



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035963
(43) 공개일자 2020년04월06일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 17/12 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7003760</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년07월13일
심사청구일자 2020년03월13일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년02월07일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/095632</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2019/011331
국제공개일자 2019년01월17일</p> <p>(30) 우선권주장
201710573731.9 2017년07월14일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
시아먼 유니버시티
중국 361005 시아먼 후지안 시밍 디스트릭트 시밍
난 로드 넘버 422
시아먼 이노박스 바이오테크 코. 엘티디.
중국 후지안 361022 시아먼 하이캉 디스트릭트 산
비안 흥 이스트 로드 50 1층</p> <p>(72) 발명자
구, 잉
중국 후지안 361005 시아먼 시밍 디스트릭트 시밍
난 로드 넘버 422
리, 샤오웨이
중국 후지안 361005 시아먼 시밍 디스트릭트 시밍
난 로드 넘버 422
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 무한</p> |
|---|--|

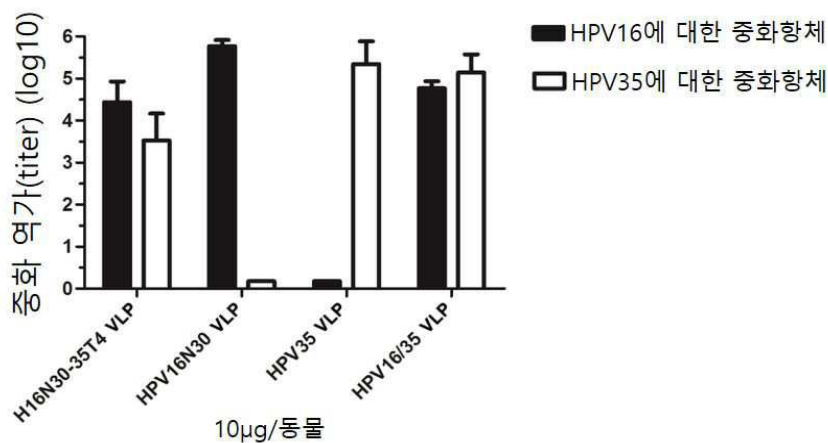
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 인간 유두종 바이러스 타입 16의 L1 단백질의 변이체

(57) 요약

돌연변이된 HPV16 L1 단백질(또는 이의 변종(variant)), 그것을 암호화하는 서열 및 그것을 제조하는 방법뿐만 아니라, 그것을 포함하는 바이러스-유사 입자(HPV virus-like particle)가 제공된다. 상기 단백질(또는 이의 변종) 및 상기 바이러스-유사 입자는 적어도 두 가지 타입의 HPV(예를 들어, HPV16 및 HPV35, 또는 HPV16, HPV35, 및 HPV31)에 대해 중화항체(neutralizing antibodies)를 유도할 수 있고, 따라서 앞서 언급한 적어도 두 가지 HPV 타입에 의한 감염, 및, 자궁경부암과 음부사마귀(condyloma acuminatum)와 같이 상기 감염에 의해 유도되는 질병을 예방하는데 사용될 수 있다. 또한 상기 단백질 및 바이러스-유사 입자의, 앞서 언급한 적어도 두 가지 HPV 타입에 의한 감염, 및 자궁경부암과 음부사마귀와 같이 상기 감염에 의해 유도되는 질병을 예방하기 위한 약제학적 조성물 또는 백신의 제조에 있어서의 용도가 제공된다.

대표도 - 도8a



(52) CPC특허분류

A61P 17/12 (2018.01)

A61P 31/20 (2018.01)

C07K 14/025 (2013.01)

C12N 2710/20022 (2013.01)

C12N 2710/20023 (2013.01)

C12N 2710/20034 (2013.01)

(72) 발명자

송, 슈오

중국 후지안 361005 시아먼 시핑 디스트릭트 시핑
난 로드 넘버 422

혜, 마오주

중국 후지안 361005 시아먼 시핑 디스트릭트 시핑
난 로드 넘버 422

리, 지하이

중국 후지안 361005 시아먼 시핑 디스트릭트 시핑
난 로드 넘버 422

시아, 녕샤오

중국 후지안 361005 시아먼 시핑 디스트릭트 시핑
난 로드 넘버 422

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이된(mutated) HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종(variant)으로서, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여 다음의 돌연변이(mutations):

(1) 4개, 6개, 8개, 10개, 20개, 30개 또는 40개 아미노산과 같이, 4-50개 아미노산의 N-말단 절단(N-terminal truncation); 및

(2) 상기 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 두 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환;을 가지는 것으로서,

선택적으로, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 다음의 돌연변이:

(3) 상기 야생형 HPV16 L1 단백질의 76-87번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 세 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환;

(4) 상기 야생형 HPV16 L1 단백질의 152-167번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 세 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환; 또는,

(5) 상기 야생형 HPV16 L1 단백질의 202-207번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 세 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환;을 더 가지고,

상기 변종은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질과는 하나 또는 여러 개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 9개)의 아미노산의 치환(substitution) (바람직하게는 보존적(conservative) 치환), 첨가(addition) 또는 결실(deletion)의 차이만을 가지고 있고, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질의 기능, 즉, 적어도 두 가지 타입의 HPV (예를 들어, HPV16 및 HPV35, 또는 HPV16, HPV35 및 HPV31)에 대해 중화항체(neutralizing antibodies)를 유도하는 기능을 유지하는 것으로서;

바람직하게는, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 상기 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여 30 또는 40개 아미노산의 N-말단 절단을 가지고;

바람직하게는, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 상기 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여 30개 아미노산의 N-말단 절단을 가지고;

바람직하게는, 상기 야생형 HPV의 두 번째 타입은 HPV35이고; 바람직하게는, (2)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기이고;

바람직하게는, 상기 야생형 HPV의 세 번째 타입은 HPV31이고; 바람직하게는, (3)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 야생형 HPV31 L1 단백질의 50-62번 위치의 아미노산 잔기이고; 바람직하게는, (4)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 상기 야생형 HPV31 L1 단백질의 127-142번 위치의 아미노산 잔기이고; 바람직하게는, (5)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 상기 야생형 HPV31 L1 단백질의 177-182번 위치의 아미노산 잔기이고;

바람직하게는, 상기 야생형 HPV16 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 1에 명시된 아미노산 서열을 가지고;

바람직하게는, 상기 야생형 HPV35 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 2에 명시된 아미노산 서열을 가지고;

바람직하게는, 상기 야생형 HPV31 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 3에 명시된 아미노산 서열을 가지고;

바람직하게는, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 7, 9, 10, 11로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 것인, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종.

청구항 2

제1항에 따른 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 암호화하는, 분리된 핵산(nucleic acid).

청구항 3

제2항에 따른 분리된 핵산을 포함하는, 벡터(vector).

청구항 4

제2항에 따른 분리된 핵산 및/또는 제3항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포(host cell).

청구항 5

제1항에 따른 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 포함하거나, 또는 제1항에 따른 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종으로 이루어진, HPV 바이러스-유사 입자(HPV virus-like particle).

청구항 6

제1항에 따른 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종, 또는 제2항에 따른 분리된 핵산, 또는 제3항에 따른 벡터, 또는 제4항에 따른 숙주 세포, 또는 제5항에 따른 HPV 바이러스-유사 입자를 포함하는, 조성물.

청구항 7

제5항에 따른 HPV 바이러스-유사 입자를 포함하고, 선택적으로 약제학적으로 허용되는 담체(carrier) 및/또는 부형제를 더 포함하는, 약제학적 조성물 또는 백신으로서;

바람직하게는, 상기 HPV 바이러스-유사 입자는 HPV 감염 또는 HPV 감염에 의해 유발되는 질병을 예방하는데 효과적인 양으로 존재하고;

바람직하게는, 상기 HPV 감염은 하나 이상의 HPV 타입 (예를 들어, HPV 16 감염, HPV 35 감염, 및/또는 HPV 31 감염)에 의한 감염이고;

바람직하게는, 상기 HPV 감염에 의해 유발되는 질병은 자궁경부암 및 음부사마귀(condyloma acuminatum)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 약제학적 조성물 또는 백신.

청구항 8

제1항에 따른 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및 이어서 상기 숙주 세포의 배양체(culture)로부터 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 회수하는 단계를 포함하고;

바람직하게는, 상기 숙주 세포는 대장균(*E. coli*)이고;

바람직하게는, 상기 방법은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 대장균에서 발현시키는 단계, 및 상기 대장균의 용해물 상층액(lysate supernatant)을 정제하여 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 수득하는 단계를 포함하고; 바람직하게는, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종은 크로마토그래피(chromatography) (예를 들어, 양이온 교환(cation exchange) 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피, 및/또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction) 크로마토그래피)를 이용해 상기 대장균의 용해물 상층액으로부터 회수되는 것인, 방법.

청구항 9

백신을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 제5항에 따른 HPV 바이러스-유사 입자를 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제와 결합시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

HPV 감염 또는 HPV 감염에 의해 유발되는 질병을 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 예방적으로 (prophylactically) 유효한 용량(effective amount)의, 제5항에 따른 HPV 바이러스-유사 입자 또는 제7항에 따른 약제학적 조성물 또는 백신을 피험자에게 투여하는 것을 포함하고;

바람직하게는, 상기 HPV 감염은 하나 이상의 HPV 타입 (예를 들어, HPV 16 감염, HPV 35 감염, 및/또는 HPV 31 감염)에 의한 감염이고;

바람직하게는, 상기 HPV 감염으로 유발되는 질병은 자궁경부암 및 음부사마귀로 구성된 군에서 선택되는 것인, 약제학적 조성물 또는 백신.

청구항 11

제1항에 따른 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종 또는 제5항에 따른 HPV 바이러스-유사 입자의, HPV 감염 또는 HPV 감염으로 유발되는 질병을 예방하기 위한 약제학적 조성물 또는 백신의 제조에 있어서의 용도로서,

바람직하게는, 상기 HPV 감염은 하나 이상의 HPV 타입 (예를 들어, HPV 16 감염, HPV 35 감염, 및/또는 HPV 31 감염)에 의한 감염이고;

바람직하게는, 상기 HPV 감염으로 유발되는 질병은 자궁경부암 및 음부사마귀로 구성된 군에서 선택되는 것인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분자 바이러스학(molecular virology) 및 면역학 분야와 관련된다. 특히, 본 발명은 돌연변이된 (mutated) HPV16 L1 단백질 (또는 이의 변종(variant)), 이를 암호화하는 서열, 이를 제조하는 방법뿐만 아니라 이를 포함하는 바이러스-유사 입자(virus-like particle)와 관련되고, 상기 단백질 (또는 이의 변종) 및 바이러스-유사 입자는 적어도 두 가지 타입의 HPV(예를 들어, HPV 16 및 HPV 35; 또는 HPV 16, HPV 35 및 HPV 31)에 대해 중화항체(neutralizing antibody)를 유도할 수 있고, 따라서 앞서 언급한 적어도 두 가지 HPV 타입에 의한 감염, 및 자궁경부암과 음부사마귀(condyloma acuminatum)와 같이 상기 감염으로 유발되는 질병을 예방하는 데 사용될 수 있다. 나아가 본 발명은 앞서 언급한 단백질 및 바이러스-유사 입자의, 상기 적어도 두 가지 HPV 타입에 의한 감염, 및 자궁경부암과 음부사마귀와 같이 상기 감염으로 유발되는 질병을 예방하기 위한 약제학적 조성물 또는 백신의 제조에서의 용도와 관련된다.

배경 기술

[0002] 인간 유두종 바이러스(Human papillomavirus, HPV)는 주로 피부 및 점막에서 사마귀를 유발한다. 종양형성 (tumorigenesis)과의 관계에 따라, HPV는 고위험 타입과 저위험 타입으로 나눌 수 있는데, 고위험 HPV 타입에 의한 감염은 여성에서의 자궁경부암을 포함한 생식기암(genital cancers)의 주요 원인인 것으로 확인되는 반면; 저위험 HPV 타입에 의한 감염은 주로 음부사마귀(condyloma acuminatum)를 유발한다. HPV 감염을 예방하고 통제할 수 있는 가장 효과적인 방법은 HPV 백신, 특히 자궁경부암을 유발할 수 있는 고위험 HPV 타입에 대한 백신을 투여하는 것이다.

[0003] HPV의 주요 캡시드 단백질(major capsid protein) L1은 속이 빈 바이러스-유사 입자(Virus-Like Particle,

VLP)로 자가 조립(self-assembly)하는 특징이 있다. HPV VLP는 주요 캡시드 단백질 L1의 오량체(pentamer) 72개로 이루어진 대칭적인 20면체 구조를 가진다 (Doorbar, J. and P. H. Gallimore. 1987. J Virol, 61(9): 2793-9). HPV VLP의 구조는 원조(native) HPV의 것과 매우 유사한데, 원조 바이러스의 중화 항원결정기(neutralizing epitopes)의 대부분을 유지하고 있고, 높은 역가(titer)의 중화항체(neutralizing antibodies)를 유도할 수 있다 (Kirnbauer, R., F. Booy, et al. 1992 Proc Natl Acad Sci USA 89(24): 12180-4).

