



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0102617
(43) 공개일자 2022년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/12 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/24 (2017.01) A61K 47/28 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)
A61K 47/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7016803

(22) 출원일자(국제) 2020년11월13일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년05월18일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2020/042405

(87) 국제공개번호 WO 2021/095838

국제공개일자 2021년05월20일

(30) 우선권주장

JP-P-2019-207001 2019년11월15일 일본(JP)

(71) 출원인

다이이찌 산쿄 가부시키가이샤

일본 도쿄도 츄오구 니혼바시 혼쵸 3-5-1

고쿠리츠 켄큐 카이하츠 호진 이야쿠 키반 켄코
에이요 켄큐쇼

일본 오사카후 이바라키시 사이토아사기 7쵸메
6-8

(72) 발명자

니와 다카코

일본 도쿄도 츄오구 니혼바시 혼쵸 3-5-1 다이이
찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

스즈키 다카시

일본 도쿄도 츄오구 니혼바시 혼쵸 3-5-1 다이이
찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 56 항

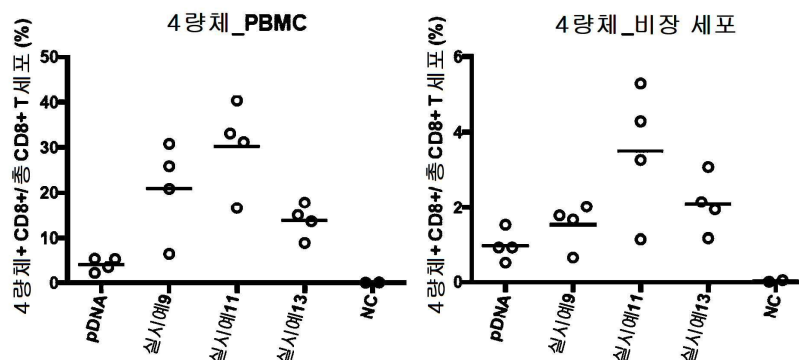
(54) 발명의 명칭 HPV mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자 백신

(57) 요약

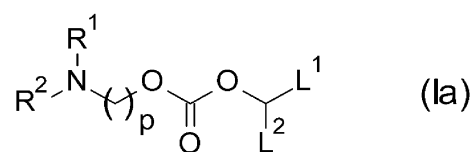
인간 파필로마바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 백신을 제공한다. 인간 파필로마바이러스

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산을 봉입한 지질 입자로서, 지질이 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질, 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 상기 입자.



식 중, R^1 및 R^2 는, 독립적으로, C_1 - C_3 알킬기를 나타내고 ; L^1 은, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ; L^2 는, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알킬기, 또는 C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ; p 는, 3 또는 4 이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/24 (2013.01)

A61K 47/28 (2013.01)

A61K 48/0033 (2013.01)

A61K 9/1617 (2013.01)

A61P 31/20 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 15/88 (2013.01)

(72) 발명자

고이즈미 마코토

일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

조나이 나오키

일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

오노데라 요시쿠니

일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

다케시타 후미히코

일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 나이

이시이 겐

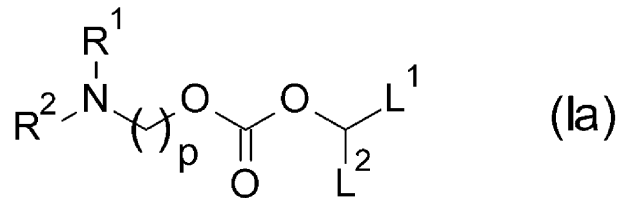
일본 오사카후 이바라키시 사이토아사기 7쵸메 6-8 고쿠리츠 켄큐 카이하츠 호진 이야쿠 키반 켄코 에이요 켄큐쇼 나이

명세서

청구범위

청구항 1

인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산을 봉입한 지질 입자로서, 지질이 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질, 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 상기 입자.



식 중,

R^1 및 R^2 는, 독립적으로, C_1 - C_3 알킬기를 나타내고 ;

L^1 은, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;

L^2 는, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알킬기, 또는 C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;

p 는, 3 또는 4 이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 R^1 및 R^2 가 모두 메틸기인, 입자.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 p 가 3 인 입자.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 L^1 이 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기인, 입자.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 L^2 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{12} 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알케닐기인, 입자.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 L^2 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{12} 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기인, 입자.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 L^1 이 (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기, cis-8-헵타데세닐기, 또는 (8Z,11Z)-헵타데카디에닐기인 입자.

청구항 8

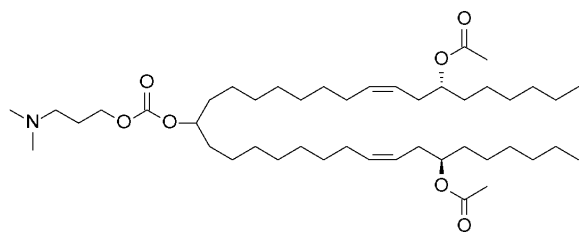
제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

일반식 (Ia) 중의 L^2 가 테실기, cis-7-테세닐기, 도테실기, 또는 (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기인, 입자.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

카티온성 지질이 하기 구조식 :

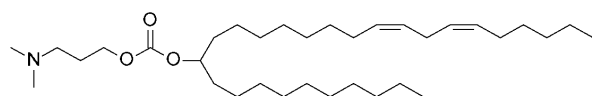


으로 나타내는 입자.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

카티온성 지질이 하기 구조식 :

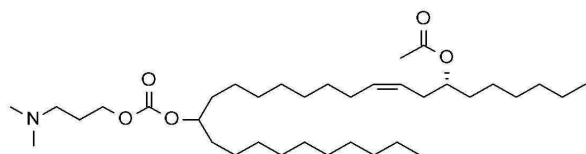


으로 나타내는 입자.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

카티온성 지질이 하기 구조식 :



으로 나타내는 입자.

청구항 12

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서,

지질이, 추가로, 양친매성 지질, 스테롤류 및 PEG 지질을 포함하는 입자.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

지질이, 추가로, 양친매성 지질, 스테롤류 및 PEG 지질을 포함하는 입자.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

양친매성 지질이, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린 및 디올레오일포스파티딜에탄올아민으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개인 입자.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

양친매성 지질이, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린 및 디올레오일포스파티딜에탄올아민으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개인 입자.

청구항 16

제 12 항 또는 제 14 항에 있어서,

스테롤류가 콜레스테롤인 입자.

청구항 17

제 13 항 또는 제 15 항에 있어서,

스테롤류가 콜레스테롤인 입자.

청구항 18

제 12 항, 제 14 항, 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

PEG 지질이, 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민인 입자.

청구항 19

제 13 항, 제 15 항, 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

PEG 지질이, 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민인 입자.

청구항 20

제 12 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 22.5 % 이하, 스테롤류가 15 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 이고, 핵산 중량에 대한 총 지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 입자.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

양친매성 지질이 5 ~ 22.5 % 인 입자.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

양친매성 지질이 10 ~ 22.5 % 인 입자.

청구항 23

제 12 항, 제 14 항, 제 16 항, 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 5 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 50 %, 카티온성 지질이 40 ~ 55 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 입자.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 40 ~ 50 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 입자.

청구항 25

제 13 항, 제 15 항, 제 17 항, 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 15 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 40 %, 카티온성 지질이 40 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 입자.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

카티온성 지질이 45 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 입자.

청구항 27

제 20 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 25 인 입자.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 22.5 인 입자.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV16 형인 입자.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E6 항원이 서열 번호 8 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 입자.

청구항 31

제 29 항 또는 제 30 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E7 항원이 서열 번호 9 의 아미노산 서열과 적어도 95 %

의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 입자.

청구항 32

제 29 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 서열 번호 17 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백을 코드하는 입자.

청구항 33

제 29 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 를 포함하는 mRNA 인 입자.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열이, 서열 번호 2, 4 또는 6 중 어느 서열과 적어도 90 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 입자.

청구항 35

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV18 형인 입자.

청구항 36

제 35 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, HPV18 형의 E6 항원이 서열 번호 14 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 입자.

청구항 37

제 35 항 또는 제 36 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, HPV18 형의 E7 항원이 서열 번호 15 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 입자.

청구항 38

제 35 항 내지 제 37 항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 서열 번호 18 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백을 코드하는 입자.

청구항 39

제 35 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 를 포함하는 mRNA 인 입자.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열이, 서열 번호 11 또는 13 중 어느 서열과 적어도 90 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 입자.

청구항 41

제 1 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산이 적어도 1 개의 수식 뉴클레오티드를 포함하는 입자.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

수식 뉴클레오티드가, 5 위치가 치환된 피리미딘 뉴클레오티드 및/또는 1 위치가 치환되어 있어도 되는 슈도우리딘의 적어도 1 개를 포함하는 입자.

청구항 43

제 41 항에 있어서,

수식 뉴클레오티드가, 5-메틸시티딘, 5-메톡시우리딘, 5-메틸우리딘, 슈도우리딘, 및 1-알킬슈도우리딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개를 포함하는 입자.

청구항 44

제 41 항에 있어서,

수식 뉴클레오티드가, 5-메틸시티딘, 5-메틸우리딘, 및 1-메틸슈도우리딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개를 포함하는 입자.

청구항 45

제 1 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서,

평균 입자경이 30 nm ~ 300 nm 인 입자.

청구항 46

인간 파필로마바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물을 제조하기 위한 제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 기재된 입자의 사용.

청구항 47

제 46 항에 있어서,

감염이 HPV16 형 또는 HPV18 형의 인간 파필로마바이러스에 의한 감염인 입자의 사용.

청구항 48

제 1 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 기재된 입자를 함유하는, 조성물.

청구항 49

제 48 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 또는 in vitro 에서 발현시키기 위한 조성물.

청구항 50

제 48 항 또는 제 49 항에 있어서,

의약으로서 사용되는 조성물.

청구항 51

제 50 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물.

청구항 52

제 50 항 또는 제 51 항에 있어서,

인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 53

제 48 항 또는 제 49 항에 기재된 조성물을 세포에 도입하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vitro 에서 발현시키는 방법.

청구항 54

제 48 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 에서 발현시키는 방법.

청구항 55

제 50 항 또는 제 51 항에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 56

제 50 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HPV mRNA 를 봉입 (封入) 한 핵산 지질 입자 백신에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 파필로마바이러스 (human papillomavirus, HPV) 는 엔벨로프막을 갖지 않는 고리형 2 본쇄 DNA 를 게놈으로서 갖는 바이러스이고, 200 전후의 유전자형이 존재한다 (비특허문헌 1). 그 중에는 감염 세포를 암화하는 유전자형이 있고, 특히 자궁경부암을 대표로 하는 암 발증과의 상관이 증명되어 있는 유전자형 16 과 18 은 하이리스크형으로 분류된다 (비특허문헌 2).

[0003] HPV 의 게놈에는 8 개의 바이러스 단백질이 코드되어 있고, 바이러스의 라이프 사이클에 있어서의 발현 시기에 따라, early genes (E1, E2, E4, E5, E6, E7) 와 late genes (L1, L2) 로 분류된다. Early genes 는 바이러스 복제 및 감염 세포의 암화를 제어하고, L1 및 L2 는 바이러스 입자 외각 (캡시드) 가 되는 구조 단백질이다 (비특허문헌 3).

[0004] HPV 는, 편평 상피의 기저층에 존재하는 케라티노사이트 전구 세포에 감염된다. HPV 감염은, 숙주 세포막 표면에 존재하는 헤파란황산프로테오글리칸에 캡시드를 구성하는 L1 단백질이 흡착됨으로써 개시된다 (비특허문헌 4). HPV 감염 방어를 담당하는 중화 항체는 L1 단백질을 표적으로 하기 위해, 현재 출시되고 있는 예방 백신에는, L1 단백질의 VLP (virus-like particle) 항원이 약효 성분으로서 포함되어 있다. 또, 현존하는 3 종 모든 예방 백신에 있어서, 유전자형 16 과 18 의 L1 VLP 항원이 포함되어 있다. 어느 백신도, HPV 감염에 나이브한 청년기의 집단에 있어서는, HPV 유전자형 16 과 18 에 대한 예방 효과는 95 % 이상이지만, 자궁경부암, 및 전암 상태인 자궁 경부 이형성의 치료 효과는 관찰되지 않는다 (비특허문헌 5).

[0005] PV 감염 세포는, E6 및 E7 의 암화 단백질에 의해 세포 주기에 이상을 초래한다. 이것은, 세포 주기나 아포

토시스 세포사 유도를 담당하는 p53 이나 pRb 의 기능이 E6 및 E7 에 의해 저해되기 때문이다 (비특허문헌 6, 7). E6 및 E7 의 암화 활성화에 중요한 영역이 분명해지고 있으며, 백신 항원으로서 E6 및 E7 을 사용할 때에는, 불활화 변이를 삽입하여 안전성을 높이는 것이 가능하다 (비특허문헌 8 - 10).

[0006] HPV 감염에 대한 숙주 방어 면역은, 중화 항체의 유도와 세포 상해성 T 세포 (cytotoxic T cell, CTL) 나 헬퍼 T 세포의 유도이다. 특히 E6 이나 E7 의 비구조 단백질은 CTL 유도의 표적 항원이고, HPV 감염에서 기인하는 자궁경부암, 및 자궁경부 이형성의 치료 백신 항원으로서 주목되고 있다 (비특허문헌 11).

[0007] 특허문헌 1 에는, HPV 유전자형 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52 및 58 의 E6 과 E7 융합 항원 유전자 서열이 기재되어 있다. 이 문헌에 기재되어 있는 유전자 서열에서는, E6 의 N 말에 IgE 리더 시퀀스가 부가되고, E6 과 E7 의 번역 영역 서열 사이에는, furin 펩티다아제의 절단 사이트가 삽입되어 있다. 또, E6 의 p53 결합 영역과 E7 의 pRb 결합 영역에 변이를 삽입하여, E6 및 E7 의 암화 활성을 불활화하고 있다. 이 유전자 서열을 포유류 발현 플라스미드에 도입하고, HPV 에 대한 DNA 유전자 백신으로서, 마우스 모델에 있어서의 약효 평가를 실시하고 있다. 면역은, 전기 천공법을 사용한 마우스 대퇴부에 대한 근육내 투여이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) JP 2016-512553

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Virology 2013 ; 445 : 2e10.
(비특허문헌 0002) J Natl Cancer Inst 1995 ; 87 : 796 - 802.
(비특허문헌 0003) J Clin Virol 2005 ; 32 (Suppl.1) : S7e15.
(비특허문헌 0004) Proc Natl Acad Sci U.S.A 2009 ; 106 : 20458e63.
(비특허문헌 0005) Gynecologic Oncology 146(2017) 196 - 204
(비특허문헌 0006) Cell 1990 ; 63 : 1129e36
(비특허문헌 0007) Cancer Res 1996 ; 56 : 4620e4.
(비특허문헌 0008) J Virol, 1989, p.2650 - 2656
(비특허문헌 0009) J Virol, 1992, p.1329 - 1335
(비특허문헌 0010) J Virol, 1994, p.5698 - 5705
(비특허문헌 0011) Nat Rev Cancer. 2006, 6(10) : 753 - 763.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 인간 파필로마바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 백신을 제공하는 것을 목적으로 한다.

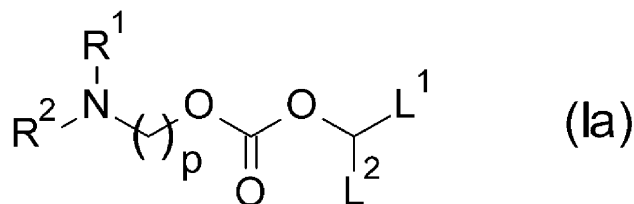
과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은, 암세포를 이식한 마우스에 인간 파필로마바이러스의 E6-E7 항원을 코딩하는 mRNA 를 봉입한 지질 입자를 투여한 결과, 암 축소 효과가 관찰된 것을 알아내어, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0012] 본 발명의 요지는 이하와 같다.

[0013] (1) 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산을 봉입한 지질 입자로서, 지질이 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질, 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 상기 입자.

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 식 중,

[0017] R^1 및 R^2 는, 독립적으로, C_1 - C_3 알킬기를 나타내고 ;

[0018] L^1 은, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;

[0019] L^2 는, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알킬기, 또는 C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;

[0020] p 는, 3 또는 4 이다.

[0021] (2) 일반식 (Ia) 중의 R^1 및 R^2 가 모두 메틸기인, (1) 에 기재된 입자.

[0022] (3) 일반식 (Ia) 중의 p 가 3 인 (1) 또는 (2) 에 기재된 입자.

[0023] (4) 일반식 (Ia) 중의 L^1 이, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기인, (1) ~ (3) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0024] (5) 일반식 (Ia) 중의 L^2 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{12} 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알케닐기인, (1) ~ (4) 중 어느 하나에 기재된 입자.

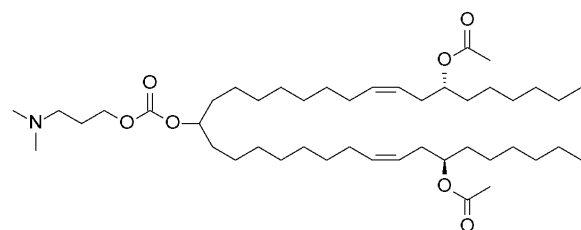
[0025] (6) 일반식 (Ia) 중의 L^2 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{12} 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기인, (1) ~ (4) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0026] (7) 일반식 (Ia) 중의 L^1 이, (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기, cis-8-헵타데세닐기, 또는 (8Z,11Z)-헵타데카디에닐기인 (1) ~ (6) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0027] (8) 일반식 (Ia) 중의 L^2 가, 데실기, cis-7-데세닐기, 도데실기, 또는 (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기인, (1) ~ (7) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0028] (9) 카티온성 지질이 하기 구조식 :

[0029] [화학식 2]

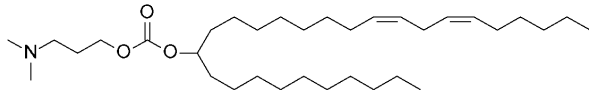


[0030]

[0031] 으로 나타내는 (1) 에 기재된 입자.

[0032] (10) 카티온성 지질이 하기 구조식 :

[0033] [화학식 3]

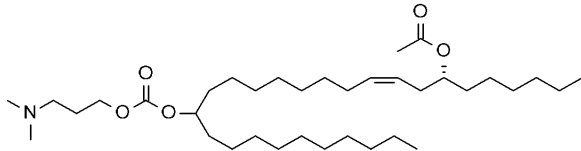


[0034]

[0035] 으로 나타내는 (1) 에 기재된 입자.

[0036] (11) 카티온성 지질이 하기 구조식 :

[0037] [화학식 4]



[0038]

[0039] 으로 나타내는 (1) 에 기재된 입자.

[0040] (12) 지질이, 추가로, 양친매성 지질, 스테롤류 및 PEG 지질을 포함하는 (1) ~ (11) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0041] (13) 양친매성 지질이, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린 및 디올레오일포스파티딜에탄올아민으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개인 (12) 에 기재된 입자.

[0042] (14) 스테롤류가 콜레스테롤인 (12) 또는 (13) 에 기재된 입자.

[0043] (15) PEG 지질이, 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민인 (12) ~ (14) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0044] (16) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 15 % 이하, 스테롤류가 20 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 (12) ~ (15) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0045] (17) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 5 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 50 %, 카티온성 지질이 40 ~ 55 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 25 인 (16) 에 기재된 입자.

[0046] (18) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 40 ~ 50 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 17.5 ~ 22.5 인 (17) 에 기재된 입자.

[0047] (19) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 45 ~ 50 %, PEG 지질이 1.5 ~ 2 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 17.5 ~ 22.5 인 (18) 에 기재된 입자.

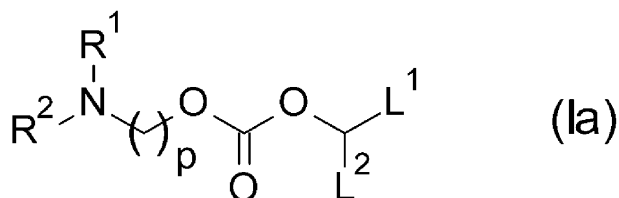
[0048] (20) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형인 (1) ~ (19) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0049] (21) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E6 항원이 서열 번호 8 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 (20) 에 기재된 입자.

[0050] (22) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E7 항원이 서열 번호 9 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 (20) 또는 (21) 에 기재된 입자.

[0051] (23) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 를 포함하는 mRNA 인 (20) ~ (22) 중 어느 하나에 기재된 입자.

- [0052] (24) HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열이, 서열 번호 2, 4 또는 6 중 어느 서열과 적어도 90 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 (23) 에 기재된 입자.
- [0053] (25) 핵산이 적어도 1 개의 수식 뉴클레오티드를 포함하는 (1) ~ (24) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0054] (26) 수식 뉴클레오티드가, 5 위치가 치환된 피리미딘 뉴클레오티드 및/또는 1 위치가 치환되어 있어도 되는 슈도우리딘의 적어도 1 개를 포함하는 (25) 에 기재된 입자.
- [0055] (27) 수식 뉴클레오티드가, 5-메틸시티딘, 5-메톡시우리딘, 5-메틸우리딘, 슈도우리딘, 및 1-알킬슈도우리딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개를 포함하는 (25) 에 기재된 입자.
- [0056] (28) 평균 입자경이 30 nm ~ 300 nm 인 (1) ~ (27) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0057] (29) 인간 파필로마바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물을 제조하기 위한 (1) ~ (28) 중 어느 하나에 기재된 입자의 사용.
- [0058] (30) 감염이 HPV16 형의 인간 파필로마바이러스에 의한 감염인 (29) 에 기재된 입자의 사용.
- [0059] (31) (1) ~ (28) 중 어느 하나에 기재된 입자를 함유하는, 조성물.
- [0060] (32) 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 또는 in vitro 에서 발현시키기 위한 (31) 에 기재된 조성물.
- [0061] (33) 의약으로서 사용되는 (31) 또는 (32) 에 기재된 조성물.
- [0062] (34) 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 (33) 에 기재된 조성물.
- [0063] (35) 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 (33) 또는 (34) 에 기재된 조성물.
- [0064] (36) (31) 또는 (32) 에 기재된 조성물을 세포에 도입하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vitro 에서 발현시키는 방법.
- [0065] (37) (31) ~ (35) 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 에서 발현시키는 방법.
- [0066] (38) (33) 또는 (34) 에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.
- [0067] (39) (33) ~ (35) 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는 방법.
- [0068] 또, 본 발명의 다른 양태에 있어서의 요지는 이하이다.
- [0069] (1-1) 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산을 봉입한 지질 입자로서, 지질이 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질, 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 상기 입자.
- [0070] [화학적식 5]



- [0071]
- [0072] 식 중,
- [0073] R^1 및 R^2 는, 독립적으로, C_1 - C_3 알킬기를 나타내고 ;
- [0074] L^1 은, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;
- [0075] L^2 는, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알킬기, 또는 C_2 - C_4 알카노일옥시기를

1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₉ 알케닐기를 나타내고 ;

[0076] p 는, 3 또는 4 이다.

[0077] (1-2) 일반식 (Ia) 중의 R¹ 및 R² 가 모두 메틸기인, (1-1) 에 기재된 입자.

[0078] (1-3) 일반식 (Ia) 중의 p 가 3 인 (1-1) 또는 (1-2) 에 기재된 입자.

[0079] (1-4) 일반식 (Ia) 중의 L¹ 이, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₇-C₁₉ 알케닐기인, (1-1) ~ (1-3) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0080] (1-5) 일반식 (Ia) 중의 L² 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₂ 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₉ 알케닐기인, (1-1) ~ (1-4) 중 어느 하나에 기재된 입자.

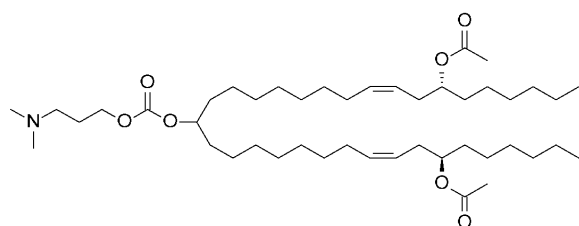
[0081] (1-6) 일반식 (Ia) 중의 L² 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₂ 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₇-C₁₉ 알케닐기인, (1-1) ~ (1-4) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0082] (1-7) 일반식 (Ia) 중의 L¹ 이, (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기, cis-8-헵타데세닐기, 또는 (8Z,11Z)-헵타데카디에닐기인 (1-1) ~ (1-6) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0083] (1-8) 일반식 (Ia) 중의 L² 가, 테실기, cis-7-테세닐기, 도테실기, 또는 (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기인, (1-1) ~ (1-7) 중 어느 하나에 기재된 입자.

[0084] (1-9) 카티온성 지질이 하기 구조식 :

[0085] [화학식 6]

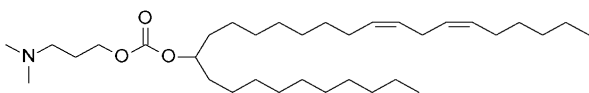


[0086]

[0087] 으로 나타내는 (1-1) 에 기재된 입자.

