacggcga catggtggac accggtttcg 5340
 gtgctatgga cttcaccacc ctgcaggctc acaagtccga ggtgccctg gacatctgca 5400

 cctccatctg caagtacccc gactacatca agatgggtgc cgagccctac ggcgactccc 5460
 tgtttctcta cctcgcgtgt gagcagatgt tcgtgcgtca cctgttcaac cgtgctgggtg 5520
 ctgtgggcga gaacgtgccc gacgacctgt acatcaaggg ttccggttcc accgtaacc 5580
 tggcttccag caactacttc cctaccccct ccggttccat ggtcacctcc gacgctcaga 5640
 tcttcaacaa gcctactgg ctgcagcgtg ctcagggtca caacaacggt atctgctggg 5700
 gcaaccagct gttcgtgacc gtggtcgaca ccaccgctc caccaacatg tctctgtgcg 5760
 ctgctatctc cacctccgag actacctaca agaacaccaa cttcaaggag tacctgcgtc 5820

 acggcgagga gtacgacctg cagttcatct tccagctgtg caagatcacc ctgaccgctg 5880
 acgtgatgac ctacatccac tccatgaact ccactatcct cgaagattgg aacttcggtc 5940
 tgcagccccc tccgggtggc accctcgagg acacctaccg tttcgtcacc tcccaggcta 6000
 tcgcttgcca gaagcacacc ccccctgctc ccaaggagga ccccctgaag aagtacacct 6060
 tctgggaggt caacctgaag gagaagttct ccgctgacct ggaccagttc cccctgggtc 6120
 gcaagttcct gctgcaggcc ggactgaagg ccaagcccaa gttcacctg ggcaagcgca 6180
 aggctacccc caccacctcc tccacctca ccaccgctaa gaggaagaag cgcaagctgt 6240

 aaaagcttgt cgagaagtac tagaggatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt 6300
 tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa 6360
 ttgttgtgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca 6420
 caaatctc acaaataagca ttttttccac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca 6480
 tcaatgtatc ttatcatgtc tggatctgat cactgcttga gcctagaaga tccggctgct 6540
 aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgtggcta gctttgttta actttaagaa 6600
 ggagatacat ctagaaatat taatagatca tggagataat taaaatgata accatctcgc 6660

 aaataaataa gtatcttact gttttcgtaa cagttttgta ataaaaaac ctataaatat 6720
 tccggattat tcataaccgc ccaccatcgg gcgcggatcc gccaccatgg ctctgtggcg 6780
 tcctccgac aacaccgtgt acctgcccc tcctccgtg gctcgtgtgg tcaacaccga 6840

cgactacgtg acccgtacct ccatcttcta ccacgtcgtt tcctcccgtc tgctgaccgt 6900
 gggcaacccc tacttccgtg tgcccctgg cggtggcaac aagcaggaca tcccaaggt 6960
 gtccgcttac cagtaccgtg tgttccgtgt gcagctgccc gacccaaca agttcggctt 7020
 gcccgacacc tccatctaca accccgagac tcagcgctc gtgtgggctt gcgctggtgt 7080

cgagatcggg cgtggccagc ccttgggtgt cggcctgtcc ggtcaccct tctacaaca 7140
 gctggacgac accgagtctt cccacgtctc tacctcaac gtgtccgagg acgtgcgcga 7200
 caacgtgtct gtggactaca agcagacca gctgtgcatc ctgggttgcg ctcccgtat 7260
 cggcgagcac tgggctaagg gcaccgttg caagtcccgt cctctgtccc agggcgactg 7320
 ccccccttc gagctgaaga acaccgtgct cgaggacggc gacatggtgg acaccgtta 7380
 cgggtgatg gacttcagca ccctgcagga caccaagtgc gaggtgcccc tggacatctg 7440
 ccagtccatc tgcaagtacc ccgactacct gcagatgtcc gctgaccct acggcgactc 7500

tatgttcttc tgctgcgtc gtgacagct gttcgctcgt cacttctgga accgtgctgg 7560
 caccatgggt gacaccgtgc cccagtcct gtacatcaag ggcaccggca tgcgtgcttc 7620
 ccccggttcc tgcgtgfact cccctcccc ctccggttcc ategtacct ccgactccca 7680
 gctgttcaac aagccctact ggctgcacaa ggctcagggc cacaacaac gtgtctgctg 7740
 gcacaaccag ctgttcgtga ccgtggtega caccaccgt tccaccaacc tgaccatctg 7800
 cgcttcacc cagtccccg tgcccggcca gtacgacgt accaagtta agcagtactc 7860
 ccgtcacgtg gaggagtacg acctgcagtt catcttcag ctctgacta tcaccctgac 7920

cgctgacgtg atgtctaca tccaactccat gaactcctct atcctcgaag attggaactt 7980
 cgggtgcccc cctccccca ctacctcct ggtggacact taccgtttcg tgcagtcctg 8040
 ggctatcacc tgccagaagg acgtgctcc cgctgagaac aaggaccct acgacaagct 8100
 gaagtcttg aacgtggacc tgaaggagaa gttctcctg gacctggacc agtaccctt 8160
 gggctgcaag ttcttgggtc aggtggcct gaggcgcaag cccaccatcg gtccccgaa 8220
 gcgttccgt cctccgcta ccactctc caagcccgc aagcgtgtgc gtgtgcgcgc 8280
 tcgcaagtaa gctagcaagc ttgtcgagaa gtactagagg atcataatca gccataccac 8340