[0004] 그러나, 기존 연구는 HPV VLP가 주로 동일한 HPV 타입에 대한 중화항체를 유도하고, 동일한 HPV 타입에 대한 방어 면역을 일으키며, 소수의 높은 상동성을 보이는 타입에 대해서는 낮은 교차방어 효과(cross-protective effect)만을 보인다는 것을 보여주었다 (Sara L. Bissett, Giada Mattiuzzo, et al. 2014 Vaccine. 32:6548-6555). 따라서, 기존 HPV 백신의 방어 범위는 매우 제한적이다. 일반적으로, 하나의 HPV 타입의 VLP는 오직 동일한 HPV 타입에 의한 감염을 예방하는 데만 사용될 수 있다. 이 경우, HPV 백신의 방어 범위를 확장할 필요가 있다면, 유일한 방법은 백신에 더 많은 HPV 타입의 VLP를 첨가하는 것이다. 현재 이용 가능한 HPV 백신은 Merck's Gardasil® (HPV 16, 18, 6 및 11에 대한 4가 백신), GSK's Cervarix® (HPV 16, 18에 대한 2가 백신), 및 Merck's Gardasil® 9 (9가 백신)을 포함하며, 이들은 모두 다양한 타입의 HPV의 VLP를 섞어서 만든 것이다. 그러나, 이러한 접근은 HPV 백신의 생산에 있어 상당한 비용 증가를 초래할 것이며, 면역접종 투여량(immunization doses)의 증가로 인한 잠재적인 안전 문제를 일으킬 수도 있다.

[0005] 따라서, 본 기술분야에는 다양한 HPV 타입에 의한 감염 및 자궁경부암과 음부사마귀와 같은 질병을 더욱 경제적이고 효과적으로 방지하기 위해, 다양한 타입의 HPV에 대해 방어적 중화항체를 유도할 수 있는 HPV 바이러스-유사 입자의 개발 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 인간 유두종 바이러스(Human Papillomavirus, HPV) 타입 16의 L1 단백질의 특정 분절(segment)을 두 번째 타입 HPV(예컨대 HPV35)의 L1 단백질의 상응하는 분절로 대체한 후, 획득한 돌연변이된 HPV16 L1 단백질이 HPV16 VLP 및 두 번째 타입 HPV의 VLP의 혼합물의 방어 효과와 필적하는 방어 효과를 보이며, 체내에서 HPV16 및 두 번째 타입 HPV(예컨대 HPV35)에 대한 높은 역가(titer)의 중화항체(neutralizing antibodies)의 발생을 유도할 수 있다는, 발명자들의 예상치 못한 발견에 바탕을 두고 있다; 나아가, HPV16에 대한 방어 효과는 HPV 16 VLP 단독의 방어 효과에 필적하며, 두 번째 타입의 HPV(예를 들어, HPV 35)에 대한 방어 효과는 두 번째 타입의 HPV 단독의 VLP에 대한 방어 효과에 필적한다.

[0007] 추가로, 위와 같은 치환을 바탕으로, HPV16 L1 단백질의 다른 특정 분절을 세 번째 타입의 HPV (예를 들어, HPV31)의 L1 단백질의 상응하는 분절로 더 대체할 수 있고, 이중 치환을 가진 획득한 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 HPV16 VLP와 두 번째 타입 및 세 번째 타입 HPV의 VLP의 혼합물의 방어 효과와 필적하는 방어 효과를 보이며, 체내에서 HPV16, 두 번째 타입 HPV(예컨대 HPV35), 및 세 번째 타입 HPV(예컨대 HPV31)에 대한 높은 역가의 중화항체의 생산을 유도할 수 있다; 나아가, HPV16에 대한 방어 효과는 HPV 16 VLP 단독의 방어 효과에 필적하며, 두 번째 타입의 HPV(예를 들어, HPV 35)에 대한 방어 효과는 두 번째 타입의 HPV 단독의 VLP에 대한 방어 효과에 필적하고, 세 번째 타입의 HPV에 대한 방어 효과는 세 번째 타입의 HPV 단독의 VLP에 대한 방어 효과에 필적한다.

[0008] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종(variant)을 제공하고, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 야생형(wild-type) HPV16 L1 단백질과 비교하여 다음의 돌연변이(mutations)를 가지고 있다:

[0009] (1) 4개, 6개, 8개, 10개, 20개, 30개 또는 40개 아미노산과 같이, 4-50개 아미노산의 N-말단 절단(N-terminal truncation); 및

[0010] (2) 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 두 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환;

[0011] 선택적으로, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 다음의 돌연변이를 더 가진다:

[0012] (3) 야생형 HPV16 L1 단백질의 76-87번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 세 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환;

[0013] (4) 야생형 HPV16 L1 단백질의 152-167번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 세 번째 타입의 L1 단백질의 해

당 위치의 아미노산 잔기로의 치환; 또는

- [0014] (5) 야생형 HPV16 L1 단백질의 202-207번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV의 세 번째 타입의 L1 단백질의 해당 위치의 아미노산 잔기로의 치환;
- [0015] 그리고, 상기 변종은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질과는 하나 또는 여러 개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 9개)의 아미노산의 치환(substitution) (바람직하게는 보존적(conservative) 치환), 첨가(addition) 또는 결실(deletion)의 차이만을 가지고 있고, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질의 기능, 즉, 적어도 두 가지 타입의 HPV (예를 들어, HPV16 및 HPV35, 또는 HPV16, HPV35 및 HPV31)에 대해 중화항체(neutralizing antibodies)를 유도하는 기능을 유지하고 있다.
- [0016] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 상기 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여 30 또는 40개 아미노산의 N-말단 절단을 가진다.
- [0017] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 상기 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여 30개 아미노산의 N-말단 절단을 가진다.
- [0018] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 야생형 HPV의 두 번째 타입은 HPV35이다. 특정 바람직한 구현예에서, (2)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기이다.
- [0019] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 야생형 HPV의 세 번째 타입은 HPV31이다. 특정 바람직한 구현예에서, (3)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 야생형 HPV31 L1 단백질의 50-62번 위치의 아미노산 잔기이다. 특정 바람직한 구현예에서, (4)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 야생형 HPV31 L1 단백질의 127-142번 위치의 아미노산 잔기이다. 특정 바람직한 구현예에서, (5)에서 서술한 상기 해당 위치의 아미노산 잔기는 야생형 HPV31 L1 단백질의 177-182번 위치의 아미노산 잔기이다.
- [0020] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV16 L1 단백질은 SEQ ID NO: 1에 명시된 아미노산 서열을 가진다.
- [0021] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV35 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 2에 명시된 아미노산 서열을 가진다.
- [0022] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV31 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 3에 명시된 아미노산 서열을 가진다.
- [0023] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기의 서열은 SEQ ID 번호: 25에 명시되어 있다.
- [0024] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV31 L1 단백질의 50-62번 위치의 아미노산 잔기의 서열은 SEQ ID 번호: 26에 명시되어 있다.
- [0025] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV31 L1 단백질의 127-142번 위치의 아미노산 잔기의 서열은 SEQ ID 번호: 27에 명시되어 있다.
- [0026] 특정 바람직한 구현예에서, 야생형 HPV31 L1 단백질의 177-182번 위치의 아미노산 잔기의 서열은 SEQ ID 번호: 28에 명시되어 있다.
- [0027] 특정 바람직한 구현예에서, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 SEQ ID 번호: 7, 9, 10, 11로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 가진다.
- [0028] 또다른 측면에서, 본 발명은 상술한 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 분리된 핵산을 포함하는 벡터(vector)를 제공한다. 특정 바람직한 구현예에서, 본 발명의 상기 분리된 핵산은 SEQ ID 번호: 19, 21, 22, 23으로 구성된 군에서 선택된 뉴클레오티드(nucleotide) 서열을 가진다.
- [0029] 관심있는 폴리뉴클레오티드(polynucleotide)의 삽입에 유용한 벡터는 본 기술분야에 잘 알려져 있고, 클로닝 벡터(cloning vectors) 및 발현 벡터(expression vectors)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 한 구현예에서, 예를 들면, 상기 벡터는 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid), 파지(phage), 및 이와 유사한 것들이다.
- [0030] 또다른 측면에서, 본 발명은 또한 상술한 것과 같은 분리된 핵산 또는 벡터를 가지고 있는 숙주 세포(host cell)과 관련된다. 그와 같은 숙주 세포는 대장균(*E. coli*) 세포와 같은 원핵 세포, 및 효모 세포(yeast cells), 곤충 세포, 식물 세포, 및 동물 세포(예를 들어, 쥐 세포, 인간 세포 등과 같은 포유류 세포)와 같은 진핵 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 숙주 세포는 또한 293T 세포와 같은 세포주일 수 있

다.

- [0031] 또다른 측면에서, 본 발명은 HPV 바이러스-유사 입자(HPV virus-like particle)와 관련되고, 상기 바이러스-유사 입자는 본 발명의 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 포함하거나, 본 발명의 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종으로 구성되거나, 또는 본 발명의 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종에 의해 형성된다.
- [0032] 특정 바람직한 구현예에서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 돌연변이된 HPV16 L1 단백질을 포함하고, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여, 4개, 6개, 8개, 10개, 20개, 30개 또는 40개 아미노산 같이, 4-50개 아미노산의 N-말단 절단(N-terminal truncation)을 가지고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로의 치환을 가진다.
- [0033] 특정 바람직한 구현예에서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 돌연변이된 HPV16 L1 단백질을 포함하고, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여, 4개, 6개, 8개, 10개, 20개, 30개 또는 40개 아미노산 같이, 4-50개 아미노산의 N-말단 절단을 가지고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로의 치환, 및 야생형 HPV16 L1 단백질의 76-87번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV31 L1 단백질의 50-62번 위치의 아미노산 잔기로의 치환을 가진다.
- [0034] 특정 바람직한 구현예에서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 돌연변이된 HPV16 L1 단백질을 포함하고, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여, 4개, 6개, 8개, 10개, 20개, 30개 또는 40개 아미노산 같이, 4-50개 아미노산의 N-말단 절단을 가지고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로의 치환, 및 야생형 HPV16 L1 단백질의 152-167번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV31 L1 단백질의 127-142번 위치의 아미노산 잔기로의 치환을 가진다.
- [0035] 특정 바람직한 구현예에서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 돌연변이된 HPV16 L1 단백질을 포함하고, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질은 야생형 HPV16 L1 단백질과 비교하여, 4, 6, 8, 10, 20, 30 또는 40개 아미노산 같이, 4-50개 아미노산의 N-말단 절단을 가지고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로의 치환, 및 야생형 HPV16 L1 단백질의 202-207번 위치의 아미노산 잔기의 야생형 HPV31 L1 단백질의 177-182번 위치의 아미노산 잔기로의 치환을 가진다.
- [0036] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 SEQ ID 번호: 7, 9, 10 또는 11에 명시된 서열을 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질을 포함한다.
- [0037] 또다른 측면에서, 본 발명은 또한 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종, 또는 분리된 핵산 또는 벡터 또는 숙주 세포 또는 HPV 바이러스-유사 입자를 포함하는 조성물과 관련된다. 특정 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 본 발명의 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자를 포함한다.
- [0038] 또다른 측면에서, 본 발명은 또한 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자를 포함하고, 선택적으로 약제학적으로 허용되는 담체(carrier) 및/또는 부형제를 더 포함하는 약제학적 조성물 또는 백신과 관련된다. 본 발명의 상기 약제학적 조성물 또는 백신은 HPV 감염 또는 자궁경부암 및 음부사마귀와 같이 HPV 감염으로 유발되는 질병을 예방하는데 사용될 수 있다.
- [0039] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 HPV 바이러스-유사 입자는 HPV 감염 또는 HPV 감염에 의해 유발되는 질병을 예방하는데 효과적인 양으로 존재한다. 특정 바람직한 구현예에서, 상기 HPV 감염은 하나 이상의 HPV 타입 (예를 들어, HPV 16 감염, HPV 35 감염, 및/또는 HPV 31 감염)에 의한 감염이다. 특정 바람직한 구현예에서, 상기 HPV 감염에 의해 유발되는 질병은 자궁경부암 및 음부사마귀로 구성된 군에서 선택된다.
- [0040] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 백신은 본 기술분야에서 잘 알려진 방법으로 투여될 수 있고, 경구 투여 또는 주사(injection)에 의한 투여를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, 특히 바람직한 투여 방법은 주사로 투여하는 것이다.
- [0041] 특정 바람직한 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물 또는 백신은 단위 용량(unit dosage)의 형태로 투여된다. 예를 들면, 본 발명을 한정하려는 의도는 아니지만, 각 단위 용량에 함유된 HPV 바이러스-유사 입자의 양은 5 µg 내지 80 µg, 바람직하게는 20 µg 내지 40 µg이다.