[0088] (1-10) 카티온성 지질이 하기 구조식 :

[0089] [화학식 7]

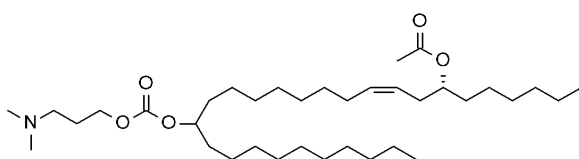


[0090]

[0091] 으로 나타내는 (1-1) 에 기재된 입자.

[0092] (1-11) 카티온성 지질이 하기 구조식 :

[0093] [화학식 8]



[0094]

[0095] 으로 나타내는 (1-1) 에 기재된 입자.

- [0096] (1-12) 지질이, 추가로, 양친매성 지질, 스테롤류 및 PEG 지질을 포함하는 (1-9) 또는 (1-10) 에 기재된 입자.
- [0097] (1-13) 지질이, 추가로, 양친매성 지질, 스테롤류 및 PEG 지질을 포함하는 (1-11) 에 기재된 입자.
- [0098] (1-14) 양친매성 지질이, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린 및 디올레오일포스파티딜에탄올아민으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개인 (1-12) 에 기재된 입자.
- [0099] (1-15) 양친매성 지질이, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린 및 디올레오일포스파티딜에탄올아민으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개인 (1-13) 에 기재된 입자.
- [0100] (1-16) 스테롤류가 콜레스테롤인 (1-12) 또는 (1-14) 에 기재된 입자.
- [0101] (1-17) 스테롤류가 콜레스테롤인 (1-13) 또는 (1-15) 에 기재된 입자.
- [0102] (1-18) PEG 지질이, 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민인 (1-12), (1-14), (1-16) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0103] (1-19) PEG 지질이, 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민인 (1-13), (1-15), (1-17) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0104] (1-20) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 22.5 % 이하, 스테롤류가 15 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 (1-12) ~ (1-19) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0105] (1-21) 양친매성 지질이 5 ~ 22.5 % 인 (1-20) 에 기재된 입자.
- [0106] (1-22) 양친매성 지질이 10 ~ 22.5 % 인 (1-21) 에 기재된 입자.
- [0107] (1-23) PEG 지질이 1 ~ 3 % 인 (1-20) ~ (1-22) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0108] (1-24) PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 (1-23) 에 기재된 입자.
- [0109] (1-25) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 5 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 50 %, 카티온성 지질이 40 ~ 55 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 (1-12), (1-14), (1-16), (1-18) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0110] (1-26) 양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 40 ~ 50 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 (1-25) 에 기재된 입자.
- [0111] (1-27) 양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 45 ~ 50 %, PEG 지질이 1.5 ~ 2 % 인 (1-26) 에 기재된 입자.
- [0112] (1-28) 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 15 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 40 %, 카티온성 지질이 40 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 (1-13), (1-15), (1-17), (1-19) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0113] (1-29) 카티온성 지질이 45 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 (1-28) 에 기재된 입자.
- [0114] (1-30) 양친매성 지질이 17.5 ~ 22.5 % 인 (1-29) 에 기재된 입자.
- [0115] (1-31) 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 25 인 (1-20) ~ (1-30) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0116] (1-32) 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 22.5 인 (1-31) 에 기재된 입자.
- [0117] (1-33) 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 17.5 ~ 22.5 인 (1-32) 에 기재된 입자.
- [0118] (1-34) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형인 (1-1) ~ (1-33) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0119] (1-35) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E6 항원이 서열 번호 8 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 (1-34) 에 기재된 입자.
- [0120] (1-36) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E7 항원이 서열 번호 9 의 아미노산 서열과 적어도

95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 (1-34) 또는 (1-35) 에 기재된 입자.

- [0121] (1-37) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 서열 번호 17 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백을 코드하는 (1-34) ~ (1-36) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0122] (1-38) 인간 파필로마바이러스가 HPV16 형이고, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 를 포함하는 mRNA 인 (1-34) ~ (1-37) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0123] (1-39) HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열이, 서열 번호 2, 4 또는 6 중 어느 서열과 적어도 90 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 (1-38) 에 기재된 입자.
- [0124] (1-40) 인간 파필로마바이러스가 HPV18 형인 (1-1) ~ (1-33) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0125] (1-41) 인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, HPV18 형의 E6 항원이 서열 번호 14 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 (1-40) 에 기재된 입자.
- [0126] (1-42) 인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, HPV18 형의 E7 항원이 서열 번호 15 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 (1-40) 또는 (1-41) 에 기재된 입자.
- [0127] (1-43) 인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 서열 번호 18 의 아미노산 서열과 적어도 95 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백을 코드하는 (1-40) ~ (1-42) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0128] (1-44) 인간 파필로마바이러스가 HPV18 형이고, HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이, 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 를 포함하는 mRNA 인 (1-40) ~ (1-43) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0129] (1-45) HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열이, 서열 번호 11 또는 13 중 어느 서열과 적어도 90 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 (1-44) 에 기재된 입자.
- [0130] (1-46) 핵산이 적어도 1 개의 수식 뉴클레오티드를 포함하는 (1-1) ~ (1-45) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0131] (1-47) 수식 뉴클레오티드가, 5 위치가 치환된 피리미딘 뉴클레오티드 및/또는 1 위치가 치환되어 있어도 되는 슈도우리딘의 적어도 1 개를 포함하는 (1-46) 에 기재된 입자.
- [0132] (1-48) 수식 뉴클레오티드가, 5-메틸시티딘, 5-메톡시우리딘, 5-메틸우리딘, 슈도우리딘, 및 1-알킬슈도우리딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개를 포함하는 (1-46) 에 기재된 입자.
- [0133] (1-49) 수식 뉴클레오티드가, 5-메틸시티딘, 5-메틸우리딘, 및 1-메틸슈도우리딘으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 개를 포함하는 (1-46) 에 기재된 입자.
- [0134] (1-50) 평균 입자경이 30 nm ~ 300 nm 인 (1-1) ~ (1-49) 중 어느 하나에 기재된 입자.
- [0135] (1-51) 인간 파필로마바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물을 제조하기 위한 (1-1) ~ (1-50) 중 어느 하나에 기재된 입자의 사용.
- [0136] (1-52) 감염이 HPV16 형 또는 HPV18 형의 인간 파필로마바이러스에 의한 감염인 (1-51) 에 기재된 입자의 사용.
- [0137] (1-53) (1-1) ~ (1-50) 중 어느 하나에 기재된 입자를 함유하는, 조성물.
- [0138] (1-54) 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 또는 in vitro 에서 발현시키기 위한 (1-53) 에 기재된 조성물.
- [0139] (1-55) 의약으로서 사용되는 (1-53) 또는 (1-54) 에 기재된 조성물.
- [0140] (1-56) 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 (1-55) 에 기재된 조성물.
- [0141] (1-57) 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 (1-55) 또는 (1-56) 에 기재된 조성물.
- [0142] (1-58) (1-53) 또는 (1-54) 에 기재된 조성물을 세포에 도입하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6

항원 및 E7 항원을 in vitro 에서 발현시키는 방법.

[0143] (1-59) (1-53) ~ (1-57) 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 에서 발현시키는 방법.

[0144] (1-60) (1-55) 또는 (1-56) 에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

[0145] (1-61) (1-55) ~ (1-57) 중 어느 하나에 기재된 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는 방법.

발명의 효과

[0146] 본 발명에 의해, 인간 파필로마바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료하는 것이 가능해진다. 또, 본 발명에 의해 인간 파필로마바이러스에 의한 감염에서 기인하는 질환(자궁경부암, 및 자궁경부 이형성 등)을 예방 및/또는 치료하는 것이 가능해진다. 또, 본 발명의 입자는, 대사 안정성, in vitro 활성, in vivo 활성, 약효 발현의 속도, 약효의 지속성, 물리적 안정성, 약물 상호 작용, 안전성 등의 점에서 우수한 성질을 갖고, 상기 질환을 치료 또는 예방하기 위한 의약으로서 유용하다.

[0147] 본 명세서에는, 본원의 우선권의 기초인 일본 특허출원 특원 2019-207001 의 명세서 및/또는 도면에 기재되는 내용을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0148] 도 1 은, HEK293T 세포에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자로부터의 HPV 유전자형 16 의 E7 단백 발현 레벨. 실시예 14 - 17 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자, NC ; 미처리에 의한 음성 컨트롤. 시험은 duplicate 로 실시하고, 평균은 봉상 그래프, 개개의 데이터는 서클 심볼로 나타난다.

도 2 는, C57BL/6 마우스에 있어서의 DNA 백신 모델과 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도 레벨. pDNA ; 참고예 1 의 DNA 백신 모델 투여군, 실시예 9, 11, 13 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; 미처리에 의한 음성 컨트롤군. PBMC ; 말초혈 단핵구, Splenocyte ; 비장 세포.

도 3 은, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도 레벨. 실시예 14 - 17 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; 미처리에 의한 음성 컨트롤군. Splenocyte ; 비장 세포.

도 4 는, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포를 제거한 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 항체 유도 능. 대조군 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 미처리 마우스, 실시예 20 ; 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여 마우스. 대조군 (미제거), 실시예 20 (미제거) ; 제거 항체를 투여하지 않은 컨트롤군. 대조군 (CD4 제거), 실시예 20 (CD4 제거) ; CD4 양성 세포 제거 항체의 투여군. 대조군 (CD8 제거), 실시예 20 (CD8 제거) ; CD8 양성 세포 제거 항체의 투여군.

도 5 는, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포를 제거한 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도능. 대조군 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 미처리 마우스, 실시예 20 ; 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여 마우스. 대조군 (미제거), 실시예 20 (미제거) ; 제거 항체를 투여하지 않은 컨트롤군. 대조군 (CD4 제거), 실시예 20 (CD4 제거) ; CD4 양성 세포 제거 항체의 투여군. 대조군 (CD8 제거), 실시예 20 (CD8 제거) ; CD8 양성 세포 제거 항체의 투여군.

도 6 은, TC-1 암 이식 모델에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 암 증식 억제 효과. 대조군 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 투여하지 않은 컨트롤군, 실시예 20 ; 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여 마우스. 대조군 (미제거), 실시예 20 (미제거) ; 제거 항체를 투여하지 않은 컨트롤군. 대조군 (CD4 제거), 실시예 20 (CD4 제거) ; CD4 양성 세포 제거 항체의 투여군. 대조군 (CD8 제거), 실시예 20 (CD8 제거) ; CD8 양성 세포 제거 항체의 투여군. 종양 사이즈는, 종양의 세로 (mm) × 가로 (mm) × 높이 (mm) 의 체적으로 나타낸다.

도 7 은, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 OVA 특이적 항체 유도 레벨. 실시예 21 - 27 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; 미처리에 의한 음성 컨트롤군.

도 8 은, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 OVA 특이적 IFN- γ 생성 레벨. 실시예 21 - 27 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; 미처리에 의한 음성 컨트롤군. No-stimulation ; 비자극에

의한 음성 컨트롤, MHC class I ; C57BL/6 마우스의 MHC class I 구속성의 에피토프 펩티드 자극, OVA ; OVA 단백 자극.

도 9 는, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도 레벨. 실시예 28 - 32 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; 미처리에 의한 음성 컨트롤군. Splenocyte ; 비장 세포.

도 10 은, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 HPV18E6 특이적 IFN- γ 산생 레벨. 실시예 37 - 40 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; Buffer 을 투여한 음성 컨트롤군. No peptides ; 펩티드 무처리의 음성 컨트롤군, HPV18E6 overlapping peptides ; HPV18E6 풀 펩티드 처리군

도 11 은, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도 레벨. 실시예 41 - 52 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; Buffer 을 투여한 음성 컨트롤군.

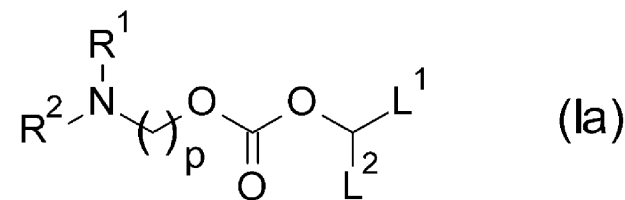
도 12 는, C57BL/6 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 HPV16E7 특이적 IFN- γ 산생 레벨. 실시예 41 - 52 ; mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군, NC ; Buffer 을 투여한 음성 컨트롤군. No peptides ; 펩티드 무처리의 음성 컨트롤군, MHC class I peptide ; HPV16E7 의 MHC class I 구속성 에피토프 펩티드 처리군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0149] 이하, 본 발명의 실시형태에 대해 보다 상세하게 설명한다.

[0150] 본 발명은, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산을 봉입한 지질 입자로서, 지질이 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질, 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 상기 입자를 제공한다.

[0151] [화학식 9]



[0152]

식 중,

[0153]

[0154] R^1 및 R^2 는, 독립적으로, C_1 - C_3 알킬기를 나타내고 ;

[0155] L^1 은, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;

[0156] L^2 는, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알킬기, 또는 C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알케닐기를 나타내고 ;

[0157] p 는, 3 또는 4 이다.

[0158] 일반식 (Ia) 중의 R^1 및 R^2 는, 독립적으로, C_1 - C_3 알킬기를 나타내지만, 바람직하게는, 모두 메틸기이다.

[0159] 일반식 (Ia) 중의 p 는, 3 또는 4 이지만, 바람직하게는, 3 이다.

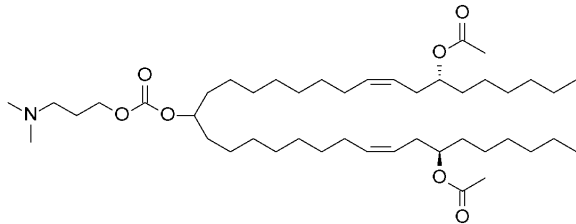
[0160] 일반식 (Ia) 중의 L^1 은, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기를 나타내지만, 바람직하게는, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{17} - C_{19} 알케닐기이다. L^1 로서 구체적으로는, (R)-11-아세톡시-cis-8-헵타데세닐기, cis-8-헵타데세닐기, 또는 (8Z,11Z)-헵타데카디에닐기 등을 예시할 수 있다.

[0161] 일반식 (Ia) 중의 L^2 는, C_2 - C_4 알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C_{10} - C_{19} 알킬기, 또는 C_2 - C_4

알카노일옥시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₉ 알케닐기를 나타내지만, 바람직하게는, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₂ 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₉ 알케닐기이다. 혹은 또, 일반식 (Ia) 중의 L² 가, 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₀-C₁₂ 알킬기, 또는 아세톡시기를 1 혹은 복수개 가지고 있어도 되는 C₁₇-C₁₉ 알케닐기인 것도 바람직하다. L² 로서 구체적으로는, 데실기, cis-7-데세닐기, 도데실기, 또는 (R)-11-아세틸옥시-cis-8-헵타데세닐기 등을 예시할 수 있다.

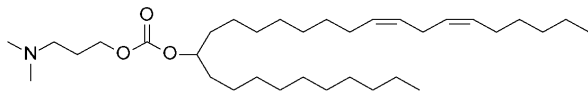
[0162] 본 발명의 입자를 구성하는 성분인 카티온성 지질로서, 구체적으로는, 하기 구조식 :

[0163] [화학식 10]



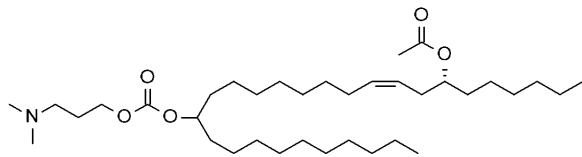
[0164]

[0165] [화학식 11]



[0166]

[0167] [화학식 12]



[0168]

[0169] 으로 각각 나타내는 이아세트산(7R,9Z,26Z,29R)-18-({[3-(디메틸아미노)프로폭시]카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일, 탄산3-디메틸아미노프로필(9Z,12Z)-옥타코사-19,22-디엔-11-일, 아세트산(7R,9Z)-18-({[3-(디메틸아미노)프로필옥시]카르보닐}옥시)옥타코사-9-엔-7-일을 예시할 수 있다.

[0170] 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질은, 1 종류의 화합물이어도 되고, 2 종류 이상의 화합물의 조합이어도 된다.

[0171] 일반식 (Ia) 로 나타내는 카티온성 지질을 제조하는 방법은, 국제 공보 제2015/005253호 팜플렛에 기재되어 있다.

[0172] 본 발명의 지질은, 추가로, 양친매성 지질, 스테롤류 및 PEG 지질을 포함해도 된다.

[0173] 양친매성 지질은, 극성, 비극성의 용매에 대해 모두 친화성을 갖는 지질이고, 구체적으로는, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜에탄올아민, 그들의 조합 등을 예시할 수 있다.

본 발명의 입자에 사용하는 양친매성 지질로서 바람직하게는, 디스테아로일포스파티딜콜린 및/또는 디올레오일포스파티딜에탄올아민이고, 보다 바람직하게는, 디스테아로일포스파티딜콜린이다.

[0174] 스테롤류는, 하이드록시기를 갖는 스테롤이고, 구체적으로는, 콜레스테롤 등을 예시할 수 있다.

[0175] PEG 지질은, PEG 수식된 지질이고, 구체적으로는, 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및/또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민, 그들의 조합 등을 예시할 수 있지만, 바람직하게는 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜이다.

[0176] 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 몰량으로, 양친매성 지질이 22.5 % 이하, 스테롤류가 15 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5

% 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 것이 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 5 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 것이 더욱 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 10 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 이고, 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 것이 더욱 바람직하다. 상기 지질 조성에 있어서 PEG 지질의 비율이, 몰량으로 1 ~ 3 % 인 것이 보다 바람직하고, 1 ~ 2 % 인 것이 더욱 더 바람직하고, 1.5 ~ 2 % 인 것이 특히 바람직하다. 또, 상기 지질 조성에 있어서 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이, 15 ~ 25 인 것이 보다 바람직하고, 15 ~ 22.5 인 것이 더욱 더 바람직하고, 17.5 ~ 22.5 인 것이 특히 바람직하다.

[0177] 카티온성 지질로서 탄산3-디메틸아미노프로필(9Z,12Z)-옥타코사-19,22-디엔-11-일, 또는 이아세트산(7R,9Z,26Z,29R)-18-({[3-(디메틸아미노)프로폭시]카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일을 사용하는 경우, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 몰량으로, 양친매성 지질이 15 % 이하, 스테롤류가 20 ~ 55 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 인 것이 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 5 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 50 %, 카티온성 지질이 40 ~ 55 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 인 것이 더욱 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 40 ~ 50 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 것이 더욱 더 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 10 ~ 15 %, 스테롤류가 35 ~ 45 %, 카티온성 지질이 45 ~ 50 %, PEG 지질이 1.5 ~ 2 % 인 것이 더욱 더 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 12.5 %, 스테롤류가 41 %, 카티온성 지질이 45 %, PEG 지질이 1.5 % 인 것이 특히 바람직하다. 상기 지질 조성에 있어서 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 것이 바람직하고, 15 ~ 25 인 것이 보다 바람직하고, 15 ~ 22.5 인 것이 더욱 더 바람직하고, 17.5 ~ 22.5 인 것이 특히 바람직하다.

[0178] 카티온성 지질로서 아세트산(7R,9Z)-18-({[3-(디메틸아미노)프로필옥시]카르보닐}옥시)옥타코사-9-엔-7-일을 사용하는 경우, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 몰량으로, 양친매성 지질이 12.5 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 45 %, 카티온성 지질이 40 ~ 65 %, PEG 지질이 1 ~ 5 % 인 것이 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 15 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 40 %, 카티온성 지질이 40 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 3 % 인 것이 보다 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 15 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 40 %, 카티온성 지질이 45 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 것이 더욱 바람직하고, 양친매성 지질, 스테롤류, 카티온성 지질, 및 PEG 지질의 지질 조성이, 몰량으로, 양친매성 지질이 17.5 ~ 22.5 %, 스테롤류가 15 ~ 40 %, 카티온성 지질이 45 ~ 60 %, PEG 지질이 1 ~ 2 % 인 것이 더욱 더 바람직하다. 상기 지질 조성에 있어서 핵산 중량에 대한 총지질 중량의 비율이 15 ~ 30 인 것이 바람직하고, 15 ~ 25 인 것이 보다 바람직하고, 15 ~ 22.5 인 것이 더욱 더 바람직하고, 17.5 ~ 22.5 인 것이 특히 바람직하다.

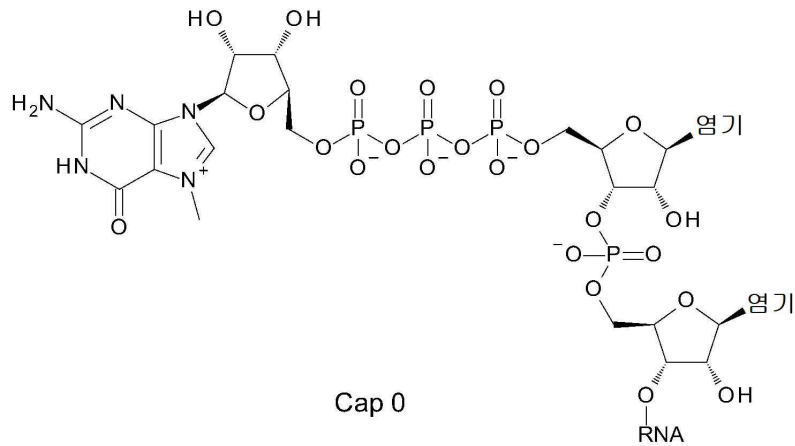
[0179] 본 발명에 있어서의 구체적인 지질의 조합으로는, 양친매성 지질로서 디스테아로일포스파티딜콜린, 디올레오일포스파티딜콜린, 또는 디올레오일포스파티딜에탄올아민, 스테롤류로서 콜레스테롤, 카티온성 지질로서 이아세트산(7R,9Z,26Z,29R)-18-({[3-(디메틸아미노)프로폭시]카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일, 탄산3-디메틸아미노프로필(9Z,12Z)-옥타코사-19,22-디엔-11-일, 또는 아세트산(7R,9Z)-18-({[3-(디메틸아미노)프로필옥시]카르보닐}옥시)옥타코사-9-엔-7-일, PEG 지질로서 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 또는 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민을 조합하여 사용해도 된다. 또, 양친매 지질로서 디스테아로일포스파티딜콜린, 또는 디올레오일포스파티딜에탄올아민, 스테롤류로서 콜레스테롤, 카티온성 지질로서 이아세트산(7R,9Z,26Z,29R)-18-({[3-(디메틸아미노)프로폭시]카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일, 또는 아세트산(7R,9Z)-18-({[3-(디메틸아미노)프로필옥시]카르보닐}옥시)옥타코사-9-엔-7-일, PEG 지질로서 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜을 사용하는 지질의 조합이 바람직하다. 본 발명에 있어서의 구체적인 지질의 조합으로서 보다 바람직하게는, 양친매 지질로서 디스테아로일포스파티딜콜린, 스테롤류로서 콜레스테롤, 카티온성 지질로서 이아세트산(7R,9Z,26Z,29R)-18-({[3-(디메틸아미노)프로폭시]카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일, 또는 아세트산(7R,9Z)-18-

(([3-(디메틸아미노)프로필옥시]카르보닐)옥시)옥타코사-9-엔-7-일, PEG 지질로서 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜이다.