atgtgtagag gtttacttg ctttaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaca 8400
 taaaatgaat gcaattgtg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaata 8460
 aagcaatagc atcacaat tcaacaata agcattttt tcaactgatt ctagtgtgg 8520
 tttgtccaaa ctcatcaatg tatctatca tgtctggatc tgatcactgc ttgagcctag 8580
 aagatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc 8640
 aataactatc ataacccta ggagatccga accagataag tgaatctag ttccaaacta 8700

ttttgcatt ttaattttc gtattagcitt acgacgctac acccagttcc catctatntt 8760

 gtcactcttc cctaaataat ccttaaaaac tccatttcca cccctcccag ttcccaacta 8820
 ttttgtccgc ccacagcggg gcatttttct tctgttatg tttttaatca aacatcctgc 8880
 caactccatg tgacaaaaccg tcatcttcgg ctacttt 8917
 <210> 3
 <211> 10595
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> multi-epitope influenza B virus-like particle
 <400> 3

 ttctctgtca cagaatgaaa atttttctgt catctcttcg ttattaatgt ttgtaattga 60
 ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcct gtagcggcgc 120

 attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct 180
 agcgcgccgt cctttegett tcttccttc ctttctegcc acgttcgccc getttcccgc 240
 tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgccttac ggcacctcga 300
 ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 360
 ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgitt cttaatagtg gactcttggt ccaaactgga 420
 acaactca accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg 480
 gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattha acgcgaatth taacaaaata 540

 ttaacgctta caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt 600
 tatttttcta aatacattca aatagtatc cgctcatgag acaataacce tgataaatgc 660
 ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc geccttattc 720
 ccttttttgc ggcattttgc cttcctgtht ttgctcacc agaaacgctg tgaaagtaa 780
 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 840
 gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag 900
 ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc 960

 gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 1020
 cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctagat gataaactg 1080
 cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca 1140
 acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 1200
 caaacacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat 1260

taactggcga actacttact ctacttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 1320
 ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata 1380

 aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta 1440
 agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 1500
 atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaaactg tcagaccaag 1560
 ttactcata tatactttag attgatitaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg 1620
 tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 1680
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 1740
 taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1800

 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 1860
 ctgtttctct agttagcggc tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 1920
 catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1980
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctc ggctgaacgg 2040
 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 2100
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggagc aaaggcggac aggtatccgg 2160
 taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgcg caaggggagc tccaggggga aacgcctggt 2220

 atctttatag tctgtcggg tttgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 2280
 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 2340
 ccttttgctg gccttttct cacaatttct ttctgcgctt atcccctgat tctgtggata 2400
 accgtattac cgcttttag tgagctgata ccgctcggc cagccgaacg accgagcga 2460
 gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcate 2520
 tgtgcggtat ttcacaccgc atagaccagc cgcgtaacct ggcaaaatcg gttacggttg 2580
 agtaataaat ggatgccctg cgtaagcggg tgtggcgga caataaagtc ttaaactgaa 2640

 caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag acagaatagt tgtaaactga 2700
 aatcagtcca gttatgctgt gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaaact 2760
 cttcattttc tgaagtgcaa attgccgctc gtattaaaga ggggcgtggc caaggcatg 2820
 gtaaagacta tattcgcggc gttgtgacaa tttaccgaac aactccgagg ccgggaagcc 2880
 gatctcggct tgaacgaatt gttaggctggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcatcac 2940
 ttcttcccgt atgcccaact ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaactctc 3000

ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag 3060

 cgcggtggca atgccctgcc tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat 3120
 ctcactacgc ggetgctcaa acttgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc 3180
 ttcttggctg aaggcagcaa gcgcatgaa tgtcttacta cggagcaagt tcccagagta 3240
 atcggagtcc ggetgatgtt gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag 3300
 atcaagagca gcccgcatgg atttgacttg gtcagggccg agcctacatg tgcgaatgat 3360
 gcccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcgtt 3420
 gctgctgctg aacatcgttg ctgctccata acatcaaaca tcgaccacg gcgtaacgcg 3480

 cttgctgctt ggatgccga ggcatagact gtacaaaaa acagtcataa caagccatga 3540
 aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc gttcggtaaa ggttctggac cagttgcgtg 3600
 agcgcatacg ctacttgcac tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc 3660
 gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgctc acccgcaac cttgggcagc agcgaagtcg 3720
 aggcatttct gtctggctg gcgaacgagc gcaaggttc ggtctccacg catcgtcagg 3780
 cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg cccttcttc 3840
 aggagatcgg tagacctcg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccgatgaag 3900

 tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcggccag gactctagct 3960
 atagtcttag tggttgctca cagctttggt tgtactatca acaggttgaa ctgctgatca 4020
 acagatcctc tacgcggccg ccgtaccata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 4080
 tctggtttaa acgtaccctg agtggtatg gcagggttg ccgccccgac gttggtgctg 4140
 agccctgggc cttacccca acttgggggt tggggtgggg aaaaggaaga aacgcgggcg 4200
 tattggtccc aatggggtct ccgtggggta tcgacagagt gccagccctg ggaccgaacc 4260
 ccgctttat gaacaaacga cccaacacc gtgcgtttta ttctgtcttt ttattgccgt 4320

 catagcgcgg gttccttccg gtattgtctc cttccgtggt tcagttagcc tccccatct 4380
 cccggtacct tataagtatt tctcacaag agctgaattt cccatagagc tctgttttag 4440
 cacttcatt acatctttgg caattccttc tccattcttt tgacttgctc cttagatct 4500
 caaactcca atgttgttt gcagctctc tgctagtttt tggacgtctt ctcccttcc 4560
 cattccattc attgtctttg ctgtgttcat agctgaaacc atctgattt ctctcttac 4620
 tccaggtacc gaagacctg ctgctctgct atgggctcta tgcgagtgcg atgcttgttt 4680
 ctgcataaa gcacagagcg ttctagttt tacttgcat gaatagtttt cagggttag 4740