- [0042] 또다른 측면에서, 본 발명은 상술한 것과 같은 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 제조하는 방법과 관련되고, 상기 방법은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및 이어서 상기 숙주 세포의 배양체(culture)로부터 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0043] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 숙주 세포는 대장균(*E. coli*)이다.
- [0044] 특정 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 대장균에서 발현시키는 단계, 및 상기 대장균의 용해물 상층액(lysate supernatant)을 정제하여 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종을 수득하는 단계를 포함한다. 특정 바람직한 구현예에서, 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종은 크로마토그래피(chromatography) (예를 들어, 양이온 교환(cation exchange) 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피, 및/또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction) 크로마토그래피)를 이용해 상기 대장균의 용해물 상층액으로부터 회수한다.
- [0045] 또다른 측면에서, 본 발명은 백신을 제조하는 방법으로서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자를 약제학적으로 허용되는 담체(carrier) 및/또는 부형제와 결합시키는 것을 포함하는 것인 방법과 관련된다.
- [0046] 또다른 측면에서, 본 발명은 HPV 감염 또는 HPV 감염에 의해 유발되는 질병을 예방하는 방법과 관련되고, 상기 방법은 예방적으로(prophylactically) 유효한 용량(effective amount)의 상기 HPV 바이러스-유사 입자 또는 상기 약제학적 조성물 또는 백신을 본 발명에 따라 피험자에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 HPV 감염은 하나 이상의 HPV 타입 (예를 들어, HPV 16 감염, HPV 35 감염, 및/또는 HPV 31 감염)에 의한 감염이다. 또다른 바람직한 구현예에서, HPV 감염으로 유발되는 상기 질병은 자궁경부암 및 음부사마귀를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 또다른 바람직한 구현예에서, 상기 피험자는 인간과 같은 포유류이다.
- [0047] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 돌연변이된 HPV16 L1 단백질 또는 이의 변종 또는 상기 HPV 바이러스-유사 입자의, 본 발명에 따라 HPV 감염 또는 HPV 감염으로 유발되는 질병을 예방하기 위한 약제학적 조성물 또는 백신의 제조에 있어서의 용도와 관련된다. 바람직한 구현예에서, 상기 HPV 감염은 하나 이상의 HPV 타입 (예를 들어, HPV 16 감염, HPV 35 감염, 및/또는 HPV 31 감염)에 의한 감염이다. 또다른 바람직한 구현예에서, HPV 감염으로 유발되는 상기 질병은 자궁경부암 및 음부사마귀를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 본 발명에 있어서의 관련 용어의 기술 및 설명
- [0049] 본 발명에 있어서, 여기에서 사용된 과학 및 기술 용어는, 달리 명시되지 않는 한, 본 기술분야의 통상의 기술자들에게 일반적으로 이해되는 의미를 가진다. 나아가, 여기에서 사용된 세포 배양, 분자유전학(molecular genetics), 핵산화학(nucleic acid chemistry), 및 면역학적 실험 과정은 모두 해당 분야에서 널리 사용되는 일반적인 단계이다. 또한, 본 발명의 더 나은 이해를 위해, 관련 용어의 정의 및 설명을 아래에 제공한다.
- [0050] 본 발명에 따르면, "야생형 HPV의 두 번째 타입(a second type of wild-type HPV)"라는 용어는 HPV16과는 다른, 야생형 HPV의 또다른 타입을 의미한다. 본 발명에 있어서, 야생형 HPV의 두 번째 타입은, 바람직하게는 야생형 HPV35이다. 본 발명에 따르면, "야생형 HPV의 세 번째 타입(a third-type of wild-type HPV)"이라는 용어는 HPV 16 및 야생형 HPV의 두 번째 타입과는 다른, 야생형 HPV의 또다른 타입을 지칭한다. 본 발명에 있어서, 야생형 HPV의 세 번째 타입은, 바람직하게는 야생형 HPV31이다.
- [0051] 본 발명에 따르면, "해당 위치(corresponding position)"라는 표현은 서열들이 최적으로 정렬되었을 때 (optimally aligned), 즉, 서열들이 가장 높은 일치율(percentage of identity)을 갖도록 정렬되었을 때, 비교되는 서열들 내의 동일한 위치를 지칭한다.
- [0052] 본 발명에 따르면, "야생형(wild-type) HPV16 L1 단백질"이라는 용어는 인간 유두종 바이러스 타입 16(human papillomavirus type 16, HPV16)에 자연적으로 존재하는 주요 캡시드 단백질(major capsid protein) L1을 지칭한다. 야생형 HPV16 L1 단백질의 서열은 본 기술분야에 잘 알려져 있고 다양한 공공 데이터베이스에서 찾을 수 있다 (예를 들어, NCBI 데이터베이스 등록 번호 ANA05496.1, ANA05539.1, AGC65525.1, AAV91659.1 및 AAD33259.1).
- [0053] 본 발명에 있어서, 야생형 HPV16 L1 단백질의 아미노산 서열을 언급할 때에는, SEQ ID 번호: 1에 나타난 서열을 참고하여 기술하는 것이다. 예를 들어, "야생형 HPV16 L1 단백질의 292 내지 316번 위치의 아미노산 잔기"라는 표현은 SEQ ID 번호: 1에 명시된 폴리펩티드의 292 내지 316번 위치의 아미노산 잔기를 지칭한다. 그러나, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 야생형 HPV16이 다수의 고립체(isolate)를 포함할 수 있고, 상기 다양한 고립체

들은 L1 단백질의 아미노산 서열에서 차이가 있을 수 있다는 것을 이해할 것이다. 나아가, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 서열에 차이가 있을지라도, 서로 다른 HPV 16 고립체의 L1 단백질은 매우 높은 아미노산 서열 일치도(sequence identity)를 가지고(96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상과 같이, 대개 95% 이상), 대체로 동일한 생물학적 기능을 가진다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명에 있어서, "야생형 HPV16 L1 단백질"이라는 용어는 SEQ ID 번호: 1에 나타난 단백질뿐만 아니라, 다양한 HPV16 고립체의 L1 단백질을 포함한다 (예를 들면, ANA05496.1, ANA05539.1, AGC65525.1, AAV91659.1 및 AAD33259.1에서 나타난 것과 같은 HPV16 L1 단백질들). 또한, 야생형 HPV16 L1 단백질의 한 서열 절편(sequence fragment)을 기술할 때, SEQ ID 번호: 1의 서열 절편뿐만 아니라, 다양한 HPV16 고립체의 L1 단백질의 해당 서열 절편을 포함한다. 예를 들면, "야생형 HPV16 L1 단백질의 292 내지 316번 위치의 아미노산 잔기"라는 표현은 SEQ ID 번호: 1의 292 내지 316번 위치의 아미노산 잔기, 및 다양한 HPV16 고립체의 L1 단백질의 해당 분절을 포함한다.

[0054] 본 발명에 따르면, "야생형 HPV35 L1 단백질(wild-type HPV35 L1 protein)"이라는 용어는 인간 유두종 바이러스 타입 35(human papillomavirus type 35, HPV35)에 자연적으로 존재하는 주요 캡시드 단백질 L1을 지칭한다. 야생형 HPV35 L1 단백질의 서열은 본 기술분야에 잘 알려져 있고 다양한 공공 데이터베이스에서 찾을 수 있다 (예를 들어, NCBI 데이터베이스 등록 번호 P27232.2, ACV84022.1, AEI61365.1, AEI61429.1, 및 ACV84029.1).

[0055] 본 발명에 있어서, 야생형 HPV35 L1 단백질의 아미노산 서열을 언급할 때에는, SEQ ID 번호: 2에 나타난 서열을 참고하여 기술하는 것이다. 예를 들어, "야생형 HPV35 L1 단백질의 266 내지 288번 위치의 아미노산 잔기"라는 표현은 SEQ ID 번호: 2에 명시된 폴리펩티드의 266 내지 288번 위치의 아미노산 잔기를 지칭한다. 그러나, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 야생형 HPV35가 다수의 고립체를 포함할 수 있고, 상기 다양한 고립체들은 L1 단백질의 아미노산 서열에서 차이가 있을 수 있다는 것을 이해할 것이다. 나아가, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 서열에 차이가 있을지라도, 서로 다른 HPV 35 고립체의 L1 단백질은 매우 높은 아미노산 서열 일치도를 가지고(96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상과 같이, 대개 95% 이상), 대체로 동일한 생물학적 기능을 가진다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명에 있어서, "야생형 HPV35 L1 단백질"이라는 용어는 SEQ ID 번호: 2에 나타난 단백질뿐만 아니라, 다양한 HPV35 고립체의 L1 단백질을 포함한다 (예를 들면, P27232.2, ACV84022.1, AEI61365.1, AEI61429.1 및 ACV84029.1에서 나타난 것과 같은 HPV35 L1 단백질들). 또한, 야생형 HPV35 L1 단백질의 한 서열 절편을 기술할 때, SEQ ID 번호: 2의 서열 절편뿐만 아니라, 다양한 HPV35 고립체의 L1 단백질의 해당 서열 절편을 포함한다. 예를 들면, "야생형 HPV35 L1 단백질의 266 내지 288번 위치의 아미노산 잔기"라는 표현은 SEQ ID 번호: 2의 266 내지 288번 위치의 아미노산 잔기, 및 다양한 HPV35 고립체의 L1 단백질의 해당 분절을 포함한다.

[0056] 본 발명에 따르면, "야생형 HPV31 L1 단백질(wild-type HPV31 L1 protein)"이라는 용어는 인간 유두종 바이러스 타입 31(human papillomavirus type 31, HPV31)에 자연적으로 존재하는 주요 캡시드 단백질 L1을 지칭한다. 야생형 HPV31 L1 단백질의 서열은 본 기술분야에 잘 알려져 있고 다양한 공공 데이터베이스에서 찾을 수 있다 (예를 들어, NCBI 데이터베이스 등록 번호 P17388.1, AEI60965.1, ANB49655.1, 및 AEI61021.1).

[0057] 본 발명에 있어서, 야생형 HPV31 L1 단백질의 아미노산 서열을 언급할 때에는, SEQ ID 번호: 3에 나타난 서열을 참고하여 기술하는 것이다. 예를 들어, "야생형 HPV31 L1 단백질의 177 내지 182번 위치의 아미노산 잔기"라는 표현은 SEQ ID 번호: 3에 명시된 폴리펩티드의 177 내지 182번 위치의 아미노산 잔기를 지칭한다. 그러나, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 야생형 HPV31이 다수의 고립체를 포함할 수 있고, 상기 다양한 고립체들은 L1 단백질의 아미노산 서열에서 차이가 있을 수 있다는 것을 이해할 것이다. 나아가, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 서열에 차이가 있을지라도, 서로 다른 HPV 31 고립체의 L1 단백질은 매우 높은 아미노산 서열 일치도를 가지고(96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상과 같이, 대개 95% 이상), 대체로 동일한 생물학적 기능을 가진다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명에 있어서, "야생형 HPV31 L1 단백질"이라는 용어는 SEQ ID 번호: 3에 나타난 단백질뿐만 아니라, 다양한 HPV31 고립체의 L1 단백질을 포함한다 (예를 들면, P17388.1, AEI60965.1, ANB49655.1 및 AEI61021.1에서 나타난 것과 같은 HPV31 L1 단백질들). 또한, 야생형 HPV31 L1 단백질의 한 서열 절편을 기술할 때, SEQ ID 번호: 3의 서열 분절뿐만 아니라, 다양한 HPV31 고립체의 L1 단백질의 해당 서열 절편을 포함한다. 예를 들면, "야생형 HPV31 L1 단백질의 177 내지 182번 위치의 아미노산 잔기"라는 표현은 SEQ ID 번호: 3의 177 내지 182번 위치의 아미노산 잔기, 및 다양한 HPV31 고립체의 L1 단백질의 해당 분절을 포함한다.

[0058] 본 발명에 따르면, "해당 서열 절편(corresponding sequence fragment)" 또는 "해당 절편(corresponding fragment)"이라는 표현은 서열들이 최적으로 정렬되었을 때, 즉, 서열들이 가장 높은 일치율을 갖도록 정렬되었

을 때, 비교되는 서열 내의 상응 위치(equivalent position)에 있는 절편을 지칭한다.

[0059] 본 발명에 따르면, "X 아미노산의 N-말단 절단(N-terminal truncation)"이라는 표현은 어느 단백질의 N-말단의 1 내지 X번 위치의 아미노산 잔기들이, 시작 코돈(initiation codon) (단백질 번역 개시를 위한 것)에 의해 암호화되는 메티오닌(methionine) 잔기로 치환된 것을 지칭한다. 예를 들어, 30개 아미노산의 N-말단 절단을 가진 HPV16 L1 단백질은 야생형 HPV16 L1 단백질의 N-말단의 1 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 시작 코돈에 의해 암호화되는 메티오닌 잔기로 치환하여 얻은 단백질을 지칭한다.

[0060] 본 발명에 따르면, "변종(variant)"이라는 용어는 하나 또는 여러 개의(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개) 아미노산의 치환(substitution) (바람직하게는 보존적(conservative) 치환), 첨가(addition) 또는 결실(deletion)이 일어난 아미노산 서열을 가지거나, 또는 본 발명에 따르면 돌연변이된 HPV16 L1 단백질과 비교할 때 최소 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 일치도를 가지고 (예를 들어, SEQ ID 번호: 7, 9, 10 및 11에 명시된 단백질), 돌연변이된 HPV16L1 단백질의 기능을 유지하는 단백질을 지칭한다. 본 발명에 있어서, "돌연변이된 HPV16 L1 단백질의 기능"이라는 용어는 체내에서 적어도 두 가지 HPV 타입 (예를 들어, HPV16 및 HPV35, 또는 HPV16, HPV35 및 HPV31)에 대해 중화항체(neutralizing antibodies)의 발생을 유도할 수 있는 능력을 지칭한다. "일치도(identity)"라는 용어는 핵산 서열 또는 아미노산 서열간 유사성의 정도를 나타낸다. 일반적으로, 서열들은 최대한 일치하도록 정렬된다. "일치도" 그 자체는 본 기술분야에 잘 알려진 의미를 가지고 있으며, BLAST와 같이 공개된 알고리즘을 이용하여 측정할 수 있다.