- [0180] 본 발명에 있어서, 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 것이다. 지질 입자에 봉입되는 핵산이 발현하는 인간 파필로마바이러스의 E6 항원과 E7 항원은, 양자의 융합 단백질어도 되고, E6 항원과 E7 항원 사이에는 프로테아제 절단 서열이 포함되어 있어도 된다. 인간 파필로마바이러스의 유전자형은, 특별히 한정되지 않지만, HPV16 형, 18 형, 31 형, 33 형, 35 형, 39 형, 45 형, 51 형, 52 형, 56 형, 58 형, 59 형, 68 형을 예시할 수 있다. HPV16 형, 18 형, 31 형, 33 형, 35 형, 39 형, 45 형, 51 형, 52 형, 56 형, 58 형, 59 형, 68 형은, 자궁경부암을 대표로 하는 암 발증과의 상관이 증명되어 있다.
- [0181] HPV16 형의 E6 항원의 아미노산 서열을 서열 번호 8 에 나타낸다. 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 서열 번호 8 의 아미노산 서열과 적어도 95 %, 바람직하게는 96 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV16 형의 E6 항원을 코드하는 것이면 된다.
- [0182] HPV16 형의 E7 항원의 아미노산 서열을 서열 번호 9 에 나타낸다. 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 서열 번호 9 의 아미노산 서열과 적어도 95 %, 바람직하게는 96 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV16 형의 E7 항원을 코드하는 것이면 된다.
- [0183] HPV18 형의 E6 항원의 아미노산 서열을 서열 번호 14 에 나타낸다. 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 서열 번호 14 의 아미노산 서열과 적어도 95 %, 바람직하게는 96 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV18 형의 E6 항원을 코드하는 것이면 된다.
- [0184] HPV18 형의 E7 항원의 아미노산 서열을 서열 번호 15 에 나타낸다. 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 서열 번호 15 의 아미노산 서열과 적어도 95 %, 바람직하게는 96 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV18 형의 E7 항원을 코드하는 것이면 된다.
- [0185] 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site) 의 아미노산 서열을 서열 번호 16 에 나타낸다. 프로테아제 절단 서열로는, Furin 단백질에 의해 절단되는 서열이면 되고, 예를 들어, R-X-K/R-R (R 은 아르기닌을, K 는 리신을, X 는 임의의 아미노산을 나타낸다) 로 나타내는 서열 등을 들 수 있다 (J. Biol. Chem. 1992, 267, 16396 ; J. Biol. Chem. 1991, 266, 12127).
- [0186] HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백질의 아미노산 서열을 서열 번호 17 에 나타낸다. 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 서열 번호 17 의 아미노산 서열과 적어도 95 %, 바람직하게는 96 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백질을 코드하는 것이면 된다.
- [0187] HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백질의 아미노산 서열을 서열 번호 18 에 나타낸다. 지질 입자에 봉입되는 핵산은, 서열 번호 18 의 아미노산 서열과 적어도 95 %, 바람직하게는 96 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지는, HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원의 융합 단백질을 코드하는 것이면 된다.
- [0188] 아미노산 서열의 동일성 (identity) 이란, 대응하는 아미노산이 완전히 일치하는 아미노산을 동일한 아미노산으로 하여, 전체 길이 서열에 대한 아미노산의 일치 비율을 수치화한 것이다. 본 발명에 있어서의 서열의 동일성은 서열 해석 소프트웨어인 GENETYX-SV/RC (주식회사 제네틱스 제조) 를 사용하여 산출되는 것이고, 이 알고리즘은, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것이다. 본 발명의 지질 입자에 봉입되는 핵산이 코드하는 아미노산은, 서열 번호 8, 9, 14 - 18 과 일정 이상의 동일성을 유지하는 한, 아미노산의 변이 (치환), 결실, 삽입 및/또는 부가가 일어나고 있어도 된다.
- [0189] 본 발명의 지질 입자에 봉입되는 핵산이 코드하는 아미노산은, 상기 서술한 서열 동일성을 유지하고, 서열 번호 8, 9, 14 - 18 의 아미노산 서열 중, 수 지점 (바람직하게는 5 개 지점 이하, 보다 바람직하게는 3, 2 또는 1 개 지점) 에 있어서, 1 개 지점당 수 개 (바람직하게는 10 개 이하, 보다 바람직하게는 7 개 이하, 더욱 바람직하게는 5, 4, 3, 2 또는 1 개) 의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및/또는 부가되어 있어도 된다.
- [0190] 인간 파필로마바이러스 (예를 들어, HPV16 형, HPV18 형) 의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산은, 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 를 포함하

는 mRNA 이면 된다. 캡 구조 (Cap) 는, 많은 진핵 생물의 mRNA 의 5' 말단에 존재하고, 7-메틸구아노신 구조를 갖는 부위이다. 캡 구조로는, 예를 들어, cap0, cap1, cap2, ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) 등을 들 수 있고, 당해 캡 구조는 하기 구조식으로 나타내는 바와 같다.

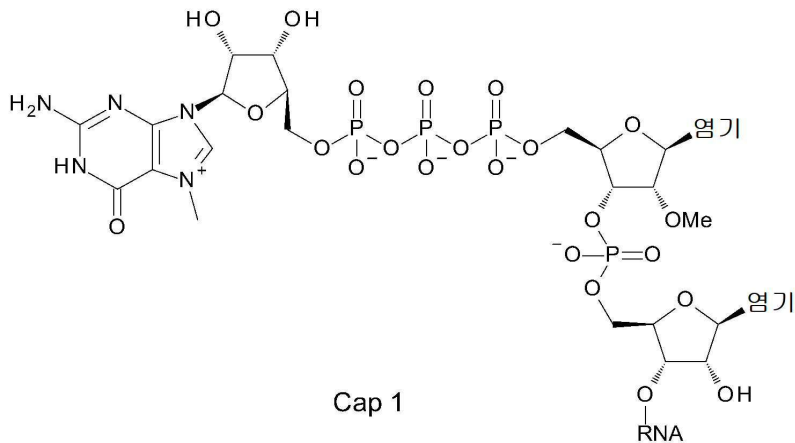
[0191] [화학식 13]



[0192]

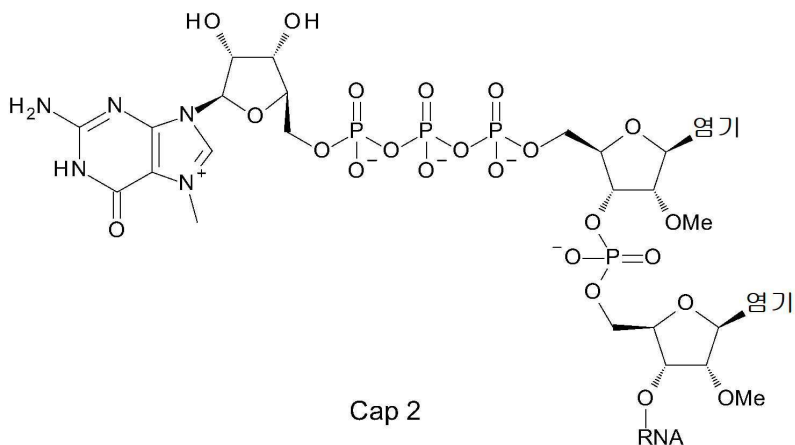
[0193] (식 중, 염기는 미수식 또는 수식된 임의의 핵산 염기를 나타내고, RNA 는 임의의 폴리뉴클레오티드를 나타낸다.)

[0194] [화학식 14]



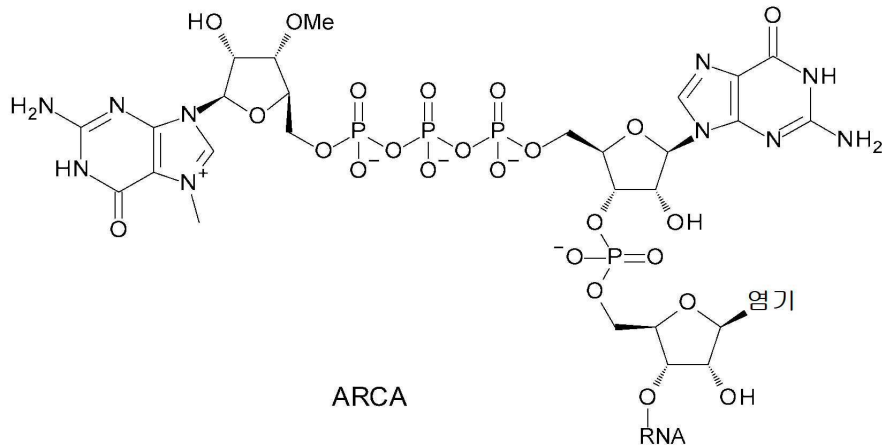
[0195]

[0196] [화학식 15]



[0197]

[0198] [화학식 16]



[0199]

[0200]

본 발명의 mRNA 의 캡 구조로는, 바람직하게는 cap0, 또는 cap1 이고, 보다 바람직하게는 cap1 이다. 5' 비번역 영역 (5'-UTR) 의 서열은, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 2 ~ 70 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 2 ~ 70 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 2 ~ 70 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 2 ~ 70 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 2 ~ 70 의 서열이다. 리더 서열 (leader sequence) 의 서열은, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 71 ~ 124 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 71 ~ 124 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 71 ~ 124 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 71 ~ 124 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 71 ~ 124 의 서열이다. E6 의 번역 영역의 서열은, E6 항원의 아미노산 서열 모두 또는 일부를 발현할 수 있는 서열로서, 개시 코돈 및/또는 종지 코돈을 포함하고 있어도 되고, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 125 ~ 574 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 125 ~ 574 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 125 ~ 574 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 125 ~ 589 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 125 ~ 589 의 서열이다. 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site) 의 서열은, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 575 ~ 595 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 575 ~ 595 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 575 ~ 595 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 590 ~ 610 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 590 ~ 610 의 서열이다. E7 의 번역 영역의 서열은, E7 항원의 아미노산 서열의 모두 또는 일부를 발현할 수 있는 서열로서, 개시 코돈 및/또는 종지 코돈을 포함하고 있어도 되고, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 596 ~ 889 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 596 ~ 889 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 596 ~ 889 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 611 ~ 925 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 611 ~ 925 의 서열이다. 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 의 서열은, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 890 ~ 1021 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 890 ~ 1021 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 890 ~ 1021 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 926 ~ 1057 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 926 ~ 1057 의 서열이다. 폴리 A 꼬리부 (polyA) 의 서열은, 예를 들어, 서열 번호 2 의 서열 중의 염기 번호 1022 ~ 1123 의 서열, 서열 번호 4 의 서열 중의 염기 번호 1022 ~ 1123 의 서열, 및 서열 번호 6 의 서열 중의 염기 번호 1022 ~ 1123 의 서열, 서열 번호 11 의 서열 중의 염기 번호 1058 ~ 1159 의 서열, 서열 번호 13 의 서열 중의 염기 번호 1058 ~ 1159 의 서열이다. 캡 구조 (Cap), 5' 비번역 영역 (5'-UTR), 리더 서열 (leader sequence), E6 의 번역 영역, 프로테아제 절단 서열 (Furin Cleavage site), E7 의 번역 영역, 3' 비번역 영역 (3'-UTR) 및 폴리 A 꼬리부 (polyA) 의 서열에는, 개변이 이루어져 있어도 되고, HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열은, 서열 번호 2, 4 또는 6 중 어느 서열과 적어도 90 %, 바람직하게는 95 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열로 이루어지면 된다. 또, HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산의 서열은, 서열 번호 11 또는 13 중 어느 서열과 적어도 90 %, 바람직하게는 95 %, 보다 바람직하게는 97 % 의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열로 이루어지면 된다.

[0201]

지질 입자에 봉입되는 핵산은, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산이면, 어떠한 형태이어도 된다. 예를 들어, 1 본쇄 DNA, 1 본쇄 RNA (예를 들어, mRNA), DNA 와 RNA 가 혼합된 1 본쇄 폴리뉴클레오티드, 2 본쇄 DNA, 2 본쇄 RNA, DNA-RNA 의 하이브리드 폴리뉴클레오티드, DNA 와 RNA 가 혼

합된 2 종의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 2 본쇄 폴리뉴클레오티드 등을 들 수 있고, 바람직하게는 mRNA 이다.

- [0202] 지질 입자에 봉입되는 핵산을 구성하는 뉴클레오티드는, 천연형의 것이어도 되고, 수식 뉴클레오티드이어도 되지만, 적어도 1 개의 수식 뉴클레오티드를 포함하면 된다.
- [0203] 수식 뉴클레오티드는, 염기, 당 및 인산디에스테르 결합 중 어느 부분이 수식된 것이어도 된다. 수식 부위는 1 개 지점이어도 되고, 2 개 지점 이상이어도 된다.
- [0204] 염기의 수식의 예로는, 사이토신의 5-메틸화, 5-플루오로화, N4-메틸화, 우라실의 5-메틸화 (티민), 5-플루오로화, 아데닌의 N6-메틸화, 구아닌의 N2-메틸화 등을 들 수 있다.
- [0205] 당의 수식의 예로는, D-리보푸라노오스의 2'-O-메틸화를 들 수 있다.
- [0206] 인산디에스테르 결합의 수식의 예로는, 포스포로티오에이트 결합을 들 수 있다.
- [0207] 수식 뉴클레오티드는, 염기 부분이 수식된 것이 바람직하고, 예를 들어, 5 위치가 치환된 피리미딘 뉴클레오티드, 1 위치가 치환되어 있어도 되는 슈도우리딘이면 되고, 구체적으로는, 5-메틸시티딘, 5-메톡시우리딘, 5-메틸우리딘, 슈도우리딘, 1-알킬슈도우리딘을 예시할 수 있다. 또, 1-알킬슈도우리딘으로는, 1-(C1-C6 알킬) 슈도우리딘이어도 되고, 바람직하게는 1-메틸슈도우리딘 또는 1-에틸슈도우리딘이다. 수식 뉴클레오티드로서 보다 바람직하게는, 5-메틸시티딘, 5-메틸우리딘, 및 1-메틸슈도우리딘을 들 수 있다. 수식 뉴클레오티드로서 특히 바람직하게는, 5-메틸시티딘 및 5-메틸우리딘의 조합, 또는 5-메틸시티딘 및 1-메틸슈도우리딘의 조합을 들 수 있다.
- [0208] 본 발명의 인간 파필로마바이러스 (예를 들어, HPV16 형, HPV18 형) 의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시킬 수 있는 핵산은, 원하는 염기 서열을 갖는 DNA 로부터 in vitro 전사 반응에 의해 제조할 수 있다. in vitro 전사에 필요한 효소, 완충액, 및 뉴클레오시드-5'-트리인산 혼합물 (아데노신-5'-트리인산 (ATP), 구아노신-5'-트리인산 (GTP), 시티딘-5'-트리인산 (CTP) 및 우리딘-5'-트리인산 (UTP)) 은, 시판되고 있는 (AmpliScribeT7 High Yield Transcription Kit (Epicentre), mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Life technologies) 등). 1 본쇄 RNA 를 제조하기 위해서 사용되는 DNA 는, 클론화된 DNA, 예를 들어, 플라스미드 DNA 또는 DNA 단편이 사용된다. 플라스미드 DNA 또는 DNA 단편은, 시판되고 있는 것을 사용해도 되고, 또 당해 분야에서 일반적으로 알고 있는 방법에 의해 제조할 수 있다 (예를 들어, Sambrook, J. et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual second edition(1989), Rashtchian, A., Current Opinion in Biotechnology, 1995, 6(1), 30 - 36, Gibson D. G. et al., Science, 2008, 319(5867), 1215 - 1220 에 기재된 방법 등).
- [0209] 안정성 및/또는 안전성을 향상시킨 mRNA 를 얻기 위해서, in vitro 전사 반응에 있어서, 일부 또는 전부의 미수식 뉴클레오시드-5'-트리인산을 수식 뉴클레오시드-5'-트리인산으로 치환함으로써, mRNA 중의 일부 또는 전부의 미수식 뉴클레오티드를 수식 뉴클레오티드로 치환할 수도 있다 (Kormann, M., Nature Biotechnology, 2011, 29, 154 - 157.).
- [0210] 안정성 및/또는 안전성을 향상시킨 mRNA 를 얻기 위해서, in vitro 전사 반응 후에 캡화 효소를 사용하는 방법에 의해 mRNA 의 5' 말단에 캡 구조 (상기의 Cap0 구조) 를 도입할 수 있다. 또, 추가로 Cap0 을 갖는 mRNA 에 2'-O-메틸트랜스페라아제를 작용시키는 방법에 의해, Cap0 을 Cap1 로 변환할 수 있다. 캡화 효소 및 2'-O-메틸트랜스페라아제는 시판되는 제품을 사용할 수 있다 (예를 들어, Vaccinia Capping System, M2080 ; mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase, M0366, 모두 New England Biolab 제조). 시판되는 제품을 사용하는 경우에는, 제품에 부속되는 프로토콜에 따라 캡 구조를 갖는 mRNA 를 제조할 수 있다.
- [0211] mRNA 의 5' 말단의 캡 구조는 효소를 사용하는 것과는 다른 방법에 의해서도 도입할 수 있다. 예를 들어, ARCA 또는 CleanCap 을 in vitro 전사 반응에 추가함으로써 ARCA 가 갖는 캡 유연체 (類緣體) 의 구조, 또는 CleanCap 에서 유래하는 Cap1 구조를 mRNA 에 도입할 수 있다. ARCA 및 CleanCap 은, 시판되는 제품을 사용할 수 있다 (ARCA, N-7003 ; CleanCap Reagent AG, N-7113, 모두 TriLink BioTechnologies 제조). 시판되는 제품을 사용하는 경우에는, 제품에 부속되는 프로토콜에 따라 캡 구조를 갖는 mRNA 를 제조할 수 있다.
- [0212] 본 발명의 핵산 봉입 지질 입자는, 박막법, 역상 증발법, 에탄올 주입법, 에테르 주입법, 탈수-재수화법, 계면 활성제 투석법, 수화법, 동결 용해법 등의 방법에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 국제공개공보 제 2015/005253호에 기재된 방법에 의해 핵산 봉입 지질 입자를 제조할 수 있다. 본 발명의 핵산 봉입 지질 입자는, 핵산 용액과 지질 용액을 마이크로 유로 내에서 혼합하는 것에 의해서도 제조할 수 있다. 예를 들어,

Precision Nanosystems 사의 NanoAssemblr (등록상표) 를 사용하여, 부속되는 프로토콜에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다.

- [0213] 본 발명의 입자는, 평균 입자경이 30 nm ~ 300 nm 이면 되고, 바람직하게는 30 ~ 200 nm 이고, 보다 바람직하게는 30 ~ 100 nm 이다. 평균 입자경은, Zeta Potential/Particle Sizer NICOMP (등록상표) 380ZLS (PARTICLE SIZING SYSTEMS) 등의 기기를 사용하여, 동적 광 산란법 등의 원리에 기초하여 체적 평균 입자경을 측정함으로써 얻을 수 있다.
- [0214] 본 발명의 입자는, 인간 파필로마바이러스 감염에 의한 질환 (자궁경부암, 자궁경부 이형성, 항문암, 중인두암, 침샘 콘딜로마) 을 예방 및/또는 치료하기 위한 조성물을 제조하기 위해서 사용할 수 있다. 감염은 HPV16 형, 18 형, 31 형, 33 형, 35 형, 39 형, 45 형, 51 형, 52 형, 56 형, 58 형, 59 형, 68 형, 6 형, 11 형의 인간 파필로마바이러스에 의한 감염이면 되고, 바람직하게는 HPV16 형 및/또는 HPV18 형이고, 보다 바람직하게는 HPV16 형이다.
- [0215] 본 발명의 입자를 사용하여, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 또는 in vitro 에서 발현시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은, 상기 입자를 함유하는 조성물을 세포에 도입하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vitro 에서 발현시키는 방법을 제공한다. 또, 본 발명은, 상기 입자를 함유하는 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 에서 발현시키는 방법도 제공한다. 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vivo 에서 발현시킴으로써, 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 그 결과로서, 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 상기 입자를 함유하는 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또, 본 발명은, 상기 입자를 함유하는 조성물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 파필로마바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0216] 본 발명의 입자는, 의약으로서 또, 실험용 시약으로서 이용할 수 있다. 본 발명의 입자는, 통상, 물, 완충액, 생리 식염수 등의 담체에 첨가되고, 이 배합물 (조성물) 을, 세포에 도입하거나 (in vitro), 포유 동물에게 투여할 수 있다 (in vivo). 포유 동물에게 투여되는 경우에는, 담체는 약학적으로 허용되는 담체 (예를 들어, 생리 식염수) 이면 된다. 또, 본 발명의 입자는, 지방, 지방유, 라놀린, 바셀린, 파라핀, 납, 수지, 플라스틱, 글리콜류, 고급 알코올, 글리세린, 물, 유화제, 현탁제 등을 기재 원료로 하는 크림, 페이스트, 연고, 젤, 로션 등의 제형으로 제제화해도 된다.
- [0217] 본 발명의 입자는, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 모르모트, 토끼, 돼지, 원숭이, 고양이, 개, 말, 염소, 양, 소 등의 포유 동물에게, 경구 투여, 혹은 근육내 투여, 정맥내 투여, 직장내 투여, 경피 투여, 경점막 투여, 피하 투여, 피내 투여 등의 방법에 의해 비경구 투여할 수 있다.
- [0218] 본 발명의 입자를 인간에게 투여하는 경우에는, 예를 들어, 성인 1 회당 약 0.001 ~ 1 mg, 바람직하게는 0.01 ~ 0.2 mg 의 투여량으로, 1 회 또는 수 차례, 근육내 주사, 피하 주사, 피내 주사, 점적 정맥 주사, 또는 정맥 주사하면 되지만, 그 투여량이나 투여 횟수는, 질환의 종류, 증상, 연령, 투여 방법 등에 따라 적절히 변경할 수 있다.
- [0219] 실험 시약으로서 사용하는 경우, 본 발명의 입자를, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 발현시키고자 하는 세포 (예를 들어, HEK293 세포 및 그 파생 세포 (HEK293T 세포, FreeStyle 293 세포나 Expi293 세포), CHO 세포, C2C12 마우스 근아 세포, 불사화 마우스 수상 세포 (MutuDC1940)) 에 도입하고, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원을 in vitro 에서 발현시킬 수 있다. 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원의 발현은, 샘플 중의 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원 단백질을 웨스턴 블롯법으로 검출하거나, 인간 파필로마바이러스의 E6 항원 및 E7 항원에 특이적인 펩티드 단편을 질량 분석법으로 검출하거나 함으로써 해석할 수 있다.
- [0220] 본 발명에 있어서, 「치료」란, 바이러스 또는 세균 등에 의한 감염증, 또는 당해 감염을 원인으로 하는 질환 (예를 들어, 전암 병변이나 암 등) 을 발증한 환자에 있어서, 이들 질환의 임상 증상의 회복, 관해, 완화 및/또는 악화의 지연을 의미한다.
- [0221] 본 발명에 있어서, 「예방」이란, 바이러스 또는 세균 등에 의한 감염증에 의한 질환의 발증율을 저감시키는 것을 의미한다. 예방은, 바이러스 또는 세균 등에 의한 감염증에 의한 질환의 진행의 리스크의 저하, 혹은 그들 질환의 중증화의 저감을 포함한다. 본 발명의 입자는, 방어 면역 반응을 유도하므로 상기 질환의 예방

및/또는 치료에 효과를 나타낸다.

[0222] 실시예

[0223] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명한다. 또한, 이들 실시예는, 본 발명을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0224] [실시예 1] HPV16 E6-E7 fusion2 mRNA-001 의 조제

[0225] (1) HPV16 E6-E7 fusion2 의 in vitro transcription (IVT) 용의 주형 DNA 의 제조

[0226] in vitro transcription (IVT) 에 사용하는 주형 DNA 를 제조하기 위해서 플라스미드를 구축하였다. GCTAGC (NheI 사이트), T7 프로모터 서열, human β -globin 의 5'-UTR 서열, KOZAK 서열, IgE leader sequence-HPV16 형 E6-Furin Cleavage site-HPV16 형 E7 의 번역 영역, human β -globin 의 3'-UTR 서열, 폴리 A 꼬리부 및 ACTAGT (SpeI 사이트) 가 순서대로 연결된 서열을 포함하는 DNA 단편 (서열 번호 1) 을 도입한 플라스미드 (pMA-HPV16_fusion2) 를 제조하였다.

[0227] (2) 주형 DNA 의 리니얼라이즈화

[0228] 실시예 1-(1) 에서 얻어진 플라스미드 (250 μ g) 를 용해시킨 Nuclease-free water (2200 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937) 에 10 $\times$ CutSmart Buffer (250 μ L, New England Biolabs catalog # B7204S), SpeI-HF (30 μ L, New England Biolabs catalog # R3133L) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 2 시간 인큐베이션 후, 65 $^{\circ}$ C 에서 20 분 인큐베이션하였다. 7.5 M 아세트산암모늄 (1250 μ L) 과 에탄올 (7500 μ L) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치 (靜置) 시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 TE-Buffer 로 500 μ g/mL 의 용액에 조제하였다.

[0229] (3) in vitro transcription 에 의한 HPV16 E6-E7 fusion2 mRNA-001 의 조제

[0230] 실시예 1-(2) 에서 얻어진 500 μ g/mL 주형 DNA (200 μ L), 100 mM CleanCap AG (200 μ L, TriLink catalog # T-7113), 100 mM ATP (200 μ L, Hongene catalog # R1331), 100 mM GTP (200 μ L, Hongene catalog # R2331), 100 mM 5-Me-CTP (200 μ L, Hongene catalog # R3-029), 100 mM 5-methyluridine triphosphate (200 μ L), Nuclease-free water (1600 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937), T7 Transcription 5 $\times$ buffer (800 μ L, Promega catalog # P140X), Enzyme mix, T7 RNA Polymerase (400 μ L, Promega catalog # P137X) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 4 시간 인큐베이션하였다. RQ1 RNase-Free DNase (100 μ L, Promega catalog # M6101) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 15 분 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (2000 μ L, Sigma-Aldrich catalog # L7026) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, RNeasy Maxi kit (Qiagen catalog # 75162) 를 사용하여 부속의 매뉴얼대로 정제하였다. 얻어진 용출액 (10.3 mL, UV 환산으로 17013 μ g) 과 Nuclease-free water (247 μ L), rApid Alkaline Phosphatase (Roche catalog # 04 898 141 001) 의 완충액 (1550 μ L) 과 효소 (3403 μ L) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 1 시간 인큐베이션 후, 75 $^{\circ}$ C 에서 15 분 인큐베이션 하였다. 8 M LiCl 용액 (7750 μ L) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, 역상 고속 액체 크로마토그래피 (Chromolith Semi-Prep (Merck catalog # 1.52016.0001) 를 2 개 연결하고, 5 % 아세토니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH7.0)/25 % 아세토니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH 7.0), 80 $^{\circ}$ C) 로 정제함으로써 목적으로 하는 mRNA 를 얻었다.