gtacatgacc ataagacaat atagtaatgc tgagctttcg tggccttctg ctatttcaaa 4800
 tgcttcatga aagcttacac atcttctcat ttttctctca gctagaatta ggcctttctt 4860
 ctttgttgcg gttgttccca ttcttgacag gggctctgtg atgaatctcc tttttctttc 4920
 ttggtctttg ggttttaaaa agcatataga ggcaccaatt agtgcTTTT gtatatcagt 4980
 taggcacctt ttgtttttta tccattccaa agcagaatct aggtcaaatt ctttcccacc 5040
 gaaccaacag tgtaattttt cagctagttc tgccttgcct tctccatctt ctattagtga 5100
 aagcaggtag gcaatttgtt ctccaacag cgacatggtg gcatcccggg tgatcaagtc 5160

ttcgtcgagt gattgtaaat aaaatgtaat ttacagtata gtatTTTaat taatatataa 5220
 atgatttgat aataattctt atttaactat aatataattg gttgggttga attaaaggtc 5280
 cgtatactag tatcgattcg cgacctactc cggaatatta atagatcatg gagataatta 5340
 aaatgataac catctcgcaa ataaataagt attttactgt tttcgtaaca gttttgtaat 5400
 aaaaaaacct ataaatattc cggattattc ataccgtccc accatcgggc gcggatccac 5460
 catgaaggca ataattgtac tactcatggt agtaacatcc aatgcagatc gaatctgcac 5520
 tggaataaca tcttcaaaact cacctcatgt ggtcaaaaca gccactcaag gggaggtcaa 5580

tgtgactggt gtgataccac taacaacaac accaacaaaa tcttattttg caaatctcaa 5640
 aggaacaagg accagagggg aactatgcc agactgtctc aactgcacag atctggatgt 5700
 ggctttgggc agaccaatgt gtgtggggac cacacctcg gcgaaagctt caatactcca 5760
 cgaagtcaaa cctgttacct ccgggtgctt tcctataatg cacgacagaa caaaaatcag 5820
 gcaactacce aatcttctca gaggatatga aaatatcagg ctatcaacce aaaacgtcat 5880
 cgatgcggaa aaggcaccag gaggacctta cagacttggg acctcaggat cttgccttaa 5940
 cgctaccagt aagagcggat ttttcgcaac aatggcttgg gctgtcccaa aggacaacaa 6000

caaaaatgca acgaaccac taacagtaga agtaccatac atttgtacag aagggaaga 6060
 ccaaatcact gtttgggggt tccattcaga tgacaaaacc caaatgaaga acctctatgg 6120
 agactcaaat cctcaaaagt tcacctcctc tgctaattgga gtaaccacac actatgtttc 6180
 tcagattggc agcttcccag atcaaacaga agacggagga ctaccacaaa gcggcaggat 6240
 tgttgttgat tacatgatgc aaaaacctgg gaaaacagga acaattgtct accaaagagg 6300
 tgtttgttg cctcaaaagg tgtggtgcgc gagtggcagg agcaaagtaa taaaagggtc 6360
 cttgccttta attggtgaag cagattgcct tcatgaaaaa tacggtggat taaacaaaag 6420

caagccttac tacacaggag aacatgcaaa agccatagga aattgcccaa tatgggtgaa 6480
 aacacctttg aagcttgcca atggaaccaa atatagacct cctgcaaac tattaagga 6540
 aagggtttc ttcggagcta ttgctggtt cctagaagga ggatgggaag gaatgattgc 6600

aggctggcac ggatacacat ctcacggagc acatggagtg gcagtggcgg cggaccttaa 6660
gagtacgcaa gaagctataa acaagataac aaaaaatctc aattctttga gtgagctaga 6720
agtaaagaat cttcaaagac taagtgggtgc catggatgaa ctccacaacg aaataactga 6780
gctggatgag aaagtggatg atctcagagc tgacactata agctcgcaaa tagaacttgc 6840

agtcttgctt tccaacgaag gaataataaa cagtgaagat gagcatctat tggcacttga 6900
gagaaaaacta aagaaaaatgc tgggtccctc tgctgtagag ataggaaatg gatgcttcga 6960
aaccaaacac aagtgaacc agacctgctt agacaggata gctgctggca cctttaatgc 7020
aggagaattt tctctcccca cttttgattc actgaacatt actgctgcat ctttaaatga 7080
tgatggattg gataaccata ctatactgct ctattactca actgctgctt ctagtttggc 7140
tgtaacattg atgctagcta tttttattgt ttatatggtc tccagagaca acgtttcatg 7200
ctccatctgt ctataagtgc acgtactaga ggatcataat cagccatacc acattttag 7260

aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga 7320
atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 7380
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtt ggtttgtcca 7440
aactcatcaa tglatcttat catgtctgga tctgatcact gcttgagcct agaagatccg 7500
gctgctaaca aagccccgaaa ggaagctgag ttggctgctg tggctagctt tgtttaactt 7560
taagaaggag atacatctag aaatattaat agatcatgga gataattaa atgataacca 7620
tctcgcaaat aaataagtat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat 7680

aaatattccg gattattcat accgtccac catcgggcgc ggatccacca tgctaccttc 7740
aactatacaa acgttaacc tatttctcac atcaggggga gtgttattat cactatatgt 7800
gtcagcttca ttgtcact tactatattc ggatatattg ctaaaatttt cacaaacaga 7860
aataactgca ccaataatgc cattggattg tgcaaacgca tcaaatgttc aggctgtgaa 7920
ccgttctgca gcaaaagggg tgacacttct tctcccagaa cggagtgga catacctcg 7980
tttatcttgc cgggctcaa cctttcagaa agcactccta attagcccc atagattcgg 8040
agaaaccaa ggaactcag ctccctgat aataaggga ccttttattg cttgtggacc 8100