[0061] 본 발명에 따르면, "일치도(identity)"라는 용어는 두 폴리펩티드 또는 두 핵산 사이의 일치 정도(match degree)를 지칭한다. 비교를 위한 두 서열이 특정 자리(site)에서 동일한 염기 또는 아미노산의 단량체 서브유닛(monomer sub-unit)을 가지고 있다면 (예를 들어, 두 DNA 분자가 특정 자리에서 아데닌(adenine)을 가지고 있거나, 두 폴리펩티드가 특정 위치에서 리신(lysine)을 가지고 있는 경우), 그 두 분자는 그 자리에서 일치하는 것이다. 두 서열 사이의 일치율은 비교를 위한 총 자릿수에 대하여 두 서열이 공유하는, 일치하는 자릿수의 합수 x 100이다. 예를 들어, 두 서열의 10개 자리 중 6개가 일치한다면, 이 두 서열은 60%의 일치도를 갖는 것이다. 예를 들어, DNA 서열: CTGACT 및 CAGGTT는 50%의 일치도를 공유한다 (6개 자리 중 3개가 일치). 일반적으로, 두 서열의 비교는 최대의 일치도를 산출하는 방식으로 수행된다. 그와 같은 정렬은, 예를 들면 Needleman 등의 방식 (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970)에 바탕을 둔 Align 프로그램 (DNASTAR 주식회사)과 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다. 두 아미노산 서열 사이의 일치율은 또한, 12의 갭 길이 패널티 (gap length penalty) 및 4의 갭 패널티를 주고, PAM120 중량 잔기 표(weight residue table)를 사용하여, ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 도입되어 있는 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))을 이용해 결정할 수 있다. 추가로, 두 아미노산 서열 사이의 일치율은, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량(gap weight) 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량(length weight)을 주고, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 이용 가능함)의 GAP 프로그램에 도입되어 있는 Needleman 및 Wunsch의 알고리즘(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))을 이용해 결정할 수 있다.

[0062] 여기서 사용된 바와 같이, "보존적 치환(conservative substitution)"은 그 아미노산 서열을 가진 단백질/폴리펩티드의 본질적인 특성에 유해하게 영향을 미치지거나 바꾸지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 위치지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis) 및 PCR-매개 돌연변이 유발(PCR-mediated mutagenesis)과 같은, 본 기술분야에 알려진 일반적인 기술에 의해 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 한 아미노산 잔기가 유사한 곁사슬(side chain)을 가진 또다른 아미노산 잔기, 예를 들면, 해당 아미노산 잔기와 물리적으로 또는 기능적으로 유사한(예컨대, 유사한 크기, 모양, 전하, 공유 결합 또는 수소 결합을 형성하는 능력을 포함한 화학적 성질을 가지는 것 등) 잔기로 치환되는 것을 포함한다. 유사한 곁사슬을 가진 아미노산 잔기의 족들(families)이 본 기술분야에서 밝혀져 왔다. 이 족들은 염기성 곁사슬을 가진 아미노산들(예를 들어, 리신, 아르지닌, 히스티딘), 산성 곁사슬을 가진 아미노산들(예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산), 비전하 극성(uncharged polar) 곁사슬을 가진 아미노산들(예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 무극성 곁사슬을 가진 아미노산들(예를 들어, 알라닌, 발린, 루신, 아이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지(β -branched) 곁사슬을 가진 아미노산들(예를 들어, 트레오닌, 발린, 아이소루신) 및 방향족 곁사슬을 가진 아미노산들(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 따라서, 일반적으로 보존적 치환은 하나의 상응하는 아미노산 잔기의 동일한 곁사슬족의 다른 아미노산 잔기로의 치환을 지칭한다. 아미노산 보존적 치환을 확인하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다 (보자면, 예를 들어, Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein

Eng. 12(10): 879-884 (1999); 및 Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)과 같이, 참조에 의해 여기에 통합된 것들).

- [0063] 본 발명에 따르면, "대장균 발현 시스템(*E. coli* expression system)"이라는 용어는 대장균(균주) 및 벡터(vector)로 구성된 발현 시스템을 지칭하며, 여기서 대장균(균주)은 ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3), 및 BLR (DE3)을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 상업적으로 이용가능한 균주에서 유래한다.
- [0064] 본 발명에 따르면, "벡터(vector)"라는 용어는 핵산 운반체 수단으로서, 그 안에 폴리뉴클레오티드(polynucleotide)가 삽입될 수 있는 것을 지칭한다. 벡터가 안에 삽입된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 단백질의 발현을 허용할 때, 그 벡터를 발현 벡터(expression vector)라고 한다. 상기 벡터는 숙주 세포로의 형질 전환(transformation), 형질도입(transduction), 또는 형질주입(transfection)을 통해, 운반된 유전적 물질 요소가 숙주 세포 내에서 발현되도록 할 수 있다. 벡터는 플라스미드(plasmids), 파지(phages), 코스미드(cosmids), 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 것들이다.
- [0065] 본 발명에 따르면, "약제학적으로 허용되는 담체(carrier) 및/또는 부형제"라는 용어는, 약제학적으로 및/또는 생리학적으로 소재(subject) 및 활성 성분과 호환가능한 담체 및/또는 부형제로서, pH 조절제, 계면활성제, 애주번트(adjuvants), 및 이온강도 강화제(ionic strength enhancers)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 본 기술분야에 잘 알려진 것 (보자면, 예를 들어, 1995년, 펜실베이니아: 맥 출판사(Mack Publishing Company)에서, Gennaro AR가 편집한, 19판, Remington's Pharmaceutical Sciences)을 지칭한다. 예를 들어, pH 조절제는 인산 완충액(phosphate buffers)을 포함하지만, 이에 한정되지 않고; 계면활성제는 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제, 또는 Tween-80 같은 비이온성 계면활성제를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며; 애주번트는 알루미늄 애주번트(예를 들어, 수산화 알루미늄), 및 프로인드 애주번트(Freund's adjuvant) (예를 들어, 완전 프로인드 애주번트(Freund's complete adjuvant))를 포함하지만, 이에 한정되지 않고; 이온강도 강화제는 NaCl을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 본 발명에 따르면, "유효 용량(effective amount)"이라는 용어는 의도한 목적을 효과적으로 달성할 수 있는 용량을 지칭한다. 예를 들어, (HPV 감염과 같은) 질병을 예방하기 위한 유효 용량은 (HPV 감염과 같은) 질병 발생의 예방, 억제, 또는 연기를 위한 유효 용량을 지칭한다. 그와 같은 유효 용량의 결정은 본 기술분야의 기술자의 능력 범위 내에 있다.
- [0067] 본 발명에 따르면, "크로마토그래피(chromatography)"라는 용어는 이온 교환 크로마토그래피(양이온-교환 크로마토그래피 같은 것), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피(하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피 같은 것), 젤 여과 크로마토그래피(젤 배제 크로마토그래피), 및 친화성 크로마토그래피를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0068] 본 발명에 따르면, "용해물 상층액(lysate supernatant)"이라는 용어는 다음의 단계에 따라 생산되는 용액을 지칭한다: 숙주 세포(대장균 같은 것)을 용해 버퍼(lysis buffer) 내에서 파괴하고(disrupted), 상기 파괴된 숙주 세포를 포함한 용해 용액으로부터 불용성 물질을 제거한다. 다양한 용해 버퍼가 본 기술분야에 잘 알려져 있는데, 이는 Tris 버퍼, 인산완충액, HEPES 버퍼, MOPS 버퍼 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 추가로, 숙주 세포의 파괴는 호모지나이저(homogenizer) 파괴, 초음파 처리, 분쇄(grinding), 고압 압출, 라이소자임(lysozyme) 처리 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법에 의해 완수할 수 있다. 불용성 물질을 제거하기 위한 방법은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 이는 여과(filtration) 및 원심분리(centrifugation)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0069] 본 발명의 유익한 효과
- [0070] 연구들은 HPV16 및 다른 타입의 HPV(HPV35 및 HPV31 같은 것) 사이에 특정 교차방어(cross-protection)가 존재하지만, 그러한 교차방어는 효과가 낮아, 대개 그 자체 타입의 VLP의 방어 수준의 100분의 1, 심지어 1000분의 1보다 낮음을 보여주었다. 따라서, HPV16 백신으로 예방접종된 피험자는 여전히 다른 타입의 HPV(HPV35 및 HPV31 같은 것)으로 감염될 위험이 높다.
- [0071] 본 발명은 돌연변이된 HPV16 L1 단백질(mutated HPV16 L1 protein) 및 그에 의해 형성된 HPV 바이러스-유사 입자(HPV virus-like particle)를 제공한다. 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 HPV 16 및 다른 타입의 HPV(예를 들어, HPV35 및 HPV31)간의 높은 교차방어를 제공할 수 있다. 특히, 동일한 면역 용량(immunizing dose)에서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 체내에서 적어도 두 가지 타입의 HPV에 대해(예를 들어, HPV 16 및 HPV 35, 또는 HPV 16, HPV 35 및 HPV 31) 높은 역가(titer)의 중화항체(neutralizing antibodies)의 발

생을 유도할 수 있고, 그것의 효과는 다양한 타입의 HPV의 VLP 혼합물(예를 들어, HPV16 VLP 및 HPV35 VLP 혼합물, 또는 HPV16 VLP, HPV35 VLP, 및 HPV31 VLP의 혼합물)에 필적한다. 따라서, 본 발명의 HPV 바이러스-유사 입자는 적어도 두 가지 타입의 HPV(예를 들어, HPV16 및 HPV35, 또는 HPV16, HPV35, 및 HPV31)에 의한 감염 및 그와 관련된 질병을 동시에 예방하는데 사용할 수 있고, 상당한 유익한 기술적 효과를 가진다. 이것은 HPV 백신의 방어 범위를 확장하고 HPV 백신의 생산 비용을 낮추는 데 있어 특히 상당한 이점을 가진다.

[0072] 본 발명의 구현에는 함께 제시된 도면 및 구현예를 참조하여 아래에 상세히 설명될 것이다. 그러나, 본 기술분야의 통상의 기술자들은 다음의 도면 및 실시예는 단지 본 발명의 예시이며, 본 발명의 범위를 한정하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 도면 및 바람직한 구현예에 관한 다음의 상세한 설명에 따르면, 본 발명의 다양한 목적과 유익한 측면이 본 기술분야의 통상의 기술자들에게 명백해 질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 실시 예 1의 정제된 변이 단백질의 SDS 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(SDS polyacrylamide gel electrophoresis) 결과를 나타낸다. M열: 단백질 분자량 마커(marker); 1열: HPV16N30 (30개 아미노산의 N-말단 절단이 일어난 HPV16 L1 단백질); 2열: H16N30-35T1; 3열: H16N30-35T2; 4열: H16N30-35T3; 5열: H16N30-35T4; 6열: H16N30-35T5; 7열: HPV16N30; 8열: H16N30-35T4-31S1; 9열: H16N30-35T4-31S2; 10열: H16N30-35T4-31S3; 11열: H16N30-35T4-31S5. 결과는 크로마토그래피로 정제한 후, 단백질 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5가 95% 이상의 순도를 가지고 있음을 보여주었다.

도 2는 실시예 1에서 준비한 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3 및 H16N30-35T4-31S5을 광범위 항체(broad-spectrum antibody) 4B3을 사용해 웨스턴 블롯 검출한 결과를 나타낸다. M열: 단백질 분자량 마커; 1열: HPV16N30; 2열: H16N30-35T1; 3열: H16N30-35T2; 4열: H16N30-35T3; 5열: H16N30-35T4; 6열: H16N30-35T5; 7열: HPV16N30; 8열: H16N30-35T4-31S1; 9열: H16N30-35T4-31S2; 10열: H16N30-35T4-31S3; 11열: H16N30-35T4-31S5. 결과는 돌연변이된 단백질 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5가 광범위 항체 4B3에 의해 특이적으로 인식될 수 있음을 보여주었다.

도 3a 내지 3i는 단백질 HPV16N30, HPV35 L1, HPV31 L1, H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3 및 H16N30-35T4-31S5를 포함한 샘플들의 분자체 크로마토그래피 분석(molecular sieve chromatography analysis) 결과를 나타낸다. 도 3a: HPV16N30; 도 3b: HPV35 L1; 도 3c: HPV31 L1; 도 3d: H16N30-35T1; 도 3e: H16N30-35T2; 도 3f: H16N30-35T3; 도 3g: H16N30-35T4; 도 3h: H16N30-35T5; 도 3i: H16N30-35T4-31S1; 도 3j: H16N30-35T4-31S2; 도 3k: H16N30-35T4-31S3; 도 3l: H16N30-35T4-31S5. 결과는 각 샘플의 첫 번째 단백질 피크(peak)가 12분 근처에서 나타나, HPV16N30 단백질로부터 조립된 VLP (HPV16N30 VLP), HPV35 L1 단백질로부터 조립된 VLP (HPV35 VLP), 및 HPV31 L1 단백질로부터 조립된 VLP (HPV31 VLP)의 결과와 비슷함을 보여주었다. 이것은 상기 돌연변이된 단백질 모두가 VLP 내로 조립될 수 있음을 나타낸다.

도 4a 내지 4i는 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP, HPV31 VLP, H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP, H16N30-35T4-31S5 VLP의 침강속도 분석(sedimentation rate analysis) 결과를 나타낸다. 도 4a, HPV16N30 VLP; 도 4b, HPV35 VLP; 도 4c, HPV31 VLP; 도 4d, H16N30-35T1 VLP; 도 4e, H16N30-35T2 VLP; 도 4f, H16N30-35T3 VLP; 도 4g, H16N30-35T4 VLP; 도 4h, H16N30-35T5 VLP; 도 4i, H16N30-35T4-31S1 VLP; 도 4j, H16N30-35T4-31S2 VLP; 도 4k, H16N30-35T4-31S3 VLP; 도 4l, H16N30-35T4-31S5 VLP. 결과는 상기 H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP, H16N30-35T4-31S5 VLP의 침강계수(sedimentation coefficients)가 상기 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP, 및 HPV31 VLP의 침강계수와 유사함을 보여주었다. 이것은 상기 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5가 크기 및 형태학적 관점에서 야생형 VLP와 유사한 바이러스-유사 입자(virus-like particles)로 조립됨을 나타낸다.