[0231] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 2 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens (BIO-RAD catalog # 7007103JA) 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0232] [실시예 2] HPV16 E6-E7 fusion10 mRNA -001 의 조제

[0233] (1) HPV16 E6-E7 fusion10 의 IVT 용의 주형 DNA 의 제조

[0234] IVT 주형에 사용하는 주형 DNA 를 제조하기 위해서 플라스미드를 구축하였다. GCTAGC (NheI 사이트), T7 프로모터 서열, β -globin 의 5'-UTR 서열, KOZAK 서열, IgE leader sequence-HPV16 형 E6-Furin Cleavage site-

HPV16 형 E7 의 번역 영역, β -globin 의 3'-UTR 서열, 폴리 A 꼬리부 및 ACTAGT (SpeI 사이트) 가 순서대로 연결된 서열을 포함하는 DNA 단편 (서열 번호 3) 을 도입한 플라스미드 (pMA-HPV16_fusion10) 를 제조하였다.

[0235] (2) in vitro transcription 에 의한 HPV16 E6-E7 fusion10 mRNA -001 의 조제

[0236] 실시예 1-(1) 에서 얻어진 플라스미드 대신에 실시예 2-(1) 에서 얻어진 플라스미드를 사용하여, 실시예 1-(2) 및 (3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다.

[0237] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 4 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0238] [실시예 3] HPV16 E6-E7 fusion10 mRNA -002 의 조제

[0239] 실시예 1-(1) 에서 얻어진 플라스미드 대신에 실시예 2-(1) 에서 얻어진 플라스미드를 사용하여, 실시예 1-(2) 와 동일한 방법으로 주형 DNA 를 얻었다. 그 후, 실시예 1-(3) 의 주형 DNA 대신에 얻어진 주형 DNA 를, 100 mM 5-Me-UTP 대신에 100 mM Pseudo-UTP (Hongene catalog # R5-022) 를 사용하여, 실시예 1-(3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다.

[0240] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 4 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0241] [실시예 4] HPV16 E6-E7 fusion10 mRNA -003 의 조제

[0242] 실시예 1-(1) 에서 얻어진 플라스미드 대신에 실시예 2-(1) 에서 얻어진 플라스미드를 사용하여, 실시예 1-(2) 와 동일한 방법으로 주형 DNA 를 얻었다. 그 후, 실시예 1-(3) 의 주형 DNA 대신에 얻어진 주형 DNA 를, 100 mM 5-Me-CTP 대신에 100 mM CTP (Hongene catalog # R3331), 100 mM 5-Me-UTP 대신에 100 mM N1-methylpseudouridine-5'-triphosphate (TriLink catalog # N-1081) 를 사용하여, 실시예 1-(3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다.

[0243] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 4 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0244] [실시예 5] HPV16 E6-E7 fusion10 mRNA -004 의 조제

[0245] 실시예 1-(1) 에서 얻어진 플라스미드 대신에 실시예 2-(1) 에서 얻어진 플라스미드를 사용하여, 실시예 1-(2) 와 동일한 방법으로 주형 DNA 를 얻었다. 그 후, 실시예 1-(3) 의 주형 DNA 대신에 얻어진 주형 DNA 를, 100 mM 5-Me-CTP 대신에 100 mM CTP (Hongene catalog # R3331) 를 사용하여, 실시예 1-(3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다.

[0246] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 4 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0247] [실시예 6] HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 mRNA -001 의 조제

[0248] (1) HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 의 IVT 용의 주형 DNA 의 제조

[0249] IVT 주형에 사용하는 주형 DNA 를 제조하기 위해서 플라스미드를 구축하였다. GCTAGC (NheI 사이트), T7 프로모터 서열, β -globin 의 5'-UTR 서열, KOZAK 서열, IgE leader sequence-HPV16 형 E6-Furin Cleavage site-HPV16 형 E7 의 번역 영역, β -globin 의 3'-UTR 서열, 폴리 A 꼬리부 및 ACTAGT (SpeI 사이트) 가 순서대로 연결된 서열을 포함하는 DNA 단편 (서열 번호 5) 을 도입한 플라스미드 (pMA-HPV16_fusion10_opt2) 를 제조하였다.

[0250] (2) 주형 DNA 의 리니얼라이즈화

[0251] 실시예 6-(1) 에서 얻어진 플라스미드 (250 μ g) 를 용해시킨 Nuclease-free water (2200 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937) 에 10 $\times$ CutSmart Buffer (250 μ L, New England Biolabs catalog # B7204S), SpeI-HF (30 μ L, New England Biolabs catalog # R3133L) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 2 시간 인큐베이션 후, 65 $^{\circ}$ C 에서 20 분 인큐베이션하였다. 7.5 M 아세트산암모늄 (1250 μ L) 과 에탄올 (7500 μ L) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 TE-Buffer 로

500 $\mu\text{g/mL}$ 의 용액에 조제하였다.

[0252] (3) *in vitro* transcription 에 의한 HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 mRNA -001 의 조제

[0253] 실시예 6-(2) 에서 얻어진 500 $\mu\text{g/mL}$ 주형 DNA (100 μL), 100 mM ATP (150 μL , Hongene catalog # R1331), 100 mM GTP (150 μL , Hongene catalog # R2331), 100 mM CTP (150 μL , Hongene catalog # R3331), 100 mM N1-methylpseudouridine-5'-triphosphate (150 μL , Hongene catalog # R5-027), Nuclease-free water (700 μL , Thermo Fisher catalog # AM9937), T7 Transcription 5 $\times$ buffer (400 μL , Promega catalog # P140X), Enzyme mix, T7 RNA Polymerase (200 μL , Promega catalog # P137X) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 인큐베이션하였다. RQ1 RNase-Free DNase (50 μL , Promega catalog # M6101) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 분 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (1000 μL , Sigma-Aldrich catalog # L7026) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해시켰다. 이 용액 (962 μL , UV 환산으로 5400 μg) 에, Nuclease-free water (2818 μL) 를 첨가하고, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 분 가운 후, 빙랭하에서 10 분 냉각시켰다. 10 $\times$ capping buffer (500 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 50 mM DTT) 를 540 μL , 20 mM GTP (270 μL , 100 mM GTP, Hongene catalog # R2331 을 Nuclease-free water 로 희석시켜 사용), 20 mM SAM (270 μL , 32 mM SAM, New England Biolabs catalog # B9003S 를 Nuclease-free water 로 희석시켜 사용), Vaccinia Capping Enzyme (540 μL , Hongene catalog # ON-028) 을 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 인큐베이션 후, 10 $\times$ capping buffer (90 μL), 20 mM SAM (270 μL), 2'-O-Methyltransferase (540 μL , Hongene catalog # ON-014) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (6300 μL) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, 역상 고속 액체 크로마토그래피 (Chromolith Semi-Prep (Merck catalog # 1.52016.0001) 을 2 개 연결하고, 5 % 아세트니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH 7.0)/25 % 아세트니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH7.0), 80 $^{\circ}\text{C}$) 로 정제함으로써 목적으로 하는 mRNA 를 얻었다.

[0254] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 6 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0255] (4) *in vitro* transcription 에 의한 HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 mRNA-001 의 조제

[0256] 실시예 6-(2) 에서 얻어진 500 $\mu\text{g/mL}$ 주형 DNA (200 μL), 100 mM ATP (300 μL , Hongene catalog # R1331), 100 mM GTP (300 μL , Hongene catalog # R2331), 100 mM CTP (300 μL , Hongene catalog # R3331), 100 mM N1-methylpseudouridine-5'-triphosphate (300 μL , Hongene catalog # R5-027), Nuclease-free water (1400 μL , APPLIED-BIO catalog # AM9937), T7 Transcription 5 $\times$ buffer, (400 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 80 mM MgCl_2 , 10 mM spermidine, 200 mM DTT) 를 800 μL , Enzyme mix, T7 RNA Polymerase (400 μL , Promega catalog # P137X) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8 시간 인큐베이션하였다. RQ1 RNase-Free DNase (100 μL , Promega catalog # M6101) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 분 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (2000 μL , Sigma-Aldrich catalog # L7026) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해시켰다. 이 용액 (1590 μL , UV 환산으로 6000 μg) 에, Nuclease-free water (2610 μL) 를 첨가하고, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분 가운 후, 빙랭하에서 10 분 냉각시켰다. 10 $\times$ capping buffer (500 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 50 mM DTT) 를 600 μL , 20 mM GTP (300 μL , 100 mM GTP, Hongene catalog # R2331 을 Nuclease-free water 로 희석시켜 사용), 20 mM SAM (300 μL , S-adenosyl-L-methionine disulfate tosylate, OX-CHEM catalog # AX8250818 을 0.005 M 황산, 10 % 에탄올 용액에 용해시켜 사용), Vaccinia Capping Enzyme (600 μL , Hongene catalog # ON-028) 을 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 인큐베이션 후, 10 $\times$ capping buffer (100 μL), 20 mM SAM (300 μL), 2'-O-Methyltransferase (600 μL , Hongene catalog # ON-014) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (7000 μL) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, 역상 고속 액체 크로마토그래피 (Chromolith Performance (Merck catalog # 1.02129.0001), 5 %

아세트오니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH 7.0)/25 % 아세트오니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH7.0), 45 °C) 로 정제함으로써 목적으로 하는 mRNA 를 얻었다.

[0257] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 6 의 서열을 갖는다. LabChip GX Touch HT mRNA StdSens (PerkinElmer catalog # CLS960010) 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0258] [실시예 7] HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 mRNA -002 의 조제

[0259] 실시예 6-(3) 의 100 mM CTP 대신에 100 mM 5-Me-CTP, 100 mM N1-methylpseudouridine-5'-triphosphate 대신에 100 mM 5-methyluridine triphosphate 를 사용하여, 실시예 6-(3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다. 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 6 의 서열을 갖는다. Experion RNA StdSens 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0260] [실시예 8] 실시예 1 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

[0261] (1) mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

[0262] 디스테아로일포스파티딜콜린 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine : 이하 DSPC 로 표기, NOF CORPORATION), 콜레스테롤 (Cholesterol : 이하 Chol 로 표기, Sigma-Aldrich, Inc.), 이아세트산 (7R,9Z,26Z,29R)-18-({[3-(디메틸아미노)프로폭시]카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일 (W02015/005253 의 실시예 23 에 기재된 화합물) (이하 LP 로 표기), 및 폴리에틸렌글리콜 분자량이 약 2000 인 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethylene Glycol, 이하 PEG-DMG 로 표기, NOF CORPORATION) 을, DSPC : Chol : LP : PEG-DMG = 10 : 43.5 : 45 : 1.5 의 몰비로, 총지질 농도 5 mM 이 되도록 에탄올에 용해시켰다.

[0263] 한편, 실시예 1 에서 얻은 HPV16 fusion2 mRNA-001 을, 시트르산 완충액 (20 mM Citrate Buffer, pH4.0) 으로, 51.8 µg/mL 로 조제하였다.

[0264] 상기의 지질 용액과 mRNA 용액을, 그 체적비가 1 : 3 이 되도록 NanoAssemblr BenchTop (Precision Nanosystems Inc.) 을 사용하여 마이크로 유로 내에서 혼합하여, 핵산 지질 입자의 조 (粗) 분산액을 얻었다. 핵산 지질 입자의 분산액을 약 25 ~ 50 배량의 인산 완충액 (pH7.4) 으로 12 - 18 시간 투석 (Float-A-Lyzer G2, MWCO : 1,000 kD, Spectra/Por) 함으로써, 에탄올 제거를 실시하여, 정제된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 분산액을 얻었다.

[0265] 또한, LP 는 W02015005253 의 실시예 23 에 기재된 방법에 따라 합성하였다.

[0266] (2) mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 특성 평가

[0267] (1) 에서 조제한 핵산 지질 입자를 포함하는 분산액의 특성 평가를 실시하였다. 각각의 특성 평가의 방법에 대해 설명한다.

[0268] (2-1) mRNA 의 봉입률

[0269] mRNA 의 봉입률은, Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit (invitrogen) 를 사용하여, 첨부 문서에 준하여 측정하였다.

[0270] 즉, 0.015 % Triton X-100 계면 활성제 존재하 및 비존재하에 있어서, 핵산 지질 입자의 분산액 중의 mRNA 를 정량하고, 다음 식에 의해 봉입률을 산출하였다.

[0271]
$$\frac{\{ \text{계면 활성제 존재하에 있어서의 mRNA 량} \} - [\text{계면 활성제 비존재하에 있어서의 mRNA 량}]}{[\text{계면 활성제 존재하에 있어서의 mRNA 량}]} \times 100 (\%)$$

[0272] (2-2) mRNA 와 지질의 비율

[0273] 핵산 지질 입자의 분산액 중의 mRNA 량을 역상 크로마토그래피로 측정하였다 (System : Agilent 1100series, Column : Bioshell A400 Protein C4 (10 cm × 4.6 mm, 3.4 µm) (SUPELCO), Buffer A : 0.1 M 아세트산트리에틸아민 (pH7.0), Buffer B : 아세트오니트릴, (B %) : 5 - 50 % (0 - 15 min), Flow Rate : 1 mL/min, Temperature : 70 °C, Detection : 260 nm).

[0274] 핵산 지질 입자의 분산액 중의 각 지질량을 역상 크로마토그래피로 측정하였다 (System : DIONEX UltiMate 3000, Column : XSelect CSH (50 mm × 3 mm, 5 µm) (Thermo Fisher Scientific), Buffer A : 0.2 % 포름산,

Buffer, B : 0.2 % 포름산, 메탄올, (B %) : 75 - 95 % (0 - 15 min), 95 % (15 - 17 min), Flow Rate : 0.4 mL/min, Temperature : 50 °C, Detection : Corona CAD (Charged Aerosol Detector)).

mRNA 에 대한 총지질량의 비율을 다음 식에 의해 산출하였다.

[총지질 농도]/[mRNA 농도] (wt/wt)

(2-3) 평균 입자경

핵산 지질 입자의 입자경은, Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPTM 380ZLS (PARTICLE SIZING SYSTEMS) 로 측정하였다. 표 중의 평균 입자경은 체적 평균 입자경을 나타내고, $\pm$ 이하는 편차를 나타낸다.

결과를 표 1 에 나타냈다.

[실시에 9 ~ 13] HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

실시에 8 과 동일한 방법으로, 실시에 2, 3, 4, 5 내지 6 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-DMG = 12.5 : 41 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 1 에 나타냈다.

[실시에 14 ~ 17] HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

실시에 8 과 동일한 방법으로, 실시에 2, 4, 6 내지 7 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-DMG = 12.5 : 41 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 1 에 나타냈다.

[실시에 18] 실시에 2 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

실시에 8 과 동일한 방법으로, 실시에 2 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-DMG = 12.5 : 41 : 45 : 1.5 의 몰비로 하고, mRNA 중량에 대한 전체 지질 중량의 비율을 25 로 하였다. 결과를 표 1 에 나타냈다.

[실시에 19] 실시에 2 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

실시에 8 과 동일한 방법으로, 실시에 2 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-DMG = 12.5 : 41 : 45 : 1.5 의 몰비로 하고, mRNA 중량에 대한 전체 지질 중량의 비율을 30 으로 하였다. 결과를 표 1 에 나타냈다.

[실시에 20] 실시에 2 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

실시에 8 과 동일한 방법으로, 실시에 2 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 결과를 표 1 에 나타냈다.

[실시에 21] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

실시에 8-(1) 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제를 실시하였다. 단, PEG-DMG 대신에, 폴리에틸렌글리콜 분자량이 약 2000 인 N-[메톡시 폴리(에틸렌글리콜)2000]카르바모일]-1,2-디미리스틸옥시프로필-3-아민 (N-[methoxy poly(ethylene glycol)2000 carbamyl]-1,2-dimyristyloxylpropyl-3-amine) : 이하 PEG-C-DMA 로 표기, Journal of Controlled Release 112(2006) 280 - 290 에 기재된 화합물 12) 을 사용하여, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-C-DMA = 10 : 38.5 : 50 : 1.5 의 몰비로 하였다.

(2) mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 특성 평가

(1) 에서 조제한 핵산 지질 입자를 포함하는 분산액의 특성 평가를 실시하였다. 각각의 특성 평가의 방법에 대해 설명한다.

(2-1) mRNA 의 봉입률

mRNA 의 봉입률은, Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit (invitrogen) 를 사용하여, 첨부 문서에 준하여 측정하였다.

- [0297] 즉, 0.015 % Triton X-100 계면 활성제 존재하 및 비존재하에 있어서, 핵산 지질 입자의 분산액 중의 mRNA 를 정량하고, 다음 식에 의해 봉입률을 산출하였다.
- [0298]
$$\{[\text{계면 활성제 존재하에 있어서의 mRNA 량}] - [\text{계면 활성제 비존재하에 있어서의 mRNA 량}]\} / [\text{계면 활성제 존재하에 있어서의 mRNA 량}] \times 100 (\%)$$
- [0299] (2-2) mRNA 와 지질의 비율
- [0300] 핵산 지질 입자의 분산액 중의 mRNA 량을 (2-1) 의 「계면 활성제 존재하에 있어서의 mRNA 량」 으로 하였다.
- [0301] 핵산 지질 입자의 분산액 중의 인지질량을 인지질 C-테스트 와코 (후지 필름 와코 순약 주식회사) 를 사용하여, 첨부 문서에 준하여 측정하였다. 즉, 2 % Triton X-100 계면 활성제 존재하에 있어서, 시료 중의 인지질량을 측정하였다.
- [0302] 핵산 지질 입자의 분산액 중의 콜레스테롤 및 LP 량을 역상 크로마토그래피로 측정하였다 (System : DIONEX UltiMate 3000, Column : Chromolith Performance RP-18 endcapped 100-3 monolithic HPLC-column (Merck, Cat.# : 1.52001.0001), Buffer A : 0.01 % 트리플루오로아세트산, Buffer B : 0.01 % 트리플루오로아세트산, 메탄올, (B %) : 82 - 97 % (0 - 17 min), Flow Rate : 2 mL/min, Temperature : 50 °C, Detection : Corona CAD (Charged Aerosol Detector)).
- [0303] 인지질, 콜레스테롤 및 LP 의 측정값과 핵산 지질 입자를 구성하는 지질 성분의 조성비로부터, 총지질량을 산출하였다.
- [0304] mRNA 에 대한 총지질량의 비율을 다음 식에 의해 산출하였다.
- [0305]
$$[\text{총지질 농도}] / [\text{mRNA 농도}] (\text{wt/wt})$$
- [0306] (2-3) 평균 입자경
- [0307] 핵산 지질 입자의 입자경은, Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPTM 380ZLS (PARTICLE SIZING SYSTEMS) 로 측정하였다. 표 중의 평균 입자경은 체적 평균 입자경을 나타내고, $\pm$ 이하는 편차를 나타낸다.
- [0308] 결과를 표 2 에 나타냈다.
- [0309] [실시예 22] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0310] 실시예 21 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-C-DMAG = 10 : 35 : 50 : 5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 2 에 나타냈다.
- [0311] [실시예 23] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0312] 실시예 21 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-C-DMA = 10 : 23.5 : 65 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 2 에 나타냈다.
- [0313] [실시예 24] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0314] 실시예 21 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-C-DMA = 10 : 48.5 : 40 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 2 에 나타냈다.
- [0315] [실시예 25] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0316] 실시예 21 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-C-DMA = 5 : 43.5 : 50 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 2 에 나타냈다.
- [0317] [실시예 26] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0318] 실시예 21 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-C-DMA = 15 : 33.5 : 50 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 2 에 나타냈다.

- [0319] [실시예 27] OVA mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0320] 실시예 21 과 동일한 방법으로, 서열 번호 7 에 기재된 OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역을 갖는 mRNA 를 봉입한 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 Chol : LP : PEG-C-DMA = 53.5 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 2 에 나타냈다.
- [0321] [실시예 28] 실시예 4 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0322] 실시예 8 과 동일한 방법으로, 실시예 4 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, DSPC 대신에, 디올레오일포스파티딜콜린 (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine : 이하 DOPC 로 표기, NOF CORPORATION) 을 사용하여, 구성 지질 조성을 DOPC : Chol : LP : PEG-DMG = 10 : 43.5 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 3 에 나타냈다.
- [0323] [실시예 29] 실시예 4 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0324] 실시예 8 과 동일한 방법으로, 실시예 4 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, DSPC 대신에, DOPC 를 사용하여, 구성 지질 조성을 DOPC : Chol : LP : PEG-DMG = 15 : 38.5 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 3 에 나타냈다.
- [0325] [실시예 30] 실시예 4 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0326] 실시예 8 과 동일한 방법으로, 실시예 4 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, DSPC 대신에, 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine : 이하 DOPE 로 표기, NOF CORPORATION) 을 사용하여, 구성 지질 조성을 DOPE : Chol : LP : PEG-DMG = 10 : 43.5 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 3 에 나타냈다.
- [0327] [실시예 31] 실시예 4 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0328] 실시예 8 과 동일한 방법으로, 실시예 4 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, DSPC 대신에, DOPE 를 사용하여, 구성 지질 조성을 DOPE : Chol : LP : PEG-DMG = 15 : 38.5 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 3 에 나타냈다.
- [0329] [실시예 32] 실시예 4 에 기재된 HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제
- [0330] 실시예 8 과 동일한 방법으로, 실시예 4 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 단, 구성 지질 조성을 DSPC : Chol : LP : PEG-DMG = 12.5 : 41 : 45 : 1.5 의 몰비로 하였다. 결과를 표 3 에 나타냈다.
- [0331] [실시예 33] HPV18 E6-E7 fusion1 opt1 mRNA -001 의 조제
- [0332] (1) HPV18 E6-E7 fusion1 opt1 의 in vitro transcription (IVT) 용의 주형 DNA 의 제조
- [0333] in vitro transcription (IVT) 에 사용하는 주형 DNA 를 제조하기 위해서 플라스미드를 구축하였다. GCTAGC (NheI 사이트), T7 프로모터 서열, human β -globin 의 5'-UTR 서열, KOZAK 서열, IgE leader sequence-HPV18 형 E6-Furin Cleavage site-HPV18 형 E7 의 ORF, human β -globin 의 3'-UTR 서열, 폴리 A 꼬리부 및 ACTAGT (SpeI 사이트) 가 순서대로 연결된 서열을 포함하는 DNA 단편 (서열 번호 10) 을 도입한 플라스미드 (pMA-HPV18_fusion1_opt1) 를 제조하였다.
- [0334] (2) 주형 DNA 의 리니얼라이즈화
- [0335] 실시예 33-(1) 에서 얻어진 플라스미드 (350 μ g) 를 용해시킨 Nuclease-free water (3080 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937) 에 10 $\times$ CutSmart Buffer (350 μ L, New England Biolabs catalog # B7204S), SpeI-HF (70 μ L, New England Biolabs catalog # R3133L) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 2 시간 인큐베이션 후, 65 $^{\circ}$ C 에서 20 분 인큐베이션하였다. 7.5 M 아세트산암모늄 (1750 μ L) 과 에탄올 (10500 μ L) 을 혼합하고, -80 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (-10 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (-10 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 TE-Buffer 로 500 μ g/mL 의 용액에 조제하였다.
- [0336] (3) in vitro transcription 에 의한 HPV18 E6-E7 fusion1 opt1 mRNA -001 의 조제
- [0337] 실시예 33-(2) 에서 얻어진 500 μ g/mL 주형 DNA (150 μ L), 100 mM CleanCap AG (150 μ L, TriLink catalog #

T-7113), 100 mM ATP (150 μ L, Hongene catalog # R1331), 100 mM GTP (150 μ L, Hongene catalog # R2331), 100 mM CTP (150 μ L, Hongene catalog # R3331), 100 mM N1-Me-Pseudo UTP (150 μ L, Hongene catalog # R5-027), Nuclease-free water (1200 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937), T7 Transcription 5 $\times$ buffer (600 μ L, Promega catalog # P140X), Enzyme mix, T7 RNA Polymerase (300 μ L, Promega catalog # P137X) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 4 시간 인큐베이션하였다. RQ1 RNase-Free DNase (75 μ L, Promega catalog # M6101) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 15 분 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (1500 μ L, Sigma-Aldrich catalog # L7026) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, RNeasy Maxi kit (Qiagen catalog # 75162) 를 사용하여 부속의 매뉴얼대로 정제하였다. 얻어진 용출액의 일부 (11.0 mL, UV 환산으로 9813 μ g) 와 Nuclease-free water (537 μ L), rApid Alkaline Phosphatase (Roche catalog # 04 898 141 001) 의 완충액 (1500 μ L) 과 효소 (1963 μ L) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 30 분 인큐베이션 후, 75 $^{\circ}$ C 에서 3 분 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (15000 μ L) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 3 시간 정치시켰다. 원심 분리 (-8 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (-8 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, 역상 고속 액체 크로마토그래피 (YMC Triart-C8 5 μ m 10 $\times$ 150 mm (YMC # T012S05-1510WT), 5 % 아세토니트릴, 400 mM 아세트산 트리에틸아민 (pH7.0)/25 % 아세토니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH7.0), 75 $^{\circ}$ C) 로 정제함으로써 목적으로 하는 mRNA 를 얻었다.