aacggaatgc aaacactttg ctctaacca ttatgcagct caaccagggg gatactaaa 8160
tggacaaga gaagacagaa acaagctgag gcatctaatt tcagtcaaat tgggcaaat 8220
ccaacagta gaaaactcca tttccatat ggcagcttgg agcgggtccg catgccatga 8280
tggtaaagaa tggacatata tcggagtga tggccccgac agtaatgcat tactcaaat 8340
aaaatatgga gaagcatata ctgacacata ccattcctat gcaaaaaaca tectaaggac 8400
acaagaaagt gcctgcaatt gcatcggggg agattgttat cttatgataa ctgatggccc 8460

agcttcaggg attagtgaat gcagattcct taagattcga gagggccgaa taataaaaga 8520

 aatatttcca acaggaagag taaaacatac tgaggaatgc acatgcggat ttgccagcaa 8580
 caaaaccata gaatgtgctt gtagagataa cagttacaca gcaaaaagac cctttgtcaa 8640
 attaaatgtg gagactgata cagcggaaat aagattgatg tgcacagaga cttatttga 8700
 cccccaga ccaaatgatg gaagcataac agggccttgc gaatctgatg gggacaaagg 8760
 gagtggagge atcaaggag gatttgttca tcaaagaatg gcatccaaga ttggaaggtg 8820
 gtactctcga acgatgtcta aaactaaaag aatggggatg ggactgtatg taaagtatga 8880
 tggagacca tggactgaca gtgaagccct tgctcttagt ggagtaatgg tttcgatgga 8940

 agaacctggt tggatttctt ttggcttcca aataaaagat aagaaatgtg atgtccctg 9000
 tattgggata gaaatggtac atgatggtgg gaaaacgact tggcactcag cagcaacagc 9060
 catttactgt ttaatgggct caggacaact gctgtgggac actgtcacag gtgttgatat 9120
 ggctctgtaa atcgatgaca agcttgtcga gaagtactag aggatcataa tcagccatac 9180
 cacatttght gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa 9240
 acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa ctgttttatt gcagcttata atggttacia 9300
 ataaagcaat agcatcacia atttcacia taaagcattt ttttactgc attctagtgg 9360

 tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atctgatcac tgcttgagcc 9420
 tagaagatcc ggctgctaac aaagcccga aggaagctga gttggctgct ggggtgcctaa 9480
 tgagtgagct aactcacatt aattgcccgg aatattaata gatcatggag ataattaaaa 9540
 tgataacat ctcgcaaata aataagtatt ttactgtttt cgtaacagtt ttgtaataaa 9600
 aaaacctata aatattccgg attattcata ccgtcccacc atcgggcgcg gatccacat 9660
 gctcgaacca tttcagattc tttcaattg tttctttatc ttatcagctc tccatttcat 9720
 ggcttggaca atagggcatt tgaatcaaat aaaaagagga ataacatga aaatacgaat 9780

 aaaaggtcca aacaaagaga caataaacag agaggatca attttgagac acagttacca 9840
 aaaagaaatc caggccaaag aaacaatgaa ggaagtactc tctgacaaca tggaggtgtt 9900
 gagtgaccac ataataatg aggggctttc tgccgaagag ataataaaaa tgggtgaaac 9960
 agttttggag atagaagaat tgcattaagt actagaggat cataatcagc cataccacat 10020
 ttgtagaggt tttacttgtt ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata 10080
 aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa 10140
 gcaatagcat cacaaattc acaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt 10200

tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatctg atcactgctt gaggcctagaa 10260
 gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa 10320
 taactatcat aaccctagg agatccgaac cagataagtg aaatctagtt ccaaactatt 10380
 ttgtcatttt taattttcgt attagcttac gacgctacac ccagttccca tctattttgt 10440
 cactcttccc taaataatcc ttaaaaactc catttccacc cctcccagtt cccaactatt 10500
 ttgtccgccc acagcggggc atttttcttc ctgttatggt tttaatcaaa catcctgcca 10560
 actccatgtg acaaaccgtc atcttcggct acttt 10595

<210> 4

<211> 8411

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> multi-epitope papilloma virus-like particle

<400> 4

ttctctgtca cagaatgaaa atttttctgt catctcttgc ttattaatgt ttgtaattga 60
 ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc 120
 attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt 180
 agcgcctcct cctttccttt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttcccgc 240
 tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga 300
 cccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgcctt gatagacggt 360

 ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt cttaatagtg gactcttggt ccaaactgga 420
 acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttgc 480
 gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata 540
 ttaacgctta caatttaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt 600
 tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccg tgataaatgc 660
 ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc 720
 ccttttttgc ggcattttgc cttctgtttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa 780

 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 840
 glaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag 900
 ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc 960
 gcatacacta ttctcagaat gacttgggtg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 1020
 cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctagat gataaactg 1080
 cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca 1140

acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 1200

 caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat 1260
 taactggcga actactfact ctagetttcc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 1320
 ataaagttag aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata 1380
 aatctggagc cggtagcgtt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta 1440
 agccctcccc tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 1500
 atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag 1560
 tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg 1620

 tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 1680
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 1740
 taatctgctg ctgcaaaaca aaaaaaccac cgtaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1800
 aagagctacc aactctttt cgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata 1860
 ctgttcttct agttagcgg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 1920
 catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1980
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 2040