도 5a 내지 5i는 다양한 VLP 샘플의 투과 전자현미경(transmission electron microscopy) 관측 결과를 나타낸다 (100,000배 확대, 기준자=1µm). 도 5a, HPV16N30로 조립된 VLP; 도 5b, HPV35 L1로 조립된 VLP; 도 5c,

HPV31 L1로 조립된 VLP; 도 5d, H16N30-35T1로 조립된 VLP; 도 5e, H16N30-35T2로 조립된 VLP; 도 5f, H16N30-35T3로 조립된 VLP; 도 5g, H16N30-35T4로 조립된 VLP; 도 5h, H16N30-35T5로 조립된 VLP; 도 5i, H16N30-35T4-31S1로 조립된 VLP; 도 5j, H16N30-35T4-31S2로 조립된 VLP; 도 5k, H16N30-35T4-31S3로 조립된 VLP; 도 5l, H16N30-35T4-31S5로 조립된 VLP. 결과는 상기 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3 및 H16N30-35T4-31S5가 HPV16N30, HPV35 L1 및 HPV31 L1 단백질과 유사하고, 반경이 약 30nm인 VLP로 조립될 수 있음을 보여주었다.

도 6a 내지 6l은 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP, HPV31 VLP, H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP, H16N30-35T4-31S5 VLP의 열안정성 평가(thermal stability evaluation) 결과를 나타낸다. 도 6a, HPV16N30 VLP; 도 6b, HPV35 VLP; 도 6c, HPV31 VLP; 도 6d, H16N30-35T1 VLP; 도 6e, H16N30-35T2 VLP; 도 6f, H16N30-35T3 VLP; 도 6g, H16N30-35T4 VLP; 도 6h, H16N30-35T5 VLP; 도 6i, H16N30-35T4-31S1 VLP; 도 6j, H16N30-35T4-31S2 VLP; 도 6k, H16N30-35T4-31S3 VLP; 도 6l, H16N30-35T4-31S5 VLP. 결과는 각 단백질로 형성된 VLP가 극히 높은 열안정성을 가지고 있음을 나타낸다.

도 7a는 실험군인 H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, 및 대조군인 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 쥐에서의 면역방어(immunoprotection) 평가 결과를 나타낸다. 결과는 상기 H16N30-35T4 VLP가 쥐에서 HPV16 및 HPV35에 대해 높은 역가(titer)의 중화항체(neutralizing antibodies)를 유도하고; 그것의 HPV16에 대한 방어 효과는 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35의 방어 효과에 필적하며, HPV35 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 게다가, 그것의 HPV35에 대한 방어 효과가 HPV35 VLP 단독, 혼합된 HPV16/HPV35의 방어 효과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높았다. 이것은 H16N30-35T4 VLP가 HPV 16 감염 및 HPV35 감염에 대한 효과적인 백신으로 사용될 수 있고, HPV16 VLP 및 HPV35 VLP를 포함하는 혼합 백신을 대신하여 사용될 수 있음을 나타낸다.

도 7b는 실험군인 H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP 및 H16N30-35T4-31S5 VLP, 및 대조군인 HPV16N30 VLP, HPV31 VLP, HPV35 VLP 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 쥐에서의 면역반응 평가 결과를 나타낸다. 결과는 상기 H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP 및 H16N30-35T4-31S3 VLP가 쥐에서 HPV16, HPV35 및 HPV31에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하고; 그들의 HPV16에 대한 방어 효과가 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 방어 효과에 필적하며, HPV35 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높고; HPV35에 대한 방어 효과가 HPV35 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 방어 효과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높고; HPV31에 대한 방어 효과가 HPV31 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 방어 효과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독 및 HPV35 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 상기 H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP 및 H16N30-35T4-31S3 VLP가 HPV16 감염, HPV35 감염 및 HPV31 감염에 대한 효과적인 백신으로 사용될 수 있고, HPV16 VLP, HPV35 VLP 및 HPV31 VLP를 포함하는 혼합 백신을 대신하여 사용될 수 있음을 나타낸다.

도 8a 내지 8c는 쥐에게 H16N30-35T4 VLP로 면역접종(immunization)한 후의 쥐 혈청 내의 중화항체 역가(neutralizing antibody titers)의 평가 결과를 나타낸다. 도 8a: 10 µg 투여군(알루미늄 애드루번트를 이용한 면역접종 투여량이 10 µg); 도 8b: 1 µg 투여군(알루미늄 애드루번트를 이용한 면역접종 투여량이 1 µg); 도 8c: 0.1 µg 투여군(알루미늄 애드루번트를 이용한 면역접종 투여량이 0.1 µg). 결과는 상기 H16N30-35T4 VLP가 쥐에서 HPV16에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하고, 그것의 방어 효과는 동일한 투여량에서의 상기 HPV16N30 VLP 단독 및 상기 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 방어 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 상기 HPV35 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었고; 또한 그것이 쥐에서 HPV35에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하고, 그것의 방어 효과는 동일한 투여량에서의 상기 HPV35 VLP 단독 및 상기 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 방어 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 상기 H16N30-35T4 VLP가 HPV16 및 HPV35에 대해 훌륭한 교차면역원성(cross-immunogenicity) 및 교차방어(cross-protection)를 가진다는 것을 나타낸다.

도 8d 내지 8f는 쥐에게 H16N30-35T4-31S3 VLP로 면역접종한 후의 쥐 혈청 내의 중화항체 역가의 평가 결과를 나타낸다. 도 8d: 10 µg 투여군(알루미늄 애드루번트를 이용한 면역접종 투여량이 10 µg); 도 8e: 1 µg 투여군(알루미늄 애드루번트를 이용한 면역접종 투여량이 1 µg); 도 8f: 0.1 µg 투여군(알루미늄 애드루번트를 이용한 면역접종 투여량이 0.1 µg). 결과는 상기 H16N30-35T4-31S3 VLP가 쥐에서 HPV16에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도

하고, 그것의 방어 효과는 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 방어 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 상기 HPV35 VLP 단독 또는 상기 HPV31 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 또한 그것이 쥐에서 HPV35에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하고, 그것의 방어 효과는 동일한 투여량에서의 상기 HPV35 VLP 단독 및 상기 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 방어 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 상기 HPV16N30 VLP 단독 또는 상기 HPV31 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 또한 그것이 쥐에서 HPV31에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하고, 그것의 방어 효과는 동일한 투여량에서의 상기 HPV31 VLP 단독 및 상기 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 방어 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 상기 HPV16N30 VLP 단독 또는 상기 HPV35 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 상기 H16N30-35T4-S3 VLP가 HPV16, HPV35 및 HPV31에 대해 훌륭한 교차면역원성 및 교차방어를 가진다는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 정보

본 발명과 관련된 서열 중 일부가 아래 표1에 제공된다.

표 1

서열에 관한 설명

SEQ ID 번호:	설명
1	야생형 HPV16 L1 단백질
2	야생형 HPV35 L1 단백질
3	야생형 HPV31 L1 단백질
4	HPV35 L1 단백질의 분절(Segment) 1을 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T1
5	HPV35 L1 단백질의 분절 2를 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T2
6	HPV35 L1 단백질의 분절 3을 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T3
7	HPV35 L1 단백질의 분절 4를 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T4
8	HPV35 L1 단백질의 분절 5를 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T5
9	HPV35 L1 단백질의 분절 4 및 HPV31 L1 단백질의 분절 1을 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T4-31S1
10	HPV35 L1 단백질의 분절 4 및 HPV31 L1 단백질의 분절 2를 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T4-31S2
11	HPV35 L1 단백질의 분절 4 및 HPV31 L1 단백질의 분절 3을 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T4-31S3
12	HPV35 L1 단백질의 분절 4 및 HPV31 L1 단백질의 분절 5를 가진 돌연변이된 HPV16 L1 단백질, H16N30-35T4-31S5
13	SEQ ID 번호:1을 암호화하는 DNA 서열
14	SEQ ID 번호:2를 암호화하는 DNA 서열
15	SEQ ID 번호:3을 암호화하는 DNA 서열
16	SEQ ID 번호:4를 암호화하는 DNA 서열
17	SEQ ID 번호:5를 암호화하는 DNA 서열
18	SEQ ID 번호:6을 암호화하는 DNA 서열
19	SEQ ID 번호:7을 암호화하는 DNA 서열
20	SEQ ID 번호:8을 암호화하는 DNA 서열
21	SEQ ID 번호:9를 암호화하는 DNA 서열
22	SEQ ID 번호:10을 암호화하는 DNA 서열
23	SEQ ID 번호:11을 암호화하는 DNA 서열
24	SEQ ID 번호:12을 암호화하는 DNA 서열
25	야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 서열
26	야생형 HPV31 L1 단백질의 50-62번 위치의 아미노산 서열
27	야생형 HPV31 L1 단백질의 127-142번 위치의 아미노산 서열
28	야생형 HPV31 L1 단백질의 177-182번 위치의 아미노산 서열

서열 1 (SEQ ID 번호:1):

MQVTFIYILVITCYENDVNVYHIFQMSLWLPSEATVYLPVPSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKPPNNKILVPKVSGLQYRVFRIH

LDPDNKFGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGEVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNV
AVNPGDCPPELINTV IQDGMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGDNPDDL YIKGS
GSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNICWGNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKIT
LTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGTLEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGK
RKATPTSSTSTAKRKRKRL

[0079] 서열 2 (SEQ ID 번호:2):

[0080] MSLWRSNEATVYLPPVSVKVVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLAVGHPYYAIKKQDSNKIAVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKGFPDTSFYDPASQRLVWAC
TGVEVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENSNKYVGNSTNRECI SMDYKQTQLCLIGCRPPIGEHWGKGTPCNANQVKGAGECPPELLENTVLQDGMVDTG
FGAMDFTTLQANKSDVPLDICSICKYPDYIKMVSEPYGDMFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGTVGETVPADLYIKGTTGTL PSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFN
KPYWLQRAQGHNNICWSNQLFVTVDTRSTNMSVCSAVSSSDSTYKDNDFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNPSILEDWNFGLTPPP
SGTLEDTYRYVTSQAVTCQKPSAPKPKDDPLKNYTFWEVDLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKARPNFRLGKRAAPASTSKKSSTKRKRVKS

[0081] 서열 3 (SEQ ID 번호:3):

[0082] MSLWRPSEATVYLPPVSVKVVSTDEYVTRTNIYYHAGSARLLTVGHPYYSIPKSDNPKIIVPKVSGLQYRVFRVRLPDPNKGFPDTSFYNPETQRLVWA
CVGLEVGRGQPLGVGISHGPLLNKFDDENSNRYAGGPGTDNRECI SMDYKQTQLCLLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNNAITPGDCPPELKNVSIQDGMVDT
GFGAMDFTALQDTSNVPLDICSICKYPDYIKMVAEYPYDGLFFYLRRQMFVRHFNRSRGTGSEVPTDLYIKGSGSTATLANSTYFPTPSGSMVTSDAQ
IFNKPYWQRAQGHNNICWGNQLFVTVDTRSTNMSVCAAIANSDDTFKSSNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLSADIMTYIHSMNPAILEDWNFGLT
TPPSGLEDTYRFVTSQAITCQKTAPQPKEDPFKDYVFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGYRARPKFKAGKRSAPSASTTTPAKRKRKTKK

[0083] 서열 4 (SEQ ID 번호:4):

[0084] MLPSEATVYLPPVSVKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYYAIKKQDSNKIAVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGV
EVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNVAVNPGDCPPELINTV IQDGMVDTGFGA
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGDNPDDL YIKGSGSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
PYWLQRAQGHNNICWGNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
GTLEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTSSTSTAKRKRKRL

[0085] 서열 5 (SEQ ID 번호:5):

[0086] MLPSEATVYLPPVSVKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGV
EVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENSNKYVGNSTNRECI SMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNVAVNPGDCPPELINTV IQDGMVDTGFGA
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGDNPDDL YIKGSGSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
PYWLQRAQGHNNICWGNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
GTLEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTSSTSTAKRKRKRL

[0087] 서열 6 (SEQ ID 번호:6):

[0088] MLPSEATVYLPPVSVKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGV
EVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGTPCNANQVKGAGECPPELINTV IQDGMVDTGFGA
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGDNPDDL YIKGSGSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
PYWLQRAQGHNNICWGNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
GTLEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTSSTSTAKRKRKRL

[0089] 서열 7 (SEQ ID 번호:7):

[0090] MLPSEATVYLPPVSVKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGV
EVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNVAVNPGDCPPELINTV IQDGMVDTGFGA
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGTVGETVPADLYIKGTTGTL PSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFNKPY
WLQRAQGHNNICWSNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGT
LEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTSSTSTAKRKRKRL

[0091] 서열 8 (SEQ ID 번호:8):

[0092] MLPSEATVYLPPVSVKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKKPNNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVGV
EVGRGQPLGVGISHGPLLNKLLDDENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNVAVNPGDCPPELINTV IQDGMVDTGFGA
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAGDNPDDL YIKGSGSTANLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIFNK

PYWLQRAQGHNNGICWSNQLFVTVDTRSTNMSLCAAVSSDSTYKDNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
GTLEDYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTTSSTSTAKRKRKRL

[0093] 서열 9 (SEQ ID 번호:9):

[0094] MLPSEATVYLPPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLAVGHPYYSIPKSDNPKKIVVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVG
VEVGRGQPLGVGISGHPLLNKLDDEENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTNVAVNPDCPPELINTVIQDGMVDTGFG
AMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRLFNAGTVGETVPADLYIKGTTGLPSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
YWLQRAQGHNNGICWSNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
TLEDYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTTSSTSTAKRKRKRL

[0095] 서열 10 (SEQ ID 번호:10):

[0096] MLPSEATVYLPPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLAVGHPYFPIKKNPNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVG
EVGRGQPLGVGISGHPLLNKFDDEENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTNVAVNPDCPPELINTVIQDGMVDTGFG
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRLFNAGTVGETVPADLYIKGTTGLPSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
PYWLQRAQGHNNGICWSNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
TLEDYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTTSSTSTAKRKRKRL

[0097] 서열 11 (SEQ ID 번호:11):

[0098] MLPSEATVYLPPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLAVGHPYFPIKKNPNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVG
EVGRGQPLGVGISGHPLLNKLDDEENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTNVAVNPDCPPELINTVIQDGMVDTGFG
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRLFNAGTVGETVPADLYIKGTTGLPSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
PYWLQRAQGHNNGICWSNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI STSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
TLEDYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTTSSTSTAKRKRKRL

[0099] 서열 12 (SEQ ID 번호:12):

[0100] MLPSEATVYLPPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLAVGHPYFPIKKNPNNKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKGFPDTSFYNPDTQRLVWACVG
EVGRGQPLGVGISGHPLLNKLDDEENASAYAANAGVDNRECI SMDYKQTLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTNVAVNPDCPPELINTVIQDGMVDTGFG
MDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRLFNAGTVGETVPADLYIKGTTGLPSTSYFPTPSGSMVTSDAQIFNK
PYWLQRAQGHNNGICWSNQLFVTVDTRSTNMSLCAAI ANSDTTFKSSNFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADIMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPG
TLEDYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLEAKPKFTLGKRKATPTTSSTSTAKRKRKRL

[0101] 서열 13 (SEQ ID 번호:13):

[0102] ATGCAGGTGACTTTTATTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAACGTTTACCATATTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTTCCTAGTGAG
GCCACTGTCTACTTGCCCTCTGCCAGTATCTAAGGTTGAAGCACGGATGAATATGTTGACGCACAACATATATTATCATGCAGGAACATCCAGACTA
CTTGACAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAATAAAACCTAACAATAACAAAATATTAGTTCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACAT
TTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGTCGTGGT
CAGCCATTAGGTGTTGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATTTGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAATGCAGGTGTGGATAATAGA
GAATGTATATCTATGATTACAACAAACACAATTTGTTAATTTGTTGCAAAACCCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCATGTACCAATGTT
GCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTAAATAAACACAGTATTCCAGGATGGTATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGACTTTACTACA
TTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAAATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGGCACAGCTTA
TTTTTTTATCTACGAAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTGTTGGTGATAATGTACCAGACGATTTATACATTAAGGCTCT
GGGTCTACTGCAAAATTTAGCCAGTTCAAATTTTTCTACACCTAGTGGTCTATGGTTACCTCTGATGCCAAATATTCAATAAACCTTACTGGTTACAA
CGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAAATATGTCATTATGTGCTGCCATA
TCTACTTCAGAACTACATATAAAAAATACTAACTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCAAAAATAACC
TTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGAT
ACTTATAGGTTTGTAAACATCCAGGCAATGCTTGTCAAAAACATACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAAT
TTAAAGGAAAAGTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCTTTAGGACGCAAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACCAAAATTTACATTAGGAAAA
CGAAAAGCTACACCACCACCTCATCTACCTCTACAACGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0103] 서열 14 (SEQ ID 번호:14):

[0104] ATGAGCCTGTGGAGGAGCAACGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTAGCGGTGAGCAAGGTGGTGGAGCACCACGAGTACGTGACCAGGACCAACATCTAC
TACCACGCCGCAGCAGCAGGCTGTGGCCGTGGGCCACCCCTACTACGCCATCAAGAAGCAGGACGCAACAAGATGCCCGTCCCAAGGTGAGCGGCCCTG

CAGTACAGGGTGTTCAGGGTGAAGCTGCCCGACCCCAACAAGTTTCGGCTTCCCGACACCAGCTTCTACGACCCCGCCAGCCAGAGGTGGTGTGGGCCTGC
 ACCGGCGTGGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCTGGGCGTGGGCATCAGCGGCCACCCCTGTGAACAAGCTGGACGACACCGAGAACAGCAACAAGTACGTG
 GGCAACAGCGGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGATCGGCTGCAGGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGC
 AAGGGCACCCCTGCAACGCCAACAGGTGAAGGCCGGAGTGCACCCCTGGAGCTGTGAACACCGTGTGCAGGACGGCGACATGGTGGACACCGGC
 TTCGGCGCATGACTTACCACCTGCAGGCCAACAGAGCGAGTGCACCCCTGGACATCTGCAGCAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTGAAGATGGTG
 AGCGAGCCCTACGGCGACATGTGTTCTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTCGTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCACCGTGGGCGAGACCGTGCCC
 GCCGACTGTACATCAAGGGCACACCGGCACCTGCCAGCACCAGTACTTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAAC
 AAGCCCTACTGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGTGGAGCAACCAGCTGTTCTGTGACCGTGGTGACACCAGGAGCACAACATG
 AGCGTGTGCAGCGCGTGTGAGCAGCAGCAGCAGCACCCTACAAGAACGACAACCTCAAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGAGTACGACCTGCAGTTCATCTTC
 CAGCTGTGAAGATCACCTGACCGCGAGCTGATGACCTACATCCACAGCATGAACCCAGCATCTGGAGGACTGGAATTCGGCCTGACCCCCCCCC
 AGCGGCACCTGGAGGACACTACAGGTACGTGACCAGCCAGGCCGTGACCTGCCAGAAGCCAGCGCCCAAGCCCAAGGACGACCCCTGAAGAACTAC
 ACCTTCTGGGAGGTGGACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCAGCTGGACCAGTTCCTGGGCGAGGAAGTTCCTGCTGACGGCCGGCTGAAGGCCAGGCC
 AACTTCAGGTGGCAAGAGGGCCGCCCGCCAGCACCAGCAAGAAGAGCAGCACCAGAGGAGGAAGGTGAAGAGCTGA

[0105] 서열 15 (SEQ ID 번호:15):

[0106] ATGAGCCTGTGGAGGCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCGTGTGAGCAAGGTGGTGAGCACCGACGAGTACGTGACCAGGACCAACATCTAC
 TACCACGCCGGCAGCGCCAGGCTGTGACCGTGGGCCACCCCTACTACAGCATCCCCAAGAGCGACAACCCCAAGAAGATCGTGGTGCCCAAGGTGAGCGGC
 CTGCAGTACAGGGTGTTCAGGGTGTGGCTGCCCGACCCCAACAAGTTCGGCTTCCCGACACCAGCTTCTACAACCCCGAGACCCAGAGGTGGTGTGGGCC
 TGCGTGGGCTGTGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCTGGGCGTGGGCATCAGCGGCCACCCCTGTGAACAAGTTCGACGACACCGAGAACAGCAACAGGTAC
 GCCGGCGGCCCGGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGTGGGCTGCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGG
 GGCAAGGGCAGCCCTGCAGCAACAACGCCATCACCCCGGCGACTGCCCCCCCTGGAGCTGAAGAACAGCGTGATCCAGGACGGCGACATGGTGGACACC
 GGCTTCGGCGCATGGACTTACCAGCTGCAGGACCAAGAGCAACGTGCCCTGGACATCTGCAACAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACCTGAAGATG
 GTGGCCGAGCCCTACGGCGACACCTGTTCTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGTGAGGCACTTCTTCAACAGGAGCGGCACCGTGGGCGAGAGCGTG
 CCCACCGACTGTACATCAAGGGCAGCGGCAGCACCGCCACCTGGCCAACAGCACCTACTTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAG
 ATCTTCAACAAGCCCTACTGGATGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGTGGGGCAACCAGTGTTCGTGACCGTGGTGGACACCAGGAGC
 ACCAATATGAGCGTGTGCGCCGATCGCCAACAGCGACACCCTTCAAGAGCAGCAACTTCAAGGAGTACCTGAGGACGCGGAGGAGTTCGACCTGCAG
 TTCATCTCCAGCTGTGAAGATCACCTGAGCGCGACATCATGACCTACATCCACAGCATGAACCCCGCCATCCTGGAGGACTGGAATTCGGCCTGACC
 ACCCCCCCAGCGGCAGCCTGGAGGACACTACAGGTTCGTGACCAGCCAGGCCATCACCTGCCAGAAGACCGCCCCCAGAAGCCCAAGGAGGACCCCTTC
 AAGGACTACGTGTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCAGCTGGACCAGTTCCTGGGCGAGGAAGTTCCTGCTGACGGCCGGCTACAGG
 GCCAGGCCAAGTTCAGGCCGCAAGAGGAGCGCCCCAGCGCCAGCACCACCACCCCGCAAGAGGAAGAAGACCAAGAAGTAA

[0107] 서열 16 (SEQ ID 번호:16):

[0108] ATGCTCCTAGTGTAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTGTGAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
 GGAACAAGCAGGCTGTGGCCGTGGGCCACCCCTACTACGCCATCAAGAAGCAGGACAGCAACAAGATCGCCGTGCCAAGGTGAGCGCCTGCAGTACAGG
 GTGTTTAGGATACATTTACTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCTGTGTAGGTGTT
 GAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAATTTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGTATTATGACGAAATGCA
 GGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAACAATTTGTGTTAATTTGGTTGCAAAACCCTATAGGGGAACACTGGGGCAAGGATCC
 CCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGT
 ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCTACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACA
 TACGGCGACAGCTTATTTTTTATCTACGAAGGGAACAATGTTTGTGAGACATTTATTAATAGGGCTGGTGTGTTGGTGATAATGTACCAGACGATTTA
 TACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATATTTTCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTAATAAA
 CCTTACTGGTTACAACGACACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGACGATACAAATATGTCA
 TTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTATTTTTTCAA
 CTGTGCAAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATATTCTATGAATTCCTACTTTTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGA
 GGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTGTAAACATCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACT
 TTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAATTTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAA
 TTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTA

[0109] 서열 17 (SEQ ID 번호:17):

[0110] ATGCTCCTAGTGTAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTGTGAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
 GGAACATCCAGACTACTTGCAGTGGACATCCCTATTTCTATTAATAAACCTAACAAATAACAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG

GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCCTGTGTAGGCGTG
GAGGTGGGCAGGGCCAGCCCCTGGGCGTGGGCATCAGCGGCCACCCCCTGCTGAACAAGCTGGACGACACCGAGAACAGCAACAAGTACGTGGGCAACAGC
GGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGATCGGCTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCC
CCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
TACGGCGACAGCTTATTTTTTATCTACGAAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGATAATGTACCAGACGATTTA
TACATTAAGGCTCTGGGCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATATTTTCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATCAATAAA
CCTTACTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGAGTACAAAATATGTCA
TTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGAGGAATATGATTTACAGTTATTTTTCAA
CTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGA
GGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATGTCTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAATACACT
TTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAA
TTTACATTAGGAAAACGAAAAGTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0111] 서열 18 (SEQ ID 번호:18):

[0112] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
GGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG
GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCCTGTGTAGGTTGT
GAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCA
GGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATGGTTGCAAACCCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGAACC
CCATGTAACGCTAATCAAGTAAAGGAGGTGAGTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
TACGGCGACAGCTTATTTTTTATCTACGAAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGATAATGTACCAGACGATTTA
TACATTAAGGCTCTGGGCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATATTTTCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATCAATAAA
CCTTACTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGAGTACAAAATATGTCA
TTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGAGGAATATGATTTACAGTTATTTTTCAA
CTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGA
GGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATGTCTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAATACACT
TTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAA
TTTACATTAGGAAAACGAAAAGTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0113] 서열 19 (SEQ ID 번호:19):

[0114] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
GGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG
GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCCTGTGTAGGTTGT
GAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCA
GGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATGGTTGCAAACCCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCC
CCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
TATGGCGACAGCTTATTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTGCTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCACCGTGGGCGAGACCGTCCCCCGGACCTG
TACATCAAGGGCACCACCGGCACCCCTGCCAGCACCAGCTACTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTAC
TGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGCTGGAGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGAGTACAAAATATGTCAATATGT
GCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGC
AAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATTCCTACTATTTGGAGGACTGGAATTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACA
CTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATGTCTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAATACACTTTTTGG
GAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAAATTTACA
TTAGGAAAACGAAAAGTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0115] 서열 20 (SEQ ID 번호:20):

[0116] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
GGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG

GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCTGTGTAGGTGTT
GAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAATGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCA
GGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCC
CCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
TACGGCGACAGCTTATTTTTTATCTACGAAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGATAATGTACCAGACGATTTA
TACATTAAGGCTCTGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATATTTTCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATCAATAAA
CCTTACTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGAGCAACCAACTATTTGTACTGTTGTGATACTACACGAGTACAAAATATGTCA
TTATGTGCTGCCGTATCTAGTTCAGACAGTACATATAAAAAATGATAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTATTTTTCAA
CTGTGCAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATTCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGA
GGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCAGGCAATGTCTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCTTAAAAATACACT
TTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAA
TTTACATTAGGAAAACGAAAAGTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0117] 서열 21 (SEQ ID 번호:21):