[0338] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 11 의 서열을 갖는다. LabChip GX Touch Standard RNA Reagent Kit (PerkinElmer catalog # CLS960010) 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0339] [실시예 34] HPV18 E6-E7 fusion1 opt1 mRNA -002 의 조제

[0340] 실시예 33-(3) 의 100 mM CTP 대신에 100 mM 5-Me-CTP (Hongene catalog # R3-029) 를 사용하여, 100 mM N1-Me-Pseudo UTP 대신에 100 mM 5-methyluridine triphosphate 를 사용하여, 실시예 33-(3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다.

[0341] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 11 의 서열을 갖는다. LabChip GX Touch Standard RNA Reagent Kit (PerkinElmer catalog #CLS960010) 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0342] [실시예 35] HPV18 E6-E7 fusion1 opt2 mRNA -001 의 조제

[0343] (1) HPV18 E6-E7 fusion1 opt2 의 IVT 용의 주형 DNA 의 제조

[0344] IVT 주형에 사용하는 주형 DNA 를 제조하기 위해서 플라스미드를 구축하였다. GCTAGC (NheI 사이트), T7 프로모터 서열, β -globin 의 5'-UTR 서열, KOZAK 서열, IgE leader sequence-HPV18 형 E6-Furin Cleavage site-HPV18 형 E7 의 ORF, β -globin 의 3'-UTR 서열, 폴리 A 꼬리부 및 ACTAGT (SpeI 사이트) 가 순서대로 연결된 서열을 포함하는 DNA 단편 (서열 번호 12) 을 도입한 플라스미드 (pMA-HPV18_fusion1_opt2) 를 제조하였다.

[0345] (2) 주형 DNA 의 리니얼라이즈화

[0346] 실시예 35-(1) 에서 얻어진 플라스미드 (400 μ g) 를 용해시킨 Nuclease-free water (3520 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937) 에 10 $\times$ CutSmart Buffer (400 μ L, New England Biolabs catalog # B7204S), SpeI-HF (80 μ L, New England Biolabs catalog # R3133L) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 2 시간 인큐베이션 후, 65 $^{\circ}$ C 에서 20 분 인큐베이션하였다. 7.5 M 아세트산암모늄 (2000 μ L) 과 에탄올 (12000 μ L) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 TE-Buffer 로 500 μ g/mL 의 용액으로 조제하였다.

[0347] (3) in vitro transcription 에 의한 HPV18 E6-E7 fusion1 opt2 mRNA -001 의 조제

[0348] 실시예 35-(2) 에서 얻어진 500 μ g/mL 주형 DNA (150 μ L), 100 mM ATP (225 μ L, Hongene catalog # R1331), 100 mM GTP (225 μ L, Hongene catalog # R2331), 100 mM CTP (225 μ L, Hongene catalog # R3331), 100 mM N1-Me-Pseudo UTP (225 μ L, Hongene catalog # R5-027), Nuclease-free water (1050 μ L, Thermo Fisher catalog # AM9937), T7 Transcription 5 $\times$ buffer (600 μ L, Promega catalog # P140X), Enzyme mix, T7 RNA Polymerase (300 μ L, Promega catalog # P137X) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 4 시간 인큐베이션하였다. RQ1

RNase-Free DNase (75 μ L, Promega catalog # M6101) 를 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 15 분 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (1500 μ L, Sigma-Aldrich catalog # L7026) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해시켰다.

이 용액의 일부 (2470 μ L, UV 환산으로 7500 μ g) 에, Nuclease-free water (2780 μ L) 를 첨가하고, 70 $^{\circ}$ C 에서 10 분 가온 후, 빙랭하에서 5 분 냉각시켰다. 10 $\times$ capping buffer (500 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM DTT) 를 750 μ L, 20 mM GTP (375 μ L, 100 mM GTP, Hongene catalog # R2331 을 Nuclease-free water 로 희석시켜 사용), 20 mM SAM (375 μ L, 32 mM SAM, New England Biolabs catalog # B9003S 를 Nuclease-free water 로 희석시켜 사용), Vaccinia Capping Enzyme (750 μ L, Hongene catalog # ON-028) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 4 시간 인큐베이션 후, 10 $\times$ capping buffer (125 μ L), 20 mM SAM (375 μ L), 2'-O-Methyltransferase (750 μ L, Hongene catalog # ON-014) 를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 4 시간 인큐베이션하였다. 8 M LiCl 용액 (8750 μ L) 을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C 에서 밤새 정치시켰다. 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 30 분) 후, 상청을 폐기하고, 70 % 에탄올을 첨가하고, 원심 분리 (4 $^{\circ}$ C, 4000 $\times$ g, 10 분) 후, 상청을 폐기하고 바람 건조시켰다. 얻어진 잔류물을 Nuclease-free water 에 용해 후, 역상 고속 액체 크로마토그래피 (YMC Triart-C8 5 μ m 10 $\times$ 150 mm (YMC # T012S05-1510WT), 5 % 아세토니트릴, 400 mM 아세트산 트리에틸아민 (pH7.0)/25 % 아세토니트릴, 400 mM 아세트산트리에틸아민 (pH7.0), 75 $^{\circ}$ C) 로 정제함으로써 목적으로 하는 mRNA 를 얻었다.

[0349] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 13 의 서열을 갖는다. LabChip GX Touch Standard RNA Reagent Kit (PerkinElmer catalog #CLS960010) 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0350] [실시예 36] HPV18 E6-E7 fusion1 opt2 mRNA -002 의 조제

[0351] 실시예 35-(3) 의 100 mM CTP 대신에 100 mM 5-Me-CTP (Hongene catalog # R3-029) 를 사용하여, 100 mM N1-Me-Pseudo UTP 대신에 100 mM 5-methyluridine triphosphate 를 사용하여, 실시예 35-(3) 과 동일한 방법으로 mRNA 를 얻었다.

[0352] 얻어진 mRNA 는, 서열 번호 13 의 서열을 갖는다. LabChip GX Touch Standard RNA Reagent Kit (PerkinElmer catalog #CLS960010) 에 의해 분석하여, 목적으로 하는 길이인 것을 확인하였다.

[0353] [실시예 37 ~ 40] HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

[0354] (1) mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

[0355] 실시예 1 의 mRNA 대신에 실시예 33 내지 실시예 36 의 mRNA 를 각각 사용하여, 표 4 에 기재된 지질 물비에 따라 실시예 8 과 동일한 방법으로 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제, 특성 평가를 실시하였다. 결과를 표 4 에 나타냈다.

[0356] [실시예 41 ~ 52] HPV mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

[0357] (1) mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제

[0358] 실시예 8 과 동일한 방법으로, 실시예 4 에 기재된 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 조제를 실시하였다. 단, 이 아세트산(7R,9Z,26Z,29R)-18-({3-(디메틸아미노)프로폭시}카르보닐}옥시)펜타트리아콘타-9,26-디엔-7,29-디일 대신에, 아세트산(7R,9Z)-18-({3-(디메틸아미노)프로필옥시}카르보닐}옥시)옥타코사-9-엔-7-일 (W02015/005253 의 실시예 28 에 기재된 화합물) (이하 LP2 로 표기) 을 사용하여, 구성 지질 조성을 표 5 에 기재된 물비로 하였다.

[0359] 또한, LP2 는 W02015005253 의 실시예 28 에 기재된 방법에 따라 합성하였다.

[0360] (2) mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 특성 평가

[0361] 실시예 8 과 동일한 방법으로, mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 특성 평가를 실시하였다. 단, mRNA 량은 이하와 같이 분석하였다.

[0362] 핵산 지질 입자 분산액을 90 % 메탄올에 희석 용해시켜, 핵산 지질 입자 중의 mRNA 량을 자외 가시 분광 광도계 (퍼킨엘머사 제조, LAMBDATM 465) 로 측정하였다. mRNA 농도를 다음 식에 의해 산출하였다.

[0363] {[260 nm 에 있어서의 흡광도] - [350 nm 에 있어서의 흡광도]} $\times$ 40 $\times$ 희석 배율 (μ g/mL)

[0364] 결과를 표 5 에 나타냈다.

[0365] [참고예 1] DNA 백신 모델

[0366] J. Yan et al./Vaccine 27(2009) 431 - 440 을 참고로, HPV16 형 E6, E7 의 융합 단백을 발현하는 플라스미드를 구축하였다. 번역 영역을 GenBank Accession Number : Fj229356 에 기재된 서열로 하였다.

표 1

실시예	mRNA	DSPC/Chol/LP/PEG-DMG (mol%)	mRNA 봉입률	lipid/mRNA (wt/wt)	평균 입자경 (nm)
8	실시예 1	10/43.5/45/1.5	97%	18	107±17
9	실시예 2	12.5/41/45/1.5	97%	19	102±26
10	실시예 3	12.5/41/45/1.5	95%	21	124±18
11	실시예 4	12.5/41/45/1.5	96%	19	108±16
12	실시예 5	12.5/41/45/1.5	96%	19	111±13
13	실시예 6	12.5/41/45/1.5	96%	20	111±14
14	실시예 2	12.5/41/45/1.5	94%	17	110±27
15	실시예 4	12.5/41/45/1.5	94%	19	111±22
16	실시예 6	12.5/41/45/1.5	95%	18	107±21
17	실시예 7	12.5/41/45/1.5	94%	17	109±10
18	실시예 2	12.5/41/45/1.5	94%	24	120±15
19	실시예 2	12.5/41/45/1.5	97%	29	119±11
20	실시예 2	10/43.5/45/1.5	97%	17	107±23

[0367]

[0368] 이상의 결과로부터, 이들 핵산 지질 입자는, mRNA 의 90 % 이상이 지질 입자 내에 봉입되어 있고, 약 100 nm 내지 약 130 nm 의 평균 입자경을 가지고 있는 것이 분명해졌다.

표 2

실시예	mRNA	DSPC/Chol/1.P/PEG-C-DMA (mol%)	mRNA 봉입률	lipid/mRNA (wt/wt)	평균 입자경 (nm)
21	O V A	10/38.5/50/1.5	93%	17	116±27
22	O V A	10/35/50/5	95%	14	71±4
23	O V A	10/23.5/65/1.5	87%	15	147±66
24	O V A	10/48.5/40/1.5	79%	22	167±41
25	O V A	5/43.5/50/1.5	95%	19	138±46
26	O V A	15/33.5/50/1.5	94%	17	112±30
27	O V A	0/53.5/45/1.5	97%	17	132±51

[0369]

[0370] 이상의 결과로부터, 이들 핵산 지질 입자는, mRNA 의 75 % 이상이 지질 입자 내에 봉입되어 있고, 약 70 nm 내지 약 170 nm 의 평균 입자경을 가지고 있는 것이 분명해졌다.

표 3

실시예	mRNA	Phospholipid/Chol/LP/PEG-DMG (mol%)	mRNA 봉입률	lipid/mRNA (wt/wt)	평균 입자경 (nm)
28	실시예 4	10(DOPC)/43.5/45/1.5	97%	18	105±12
29	실시예 4	15(DOPC)/38.5/45/1.5	97%	18	99±28
30	실시예 4	10(DOPE)/43.5/45/1.5	98%	21	83±20
31	실시예 4	15(DOPE)/38.5/45/1.5	98%	20	81±33
32	실시예 4	12.5(DSPC)/41/45/1.5	97%	17	102±26

[0371]

[0372] 이상의 결과로부터, 이들 핵산 지질 입자는, mRNA 의 95 % 이상이 지질 입자 내에 봉입되어 있고, 약 80 nm 내지 약 110 nm 의 평균 입자경을 가지고 있는 것이 분명해졌다.

표 4

실시예	mRNA	DSPC/Chol/LP/PEG-DMG (mol%)	mRNA 봉입률	lipid/mRNA (wt/wt)	평균 입자경 (nm)
37	실시예33	12.5/41/45/1.5	99%	22	122±26
38	실시예34	12.5/41/45/1.5	99%	24	104±24
39	실시예35	12.5/41/45/1.5	99%	20	99±25
40	실시예36	12.5/41/45/1.5	99%	22	122±6

[0373]

[0374]

이상의 결과로부터, 이들 핵산 지질 입자는, mRNA 의 95 % 이상이 지질 입자 내에 봉입되어 있고, 약 90 nm 내지 약 130 nm 의 평균 입자경을 가지고 있는 것이 분명해졌다.

표 5

실시예	mRNA	DSPC/Chol/LP2/PEG-DMG (mol%)	mRNA 봉입률	lipid/mRNA (wt/wt)	평균 입자경 (nm)
4 1	실시예 4	12.5/41/45/1.5	98%	17	101±24
4 2	실시예 4	17.5/36/45/1.5	98%	17	97±29
4 3	실시예 4	22.5/31/45/1.5	99%	16	115±22
4 4	실시예 4	12.5/33.5/52.5/1.5	98%	16	105±33
4 5	실시예 4	17.5/28.5/52.5/1.5	98%	16	102±21
4 6	실시예 4	22.5/23.5/52.5/1.5	98%	15	114±36
4 7	실시예 4	17.5/28/52.5/2	97%	14	110±16
4 8	실시예 4	17.5/27.5/52.5/2.5	98%	16	80±33
4 9	실시예 4	17.5/27/52.5/3	97%	16	71±32
5 0	실시예 4	12.5/26/60/1.5	97%	16	110±46
5 1	실시예 4	17.5/21/60/1.5	98%	16	106±26
5 2	실시예 4	22.5/16/60/1.5	97%	16	102±34

[0375]

[0376]

이상의 결과로부터, 이들 핵산 지질 입자는, mRNA 의 95 % 이상이 지질 입자 내에 봉입되어 있고, 약 70 nm 내지 약 120 nm 의 평균 입자경을 가지고 있는 것이 분명해졌다.

[0377]

[시험예 1]

[0378]

mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 도입한 배양 세포로부터의 HPV 유전자형 16E7 백신 항원의 발현 레벨 (도 1)

[0379]

96 웰 플레이트의 1 웰 당, 2×10^4 개의 인간 태아 신장 세포주인 HEK293T 세포를 파종하고, 37 °C, CO₂ 농도 5 % 의 조건으로 하룻밤 배양하였다. 그 후, mRNA 총농도가 0.3 - 10 µg/mL 가 되도록, 실시예 14 ~ 17 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 HEK293T 세포에 첨가하고, 37 °C, CO₂ 농도 5 % 의 조건으로 48 시간 배양하였다. 배양 후, 96 웰 플레이트를 4 °C 에서 1 시간 정치시키고, 0.05 % Tween 20 을 포함하는 PBS(-) (PBST) 를 1 웰 당 300 µL 첨가하고 3 회 세정을 실시하였다. 그 후, 플레이트의 웰 상에 고정화된 HPV 유전자형 16 의 E7 발현 단백 (16E7) 은, horse radish peroxidase (HRP) 가 라벨된 항 16E7 항체를 첨가하여, 실온에서 2 시간 반응시키고, PBST 로 웰을 3 회 세정한 후, HRP 기질을 첨가하여 검출하였다. 16E7 단백 발현 레벨은, 각 웰의 450 nm 의 흡광도로부터 백그라운드가 되는 540 nm 의 흡광도를 빼서 산출하였다.

[0380]

[시험예 2]

[0381]

HPV 유전자형 16E7 백신 항원에 특이적인 세포 상해성 T 세포 (CTL) 의 유도 레벨 (도 2, 3, 5, 9)

[0382]

C57BL/6J 마우스는 넛폰 클레아로부터 구입하였다. 모든 동물 실험은, 의약 기반·건강·영양 연구소의 기관 가이드 라인에 따라 실시하였다. 동물의 모든 처치는 마취하에서 실시되고, 이소플루란의 흡입 마취하, 혹은 케타라/셀렉타의 피하 투여 마취하에서 실시하였다.

[0383]

7 주령의 C57BL/6 마우스의 대퇴부 근육내에, 1 마리당 mRNA 량으로 4 - 10 µg 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 10 일 간격으로 2 회 접종하였다. 또, 플라스미드 DNA 의 대퇴부 근육내 투여는, 1 마리당 40 µg 의 DNA 를 일렉트로포레이션법으로 투여하였다. 일렉트로포레이션법의 투여 조건은, 30 V, 50 ms ON/100 ms OFF, 3

cycles 로 하였다. 일렉트로포레이션법도 10 일 간격으로 2 회 접종하였다. 최종 면역으로부터 1 주 후에 헤파린 존재하에서의 말초혈의 회수, 혹은 비장을 최종 면역으로부터 1 주 후 혹은 2 주 후에 회수하고, 말초혈 단핵구 (PBMCs) 및 비장 세포의 조제를 실시하고, 평가 시료로 하였다. PBMCs 및 비장 세포 중의 HPV 유전자형 16E7 백신 항원에 특이적인 세포 상해성 T 세포 (CTL) 의 유도 레벨은, T 세포 표면 마커에 대한 항체, 및 MHC class I 분자와 16E7 에피토프의 4 량체 (tetramer) 복합체에 의한 면역 염색을 실시한 후, FACS 법을 사용하여 측정하였다.

[0384] [시험예 3]

[0385] HPV 유전자형 16E7 백신 항원에 대한 항체가 측정 (도 4)

[0386] 7 주령의 C57BL/6 마우스의 대퇴부 근육 내에, 1 마리당 mRNA 량으로 10 μ g 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 10 일 간격으로 2 회 접종하였다. 최종 면역으로부터 1 주 후에 헤파린 존재하에서의 말초혈의 회수와 혈장의 조제를 실시하고, 평가 시료로 하였다. 혈장 중의 HPV 유전자형 16E7 백신 항원에 결합하는 total IgG 는, ELISA 법을 사용하여 측정하였다. ELISA 법의 고상화 처리는, 96 웰 플레이트에 16E7 재조합 단백을 0.5 μ g/mL 의 농도로 4 $^{\circ}$ C, 하룻밤 고상화하였다. 동시에, 농도가 이미 알려진 마우스 IgG 단백질의 희석 계열도 제조하고, 표준 곡선용으로 동일 플레이트 상에 고상화하였다. 그 후, PBST 로 3 회 세정 후, 1 % BSA 를 포함하는 PBST (1 % BSA/PBST) 로 1 시간, 블로킹 처리를 실시하였다. 혈장 시료는, 1 % BSA/PBST 로 단계 희석 계열을 제조하고, 16E7 고상화 웰에 첨가하고, 실온에서 2 시간 반응시켰다. 마우스 IgG 표준 곡선용의 웰 (wells) 은, 1 % BSA/PBST 를 첨가하고, 동일하게 반응시켰다. PBST 로 3 회 세정 후, HRP 라벨된 항마우스 IgG 항체를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. PBST 로 3 회 세정 후, HRP 기질을 첨가하여 발색하고, 발색 정지액으로서 1 N 의 황산 용액을 첨가하였다. 16E7 에 결합한 마우스 IgG 농도는, 각 웰의 450 nm 의 흡광도로부터 백그라운드가 되는 540 nm 의 흡광도를 뺀 후, 표준 곡선을 사용하여 산출하였다.

[0387] [시험예 4]

[0388] C57BL/6 마우스를 사용한 TC-1 암세포의 이식 실험과 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 암 퇴축 효과 (도 4 - 6)

[0389] C57BL/6 마우스의 폐 상피 세포에 HPV 유전자형 16 의 E6 및 E7 이 발현하는 TC-1 암세포주를, 마우스 옆구리의 피하에 투여하고, 종양 사이즈를 시간 경과적으로 측정하였다. 암 이식 사이트인 마우스 옆구리는 TC-1 암 세포 이식 전에 면도하고, 1 마리당 1×10^5 개의 TC-1 세포를 이식하였다. 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자는, TC-1 세포 이식으로부터 8 일 후에, 1 마리당 10 μ g 의 mRNA 를 근육 내에 투여하였다. CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포를 제거하기 위한 항체 투여는, mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여의 2 일 전부터 개시하였다.

[0390] [시험예 5]

[0391] 항 CD4 항체, 항 CD8 항체의 투여에 의한 CD4 양성 및 CD8 양성 세포의 제거 (도 4 - 6)

[0392] 7 주령의 C57BL/6 마우스의 복강 내에, 1 일 1 마리당 100 μ g 의 항 CD4 항체 (GK1.5), 및 항 CD8 항체 (53 - 6.72) 를, mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여의 2 일 전부터 3 일간 연속으로 투여하였다. 항체 투여 3 일째에, 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 1 마리당 mRNA 량으로 10 μ g, 대퇴부 근육 내에 투여하였다.

[0393] [시험예 6]

[0394] OVA 백신 항원에 대한 항체가 측정 (도 7)

[0395] 7 주령의 C57BL/6 마우스의 미근부 (尾根部) 피내에, 1 마리당 mRNA 량으로 15 μ g 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 2 주 간격으로 2 회 접종하였다. 최종 면역으로부터 1 주 후에 말초혈의 회수와 혈청의 조제를 실시하고, 평가 시료로 하였다. 혈장 중의 OVA 백신 항원에 결합하는 total IgG 는, ELISA 법을 사용하여 측정하였다. ELISA 법의 고상화 처리에 있어서, 96 웰 플레이트에 OVA 재조합 단백을 1 μ g/mL 의 농도로 4 $^{\circ}$ C, 하룻밤 고상화하였다. 동시에, 농도가 이미 알려진 마우스 IgG 단백질의 희석 계열도 제조하고, 표준 곡선용으로 동일 플레이트 상에 고상화하였다. 그 후, PBST 로 3 회 세정 후, 1 % BSA 를 포함하는 PBST (1 % BSA/PBST) 로 1 시간, 블로킹 처리를 실시하였다. 혈청 시료는, 1 % BSA/PBST 로 단계 희석 계열을 제조하고, OVA 고상화 웰에 첨가하고, 실온에서 2 시간 반응시켰다. 마우스 IgG 표준 곡선용의 웰 (wells) 은, 1

% BSA/PBST 를 첨가하고, 동일하게 반응시켰다. PBST 로 3 회 세정 후, HRP 라벨된 항마우스 IgG 항체를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. PBST 로 3 회 세정 후, HRP 기질을 첨가하여 발색하고, 발색 정지액으로서 1 N 의 황산 용액을 첨가하였다. 16E7 에 결합한 마우스 IgG 농도는, 각 웰의 450 nm 의 흡광도로부터 백그라운드가 되는 540 nm 의 흡광도를 뺀 후, 표준 곡선을 사용하여 산출하였다.

[0396] [시험예 7]

[0397] OVA 백신 항원 특이적 T 세포 사이토카인 산생능 (도 8)

[0398] 7 주령의 C57BL/6 마우스의 미근부 피내에, 1 마리당 mRNA 량으로 15 μ g 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 2 주 간격으로 2 회 접종하였다. 최종 면역으로부터 1 주 후에 비장을 회수하여, 비장 세포를 조제하였다. 96 웰 배양 플레이트에 파종한 비장 세포를, OVA 항원의 MHC class I 구속성 에피토프 펩티드, OVA 백신 항원 단백질 각각으로 자극하고, 24 시간 배양하였다. OVA 항원 특이적 사이토카인 산생 레벨은, 배양 상청을 시료로 하여, 사이토카인 ELISA 법을 사용하여 평가하였다. 본 검토에서는, CTL 이나 Th1 로부터 산생되는 대표적인 사이토카인인 IFN- γ 를 측정하였다.

[0399] [시험예 8]

[0400] HPV 유전자형 18E6E7 백신 항원 특이적 T 세포 사이토카인 산생능 (도 10)

[0401] C57BL/6J 마우스는 닛폰 클레아로부터 구입하였다. 동물의 모든 처치는 이소플루란의 흡입 마취하에서 실시하였다.

[0402] 6 주령의 C57BL/6 마우스의 비복근 내에, 1 마리당 mRNA 환산으로 5 μ g 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 2 주 간격으로 2 회 투여하였다. 최종 투여로부터 1 주 후에 비장을 채취하여, 비장 세포를 조제하였다. HPV18E6 폴 펩티드 (JPT 사 제조, catalog # PM-HPV18-E6) 로 비장 세포를 처리하고, 48 시간 배양 후의 배양 상청 중의 IFN- γ 량을 사이토카인 ELISA 법에 의해 측정하였다.

[0403] [시험예 9]

[0404] HPV 유전자형 16E6E7 백신 항원에 특이적인 세포 상해성 T 세포 (CTL) 의 유도 레벨 (도 11)

[0405] C57BL/6J 마우스는 닛폰 클레아로부터 구입하였다. 동물의 모든 처치는 이소플루란의 흡입 마취하에서 실시하였다.