 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 2100
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 2160
 taagcggcag ggtcggaaca ggagagcga cgaggagct tccaggggga aacgcctggt 2220
 atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 2280
 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 2340
 ccttttgctg gccttttct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata 2400
 accgtattac gcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcga 2460

 gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 2520
 tgtgcggtat ttacacccgc atagaccagc cgcgtaacct ggcaaaatcg gttacggttg 2580
 agtaataaat ggatgccctg cgtaagcggg tgtggcgga caataaagtc ttaaaactgaa 2640
 caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag acagaatagt tgtaaaactga 2700
 aatcagtcca gttatgctg gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaaaact 2760
 cttcattttc tgaagtgcaa attgcccgtc gtattaaaga gggcgctggc caaggcatg 2820
 gtaaagacta tattcgcggc gttgtgacaa ttaccgaac aactccgagg ccgggaagcc 2880

gatctcggct tgaacgaatt gttaggtaggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcacac 2940
ttcttcccgt atgcccact ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaatctgc 3000
ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag 3060
cgcggtggca atgcccctgcc tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat 3120
ctcactacgc ggctgctcaa acttgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc 3180
ttcttggctg aaggcagcaa gcgcatgaa tgccttacta cggagcaagt tcccaggta 3240
atcggagtcc ggctgatgtt gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag 3300

atcaagagca gcccgatgg atttgacttg gtcaggccg agcctacatg tgcaatgat 3360
gcccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcgtt 3420
gctgctgctg aacatcgttg ctgctccata acatcaaca tcgaccacg gcgtaacgcg 3480
cttctgctct ggatgcccga ggcatagact gtacaaaaa acagtcataa caagccatga 3540
aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc gttcggctcaa ggttctggac cagttgcgtg 3600
agcgcatacg ctacttgcac tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc 3660
gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc acccggaac cttgggcagc agcgaagtgc 3720

aggcatttct gtctggctg gcgaacgagc gcaaggttc ggtctccacg catcgtcagg 3780
cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg cccttgcttc 3840
aggagatcgg tagacctcgg ccgtgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccgatgaag 3900
tggttcgcac cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcggccag gactctagct 3960
atagtcttag tggttggcta cagctttgtt tgtactatca acaggttgaa ctgctgatca 4020
acagatcctc tacgcggccg cggtaccata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 4080
tctggtttaa acgtaccgt agtgctatg gcagggcttg ccgccccgac gttggctgcg 4140

agccctgggc cttcaccga acttgggggt tggggtgggg aaaaggaaga aacgcggcgc 4200
tattggtccc aatggggtct cgggtgggta tcgacagagt gccagccctg ggaccgaacc 4260
ccgctttat gaacaaacga cccaacacc gtgcgtttta ttctgtcttt ttattgccgt 4320
catagcggg gttccttccg gtattgtctc cttccgtgtt tcagttagcc tecccatct 4380
cccgtaccg catgctatgc ataagctttt acagcttgcg cttcttctc ttagcggtagg 4440
tggaggtgga ggaggtggtg ggggtagcct tgcgcttgc caggtgaaac ttgggcttgg 4500
ccttcagtcc ggctgcagc aggaacttgc gaccagggg gaactggtcc aggtcagcgg 4560

agaacttctc cttcaggtg acctcccaga aggtgtactt cttcagggg tcctccttgg 4620
gagcaggggg ggtgtgcttc tggcaagcga tagcctggga ggtgacgaaa cggtaggtgt 4680
cctcaggggt gccaccggga ggggctgca gaccgaagtt ccaatcttcg aggatagtgg 4740

agttcatgga gtggatgtag gtcacacgt cagcggtcag ggtgatcttg cacagctgga 4800
 agatgaactg caggtcgtac tccctgccgt gacgcaggta ctccctgaag ttggtgttct 4860
 tgtagtagt ctggagggtg gagatagcag cgcacagaga catgttggtg gaacgggtgg 4920
 tgtcgaccac ggtcacgaac agctggttgc cccagcagat accgttggtg tgaccctgag 4980

 cacgctgcag ccagtagggc ttgttgaaga tctgagcgtc ggaggtgacc atggaaccgg 5040
 aggggtagg gaagtagttg ctggaagcca ggttagcggg ggaaccggaa cccttgatgt 5100
 acaggtcgtc gggcacgttc tcgcccacag caccagcacg gttgaacagg tgacgcacga 5160
 acatctgctc acgacgcagg tagaagaaca gggagtcgcc gtagggctcg gacaccatct 5220
 tgatgtagtc ggggtacttg cagatggagg tgcagatgtc caggggcacc tcggacttgt 5280
 tagcctgcag ggtggtgaag tccatagcac cgaaccggg gtcaccatg tcgccgtcct 5340
 ggatcacggt gttgatcagc tcgagagggg ggcagtcgcc ggggttcaca gccacgttgg 5400

 tgcaggggga acccttgccc cagtgtctgc cgtgggggg cttgcaaccg atcaggcaca 5460
 gctgggtctg ctgttagtcc atggagatgc actcgcggtt gtcgacacca gcgttagcag 5520
 cgtaagcggg agcgttctcg gtgtcgtcca gcttgttcag cagggggtga ccggagatac 5580
 cgacaccag gggctggcca cggccgacct ccacgccac gcaagcccac acgaggcgt 5640
 ggggtgcagg gttgtagaag gaggtgtcgg ggaaccgaa cttgttgggg tcgggcagg 5700
 ggatacggaa cacacgttac tgcaggccgg acacctggg caccaggatc ttgttgtgt 5760
 tgggcttctt gatggggaag taggggtgac ccacagccag cagacgggag gtgccagcgt 5820