[0118] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
GGAACATCCAGACTACTTGCAGTGGGCCACCCCTACTACAGCATCCCAAGAGCGACAACCCCAAGAAGATCGTGGTGCCCAAGGTGAGCGGCCTGCAGTAC
AGGGTGTTCAGGATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCTGTGTAGGT
GTTGAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAATGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAAT
GCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGA
TCCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGT
GCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAA
CCATATGGCGACAGCTTATTTCTTCTACTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCACCGTGGGCGAGACCGTGGCCGCGAC
CTGTACATCAAGGGCACCCGGCACCTGCCAGCACCAGCTACTTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCC
TACTGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGTGGAGTAACCAACTATTTGTACTGTTGTGATACTACACGAGTACAAAATATGTCAATTA
TGTGCTGCCATATCTACTTCAGAAAACATATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTG
TGCAAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATTCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGC
ACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCAGGCAATGTCTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCTTAAAAATACACTTTT
TGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAAATTT
ACATTAGGAAAACGAAAAGTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0119] 서열 22 (SEQ ID 번호:22):

[0120] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
GGAACATCCAGACTACTTGCAGTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG
GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCTGTGTAGGTGTT
GAGGTGGGCAGGGCCAGCCCTGGGCGTGGGCATCAGCGGCCACCCCTGTGAACAAGTTCGACGACACCGAGAACAGCAACAGGTACGCCGCGGCCCC
GGCACCGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCTGATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCC
CCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
TATGGCGACAGCTTATTTCTTCTACTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCACCGTGGGCGAGACCGTGGCCGCGACCTG
TACATCAAGGGCACCCGGCACCTGCCAGCACCAGCTACTTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTAC
TGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGTGGAGTAACCAACTATTTGTACTGTTGTGATACTACACGAGTACAAAATATGTCAATTAATGT
GCTGCCATATCTACTTCAGAAAACATATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGC
AAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATTCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACA
CTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCAGGCAATGTCTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCTTAAAAATACACTTTTGG
GAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAAATTTACA
TTAGGAAAACGAAAAGTACACCCACCCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAA

[0121] 서열 23 (SEQ ID 번호:23):

[0122] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
GGAACATCCAGACTACTTGCAGTGGACATCCCTATTTTCTATTAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG

GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCCCTGTGTAGGTGTT
 GAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCA
 GGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATTGGCTGCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGC
 CCTGCAGCAACAACGCCATCCCCCGGCGACTGCCCCCCTGGAGCTGATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
 ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
 TATGGCGACAGCTTATTCTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCACCGTGGGCGAGACCGTGCCCCCGACCTG
 TACATCAAGGGCACCACCGGCACCTGCCAGCACCAGCTACTTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTAC
 TGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGTGGAGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGAGTACAAATATGTCATTATGT
 GCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTAAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGC
 AAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGAGGCACA
 CTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCTTAAAAAATACACTTTTGG
 GAAGTAAATTTAAAGAAAAGTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAATTTACA
 TTAGGAAAACGAAAAGCTACACCACCCTCATCTACCTTACAACCTGCTAAACGCAAAAACGTAAGCTGTAA

[0123] 서열 24 (SEQ ID 번호:24):

[0124] ATGCTTCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCA
 GGAACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCTATTA AAAACCTAACAAATAAATAATAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGG
 GTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTGGGCCCTGTGTAGGTGTT
 GAGGTAGGTCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCA
 GGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATTGGTTGCAAACCCTATAGGGGAACACTGGGGCAAGGATCC
 CCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCT
 ATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCA
 TATGGCGACAGCTTATTCTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGTGAGGCACCTGTTCAACAGGGCCGGCACCGTGGGCGAGACCGTGCCCCCGACCTG
 TACATCAAGGGCACCACCGGCACCTGCCAGCACCAGCTACTTCCCCACCCAGCGGCAGCATGGTGACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTAC
 TGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGTGGAGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGAGTACAAATATGTCATTATGC
 GCCGCCATCGCCAACAGCGACACCACCTTCAAGAGCAGCAACTCAAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGAGTATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGC
 AAAATAACCTTAACTGCAGACATTATGACATACATACATTCTATGAATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGAGGCACA
 CTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCTTAAAAAATACACTTTTGG
 GAAGTAAATTTAAAGAAAAGTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGGAGGCCAAACAAAATTTACA
 TTAGGAAAACGAAAAGCTACACCACCCTCATCTACCTTACAACCTGCTAAACGCAAAAACGTAAGCTGTAA

[0125] 서열 25 (SEQ ID 번호:25):

[0126] TVGETVPADLYIKGTTGLPSTS

[0127] 서열 26 (SEQ ID 번호:26):

[0128] YSIPKSDNPKKIV

[0129] 서열 27 (SEQ ID 번호:27):

[0130] FDDTENSRYAGGPGT

[0131] 서열 28 (SEQ ID 번호:28):

[0132] SNNAIT

[0133] **본 발명을 실시하기 위한 구체적인 예시**

[0134] 본 발명을 설명하기 위한 것이지만, 한정하려는 의도는 아닌 다음의 실시예들을 참조하여 본 발명이 기술되어 있다.

[0135] 달리 명시되지 않으면, 본 발명에서 사용된 분자생물학적 실험 방법 및 면역분석은 주로, 1989년에 콜드 스프링 하버 연구소 출판사(Cold Spring Harbor Laboratory Press)에서 출판한, J. Sambrook 등의, 분자 클로닝: 실험 설명서(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2판, 및 1995년에 존 와일리 & 선즈 (John Wiley & Sons) 주식회사에서 출판한, F. M. Ausubel 등의, 분자생물학의 짧은 프로토콜(Short Protocols in Molecular Biology), 3판의 실험과정을 참고하여 수행하였다; 제한 핵산내부해효소(restriction endonucleases)는 제조

사가 권장한 조건 하에서 사용하였다. 본 기술분야의 통상의 기술자들은 본 발명이 실시예의 방식으로 기술되었고, 상기 실시예들이 본 발명의 범위를 한정하려는 의도는 아니라는 것을 이해할 것이다.

실시예 1

[0136] 돌연변이된 HPV16 L1 단백질의 발현 및 정제

[0137] 발현 벡터(expression vector)의 제작

[0138] HPV35 L1 단백질로부터 유래한 분절(Segment) 3 또는 분절 5를 포함하는, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질(mutated HPV16 L1 protein)을 암호화하는 발현 벡터는 다중 돌연변이 생성(multi-site mutagenesis)을 위한 PCR로 제작하였으며, 초기 주형(initial template)으로 pTO-T7-HPV16L1N30C 플라스미드(30개 아미노산의 N-말단 절단이 일어난 HPV16 L1 단백질(이 단백질의 명칭은 HPV16N30이다)을 암호화하는 것; 표 2에서 16L1N30으로 요약되어 있음)을 사용했다. 각 PCR 반응에서 사용한 주형 및 프라이머(primers)는 표 2에 나타냈고, PCR 반응의 증폭(amplification) 조건은 다음과 같이 설정하였다: 94°C에서 10분 동안의 변성(denaturing); (94°C에서 50초 동안의 변성, 특정 온도에서 특정 시간 동안의 결합(annealing), 72°C에서 7분 30초 동안의 신장(extending))의 25 사이클(cycles); 마지막으로 72°C에서 7분 동안의 신장. 사용한 PCR 프라이머의 서열은 표 3에 열거하였다.

[0139] 2 µL의 제한 핵산내부분해효소(restriction endonuclease DpnI)를 증폭 산물(50 µL)에 첨가하고, 37°C에서 60분 동안 배양하였다(incubate). 효소분해(enzyme-digested) 산물 10 µL를 염화칼슘 방법(calcium chloride method)으로 제작한, 40 µL의 수용성 대장균(competent *E. coli*) ER2566 (New England Biolabs에서 구매함)의 형질전환(transformation)에 사용하였다. 형질전환된 대장균은 카나마이신(kanamycin)(최종 농도: 25mg/mL, 이하 동일)을 함유한 고체 LB 배지(LB 배지 성분: 펩톤 10g/L, 효모 분말 5g/L, 염화나트륨 10g/L, 이하 동일)에 도말하였고, 단일 콜로니들(colonies)이 선명하게 관측될 때까지 37°C에서 10-12 시간동안 정적 배양(static culture) 하였다. 단일 콜로니들을 골라서 4mL의 액체 LB배지(카나마이신을 함유하는 것)가 들어있는 시험관에 접종하였고, 37°C에서 10시간 동안 220rpm으로 흔들면서 배양하였다. 그 다음, 1mL의 세균용액(bacterial solution)을 취해 -70°C에 보관하였다. 대장균으로부터 플라스미드를 추출하였고, 플라스미드에 삽입된 타겟 절편(target fragments)의 뉴클레오티드 서열은 T7 프라이머를 사용해 분석하였다. 서열분석 결과는 상기 제조된 플라스미드(발현 벡터) 각각에 삽입된 타겟 절편들의 뉴클레오티드 서열이 각각 SEQ ID 번호: 18 및 20이고, 따라서 암호화된 아미노산 서열은 SEQ ID 번호: 6 및 8(해당 단백질의 이름은 각각 H16N30-35T3 및 H16N30-35T5이다)임을 보여주었다.

[0140] 돌연변이된 단백질 H16N30-35T3은 야생형 HPV16 L1 단백질의 199-210번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 173-184번 위치의 아미노산 잔기로 대체되었다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다. 돌연변이된 단백질 H16N30-35T5는 야생형 HPV16 L1 단백질의 374-384번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 346-356번위치의 아미노산 잔기로 대체되었다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다.

[0141] HPV35 L1 단백질로부터 유래한 분절(Segment) 1, 분절 2 또는 분절 4를 포함하고 있는 돌연변이된 HPV16 L1 단백질의 발현 벡터는 깃슨 어셈블리(Gibson assembly) (Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods. 2009; 6:343-5. doi: 10.1038/nmeth. 1318)를 사용하여 제조했다. 간략히 서술하면, 첫 번째로 돌연변이를 가진 짧은 절편 및 돌연변이를 가지지 않은 긴 절편을 PCR 반응으로 수득하고, 깃슨 어셈블리 시스템(Gibson assembly system)을 이용해 두 절편을 고리 모양으로 결합시킨다. 사용한 초기 주형(initial template)은 pTO-T7-HPV16L1N30C 플라스미드 및 pTO-T7-HPV35L1 플라스미드(HPV35 L1 단백질을 암호화하는 것; 표 2에서 35L1으로 요약되어 있음)이다. 상기 각 PCR 반응에서 사용된 주형 및 프라이머를 표 2에 나타냈고, 짧은 절편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 증폭 조건은 다음과 같이 설정하였다: 94°C에서 10분 동안의 변성(denaturing); (94°C에서 50초 동안의 변성, 특정 온도에서 특정 시간 동안의 결합(annealing), 72°C에서 1분 동안의 신장(extending))의 25 사이클(cycles); 마지막으로 72°C에서 10분 동안의 신장. 긴 절편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 증폭 조건은 다음과 같이 설정하였다: 94°C에서 10분 동안의 변성; (94°C에서 50초 동안의 변성, 특정 온도에서 특정 시간 동안의 결합, 72°C에서 7분 30초 동안의 신장)의 25 사이클; 마지막으로 72°C에서 10분 동안의 신장. 사용한 PCR 프라이머의 서열은 표 3에 열거하였다. 증폭 산물로 전기영동을 하였고, 타겟 절편은 DNA 수득 키트(recovery kit)를 이용해 수득하였으며 농도를 확인하였다. 증폭된 짧은 절편 및 긴 절편은 2:1의 분자비(molar ratio)로 혼합한 후(총 부피 3 µL), 3 µL의 2X 깃슨 어셈블리 프리믹스(Gibson Assembly premixes) (2 X Gibson Assembly Master Mix, NEB에서 구매한 것으로, T5 핵산외부분해효소(exonuclease), Phusion DNA 중합효

소(DNA polymerase), Taq DNA 연결효소(DNA ligase)를 포함함)를 첨가하고, 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0142] 염화칼슘 방법으로 제작한 수용성 대장균 ER2566(New England Biolabs에서 구매함) 40 μL를 상기 조립된 산물(6 μL)로 형질전환 하였다. 형질전환된 대장균은 카나마이신을 함유한 고체 LB 배지에 도말하였고, 단일 콜로니들이 선명하게 관측될 때까지 37°C에서 10-12 시간동안 정적 배양하였다. 단일 콜로니들을 골라서 4mL의 액체 LB 배지(카나마이신을 함유하는 것)가 들어있는 시험관에 접종하였고, 37°C에서 10시간 동안 220rpm으로 흔들면서 배양하였다. 그 다음, 1mL의 세균용액을 취해 -70°C에 보관하였다. 대장균으로부터 추출한 플라스미드, 및 상기 플라스미드에 삽입된 타겟 절편의 뉴클레오티드 서열은 T7 프라이머를 사용해 분석하였다. 서열분석 결과는 상기 제조된 플라스미드(발현 벡터) 각각에 삽입된 타겟 절편들이 각각 SEQ ID 번호: 16, 17, 및 19이고, 따라서 암호화된 아미노산 서열은 SEQ ID 번호: 4, 5, 및 7(해당 단백질의 이름은 각각 H16N30-35T1, H16N30-35T2 및 H16N30-35T4이다)임을 보여주었다.