[0406] 6 주령의 C57BL/6 마우스의 비복근 내에, 1 마리당 mRNA 환산으로 5 μ g 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 2 주 간격으로 2 회 투여하였다. 최종 투여로부터 1 주 후에 비장을 채취하여, 비장 세포를 조제하였다. 비장 세포 중의 HPV 유전자형 16 의 E7 (HPV16E7) 에 특이적인 세포 상해성 T 세포 (CTL) 의 유도 레벨은, T 세포 표면 마커에 대한 항체 및 MHC class I 분자 구속성 HPV16E7 에피토프와 MHC class I 분자의 복합체에 의해 면역 염색을 실시하고, 플로우 사이토메트리법을 사용하여 측정하였다.

[0407] [시험예 10]

[0408] HPV 유전자형 16E6E7 백신 항원 특이적 T 세포 사이토카인 산생능 (도 12)

[0409] 6 주령의 C57BL/6 마우스의 비복근 내에, 1 마리당 mRNA 환산으로 5 μ g 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 2 주 간격으로 2 회 투여하였다. 최종 투여로부터 1 주 후에 비장을 채취하여, 비장 세포를 조제하였다. 96 웰 배양 플레이트에 비장 세포를 파종하고, HPV16E7 의 MHC class I 구속성 에피토프 펩티드 처리하에서 24 시간 배양한 후, 배양 상청 중의 IFN- γ 량을 사이토카인 ELISA 법에 의해 측정하였다.

[0410] [시험예 1 ~ 10 의 결과]

[0411] 실시에 14 ~ 17 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자에 의한 HPV 유전자형 16 의 E7 발현 레벨 (도 1)

[0412] HEK293T 세포를 사용하여, 배양 세포에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자로부터의 항원 발현 레벨을 검토하였다. 결과를 도 1 에 나타낸다. 실시예 15, 16 에 있어서는, 실시예 14, 17 에 비해 HPV 혈청형 16 의 E7 (16E7) 단백질 발현 레벨이 높은 경향이 확인되었다. 한편, mRNA 봉입 핵산 지질 입자 미처리의 웰과 비교하면, 모두 16E7 단백질 발현을 유도하고 있으므로, 배양 세포에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 단백질 발현 유도능이 분명해졌다.

[0413] DNA 백신 모델과 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도 레벨의 비교 (도 2)

- [0414] 참고예 1 의 DNA 백신 모델을 구축하고, 마우스 모델에 있어서의 실시예 9, 11, 13 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도능과 비교 검토를 실시하였다. 결과를 도 2 에 나타낸다. 최종 면역으로부터 1 주 후에 말초혈 중의 16E7 특이적 CTL 유도 레벨을 평가한 결과, 3 종의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자는, 모두 DNA 백신 모델 (pDNA) 에 비해 높은 CTL 유도능을 나타냈다 (좌측 도면). 또, 최종 면역으로부터 2 주 후의 비장 세포 중의 16E7 특이적 CTL 유도 레벨을 평가한 결과, 실시예 9, 11, 13 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자는 pDNA 와 동등 이상의 CTL 유도 레벨을 나타냈다 (우측 도면).
- [0415] mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 14 내지 실시예 17 의 마우스에 있어서의 CTL 유도능 (도 3)
- [0416] C57BL/6 마우스에 있어서의 4 종류의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 16E7 특이적 CTL 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 3 에 나타낸다. 16E7 특이적 CTL 유도 레벨은, 개체간의 편차는 있지만, 4 종의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 모두에 있어서 관찰되었다.
- [0417] mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 항체 유도능에 있어서의 CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포의 중요성 (도 4)
- [0418] TC-1 암세포를 이식 후, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포를 제거한 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 항체 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 4 에 나타낸다. 세포 제거 항체를 투여하지 않은 대조군 (대조군 (미제거)) 과 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 투여한 군 (실시예 20 (미제거)) 을 비교하면, 실시예 20 (미제거) 군에서 16E7 특이적 항체 레벨이 확인되었다. 또, CD8 양성 세포를 제거한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군 (실시예 20 (CD8 제거)) 도, 실시예 20 (미제거) 군과 동등한 항체 유도 레벨을 나타냈다. 그러나, CD4 양성 세포를 제거한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군 (실시예 20 (CD4 제거)) 에서는, 실시예 20 (미제거) 군과 실시예 20 (CD8 제거) 군에 비해, 16E7 항체 유도 레벨이 감소하고 있는 것이 분명해졌다. 이상의 결과로부터, mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여에 의한 16E7 항원 특이적 항체 유도에는, CD4 양성 세포가 중요한 가능성이 시사되었다.
- [0419] mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 CTL 유도능에 있어서의 CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포의 중요성 (도 5)
- [0420] TC-1 암세포를 이식 후, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포를 제거한 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 16E7 특이적 CTL 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 5 에 나타낸다. 세포 제거 항체를 투여하지 않은 대조군 (대조군 (미제거)) 과 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 투여한 군 (실시예 20 (미제거)) 을 비교하면, 실시예 20 (미제거) 군에서 16E7 특이적 CTL 레벨이 확인되었다. 한편, CD4 양성 세포를 제거한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군 (실시예 20 (CD4 제거)) 은, 실시예 20 (미제거) 군과 비교하면 낮은 CTL 유도 레벨을 나타냈다. 또한, CD8 양성 세포를 제거한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군 (실시예 20 (CD8 제거)) 에서는, 실시예 20 (미제거) 군과 비교하여, 16E7 특이적 CTL 유도 레벨이 극적으로 감소하고 있는 것이 분명해졌다. 이상의 결과로부터, mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여에 의한 16E7 항원 특이적 CTL 유도에는, CD8 양성 세포가 필수일 가능성이 시사되었다.
- [0421] mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 암 증식 억제 효과에 있어서의 CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포의 중요성 (도 6)
- [0422] TC-1 암세포를 이식 후, CD4 양성 세포 및 CD8 양성 세포를 제거한 마우스에 있어서의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 암 퇴축 효과를 검토하였다. 결과를 도 6 에 나타낸다. 세포 제거 항체를 투여하지 않은 대조군 (대조군 (미제거)) 과 실시예 20 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 투여한 군 (실시예 20 (미제거)) 을 비교하면, 실시예 20 (미제거) 군에서 TC-1 암 증양의 증식 억제 효과가 확인되었다. 또, CD4 양성 세포를 제거한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군 (실시예 20 (CD4 제거)) 은, 실시예 20 (미제거) 군과 동일하게, TC-1 암 증식 억제 효과를 나타냈다. 그러나, CD8 양성 세포를 제거한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군 (실시예 20 (CD8 제거)) 에서는, 실시예 20 (미제거) 군과 비교하여, TC-1 암 증식이 억제되지 않고, 종양 사이즈는 대조군 (미제거) 과 동등하였다. 이상의 결과로부터, mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여에 의한 암 증식 억제 효과에는, CD8 양성 세포가 필수일 가능성이 시사되었다.
- [0423] 지질 조성이 상이한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 21 내지 실시예 27 의 OVA 특이적 항체 유도 레벨 (도 7)
- [0424] C57BL/6 마우스에 실시예 21 내지 실시예 27 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 근육내 투여하고, 최종 면역으로부터 1 주 후의 혈중 OVA 특이적 항체 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 7 에 나타낸다. OVA 특이적 항체 유도 레벨은, 실시예 22 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자에서 낮고, 그 밖의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군에서는 동등하였다.
- [0425] 지질 조성이 상이한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 21 내지 실시예 27 의 OVA 특이적 IFN- γ 유도 레벨 (도

8)

- [0426] C57BL/6 마우스에 실시예 21 내지 실시예 27 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 근육내 투여하고, 최종 면역으로부터 1 주 후에, 비장 세포로부터의 OVA 특이적 T 세포 사이토카인 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 8 에 나타낸다. 실시예 26 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 면역군에서는, OVA 의 MHC class I 구속성 에피토프 펩티드, 및 OVA 단백질 자극에 대한 IFN- γ 유도 레벨이 가장 낮고, 실시예 21, 실시예 22, 실시예 25, 실시예 27 의 OVA 항원 특이적 유도 레벨은 동등하였다.
- [0427] 인지질종과 그 함량이 상이한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 28 내지 실시예 32 의 마우스에 있어서의 CTL 유도 레벨 (도 9)
- [0428] C57BL/6 마우스에 있어서의 4 종류의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자의 16E7 특이적 CTL 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 9 에 나타낸다. 16E7 특이적 CTL 유도 레벨은, 인지질종이 DOPC 인 실시예 28, 실시예 29, DOPE 인 실시예 30, 실시예 31, 그리고 DSPC 인 실시예 32 와 동등하였다.
- [0429] mRNA 수식이 상이한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 37 ~ 40 의 HPV18E6 특이적 사이토카인 산생 유도 레벨 (도 10)
- [0430] C57BL/6 마우스에 실시예 37 내지 실시예 40 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 근육내 투여하고, 최종 면역으로부터 1 주 후에, 비장 세포로부터의 HPV18E6 특이적 T 세포 사이토카인량을 검토하였다. 결과를 도 10 에 나타낸다. 실시예 37 내지 실시예 40 의 각 군에서는, NC 군과 비교하여, HPV18E6 풀 펩티드 처리에 대한 IFN- γ 산생 유도가 보였다 (도 10).
- [0431] 지질 구성비가 상이한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 41 ~ 52 의 CTL 유도능 (도 11)
- [0432] C57BL/6 마우스에 실시예 41 내지 실시예 52 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 근육내 투여하고, 최종 면역으로부터 1 주 후에, 비장 세포 중의 16E7 특이적 CTL 유도 레벨을 평가하였다. 결과를 도 11 에 나타낸다. 16E7 특이적 CTL 유도 레벨은, NC 군에 비해, 평가한 모든 mRNA 봉입 핵산 지질 입자에 있어서 높았다.
- [0433] 지질 구성비가 상이한 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 실시예 41 ~ 52 의 HPV16E7 특이적 IFN- γ 유도 레벨 (도 12)
- [0434] C57BL/6 마우스에 실시예 41 내지 실시예 52 의 mRNA 봉입 핵산 지질 입자를 근육내 투여하고, 최종 면역으로부터 1 주 후에, 비장 세포로부터의 HPV16E7 특이적 T 세포 사이토카인 유도 레벨을 검토하였다. 결과를 도 12 에 나타낸다. NC 군에 비해, 어느 mRNA 봉입 핵산 지질 입자 투여군에 있어서도, HPV16E7 의 MHC class I 구속성 에피토프 펩티드 처리에 의해 IFN- γ 산생이 증강되었다.
- [0435] 본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허출원을 그대로 참고로 하여 본 명세서에 받아들이는 것으로 한다.

산업상 이용가능성

- [0437] 본 발명은 인간 파필로마바이러스에 의한 감염의 예방 및/또는 치료에 이용할 수 있다.
- [0438] 서열표 프리텍스트
- [0439] <서열 번호 1> HPV16 E6-E7 fusion2 의 IVT 용의 주형 DNA.
- [0440] GCTAGC (NheI 사이트) : 염기 번호 1 ~ 6
- [0441] T7 프로모터 서열 : 염기 번호 8 ~ 27
- [0442] human β -globin 의 5'-UTR 서열 : 염기 번호 39 ~ 88
- [0443] KOZAK 서열 : 염기 번호 89 ~ 94
- [0444] IgE leader sequence 의 번역 영역 : 염기 번호 95 ~ 148
- [0445] HPV16 형 E6 의 번역 영역 : 염기 번호 149 ~ 598
- [0446] Furin cleavage site : 염기 번호 599 ~ 619

- [0447] HPV16 형 E7 의 번역 영역 : 염기 번호 620 ~ 913
- [0448] human β -globin 의 3'-UTR 서열 : 염기 번호 914 ~ 1045
- [0449] poy1A : 염기 번호 1046 ~ 1147
- [0450] ACTAGT (SpeI 사이트) : 염기 번호 1152 ~ 1157

gctagcgttaatacgaactcactataaggagacccaagctacatttgcttctgacacaactgtgttacta
gcaacctcaaacagacacccgccaccatggactggacctggatcctgtttctggtggccgctgccacacg
ggtgcacagctttcaggacctcaagagaggccagaaagctgcctcagctgtgtaccgagctgcagac
caccatccacgacatcatcctggaatgcgtgtactgcaagcagcagctcctgcggagagaggtgtacga
tttcgccttccgggacctgtgcatcgtgtacagagatggcaacccctacgccgtgtgcgacaagggcct
gaagtcttacagcaagatcagcaggtaccggcactactgtacagcctgtacggcaccacactggaaca
gcagtacaacaagccctgtgcgacctgtgatccggtgcataactgccagaacctctgtgccccga
ggaaaagcagcggcaccctggacaagaagcagcgggtccacaacatcagaggccggtggacaggcagagg
catgagctgttgtcggagcagccggaccagaagagaaacccagctgagaggccggaagagaagaagcca
cggcgatacccttacactgcacgagtacatgctggacctgcagcctgagacaaccgatctgtacggcta
cggccagctgaacgacagctctgaggaagaggacgagatcgacggacctgtggacaggccgaacctga
tagagcccactacaatatcgtgaccttctgctgcaagtgcgacagcaccctgagactgtgtgtgcagag
caccacgtggacatcagaacctggaagatctgctgatgggcacctgggaatcgtgggccctatctg
tagccagaagccttgagctcgttttctgtgtccaatttctattaaaggttcccttgttccctaagtc
caactactaaactgggggatattatgaagggccttgagcatctggatctgcctaataaaaaacattta
ttttcattgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagacactagt

[0451]

- [0452] <서열 번호 2> HPV16 E6-E7 fusion2 mRNA -001.

aggagacccaagcuacauuugcuucugacacaacuguguacacuaagcaaccucaaacagacaccgccac
cauggacuggaccuggaucuuugcugggccgucgccacacgggugcacagcuucaggaccucca
agagaggcccagaaagcugccucagcuguguaccgagcugcagaccaccauccacgacaucauccugga
augcguguacugcaagcagcagcuccugcggagagagguguacgauuucgcuuccgggaccugugcau
cguguacagagauggcaaccccuacgccgugugcgacaagggccugaaguucacagcaagaucagcga
guaccggcacuacugcuacagccugucggcaccacacuggaacagcaguacaacaagcccugugcga
ccugcugaucggugcaucaacugccagaaaccucugugcccaggagaaagcagcggcaccuggacaa
gaagcagcgguuaccacaacacagaggccggugagaggcagaggcaugagcuguugcggagcagccg
gaccagaagagaaacccagcugagaggccggaagagaagaagccacggcgauaccccuacacugcacga
guacaucuggaccugcagccugagacaaccgaucugucggcuacggcagcugaacgacagcucuga
ggaagaggacgagaucgacggaccugcugacaggccgaaccugauagagcccacuaaauaucugac
cuucugcugcaagugcgacagcaccugagacugugugcagagcaccacguggacaucaagaacccu
ggaagaucugcugaugggcaccucgggaauucgugggccuacuguaagccagaagccuugagcucguu
ucuugcuguccaauuucuaauaaagguuccuuuuuuccuuaaguccaacuacuaaacugggggauuuu
ugaagggccuugagcaucuggauucugccuaauaaaaaacauuuuuuuuauugcaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagagcacuag

[0453]

[0454] <서열 번호 3> HPV16 E6-E7 fusion10 의 IVT 용의 주형 DNA.

[0455] GCTAGC (NheI 사이트) : 염기 번호 1 ~ 6

[0456] T7 프로모터 서열 : 염기 번호 8 ~ 27

[0457] human β -globin 의 5'-UTR 서열 : 염기 번호 39 ~ 88

[0458] KOZAK 서열 : 염기 번호 89 ~ 94

[0459] IgE leader sequence 의 번역 영역 : 염기 번호 95 ~ 148

[0460] HPV16 형 E6 의 번역 영역 : 염기 번호 149 ~ 598

[0461] Furin cleavage site : 염기 번호 599 ~ 619

[0462] HPV16 형 E7 의 번역 영역 : 염기 번호 620 ~ 913

[0463] human β -globin 의 3'-UTR 서열 : 염기 번호 914 ~ 1045

[0464] poyLA : 염기 번호 1046 ~ 1147

[0465] ACTAGT (SpeI 사이트) : 염기 번호 1152 ~ 1157

gctagcgtaatacgaactcactataaggagacccaagctacatttgcttctgacacaactgtgttcacta
gcaacctcaaacagacacccgccaccatggactggacctggatcctgttcttgggtggccgcccacacg
gggtgcacagcttccaggacccccaaagagaggcccagaaagctgccccagctgtgcaccgagctgcagac
caccatccacgacatcatcctggaatgcgtgtactgcaagcagcagctcctgcggagagaggtgtacga
cttcgccttccgggacctgtgcatcgtgtacagagacggcaacccctacgccgtgtgcgacaaggccct
gaagttctacagcaaatcagcaggtaccggcactactgctacagcctgtacggcaccacactggaaca
gcagtacaacaagccccctgtgcgacctgctgatccggtgcatcaactgccagaacccccctgtgccccga
ggaaaagcagcggcaccctggacaagaagcagcgggtccacaacatcagaggccggtggacaggcagagg
catgagctgctgccggagcagccggaccagaagagaaacccagctgagaggccggaagagaagaagcca
cggcgacacccccacactgcacgagtacatgctggacctgcagcccagacaaccgacctgtacggcta
cggccagctgaacgacagcagcagggaagaggacgagatcgacggacccgcccagcaggccgaacccga
cagagcccactacaacatcgtgaccttctgtgcaagtgcgacagcaccctgagactgtgcgtgcagag
caccacgctggacatcagaacccctggaagacctgctgatgggcacccctgggaatcgtagggcccatctg
cagccagaagccctgagctcgcttcttctgtgtccaatttctattaaaggttcctttgttccctaagtc
caactactaaactgggggatattatgaaggcccttgagcatctggattctgcctaataaaaaaacattta
ttttcattgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagagcactagt

[0466]

- [0467] <서열 번호 4> HPV16 E6-E7 fusion10 mRNA -001 ~ 006.
- aggagacccaagcuacauuugcuucugacacacacuguguucacuaagcaaccucaaacagacaccgccac
cauggacuggaccuggauccuguuuccuggugccgccgccacacgggugcacagcuuccaggacccccca
agagaggcccagaaagcugccccagcugugcaccgagcugcagaccaccauccacgacaucauccugga
augcguguacugcaagcagcagcuccugcggagagagguguacgacuucgccuuccgggaccugugcau
cguguacagagacggcaaccccuacgccgugugcgacaagggccugaaguucacagcaagaucagcga
guaccggcacuacugcuacagccugucggcaccacacuggaacagcagucacaacaagccccugugcga
ccugcugaucggugcaucaacugccagaaacccugugccccgaggaaaagcagcggcaccuggacaa
gaagcagcggauccacaacaucaagggccggugacagggcagaggcaugagcugcugccggagcagccg
gaccagaagagaaacccagcugagaggccggaagagaagaagccacggcgacccccacacugcacga
guacaugcuggaccugcagcccagacaaccgaccuguacggcuacggccagcugaacgacagcagcga
ggaagaggacgagaucgacggaccgccgggacagggccgaacccgacagagcccacuacaacaucgugac
cuucugcugcaagugcgacagcaccugagacugugcgugcagagcaccacguggacaucaagaacccu
ggaagaccugcugaugggcacccugggaaucgugggccccaucugcagccagaagcccugagcucgcuu
ucuugcuguccaaauuucuaauuaagguuccuuuuccuaaguccaacuacuaaacugggggauuuu
ugaagggccuugagcaucuggaauucguccuaauaaaaaacauuuuuuuuauugcaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagagcacuag
- [0468]
- [0469] <서열 번호 5> HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 주형 DNA.
- [0470] GCTAGC (NheI 사이트) : 염기 번호 1 ~ 6
- [0471] T7 프로모터 서열 : 염기 번호 8 ~ 27
- [0472] human β -globin 의 5'-UTR 서열 : 염기 번호 39 ~ 88
- [0473] KOZAK 서열 : 염기 번호 89 ~ 94
- [0474] IgE leader sequence 의 번역 영역 : 염기 번호 95 ~ 148
- [0475] HPV16 형 E6 의 번역 영역 : 염기 번호 149 ~ 598
- [0476] Furin cleavage site : 염기 번호 599 ~ 619
- [0477] HPV16 형 E7 의 번역 영역 : 염기 번호 620 ~ 913
- [0478] human β -globin 의 3'-UTR 서열 : 염기 번호 914 ~ 1045
- [0479] poylA : 염기 번호 1046 ~ 1147

[0480]

ACTAGT (SpeI 사이트) : 염기 번호 1152 ~ 1157

gctagcgtaatacgaactcactatagggagacccaagctacatttgccttctgacacaactgtgttcacta
gcaacctcaaacagacacccgaccatggactggacctggatcctgttcttggtggccgcccacacg
ggtgcacagcttccaggaccccaagagagggcccagaagctgccccagctgtgcaccgagctgcagac
caccatccacgacatcatcctggaatgctgttactgcaagcagcagctcctgcggagagaggtgtacga
cttgccttccgggacctgtgcatcgtgtacagagacggcaacccctacgcccgtgtgcgacaagggcct
gaagtctacagcaagatcagcaggtaccggcactactgtctacagcctgtacggcaccacactggaaca
gcagtacaacaagccctgtgcgacctgtgatccggtgcatcaactgccagaacccctgtgcccga
ggaaaagcagcggcacctggacaagaagcagcgggtccacaacatcagaggccggtggacaggcagagg
catgagctgtgcccggagcagccggaccagaagagaacccagctgagaggccggaagagaagaagcca
cggcgacacccccacactgcacgagtacatgttgacctgcagcccagacaaccgacctgtacggcta
cggccagctgaacgacagcagcaggaagaggacgagatcgacggaccgcccggacaggccgaacccga
cagagcccactacaacatcgtgaccttctgtgcaagtgcgacagcaccctgagactgtgcgtgcagag
caccacgtggacatcagaacccctggaagacctgtgatgggacccctgggaatcgtgggccccatctg
cagccagaagccctgagctcgttcttctgttccaatttctattaaaggcttcttcttccctaagtc
caactactaaactgggggatattatgaagggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacattta
ttttcattgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagagcactagt

[0481]

[0482]

<서열 번호 6> HPV16 E6-E7 fusion10 opt2 mRNA -001.

gggagacccaagcuacuuugcuucugacacaacuguguuacacuaagcaaccucaaacagacaccgccac
cauggacuggaccuggaucuguuuccugugggccgcccacacgggugcacagcuuccaggaccccca
agagaggcccagaaagcugccccagcugugcaccgagcugcagaccaccauccacgacaucuccugga
augcugugacugcaagcagcagcuccugcggagagagguguacgacuucgcuuccgggaccugugcau
cguguacagagacggcaaccccuacgcccugugcgacaagggccugaaguucacagcaagaucagcga
guaccggcacuacugcuacagccugacggcaccacacuggaacagcaguacaacaagccccugugcga
ccugcugauccggugcaucaacugccagaaacccugugccccgaggaaaagcagcggcaccuggacaa
gaagcagcggauccacaacaucagaggccggugacaggcagaggcaugagcugcugccggagcagccg
gaccagaagagaacccagcugagaggccggaagagaagaagccacggcgacacccccacacugcacga
guacaugcuggaccugcagcccagacaaccgaccugacggcuacggccagcugaacgacagcagcga
ggaagaggacgagaucgacggaccgcccggacaggccgaacccgacagagcccacuaacaucugugac
cuucugcugcaagugcagcagcccgugagacugugcugcagagcaccacguggacaucaagaacccu
ggaagaccugcugaugggacccugggaaucgugggccccaucugcagccagaagccugagcucgcuu
ucuugcuguccaaauucuaauuaagguuccuuuguucccuuaguccaacuacuaaacugggggaauua
ugaagggccuugagcaucuggaucugccuaauuaaaaaaacuuuuuuuucuuucaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagagcacuag

[0483]

[0484]

<서열 번호 7> OVA (Ovalbumin) 의 번역 영역

atgggctccatcggcgcagcaagcatggaattttgttttgatgtattcaaggagctcaaagtccaccat
gccaatgagaacatcttctactgccccattgccatcatgtcagctctagccatggtataacctgggtgca
aaagacagcaccaggacacagataaataaggttgcgtttgataaaacttcaggattcggagacagt
attgaagctcagtggtggcacatctgtaaacttcactcttcacttagagacatcctcaaccaaatacc
aaaccaaatagtgtttattcggttcagccttgccagtagactttatgctgaagagagataccaatcctg
ccagaatacttgtagtggtgaaggaactgtatagaggaggcttgaacctatcaactttcaaacagct
gcagatcaagccagagagctcatcaattcctgggtagaaagtcagacaaatggaattatcagaaatgtc
cttcagccaagctccgtggattctcaaactgcaatggttctgggttaatgccattgtcttcaaaggactg
tgggagaaaacatttaaggatgaagacacacaagcaatgcctttcagagtgaactgagcaagaagcaaa
cctgtgcagatgatgtaccagattgggtttatttagagtggcatcaatggcttctgagaaaatgaagatc
ctggagcttccatttgccagtgggacaatgagcatgttgggtgctgttgcctgatgaagtctcaggcctt
gagcagcttgagagtataatcaactttgaaaaactgactgaatggaccagttctaatgttatggaagag
aggaagatcaaagtgtacttacctcgcatgaagatggaggaaaaatacaacctcacatctgtcttaatg
gctatgggcattactgacgtgtttagctcttcagccaatctgtctggcatctcctcagcagagagcctg
aagatatctcaagctgtccatgcagcacatgcagaaatcaatgaagcaggcagagaggtggtagggtca
gcagaggctggagtggatgctgcaagcgtctctgaagaatttagggctgaccatccattcctcttctgt
atcaagcacatcgcaaccaacgccgttctcttctttggcagatgtgtttccccttaa

[0485]

[0486]

<서열 번호 8> HPV16 형의 E6 항원의 아미노산 서열.

FQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKGLKFY
SKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRGMS
CRSSRTRRETQL

[0487]

[0488]

<서열 번호 9> HPV16 형의 E7 항원의 아미노산 서열.

HGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYGYQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQ
STHVDIRTLEDLLMGTLGIVGPICSQKP

[0489]

- [0490] <서열 번호 10> pMA-HPV18_fusion1_opt1
- GCTAGCGTAATACGACTCACTATAAGGAGACCCAAGCTACATTTGCTTCTGACACAACGTGTGTTCACTA
GCAACCTCAAACAGACACCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGCCACAAG
AGTGCACAGCTTCGAGGACCCACAGACGGCCCTACAAGCTGCCCCGACCTGTGCACCGAGCTGAACAC
CAGCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTGTACTGCAAGACCGTGCTGGAACGTACCGAGGTGTTTGA
GTTGCGCTTCAAGGACCTGTTGTTGTTGTACCGGGACAGCATCCCCACGCCGCTGCCACAAGGGCAT
CGACTTCTACAGCCGGATCAGAGAGCTGCGGCACTACAGCGACAGCGTGACGGCGACACCCTGGAAAA
GCTGACCAACACCGGCTGTACAACCTGCTGATCCGGTGCCTGAGATGCCAGAAGCCCTGAACCCCGC
CGAGAAGCTGAGACACCTGAACGAGAAGCGGGGTTCCACAACATCGCCGGCCACTACAGAGGCCAGGG
CCACAGCTGCTGCAACCGGGCCAGACAAGAGAGACTGCAGCGGGGAGAGAAACCAAGTGCGGGGCGAG
AAAGAGAAGAAGCCACGGCCCCAAGGCCACACTGCAGGACATCGTGCTGCACCTGGAACCCAGAACGA
GATCCCCGTGGACCTGCTCGGACACGGCCAGCTGAGCGACAGCGAGGAAGAGAACGACGAGATCGACGG
CGTGAACCACCAGCACCTGCCCCCAGAAAGGGCCGAACCACAGAGACACACCATGCTGTGCATGTGCTG
CAAGTGCGAGGCCCGGATCAAGCTGGTGGTGGAAAGCAGCGCCGACGACCTGAGAGCCTTCCAGCAGCT
GTTCTGAACACCCTGAGCTTCGTGGGACCCTGGTGCGCCAGCCAGCAGTGAGCTCGCTTTCTTGCTGT
CCATTTCTATTAAAGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCC
TTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGGCACTAGT
- [0491]
- [0492] NheI 서열 : 염기 번호 1 ~ 6
- [0493] T7 프로모터 : 염기 번호 7 ~ 24
- [0494] A : 전사 개시점 : 염기 번호 25
- [0495] 5'-UTR : 염기 번호 39 ~ 88
- [0496] Kozak 서열 : 염기 번호 89 ~ 94
- [0497] IgE leader 서열 : 염기 번호 95 ~ 148
- [0498] HPV18 E6 서열 : 염기 번호 149 ~ 613
- [0499] Furin 인식 서열 : 염기 번호 614 ~ 634
- [0500] HPV18 E7 서열 : 염기 번호 635 ~ 949
- [0501] 3'-UTR : 염기 번호 950 ~ 1081
- [0502] polyA 서열 : 염기 번호 1082 ~ 1183
- [0503] SpeI 서열 : 염기 번호 1188 ~ 1193

[0504] <서열 번호 11> HPV18 E6-E7 fusion1 opt1 mRNA -001 및 002

AGGAGACCCAAGCUACAUUUGCUUCUGACACAACUGUGUUCACUAGCAACCUCAAACAGACACCGCCAC
CAUGGACUGGACCUGGAUCCUGUUCUGGUGGCCGCCGCCACAAGAGUGCACAGCUUCGAGGACCCAC
CAGACGGCCCUACAAGCUGCCCGACUGUGCACCAGCUGAACACCAGCCUGCAGGACAUCGAGAUAC
CUGCGUGUACUGCAAGACCGUGCUGGAACUGACCGAGGUGUUCGAGUUCGCCUUAAGGACCUGUUCGU
GGUGUACCGGGACAGCAUCCCCACGCCGCGGCCACAAGGGCAUCGACUUCUACAGCCGGAUCAGAGA
GCUGCGGCACUACAGCGACAGCGUGUACGGCGACACCCUGGAAAAGCUGACCAACACCGGCCUGUACAA
CCUGCUGAUCCGGUGCCUGAGAUGCCAGAAGCCCCUGAACCCCGCGAGAAGCUGAGACACCUGAACGA
GAAGCGGCGGUUCCACAACAUCGCCGGCCACUACAGAGGCCAGGGCCACAGCUGCUGCAACCGGGCCAG
ACAAGAGAGACUGCAGCGCGGAGAGAAACCAAGUGCGGGGCAGAAAGAGAAGAAGCCACGGCCCCAA
GGCCACACUGCAGGACAUCGUGCUGCACCUGGAACCCAGAACGAGAUCCCGUGGACCUGCUCGGACA
CGGCCAGCUGAGCGACAGCGAGGAAGAGAACGACGAGAUUCGACGGCGUGAACACCAGCACCUGCCCGC
CAGAAGGGCCGAACCACAGACACACCAUGCUGUGCAUGUGCUGCAAGUGCGAGGCCCGGAUCAAGCU
GGUGGUGGAAAGCAGCGCCGACGACCUGAGAGCCUUCAGCAGCUGUUCUGAACCCUGAGCUUCGU
GGGACCCUGGUGCGCCAGCCAGCAGUGAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAAUUCUUAUUAAGGUUCCUUU
GUUCCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAU
AAAAAACAUUUUUUUAUUGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGCACUAG

[0505]

[0506] <서열 번호 12> pMA-HPV18_fusion1_opt2

GCTAGCGTAATACGACTCACTATAGGAGAGACCAAGCTACATTTGCTTCTGACACAACGTGTGTTCTACTA
GCAACCTCAAACAGACACCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGTTGGCCGCCGCCACAAG
AGTGCACAGCTTCGAGGACCCACAGACGGCCCTACAAGCTGCCCAGCTGTGCACCGAGCTGAACAC
CAGCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTGTACTGCAAGACCGTGCTGGAACGTACCGAGGTGTTCTGA
GTTCTGCTTCAAGGACCTGTTCTGTTGTACCGGGACAGCATCCCCACGCCGCTGCCACAAGGGCAT
CGACTTCTACAGCCGATCAGAGAGCTGCGGCACTACAGCGACAGCGTGACGGCGACACCTGGAAAA
GCTGACCAACACCGGCCTGTACAACCTGCTGATCCGGTGCCTGAGATGCCAGAAGCCCTGAACCCCGC
CGAGAAGCTGAGACACCTGAACGAGAAGCGGCGGTTCCACAACATCGCCGGCCACTACAGAGGCCAGGG
CCACAGCTGCTGCAACCGGGCCAGACAAGAGAGACTGCAGCGGCGGAGAGAAACCAAGTGCGGGGCAG
AAAGAGAAGAAGCCACGGCCCCAAGGCCACACTGCAGGACATCGTGCTGCACCTGGAACCCAGAACGA
GATCCCGTGGACCTGCTCGGACACGGCCAGCTGAGCGACAGCGAGGAAGAGAACGACGAGATCGACGG
CGTGAACCACCGACCTGCCCGCCAGAAGGGCCGAACCACAGAGACACACCATGCTGTGCATGTGCTG
CAAGTGCGAGGCGCGGATCAAGCTGGTGGTGAAAGCAGCGCCGACGACCTGAGAGCCTTCCAGCAGCT
GTTCTGAAACCCCTGAGCTTCGTGGGACCCTGGTGCAGCCAGCAGTGAGCTCGCTTTCTTGCTGT
CCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCC
TTGAGCATCTGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGAGCACTAGT

[0507]

[0508] NheI 서열 : 염기 번호 1 ~ 6

[0509] T7 프로모터 : 염기 번호 7 ~ 24

[0510] G : 전사 개시점 : 염기 번호 25

[0511] 5'-UTR : 염기 번호 39 ~ 88

[0512] Kozak 서열 : 염기 번호 89 ~ 94

[0513] IgE leader 서열 : 염기 번호 95 ~ 148

[0514] HPV18 E6 서열 : 염기 번호 149 ~ 613

[0515] Furin 인식 서열 : 염기 번호 614 ~ 634

[0516] HPV18 E7 서열 : 염기 번호 635 ~ 949

[0517] 3'-UTR : 염기 번호 950 ~ 1081

[0518] polyA 서열 : 염기 번호 1082 ~ 1183

[0519] SpeI 서열 : 염기 번호 1188 ~ 1193

[0520] <서열 번호 13> HPV18 E6-E7 fusion1 opt2 mRNA -001 및 002

GGGAGACCCAAGCUACAUUUGCUUCUGACACAACUGUGUUCACUAGCAACCUCAAACAGACACCGCCAC
CAUGGACUGGACCUGGAUCCUGUUCUGGUGGCCGCCACAGAGUGCACAGCUUCGAGGACCCAC
CAGACGGCCCUACAAGCUGCCCGACCUGUGCACCGAGCUGAACACCAGCCUGCAGGACAUCGAGAUCAC
CUGCGUGUACUGCAAGACCGUGCUGGAACUGACCGAGGUGUUCGAGUUCGCCUUAAGGACCUGUUCGU
GGUGUACCGGGACAGCAUCCCCACGCCGCCUGCCACAAGGGCAUCGACUUCUACAGCCGGAUCAGAGA
GCUGCGGCACUACAGCGACAGCGUGUACGGCGACACCCUGGAAAAGCUGACCAACACCGGCCUGUACAA
CCUGCUGAUCCGGUGCCUGAGAUCCAGAAGCCCCUGAACCCCGCCGAGAAGCUGAGACACCUGAACGA
GAAGCGGCGGUUCCACAACAUCCGCCGCCACUACAGAGGCCAGGGCCACAGCUGCUGCAACCGGGCCAG
ACAAGAGAGACUGCAGCGGGGAGAGAAACCCAAGUGCGGGGCAGAAAGAGAAGAAGCCACGGCCCCAA
GGCCACACUGCAGGACAUCGUGCUGCACCUGGAACCCAGAACGAGAUCCCCGUGGACCUGCUCGGACA
CGGCCAGCUGAGCGACAGCGAGGAAGAGAACGACGAGAUCCGCGGUGAACACCAGCACCUGCCCCG
CAGAAGGGCCGAACACAGAGACACCAUGCUGGCAUGUGCUGCAAGUGCGAGGCCCGGAUCAAGCU
GGUGGUGGAAAGCAGCGCCGACGACCUGAGAGCCUCCAGCAGCUGUCCUGAACCCUGAGCUUCGU
GGGACCCUGGUGCGCCAGCCAGCAGUGAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAAUUCUUAUAAAGGUUCCUUU
GUUCCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAU
AAAAAACAUUUUUUCAUUGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGCACUAG

[0521]

[0522] <서열 번호 14> HPV18 형의 E6 항원의 아미노산 서열.

FEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFKDLFVVYRDSIPHAACHKGIDFY
SRIRELRHYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAGHYRGQGHSC
CNRARQERLQRRRETQV

[0523]

[0524] <서열 번호 15> HPV18 형의 E7 항원의 아미노산 서열.

HGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHGQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEA
RIKL VVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVGPWCASQQ

[0525]

[0526] <서열 번호 16> 프로테아제 절단 서열의 아미노산 서열

[0527] RGRKRRS

[0528] <서열 번호 17> HPV16 형의 E6 항원 및 E7 항원 융합 단백질의 아미노산 서열

MDWTWILFLVAAATRVHSFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIIECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCTI
VYRDGNPYAVCDKGLKFYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDK
KQRFHNIIRGRWTGRGMSCCRSTRRETQLRGRKRSSHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYGYGQLNDSSE
EEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVGPICSQKP

[0529]

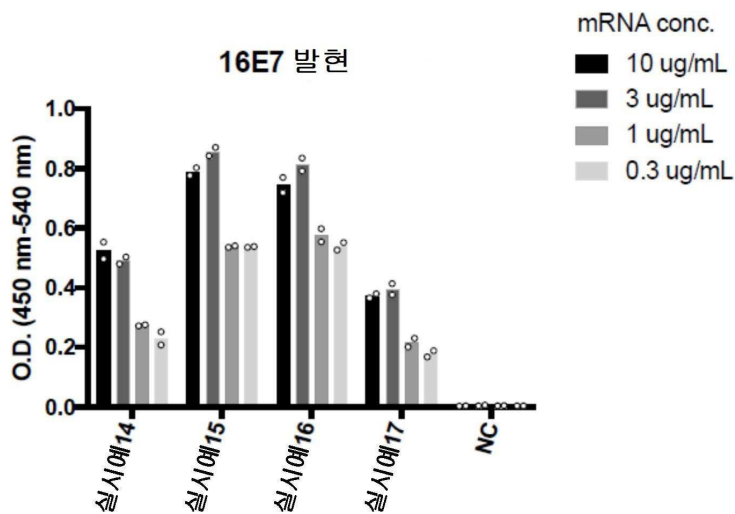
[0530] <서열 번호 18> HPV18 형의 E6 항원 및 E7 항원 융합 단백질의 아미노산 서열

MDWTWILFLVAAATRVHSFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTVFEFAFKDLFV
VYRDSIPHAACHKGIDFYSRIRELRYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLNE
KRRFHNIAAGHYRGQGHSCCNRARQERLQRRRETQVRGRKRSSHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGH
GQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQLFLNTLSFV
GPWCASQQ

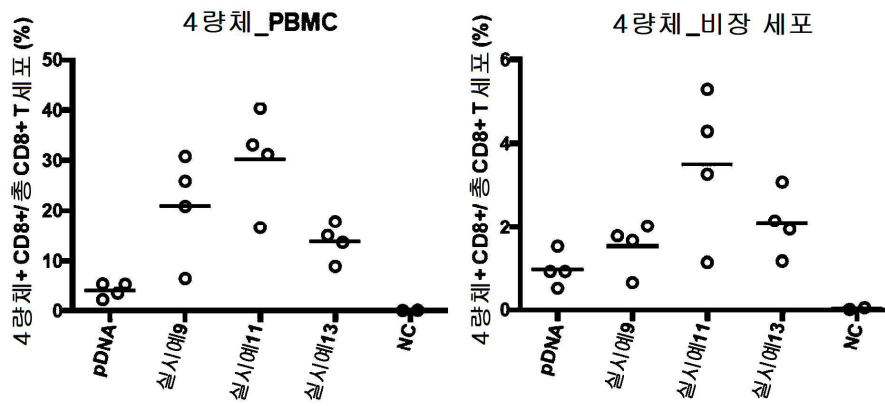
[0531]

도면

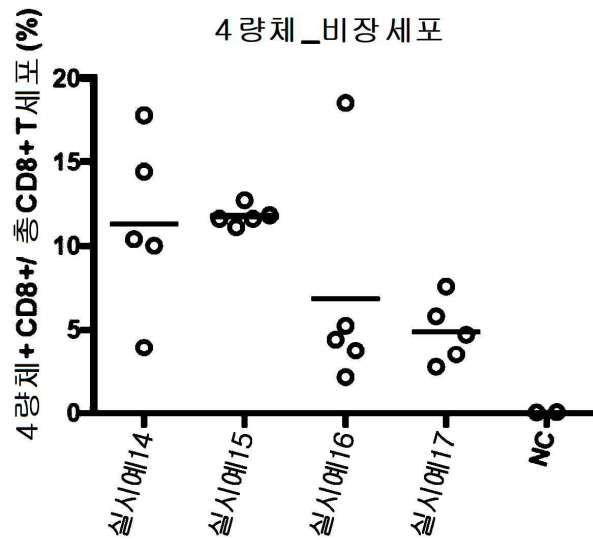
도면1



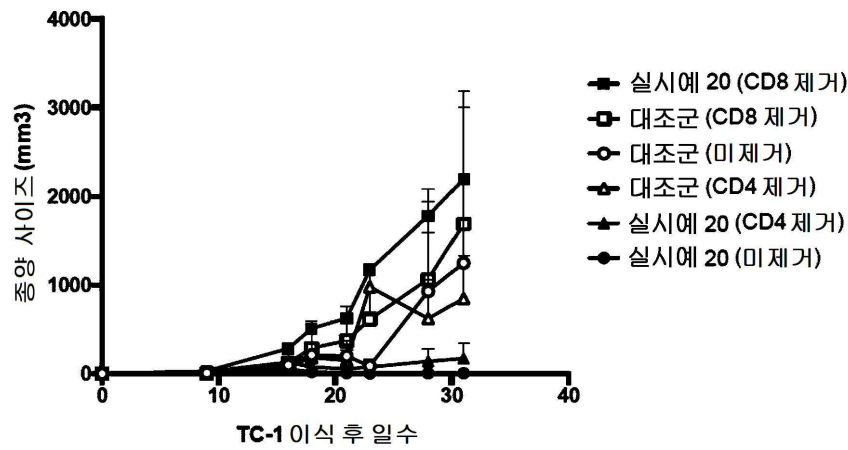
도면2



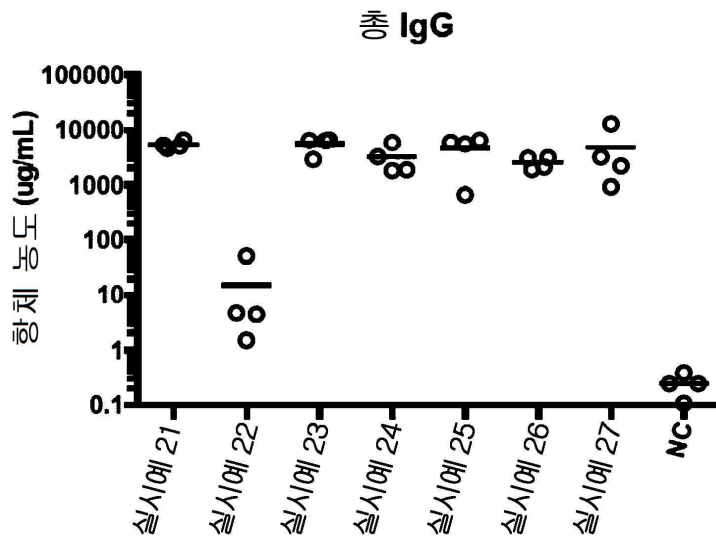
도면3



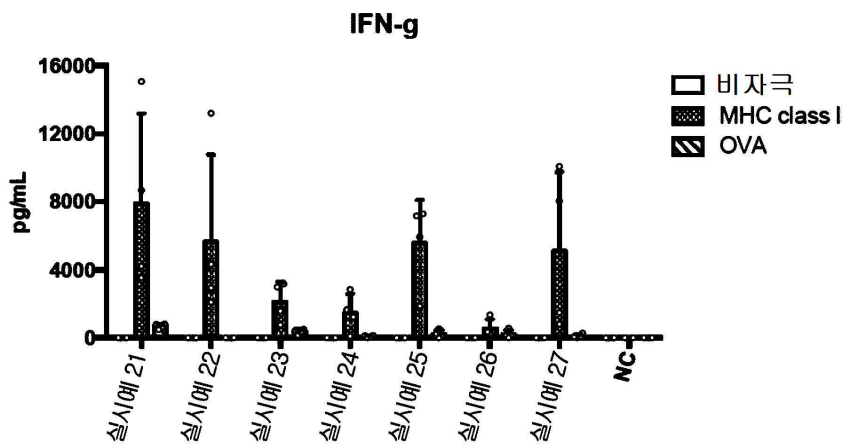
도면6



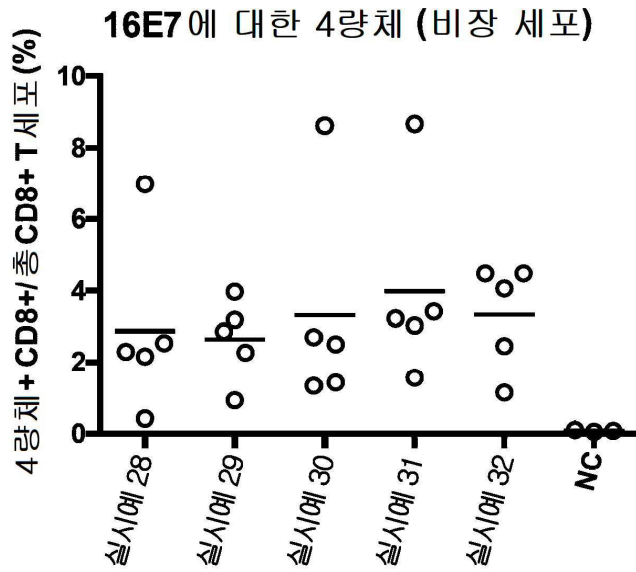
도면7



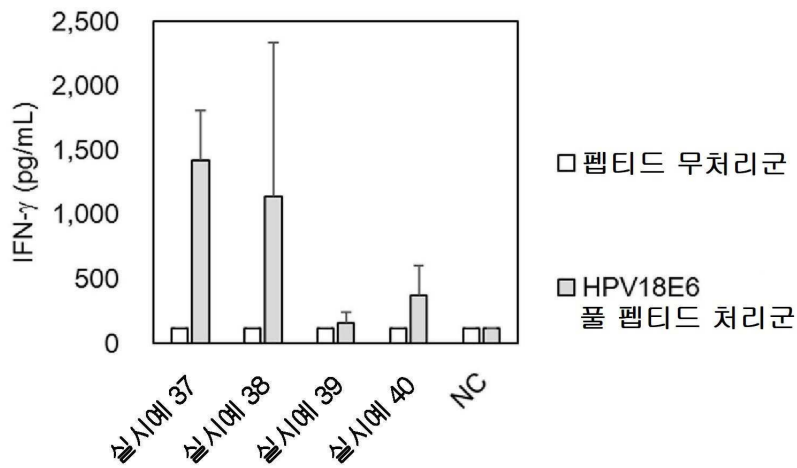
도면8



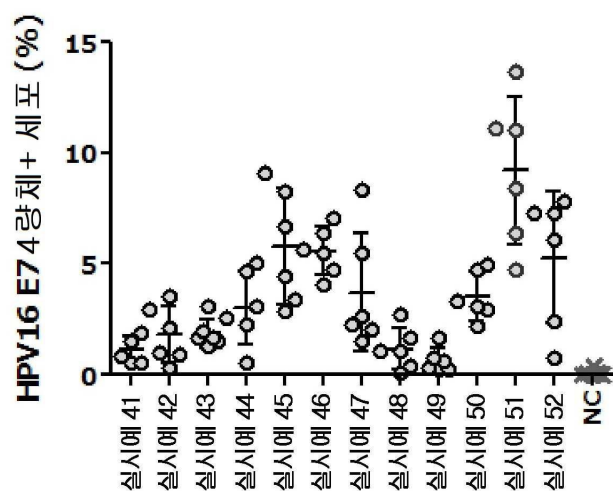
도면9



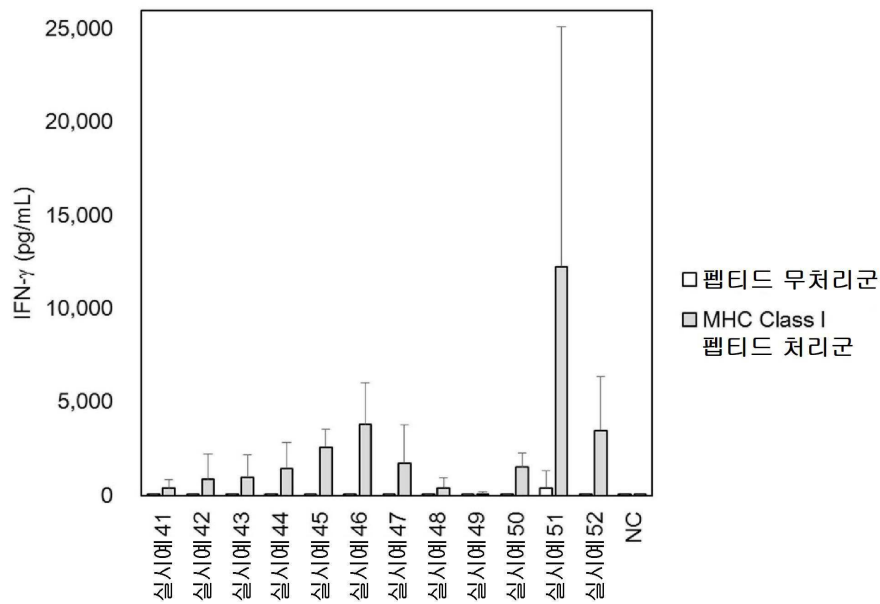
도면10



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION

<120> Nucleic acid lipid particle vaccine in which HPV mRNA is encapsulated

<130> FP-288PCT

<150> JP2019-207001

<151> 2019-11-15

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> template DNA

<400> 1

gctagcgtaa tacgactcac tataaggaga cccaagctac atttgcttct gacacaactg 60

tggtcactag caacctcaaa cagacaccgc caccatggac tggacctgga tctgtttct 120

ggtggccgct gccacacggg tgcacagctt tcaggaccct caagagaggc ccagaaagct 180
 gcctcagctg tgtaccgagc tgcagaccac catccacgac atcatcctgg aatgcgtgta 240
 ctgcaagcag cagctcctgc ggagagaggt gtacgatctt gccttcggg acctgtgcat 300
 cgtgtacaga gatggcaacc cctacgccgt gtgcgacaag ggcctgaagt tctacagcaa 360
 gatcagcgag taccggcact actgtctacag cctgtacggc accacactgg aacagcagta 420
 caacaagccc ctgtgcgacc tgctgatccg gtgcatcaac tgccagaaac ctctgtgccc 480

 cgaggaaaag cagcggcacc tggacaagaa gcagcggttc cacaacatca gaggccggtg 540
 gacagcgaga ggcatgagct gttgtcggag cagccggacc agaagagaaa cccagctgag 600
 aggccggaag agaagaagcc acggcgatac cctacactg cacgagtaca tgctggacct 660
 gcagcctgag acaaccgatc tgtacggcta cgccagctg aacgacagct ctgaggaaga 720
 ggacgagatc gacggacctg ctggacaggc cgaacctgat agagcccact acaatatcgt 780
 gaccttctgc tgcaagtgcg acagaccct gagactgtgt gtgcagagca cccacgtgga 840
 catcagaacc ctggaagatc tgctgatggg caccctggga atcgtgggcc ctatctgtag 900

 ccagaagcct tgagctcgct ttcttgctgt ccaatttcta ttaaaggttc ctttgttccc 960
 taagtccaac tactaaactg ggggatatta tgaaggcct tgagcatctg gattctgcct 1020
 aataaaaaac atttatttc attgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
 aaaaaaagag cactagt 1157