 ggtagtagat gttggtacga gccacgtact cgtcggtgga caccacctg gacacgggca 5880
 cggggggcag gtacacggtg gcctcggagg gcagccacag ggacatggtg gcggatccat 5940
 cccgggtgat caagtcttcg tcgagtgatt gtaataaaa tgtaatttac agtatagtat 6000
 ttttaatta atacaaatga tttgataata attcttattt aactataata tattgtgttg 6060
 ggttgaatta aaggtccgta tactagatc gattcgcgac ctactccgga atattaatag 6120
 atcatggaga taattaaat gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgtttc 6180
 gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 6240

 tcgggcgcgg atccgccacc atggctctgt ggcgtccctc cgacaacacc gtgtacctgc 6300
 cccctccctc cgtggctcgt gtggfcaaca ccgacgacta cgtgaccgt acctccatct 6360
 tctaccacgc tggttcctcc cgtctgctga ccgtgggcaa cccctacttc cgtgtgcccc 6420
 ctggcgggtg caacaagcag gacatccca aggtgtccgc ttaccagtac cgtgtgttcc 6480
 gtgtgcagct gcccgacccc aacaagtctg gtcgcccga cacctccatc tacaaccccg 6540
 agactcagcg cctcgtgtgg gcttgcgctg gtgtcgagat cggtcgtggc cagcccctgg 6600

gtgtcggcct gtccggtcac cccttctaca acaagctgga cgacaccgag tcttcccacg 6660

ctgctacctc caacgtgtcc gaggacgtgc gcgacaacgt gtctgtggac tacaagcaga 6720

cccagctgtg catcctgggt tgcgttcccg ctatcggcga gcactgggct aagggcacccg 6780

cttgcaagtc ccgtcctctg tcccagggcg actgcccccc tctcgagctg aagaacaccg 6840

tgctcgagga cggcgacatg gtggacaccg gttacgggtg tatggacttc agcacctgc 6900

aggacaccaa gtgcgaggtg cccctggaca tctgccagtc catctgcaag tacceccgact 6960

acctgcagat gtccgctgac ccctacggcg actctatggt cttctgcctg cgtcgtgagc 7020

agctgttcgc tegtacttc tggaaacctg ctggcaccat gggtgacacc gtgccccagt 7080

ccctgtacat caagggcacc ggcatgctg cttcccccg ttcctgcgtg tactccctt 7140

ccccctccgg ttccatcgtg acctccgact ccagctggt caacaagccc tactggctgc 7200

acaaggtca gggtcacaac aacggtgtct gctggcaca ccagctgttc gtgacctgg 7260

tgcacaccac ccgttccacc aacctgacca tctgctcttc caccagctcc cccgtgcccc 7320

gccagtacga cgctaccaag ttcaagcagt actcccgtca cgtggaggag tacgacctgc 7380

agttcatctt ccagctctgc actatcacc tgaccctga cgtgatgtcc tacatcact 7440

ccatgaactc ctctatctc gaagattgga acttcggtgt cccccctccc cccactacct 7500

ccctggtgga cacttacgt ttcgtgcagt ccgtggctat cacctgccag aaggacgtg 7560

ctcccgtga gaacaaggac ccctacgaca agctgaagtt ctggaacctg gacctgaagg 7620

agaagtctc cctggacctg gaccagtacc cctgggtcg caagtctctg gtgcaggctg 7680

gcctgaggcg caagcccacc atcggctccc gcaagcgttc cgctccctcc gctaccacct 7740

cctccaagcc cgccaagcgt gtgctgtgct gcgctcga gtaagctagc aagcttctcg 7800

agaagtacta gaggatcata atcagccata ccacattgt agaggtttta cttgctttaa 7860

aaaacctccc acacctccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgtgtta 7920

acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 7980

ataaagcatt ttttactg cattctagt gtggtttgtc caaactcctc aatgtatctt 8040

atcatgtctg gatctgatca ctgcttgagc ctagaagatc cggctgctaa caaagcccga 8100

aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tatcataacc ctaggagat 8160

ccgaaccaga taagtgaat ctagtccaa actatctgt cattttta tttcgtatta 8220

gcttacgacg ctacaccag ttccatctc tttgtcact cttccctaaa taatcctaa 8280

aaactcatt tccaccctc ccagttcca actatctgt ccgccacag cggggcattt 8340

ttcttctgt taigtthtta atcaaacatc ctgccaactc catgtgacaa accgtcatct 8400
 tcggctactt t 8411
 <210> 5
 <211> 8445
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> multi-epitope papilloma virus-like particle
 <400> 5
 ttctctgtca cagaatgaaa atttttctgt catctcttcg ttattaatgt ttgtaattga 60
 ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcct gtagcggcgc 120
 attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct 180
 agcgcgccgt cctttegett tctteccctc ctttctcgcc acgttcgcgc getttcccg 240

 tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga 300
 ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 360
 ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt cttaatagtg gactcttggt ccaaactgga 420
 acaacactca accctatctc ggtctattct ttgatttat aagggatttt gccgatttcg 480
 gcctattggt taaaaaatga gctgatthaa caaaaattha acgcgaatth taacaaaata 540
 ttaacgctta caatthagg ggcactthtc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt 600
 taththtcta aatacattca aatathatc cgctcatgag acaataacc tgataaatgc 660

 ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttcctgtgc gccttattc 720
 cctththtgc ggcattthgc cttctgtth ttgctcacc agaaacgtg gtgaaagtaa 780
 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 840
 gtaagatcct tgagagthth cgccccgaag aacgtththc aatgatgagc actththaaag 900
 thctgtctat tggcgcggta thatccgta ttgacgccg gcaagagcaa ctcggtcgc 960
 gcatacacta thctcagaat gacttggttg agthctcacc agtcacagaa aagcatctta 1020
 cggatggcat gacagthaaga gaathatgca gtgctgcat aacctagat gataacactg 1080

 cgccaactt actthtgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct thththgaca 1140
 acatggggga tcatgthact cgcctthgac gthgggaacc ggagctgath gaagccatac 1200
 caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat 1260
 thactggcga actactthct ctgactthcc ggcaacaath aatagactgg atggaggcgg 1320
 athaaagthg aggaccactt ctgcgctcgg cctthccggc tggctgthth atthctgata 1380
 aatctggagc cggthgagct gggthctcgc gthactthg agcactgggg ccagatgtha 1440

agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 1500

atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttgtaactg tcagaccaag 1560

tttactcata tatacttttag attgatitaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg 1620

tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttcact 1680

gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 1740

taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1800

aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 1860

ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 1920

catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1980

ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 2040

ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 2100

agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 2160

taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgcga cgagggagct tccaggggga aacgcctggt 2220

atctttatag tctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 2280

cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 2340

ccttttgctg gccttttct cacaatgttct ttctctgctt atcccctgat tctgtggata 2400

accgtattac cgcttttag tgagctgata ccgctcggc cagccgaac accgagcgcga 2460

gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 2520

tgtgcggtat ttcacaccgc atagaccagc cgcgtaacct ggcaaaatcg gttacggtt 2580

agtaataaat ggatgccctg cgtaagcggg tgtggcgga caataaagtc ttaaactgaa 2640

caaaatagat ctaaactatg acaataaagt cttaaactag acagaatagt tgtaaactga 2700

aatcagtcca gttatgctgt gaaaaagcat actggacttt tgttatgct aaagcaaact 2760

cttcattttc tgaagtgcaa attgccgctc glattaaaga ggggcgtggc caaggcatg 2820

gtaaagacta tattcgcggc gttgtgacaa ttaccgaac aactccgcg cgggaagcc 2880

gatctcggct tgaacgaatt gttaggtggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcatcac 2940

ttcttcccgt atgccaact ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaatctgc 3000

ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag 3060

cgcggtgga atgccctgcc tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat 3120

ctcactacgc ggctgctcaa acttgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc 3180

ttcttggctg aaggcagcaa gcgcgatgaa tgccttacta cggagcaagt tcccgagta 3240
 atcggagtcc ggctgatgtt gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag 3300
 atcaagagca gcccgcattg atttgacttg gtcagggccg agcctacatg tgcgaatgat 3360
 gccatactt gagccaccta actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcgtt 3420
 gctgctgctg aacatcgttg ctgctccata acatcaaca tgcaccacg gcgtaacgcg 3480
 ctgctgctt ggatgcccga ggcatagact gtacaaaaa acagtcataa caagccatga 3540
 aaaccgccac tgcgccgta ccaccgctgc gttcggtaaa ggttctggac cagttgctg 3600

 agcgcatacg ctacttgcac tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc 3660
 gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgctgc acccggcaac cttgggcagc agcgaagtgc 3720
 aggcatttct gtcttgctg gcaaacgagc gcaaggtttc ggtctccacg catcgtcagg 3780
 cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg cccttgcttc 3840
 aggagatcgg tagacctcgg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccggatgaag 3900
 tggttcgcac cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcggccag gactctagct 3960
 atagttctag tggttggcta cagctttgtt tgfactatca acaggttgaa ctgctgatca 4020

 acagatcctc tacgcgccg cggtaaccata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 4080
 tctggtttcg acctactccg gaatattaat agatcatgga gataattaa atgataacca 4140
 tctcgcaaat aaataagat tttactgttt tcgtaacagt tttgtaataa aaaaacctat 4200
 aatatattccg gattattcat accgtcccac catcgggcgc ggatccgcca ccatgtccct 4260
 gtggctgccc tccgaggcta ccgtgtacct gccccccgtg cccgtgtcca aggtggtgctc 4320
 caccgacgag tacgtggctc gtaccaacat ctactaccac gctggcacct cccgtctgct 4380
 ggctgtgggt caccctact tcccataca gaagcccaac aacaacaaga tctggtgcc 4440

 caaggtgtcc ggctgagct accgtgtgtt ccgtatecac ctgcccgacc ccaacaagtt 4500
 cggtttcccc gacacctct tctacaacc tgacaccag cgcctcgtgt ggcttgcgt 4560
 gggcgtggag gtcggccgtg gccagccct ggtgtcgggt atctccgtc acccctgct 4620
 gaacaagctg gacgacacc agaacgcttc cgttacgct gctaacgctg gtgtgacaa 4680
 ccgcgagtgc atctccatgg actacaagca gaccagctg tgcctgatcg gttgcaagcc 4740
 ccccatcgge gagcactggg gcaagggttc ccctgcacc aacgtggctg tgaaccggg 4800
 cgactgcccc cctctcgagc tgatcaaac cgtgatccag gacggcgaca tggaggacac 4860

 cggtttcggt gctatggact tcaccacct gcaggctaac aagtcgagg tgcacctgga 4920
 catctgcacc tccatctgca agtaccgca ctacatcaag atggtgtccg agccctacgg 4980
 cgactccctg ttcttctacc tgcgtcgtga gcagatgttc gtgcgtcacc tgttcaaccg 5040

tgctggtgct gtggcgaga acgtgcccga cgacctgtac atcaagggtt cgggttccac 5100
 cgctaacctg gtttccagca actacttccc taccctctcc ggttccatgg tcacctccga 5160
 cgctcagatc ttcaacaagc cctactggct gcagcgtgct cagggtcaca acaacggtat 5220
 ctgctggggc aaccagctgt tcgtgaccgt ggtcgacacc acccgttcca ccaacatgtc 5280