 <210> 2
 <211> 1132
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPV E6-E7 fusion 2 mRNA
 <400> 2

 aggagaccca agcuacauuu gcuucugaca caacuguguu cacuagcaac cucaaacaga 60

 caccgccacc auggacugga ccuggauccu guuucuggug gccgcugcca cacgggugca 120
 cagcuuucag gaccucaag agaggcccag aaagcugccu cagcugugua ccgagcugca 180
 gaccaccauc cagacauc uccuggaug cguguacugc aagcagcagc uccugcggag 240
 agagguguac gauuucgcu uccgggaccu gugcaucgug uacagagaug gcaacccua 300
 cgccgugugc gacaagggcc ugaaguucua cagcaagauc agcgaguacc ggcacuacug 360
 cuacagccug uacggcacca cacuggaaca gcaguacaac aagccccugu gcgaccugcu 420

gauccggugc aucaacugcc agaaaccucu gugccccgag gaaaagcagc ggcaccugga 480

caagaagcag cgguuccaca acaucagagg ccgguggaca ggagagagca ugagcuguug 540

ucggagcagc cggaccagaa gagaaccaca gcugagaggc cggaagagaa gaagccacgg 600

cgauaccccu acacugcacg aguacaugcu ggaccugcag ccugagacaa ccgaucugua 660

cggcuacggc cagcugaacg acagcucuga ggaagaggac gagaugcagc gaccugcugg 720

acaggccgaa ccugauagag cccacuacaa uaucgugacc uucugcugca agugcgacag 780

caccugaga cugugugugc agagcaccca cugggacauc agaaccugg aagaucugcu 840

gaugggcacc cugggaaucg uggggccuau cuguagccag aagccuugag cucgcuuucu 900

ugcuguccaa uuucuauuaa agguuccuuu guucccuaag uccaacuacu aaacuggggg 960

auuuuugaa gggccuugag caucuggauu cugccuaaua aaaaacauuu auuuucauug 1020

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagagcacu ag 1132

<210> 3

<211> 1157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> template DNA

<400> 3

gctagcgtaa tacgactcac tataaggaga cccaagctac atttgcttct gacacaactg 60

tgttcactag caacctcaaa cagacaccgc caccatggac tggacctgga tcctgttcct 120

ggtggccgcc gccacacggg tgcacagctt ccaggacccc caagagagc ccagaaagct 180

gccccagctg tgcaccgagc tgcagaccac catccagac atcatcctgg aatgcgtgta 240

ctgcaagcag cagctcctgc ggagagaggt gtacgacttc gccttcggg acctgtgcat 300

cgtgtacaga gacggcaacc cctacgccgt gtgcgacaag ggcctgaagt tctacagcaa 360

gatcagcgag taccggcact actgtacag cctgtacggc accacactgg aacagcagta 420

caacaagccc ctgtgcgacc tgctgatccg gtgcatcaac tgccagaaac ccctgtgccc 480

cgaggaaaag cagcggcacc tggacaagaa gcagcggttc cacaacatca gaggccggtg 540

gacaggcaga ggcatgagct gctgccggag cagccggacc agaagagaaa ccagctgag 600

aggccggaag agaagaagcc acggcgacac cccacactg cacgagtaca tgctggacct 660

gcagcccag acaaccgacc tgtacggcta cggccagctg aacgacagca gcgaggaaga 720

ggacgagatc gacggacccg ccggacaggc cgaaccgac agagcccact acaacatcgt 780

gaccttctgc tgcaagtgcg acagcaccct gagactgtgc gtgcagagca cccacgtgga 840
catcagaacc ctggaagacc tgctgatggg caccctggga atcgtgggcc ccatctgcag 900
ccagaagccc tgagctcgct ttcttgctgt ccaatttcta ttaaaggttc ctttgttccc 960

taagtccaac tactaaactg ggggatatta tgaaggcct tgagcatctg gattctgcct 1020
aataaaaaac atttatattc attgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaagag cactagt 1157

<210> 4
<211> 1132
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HPV E6-E7 fusion 10 mRNA
<400> 4

aggagaccca agcuacauuu gcuucugaca caacuguguu cacuagcaac cucaaacaga 60
cacccgccacc auggacugga ccuggauccu guuccuggug gccgccgcca cacgggugca 120

cagcuuccag gacccccaaag agaggcccag aaagcugccc cagcugugca ccgagcugca 180
gaccaccauc cagcacauc uccuggaauug cguguacugc aagcagcagc uccugcggag 240
agagguguac gacuucgcuu uccgggaccu gugcaucgug uacagagacg gcaaccccua 300
cgccgugugc gacaagggcc ugaaguucua cagcaagauc agcgaguacc ggcacuacug 360
cuacagccug uacggcacca cacuggaaca gcaguacaac aagccccugu gcgaccugcu 420
gauccggugc aucaacugcc agaaaccccu gugccccgag gaaaagcagc ggcaccugga 480
caagaagcag cgguuccaca acaucagagg ccgguggaca ggcaagggca ugagcugcug 540

ccggagcagc cggaccagaa gagaaccca gcugagaggc cggaagagaa gaagccacgg 600
cgacaccccc acacugcagc aguacaugcu ggaccugcag cccgagacaa ccgaccugua 660
cgguacggc cagcugaacg acagcagcga ggaagaggac gagaucgacg gacccgccgg 720
acaggccgaa cccgacagag cccacuacaa caucgugacc uucugcugca agugcgacag 780
caccugaga cugugcgugc agagcaccca cguggacauc agaaccugg aagaccugcu 840
gaugggcacc cugggaauug ugggccccaau cugcagccag aagcccugag cucgcuuucu 900
ugcuguccaa uuucuauuaa agguuccuuu guucccuaag uccaacuacu aaacuggggg 960

auuuuugaa gggccuugag caucuggauu cugccuaaua aaaaacauuu auuuucauug 1020
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagagcacu ag 1132

<210> 5

<211> 1157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> template DNA

<400> 5

gctagcgtaa tacgactcac tatagggaga cccaagctac atttgcttct gacacaactg 60

tgttcactag caacctcaaa cagacaccgc caccatggac tggacctgga tcctgttcct 120

ggtggccgcc gccacacggg tgcacagctt ccaggacccc caagagaggc ccagaaagct 180

gccccagctg tgcaccgagc tgcagaccac catccacgac atcatcctgg aatgcgtgta 240

ctgcaagcag cagctcctgc ggagagaggt gtacgacttc gccttcggg acctgtgcat 300

cgtgtacaga gacggcaacc cctacgccgt gtgcgacaag ggctgaagt tctacagcaa 360

gatcagcgag taccggcact actgctacag cctgtacggc accacactgg aacagcagta 420

caacaagccc ctgtgcgacc tgctgatccg gtgcatcaac tgccagaaac ccctgtgccc 480

cgaggaaaag cagcggcacc tggacaagaa gcagcgggtc cacaacatca gaggccggtg 540

gacaggcaga ggcatgagct gctgccggag cagccggacc agaagagaaa cccagctgag 600

aggccggaag agaagaagcc acggcgacac cccacactg cagagtaca tgctggacct 660

gcagcccag acaaccgacc tgtacggcta cggccagctg aacgacagca gcgaggaaga 720

ggacgagatc gacggacccg ccggacaggc cgaacccgac agagcccact acaacatcgt 780

gaccttctgc tgcaagtgcg acagcacctt gagactgtgc gtgcagagca cccacgtgga 840

catcagaacc ctggaagacc tgctgatggg caccctggga atcgtgggcc ccatctgcag 900

ccagaagccc tgagctcgct ttcttgctgt ccaatttcta ttaaagggtc ctttgttccc 960

taagtccaac tactaaactg ggggatatta tgaaggcct tgagcatctg gattctgcct 1020

aataaaaaac atttattttc attgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

aaaaaaagag cactagt 1157

<210> 6

<211> 1132

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPV16 E6-E7 fusion 10 opt2

<400> 6

gggagaccca agcuacauuu gcuucugaca caacuguguu cacuagcaac cucaaacaga	60
caccgccacc auggacugga ccuggauccu guuccugug gcccgcgcca cacgggugca	120
cagcuuccag gacccccaa agaggcccag aaagcugccc cagcugugca ccgagcugca	180
gaccaccauc cagacauca uccuggaug cguguacugc aagcagcagc uccugcggag	240
agagguguac gacuugccu uccgggaccu gugcaucgug uacagagacg gcaacccua	300
cgccgugugc gacaagggcc ugaaguucua cagcaagauc agcgaguacc ggcacuacug	360
cuacagccug uacggcacca cacuggaaca gcaguacaac aagccccugu gcgaccugcu	420
gauccggugc aucaacugcc agaaacccu gugccccgag gaaaagcagc ggcaccugga	480
caagaagcag cgguuccaca acaucagagg ccgguggaca ggacagaggca ugagcugcug	540
ccggagcagc cggaccagaa gaaaaacca gcugagaggc cggaagagaa gaagccacgg	600
cgacaccccc acacugcacg aguacaugcu ggaccugcag cccgagacaa ccgaccugua	660
cggcuacggc cagcugaacg acagcagcga ggaagaggac gagaucgacg gacccgccgg	720
acaggccgaa cccgacagag cccacuacaa caucgugacc uucugcugca agugcgacag	780
caccugaga cugugcugc agagcaccca cugggacauc agaaccucgg aagaccugcu	840
gaugggcacc cugggaaucg ugggccccau cugcagccag aagcccugag cucgcuuucu	900
ugcuguccaa uuucuauuaa agguuccuuu guuccuaag uccaacuacu aaacuggggg	960
auauuaugaa gggccuugag caucuggauu cugccuaaua aaaaacauuu auuuucauug	1020
caaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaagagcacu ag	1132

<210> 7

<211> 1161

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 7

atgggctcca tcggcgacg aagcatggaa tttgttttg atgtattcaa ggagctcaaa	60
gtccaccatg ccaatgagaa catcttctac tgccccattg ccatcatgtc agctctagcc	120
atggtatacc tgggtgcaaa agacagcacc aggacacaga taaataaggt tgttcgcttt	180
gataaacttc caggattcgg agacagtatt gaagctcagt gtggcacatc tgtaaacgtt	240
cactttcac ttagagacat cctcaaccaa atcaccaaac caaatgatgt ttattcgttc	300
agccttgcca gtagacttta tgctgaagag agatacccaa tcctgccaga atacttgag	360

tgtgtgaagg aactgtatag aggaggcttg gaacctatca actttcaaac agctgcagat 420
 caagccagag agtcatcaa ttctgggta gaaagtcaga caaatggaat taccagaaat 480
 gtcttcagc caagctccgt ggattctcaa actgcaatgg ttctggttaa tgccattgtc 540
 ttcaaaggac tggggagaa aacatttaag gatgaagaca cacaagcaat gcctttcaga 600
 gtgactgagc aagaaagcaa acctgtgcag atgatgtacc agattggttt atttagagtg 660

gcatcaatgg ctctcgagaa aatgaagatc ctggagcttc catttgccag tgggacaatg 720
 agcatgttgg tgctgttggc tgatgaagtc tcaggccttg agcagcttga gagtataatc 780
 aactttgaaa aactgactga atggaccagt tctaattgta tggaagagag gaagatcaaa 840
 gtgtacttac ctgcgatgaa gatggaggaa aaatacaacc tcacatctgt cttaatggct 900
 atgggcatta ctgacgtgtt tagctcttca gccaatctgt ctggcatctc ctgagcagag 960
 agcctgaaga tatctcaagc tgtccatgca gcacatgcag aaatcaatga agcaggcaga 1020
 gaggtggtag ggicagcaga ggctggagtg gatgctgcaa gcgtctctga agaatttagg 1080

gctgaccatc cattctcttt ctgtatcaag cacatcgcaa ccaacgccgt tctcttcttt 1140
 ggcagatgtg ttccccccta a 1161

<210> 8

<211> 150

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 8

Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr

1 5 10 15

Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys

20 25 30

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp

35 40 45

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys

50 55 60

Gly Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr

65 70 75 80

Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys

85 90 95

Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu

100 105 110
Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg

115 120 125
Gly Arg Trp Thr Gly Arg Gly Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr

130 135 140
Arg Arg Glu Thr Gln Leu

145 150

<210> 9

<211> 97

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 9

His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro

1 5 10 15
Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu

20 25 30
Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg

35 40 45
Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu

50 55 60
Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp

65 70 75 80
Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Pro Ile Cys Ser Gln Lys

85 90 95
Pro

<210> 10

<211> 1193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pMA-HPV18 fusion1 opt1

<400> 10

gctagcgtaa tacgactcac tataaggaga cccaagctac atttgcttct gacacaactg	60
tgttcactag caacctcaaa cagacaccgc caccatggac tggacctgga tcctgttcct	120
ggtggccgcc gccacaagag tgcacagctt cgaggacccc accagacggc cctacaagct	180
gccccacctg tgcaccgagc tgaacaccag cctgcaggac atcgagatca cctgcgtgta	240
ctgcaagacc gtgctggaac tgaccgaggt gttcgagtgc gccttcaagg acctgttcgt	300
ggtgtaccgg gacagcatcc cccacgccgc ctgccacaag ggcatcgact tctacagccg	360
gatcagagag ctgcggcact acagcgacag cgtgtacggc gacaccctgg aaaagctgac	420
caacaccggc ctgtacaacc tgctgatccg gtgcctgaga tgccagaagc ccctgaaccc	480
cgccgagaag ctgagacacc tgaacgagaa gcggcggttc cacaacatcg ccggccacta	540
cagaggccag ggccacagct gctgcaaccg ggccagacaa gagagactgc agcggcggag	600
agaaacccaa gtgcggggca gaaagagaag aagccacggc cccaaggcca cactgcagga	660
catcgtgctg cacctggaac cccagaacga gatccccgtg gacctgctcg gacacggcca	720
gctgagcgac agcgaggaag agaacgacga gatcgacggc gtgaaccacc agcacctgcc	780
cgccagaagg gccgaaccac agagacacac catgctgtgc atgtgctgca agtgcgaggc	840
ccgatcaag ctggtggtgg aaagcagcgc cgacgacctg agagccttcc agcagctgtt	900
cctgaacacc ctgagcttgc tgggacctg gtgcgccagc cagcagttag ctcgtttct	960
tgctgtccaa ttctattaa aggttccttt gtccctaag tccaactact aaactggggg	1020
atattatgaa gggccttgag catctggatt ctgcctaata aaaaacattt attttcattg	1080
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1140
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagagcact agt	1193

<210> 11

<211> 1168

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPV18 E6-E7 fusion1 opt1 mRNA

<400> 11

aggagaccca agcuacauuu gcuucugaca caacuguguu cacuagcaac cucaaacaga	60
caccgccacc auggacugga ccuggauccu guuccuggug gccgccgcca caagagugca	120
cagcuucgag gacccacca gacggccua caagcugccc gaccugugca ccgagcugaa	180
caccagccug caggacaucg agaucaccug cguguacugc aagaccgugc uggaacugac	240

cgagguguuc gaguucgccu ucaaggaccu guucguggug uaccgggaca gcauccccca 300

cgccgccugc cacaaggga ucgacuucua cagccggauc agagagcugc ggcacucacag 360

cgacagcgug uacggcgaca ccucggaaaa gcugaccaac accggccugu acaaccugcu 420

gauccggugc cugagaugcc agaagcccu gaaccccgcc gagaagcuga gacaccugaa 480

cgagaagcgg cgguuccaca acaucgccgg ccacuacaga ggccagggcc acagcugcug 540

caaccgggcc agacaagaga gacugcagcg gcggagagaa acccaagugc ggggcagaaa 600

gagaagaagc cacggcccca aggccacacu gcaggacauc gugcugcacc uggaacccca 660

gaacgagauc ccguggacc ugcucggaca cggccagcug agcgacagcg aggaagagaa 720

cgacgagauc gacggcguga accaccagca ccugcccgc agaagggcg aaccacagag 780

acacaccaug cugugcaugu gcugcaagug cgaggcccg aucaagcugg ugguggaaag 840

cagcgccgac gaccugagag ccuuccagca gcuguuccug aacaccuga gcuucguggg 900

accucggugc gccagccagc agugagcucg cuuucuugcu guccaauuuc uauuaaaggu 960

uccuuuguuc ccuaagucca acuaacuaac ugggggauau uaugaagggc cuugagcauc 1020

uggauucugc cuaaiaaaaa acauuuuuu ucauugcaaa aiaaaaaaaa aiaaaaaaaa 1080

iaaaaaaaa aiaaaaaaaa aiaaaaaaaa aiaaaaaaaa aiaaaaaaaa aiaaaaaaaa 1140

iaaaaaaaa aiaaaaaaag agcacuag 1168

<210> 12

<211> 1193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pMA-HPV18 fusion1 opt2

<400> 12

gctagcgtaa tacgactcac tatagggaga cccaagctac atttgcttct gacacaactg 60

tgttactag caacctcaaa cagacaccgc caccatggac tggacctgga tctgttctt 120

ggtggccgcc gccacaagag tgcacagctt cgaggacccc accagacggc cctacaagct 180

gcccgaactg tgcaccgagc tgaacaccag cctgcaggac atcgagatca cctgcgtgta 240

ctgcaagacc gtgctggaac tgaccgaggt gtctgagttc gccttcaagg acctgttct 300

ggtgtaccgg gacagcatcc cccacgccgc ctgccacaag ggcatcgact tctacagccg 360

gatcagagag ctgcggcact acagcgacag cgtgtacggc gacaccctgg aaaagctgac 420

caacaccggc ctgtacaacc tgctgatccg gtgcctgaga tgccagaagc ccctgaaccc 480

cgccgagaag ctgagacacc tgaacgagaa gcggcggttc cacaacatcg ccggccacta 540

cagaggccag ggccacagct gctgcaaccg ggccagacaa gagagactgc agcggcggag 600

agaaacccaa gtgcggggca gaaagagaag aagccacggc cccaaggcca cactgcagga 660

catcgtgctg cacctggaac ccagaaacga gatccccgtg gacctgctcg gacacggcca 720

gctgagcgac agcgaggaag agaacgacga gatcgacggc gtgaaccacc agcacctgcc 780

cgccagaagg gccgaaccac agagacacac catgctgtgc atgtgctgca agtgcgaggc 840

ccggatcaag ctggtggtgg aaagcagcgc cgacgacctg agagccttcc agcagctgtt 900

cctgaacacc ctgagcttcg tgggaccttg gtgcgccagc cagcagttag ctcgctttct 960

tgctgtccaa tttctattaa aggttccttt gtccctaag tccaactact aaactggggg 1020

atattatgaa gggccttgag catctggatt ctgcctaata aaaaacattt attttcattg 1080

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagagcact agt 1193

<210> 13

<211> 1168

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPV18 E6-E7 fusion1 opt2 mRNA

<400> 13

gggagaccca agcuacauuu gcuucugaca caacuguguu cacuagcaac cucaaacaga 60

caccgccacc auggacugga ccuggauccu guuccuggug gccgccgcca caagagugca 120

cagcuucgag gacccccacca gacggcccua caagcugccc gaccugugca ccgagcugaa 180

caccagccug caggacaucg agaucaccug cguguacugc aagaccgugc uggaacugac 240

cgagguguuc gaguucgccu ucaaggaccu guucguggug uaccgggaca gcauccccca 300

cgccgccugc cacaagggca ucgacuucua cagccggauc agagagcugc ggcacuacag 360

cgacagcgug uacggcgaca ccugggaaaa gcugaccaac accggccugu acaaccugcu 420

gauccggugc cugagaugcc agaagccccu gaaccccgcc gagaagcuga gacaccugaa 480

cgagaagcgg cgguuccaca acaucgccgg ccacuacaga ggccagggcc acagcugcug 540

caaccgggcc agacaagaga gacugcagcg gcggagagaa acccaagugc ggggcagaaa 600

gagaagaagc cacggcccca aggccacacu gcaggacauc gugcugcacc uggaacccca 660

gaacgagauc cccguggacc ugcucggaca cgccagcug agcgacagcg aggaagagaa 720

cgacgagauc gacggcguga accaccagca ccugccccgc agaagggccg aaccacagag 780

acacaccaug cugugcaugu gcugcaagug cgaggcccgg aucaagcugg ugguggaaag 840

cagcgccgac gaccugagag ccuuccagca gcuguuccug aacaccucca gcuucguggg 900
 acccuggugc gccagccagc agugagcucg cuuucugcu guccaauuuc uauuaaaggu 960
 uccuuuguuc ccuaagucca acuacuaaac ugggggauau uaugaagggc cuugagcauc 1020

uggauucugc cuaauaaaaa acauuuuuuu ucauugcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcacuag 1168

<210> 14

<211> 155

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 18

<400> 14

Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr

1 5 10 15

Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp

65 70 75 80

Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr

85 90 95

Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala

100 105 110

Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala

115 120 125

Gly His Tyr Arg Gly Gln Gly His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln

130 135 140

Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val

145 150 155

<210> 15

<211> 104

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 18

<400> 15

His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro

1 5 10 15

Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Gly His Gly Gln Leu Ser Asp

20 25 30

Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu

35 40 45

Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys

50 55 60

Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Lys Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp

65 70 75 80

Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val

85 90 95

Gly Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln

100

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> proteolytic cleavage site

<400> 16

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

1 5

<210> 17

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein of E6 and E7 antigens from human papillomavirus
type 16

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu

20 25 30

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val

35 40 45

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe

50 55 60

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys

65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr

85 90 95

Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro

100 105 110

Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys

115 120 125

Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn

130 135 140

Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Gly Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser

145 150 155 160

Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser His

165 170 175

Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu

180 185 190

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

195 200 205

Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu
245 250 255

Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
260 265 270

<210> 18

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein of E6 and E7 antigens from human papillomavirus
type 18

<400> 18

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15
His Ser Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu
20 25 30

Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val
35 40 45

Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala Phe
50 55 60

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

65 70 75 80
His Lys Gly Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His Tyr
85 90 95

Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly
100 105 110

Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn
115 120 125

Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn

130 135 140
Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Gly His Ser Cys Cys Asn Arg Ala
145 150 155 160

Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val Arg Gly Arg

	165		170		175	
Lys	Arg	Arg	Ser	His	Gly	Pro
Lys	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Ile
Val	Leu					
	180		185		190	
His	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn	Glu
Ile	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Gly
His	Gly					
	195		200		205	
Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu
Glu	Glu	Glu	Asn	Asp	Glu	Ile
Asp	Gly	Val	Asn			
	210		215		220	
His	Gln	His	Leu	Pro	Ala	Arg
Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Gln	Arg
His	Thr	Met				
	225		230		235	
240						
Leu	Cys	Met	Cys	Cys	Lys	Cys
Glu	Ala	Arg	Ile	Lys	Leu	Val
Val	Glu					
	245		250		255	
Ser	Ser	Ala	Asp	Asp	Leu	Arg
Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Leu
Asn	Thr					
	260		265		270	
Leu	Ser	Phe	Val	Gly	Pro	Trp
Cys	Ala	Ser	Gln	Gln		
	275		280			