 tctgtgcgct gctatctcca cctccgagac tacctacaag aacaccaact tcaaggagta 5340
 cctgcgtcac ggcgaggagt acgacctgca gttcatcttc cagctgtgca agatcacctt 5400
 gaccgctgac gtgatgacct acatccactc catgaactcc actatcctcg aagattggaa 5460
 ctteggctctg cagccccctc cgggtggcac cctcgaggac acctaccgtt tcgtcacctc 5520
 ccaggctatc gcttgccaga agcacacccc cctgtctccc aaggaggacc cctgaagaa 5580
 gtacaccttc tgggaggta acctgaagga gaagtctcc gctgacctgg accagttccc 5640
 cctgggtcgc aagtctctgc tgcaggccgg actgaaggcc aagcccaagt tcacctggg 5700

 caagcgaag gctaccccca ccacctctc cacctccacc accgctaaga ggaagaagcg 5760
 caagctgtaa aagcttctcg agaagtacta gaggatcata atcagccata ccacatttgt 5820
 agaggtttta ctgtctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat 5880
 gaatgcaatt gttgttgtta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 5940
 tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt ttttctactg cattctagtt gtggtttgtc 6000
 caaactcacc aatgtatctt atcatgtctg gatctgatca ctgcttgacc ctagaagatc 6060
 cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgtggctagc tttgtttaa 6120

 ttaagaagg agatacatct agaaatatta atagatcatg gagataatta aatgataac 6180
 catctcgcaa ataaataagt attttactgt tttcgtaaca gttttgtaat aaaaaaacct 6240
 ataaatattc cggattattc ataccgtccc accatcgggc gcggatccgc caccatggct 6300
 ctgtggcgte cctccgacaa cacctgttac ctgcccctc cctccgtggc tcgtgtggte 6360
 aacaccgacg actacgtgac ccgtacctc atcttctacc acgctggttc ctcccgtctg 6420
 ctgacctggg gcaacccta ctccgtgtg cccgtggcg gtggcaacaa gcaggacatc 6480
 cccaagggtg ccgcttacca gtacctgtg ttccgtgtgc agctgccga cccaacaag 6540

 ttcggctctc ccgacacctc catctacaac cccgagactc agcgcctcgt gtggccttgc 6600
 gctgggtctc agatcggctg tggccagccc ctgggtgtcg gcctgtccgg tcacccttc 6660
 tacaacaagc tggacgacac cgagtcctc cacgctgcta cctccaacgt gtccgaggac 6720
 gtgctcgaca acgtgtctgt ggactacaag cagaccagc tgtgcatcct gggttgcgt 6780
 cccgctatcg gcgagcactg ggctaagggc accgcttga agtcccgtcc tetgtcccag 6840
 ggcgactgcc ccctctcga gctgaagaac accgtgctcg aggacggcga catggtggac 6900

accggttacg gtgctatgga cttcagcacc ctgcaggaca ccaagtgcga ggtgccctg 6960

gacatctgcc agtccatctg caagtacccc gactacctgc agatgtccgc tgaccctac 7020

ggcgactcta tgttcttctg cctgcgtcgt gagcagetgt tcgctcgtca cttctggaac 7080

cgtgctggca ccatgggtga caccgtgcc cagtccctgt acatcaaggg caccggcatg 7140

cgtgcttccc ccggttctcg cgtgtactcc ctttccccct ccggttccat cgtgacctcc 7200

gactcccage tgttcaacaa gccctactgg ctgcacaagg ctgagggtca caacaacggt 7260

gtctgctggc acaaccagct gttcgtgacc gtggctgaca ccaccggtc caccaacctg 7320

accatctgcg cttccacca gtccccctg cccggccagt acgacgtac caagttaag 7380

cagtactccc gtcacgtgga ggagiacgac ctgcagtca tcttccagct ctgcactatc 7440

acctgaccg ctgacgtgat gtcctacatc cactccatga actcctctat cctcgaagat 7500

tggaacttgc gtgtcccccc tcccccaact acctccctgg tggacactta ccgtttcgtg 7560

cagtccgtgg ctatcacctg ccagaaggac gctgctcccg ctgagaacaa ggaccctac 7620

gacaagctga agttctggaa cgtggacctg aaggagaagt tctcctgga cctggaccag 7680

taccctctgg gtcgcaagtt cctggtgcag gctggcctga ggcgcaagcc caccatcggt 7740

ccccgcaagc gttccgctcc ctccgtacc acctcctcca agcccgcaa gcgtgtgcgt 7800

gtgcgcgctc gcaagtaagc tagcaagctt gtcgagaagt actagaggat cataatcagc 7860

cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct ccccctgaac 7920

ctgaaacata aatgaatgc aattgttgt gtttaactgt ttattgcagc ttataatggt 7980

tacaaataaa gcaatagcat cacaaattc acaataaag cattttttc actgcattct 8040

agttgtggtt tgcctaaact catcaatgia tcttatcatg tctggatctg atcactgctt 8100

gagcctagaa gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac 8160

cgctgagcaa taactatcat aaccctagg agatccgaac cagataagtg aatctagtt 8220

ccaaactatt ttgtcatttt taattttcgt attagcttac gacgtacac ccagttccca 8280

tctattttgt cactcttccc taaataatcc ttaaaaactc catttccacc cctcccagtt 8340

cccaactatt ttgtccgccc acagcggggc atttttcttc ctggtatggt tttaatcaaa 8400

catcctgcca actccatgtg acaaaccgtc atcttcggct acttt 8445