[0143] 돌연변이된 단백질 H16N30-35T1은 야생형 HPV16 L1 단백질의 76-87번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 50-61번 위치의 아미노산 잔기로 대체되었다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다. 돌연변이된 단백질 H16N30-35T2는 야생형 HPV16 L1 단백질의 158-167번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 132-141번 위치의 아미노산 잔기로 대체되었다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다. 돌연변이된 단백질 H16N30-35T4는 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기가 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로 대체되었다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다.

[0144] HPV35 L1으로부터 유래한 분절 및 HPV31 L1으로부터 유래한 분절을 포함하는 이중 치환을 가진, 돌연변이된 HPV16 L1 단백질을 암호화하는 발현 벡터는 깃슨 어셈블리(Gibson assembly)를 이용해 제작하였다. 간략히 서술하면, 첫 번째로 돌연변이를 가진 짧은 절편 및 돌연변이를 가지지 않은 긴 절편을 PCR 반응으로 수득하고, 깃슨 어셈블리 시스템(Gibson assembly system)을 이용해 두 절편을 고리 모양으로 결합시킨다. 사용한 초기 주형(initial template)은 pTO-T7-H16N30-35T4 플라스미드(돌연변이된 단백질 H16N30-35T4를 암호화하는 것; 표 2에서 H16N30-35T4로 요약되어 있음), 및 pTO-T7-HPV31L1 플라스미드(HPV31 L1 단백질을 암호화하는 것; 표 2에 31L1로 요약되어 있음)를 포함한다. 상기 각 PCR 반응에서 사용된 주형 및 프라이머를 표 2에 나타냈고, 짧은 절편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 증폭 조건은 다음과 같이 설정하였다: 94°C에서 10분 동안의 변성(denaturing); (94°C에서 50초 동안의 변성, 특정 온도에서 특정 시간 동안의 결합(annealing), 72°C에서 1분 동안의 신장(extending))의 25 사이클(cycles); 마지막으로 72°C에서 10분 동안의 신장. 긴 절편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 증폭 조건은 다음과 같이 설정하였다: 94°C에서 10분 동안의 변성; (94°C에서 50초 동안의 변성, 특정 온도에서 특정 시간 동안의 결합, 72°C에서 7분 30초 동안의 신장)의 25 사이클; 마지막으로 72°C에서 10분 동안의 신장. 사용한 PCR 프라이머의 서열은 표 3에 열거하였다. 증폭 산물로 전기영동을 하였고, 타겟 절편은 DNA 수득 키트(recovery kit)를 이용해 수득하였으며 농도를 확인하였다. 증폭된 짧은 절편 및 긴 절편은 2:1의 분자비(molar ratio)로 혼합한 후(총 용량 3 μL), 3 μL의 2X 깃슨 어셈블리 프리믹스(Gibson Assembly premixes) (2 X Gibson Assembly Master Mix, NEB에서 구매한 것으로, T5 핵산외부분해효소(exonuclease), Phusion DNA 중합효소(DNA polymerase), Taq DNA 연결효소(DNA ligase)를 포함함)를 첨가하고, 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0145] 염화칼슘 방법으로 제작한 수용성 대장균 ER2566(New England Biolabs에서 구매함) 40 μL를 조립된 산물(6 μL)로 형질전환 하였다. 형질전환된 대장균은 카나마이신을 함유한 고체 LB 배지에 도말하였고, 단일 콜로니들이 선명하게 관측될 때까지 37°C에서 10-12 시간동안 정적 배양하였다. 단일 콜로니들을 골라서 4mL의 (카나마이신을 함유하는) 액체 LB배지가 들어있는 시험관에 접종하였고, 37°C에서 10시간 동안 220rpm으로 흔들면서 배양하였다. 그 다음, 1mL의 세균용액을 취해 -70°C에 보관하였다. 대장균으로부터 플라스미드를 추출하였고, 플라스미드에 삽입된 타겟 절편(target fragments)의 뉴클레오티드 서열은 T7 프라이머를 사용해 분석하였다. 서열분석 결과는 상기 제조된 플라스미드(발현 벡터) 각각에 삽입된 소기의 절편들의 뉴클레오티드 서열이 각각 SEQ ID 번호: 21, 22, 23, 및 24이고, 따라서 암호화된 아미노산 서열은 SEQ ID 번호: 9, 10, 11, 12(해당 단백질의 이름은 H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, 및 H16N30-35T4-31S5이다)임을 보여주었다.

[0146] 돌연변이된 단백질 H16N30-35T4-31S1은 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 76-87번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV31 L1 단백질의 50-62번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다. 돌연변이된 단백질 H16N30-35T4-31S2는 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있고, 야생형 HPV16 L1

단백질의 152-167번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV31 L1 단백질의 127-142번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있다는 점에서 HPV16N30과 차이가 있다. 돌연변이된 단백질 H16N30-35T4-31S3는 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 202-207번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV31 L1 단백질의 177-182번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있다는 점에서 차이가 있다. 돌연변이된 단백질 H16N30-35T4-31S5는 야생형 HPV16 L1 단백질의 292-316번 위치의 아미노산 잔기가 HPV35 L1 단백질의 266-288번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있고, 야생형 HPV16 L1 단백질의 375-384번 위치의 아미노산 잔기가 야생형 HPV31 L1 단백질의 350-359번 위치의 아미노산 잔기로 대체되어 있다는 점에서 차이가 있다.

표 2

[0147]

발현 벡터를 제작하는 데 사용된 PCR 반응의 주형(templates) 및 프라이머(primers)

주형	업스트림(Upstream) 프라이머	다운스트림(Downstream) 프라이머	산물
16L1N30	G-V-H16N30-35T1-F	G-V-H16N30-35T1-R	H16N30-35T1 긴 절편 (long fragment)
35L1	G-H16N30-35T1-F	G-H16N30-35T1-R	H16N30-35T1 짧은 절편 (short fragment)
16L1N30	G-V-H16N30-35T2-F	G-V-H16N30-35T2-R	H16N30-35T2 긴 절편
35L1	G-H16N30-35T2-F	G-H16N30-35T2-R	H16N30-35T2 짧은 절편
16L1N30	H16N30-35T3-F	H16N30-35T3-R	H16N30-35T3
16L1N30	G-V-H16N30-35T4-F	G-V-H16N30-35T4-R	H16N30-35T4 긴 절편
35L1	G-H16N30-35T4-F	G-H16N30-35T4-R	H16N30-35T4 짧은 절편
16L1N30	H16N30-35T5-F	H16N30-35T5-R	H16N30-35T5
H16N30-35T4	G-V-H16N30-35T4-31S1-F	G-V-H16N30-35T4-31S1-R	H16N30-35T4-31S1 긴 절편
31L1	G-H16N30-35T4-31S1-F	G-H16N30-35T4-31S1-R	H16N30-35T4-31S1 짧은 절편
H16N30-35T4	G-V-H16N30-35T4-31S2-F	G-V-H16N30-35T4-31S2-R	H16N30-35T4-31S2 긴 절편
31L1	G-H16N30-35T4-31S2-F	G-H16N30-35T4-31S2-R	H16N30-35T4-31S2 짧은 절편
H16N30-35T4	G-V-H16N30-35T4-31S3-F	G-V-H16N30-35T4-31S3-R	H16N30-35T4-31S3 긴 절편
31L1	G-H16N30-35T4-31S3-F	G-H16N30-35T4-31S3-R	H16N30-35T4-31S3 짧은 절편
H16N30-35T4	G-V-H16N30-35T4-31S5-F	G-V-H16N30-35T4-31S5-R	H16N30-35T4-31S5 긴 절편
31L1	G-H16N30-35T4-31S5-F	G-H16N30-35T4-31S5-R	H16N30-35T4-31S5 짧은 절편

표 3

[0148]

사용한 프라이머의 서열 (SEQ ID 번호: 29 내지 60)

SEQ ID 번호:	프라이머 이름	프라이머 서열 (5'-3')
29	G-V-H16N30-35T1-F	ATACATTTACCTGACCCCAATAAG
30	G-V-H16N30-35T1-R	TGTTCTCTGCATGATAATATATGTTTG
31	G-H16N30-35T1-F	AACATATATTATCATGCAGGAACAAGCAGGCTGCTGGCCGTGGGC
32	G-H16N30-35T1-R	CTTATTGGGGTCAGGTAATGTATCCTGAACACCCTGTACTGCAGGC
33	G-V-H16N30-35T2-F	AAACCACCTATAGGGGAACACTG
34	G-V-H16N30-35T2-R	TACACAGGCCCAAACCAGCCGC
35	G-H16N30-35T2-F	GCGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAGGCGTGGAGGTGGGCAGGGGCC
36	G-H16N30-35T2-R	CAGTGTTCCTCATAGGTGGTTTGCAGCCGATCAGGCACAGCTGGG
37	H16N30-35T3-F	GGCAAAGGAACCCCATGTAACGCTAATCAAGTAAAGGCAGGTGAGTGTCCACCAT
38	H16N30-35T3-R	ATGGTGGACACTCACCTGCCTTACTTGATTAGCGTTACATGGGGTTCCTTTGCC
39	G-V-H16N30-35T4-F	TGGGGTAACCAACTATTGTACTG
40	G-V-H16N30-35T4-R	TAAGCTGTCGCCATATGGTTCTG

41	G-H16N30-35T4-F	CAGAACCATATGGCGACAGCTTATTCTTCTACCTGAGGAGGGAGC
42	G-H16N30-35T4-R	CAGTAACAAATAGTTGGTTACCCACAGCAGATGCCGTTGTGTGG
43	H16N30-35T5-F	ATGTGCTGCCGTATCTAGTTCAGACAGTACATATAAAAATGATAACTTTAAGGAG
44	H16N30-35T5-R	CTCCTTAAAGTTATCATTTTTTATATGTACTGTCTGAACTAGATACGGCAGCACAT
45	G-V-H16N30-35T4-31S1-F	ATACATTTACTGACCCCAATAAGTT
46	G-V-H16N30-35T4-31S1-R	TGCAAGTAGTCTGGATGTTCTCTGC
47	G-H16N30-35T4-31S1-F	CAGGAACATCCAGACTACTTGCAGTGGGCCACCCCTACTACAGCAT
48	G-H16N30-35T4-31S1-R	CTTATTGGGGTTCAGGTAATGTATCCTGAACACCCTGTACTGCAGGC
49	G-V-H16N30-35T4-31S2-F	ATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGG
50	G-V-H16N30-35T4-31S2-R	AACACCTACACAGGCCCAACCAGC
51	G-H16N30-35T4-31S2-F	TGGTTTGGGCTGTGTAGGTGTTGAGGTGGGCAGGGGCCAGCC
52	G-H16N30-35T4-31S2-R	CCTATAGTGGTTTGCAACCAATCAGGCACAGCTGGGTCTGCTTG
53	G-V-H16N30-35T4-31S3-F	ATAAACACAGTTATTCAGGATGG
54	G-V-H16N30-35T4-31S3-R	AATTAACACAATTGTGTTTGTGTTGT
55	G-H16N30-35T4-31S3-F	AACAACACAATTGTGTTAATTGGCTGCAAGCCCCCATCGGCG
56	G-H16N30-35T4-31S3-R	CCATCTGAATAACTGTGTTATCAGTCCAGGGGGGGCAGTCGC
57	G-V-H16N30-35T4-31S5-F	TATGATTTACAGTTATTTTTTC
58	G-V-H16N30-35T4-31S5-R	TAATGACATATTTGTACTGCGTG
59	G-H16N30-35T4-31S5-F	CACGCGTACAATATGTCATTATGCGCCGCATCGCCAACAGCG
60	G-H16N30-35T4-31S5-R	TGAAAAATAAACTGTAAATCATACTCCTCGCCGTGCCTCAGGTA

[0149] 돌연변이된 단백질의 대규모 발현

[0150] 재조합 플라스미드(recombinant plasmid) pTO-T7-H16N30-35T1, pTO-T7-H16N30-35T2, pTO-T7-H16N30-35T3, pTO-T7-H16N30-35T4, pTO-T7-H16N30-35T5, pTO-T7-H16N30-35T4-31S1, pTO-T7-H16N30-35T4-31S2, pTO-T7-H16N30-35T4-31S3, pTO-T7-H16N30-35T4-31S5를 가진 대장균의 세균용액(bacteria liquids)을 -70℃ 냉장고에서 꺼내, 카나마이신(kanamycin)을 함유한 액체 LB 배지 100mL에 각각 접종하였고, 8시간 동안 37℃, 200rpm으로 배양하였다; 그리고 카나마이신을 함유한 LB 배지 500mL에 옮겨 접종하였고(1mL의 세균용액을 접종하였다), 계속 배양하였다. 세균의 농도가 약 0.6의 OD₆₀₀에 도달하면, 배양 온도를 25℃로 낮추었고, 500 μL의 IPTG를 각 배양 플라스크에 첨가하여, 8시간 동안 배양을 지속하였다. 배양 끝에, 세균세포를 원심분리로 모았다. 각각 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5 단백질을 발현하는 세균세포들을 수득하였다.

[0151] 돌연변이된 단백질을 발현하는 세균세포의 파쇄(disruption)

[0152] 수득한 세포는 1g의 세균세포와 10mL의 용해물(lysate) (20mM 트리스 버퍼(Tris buffer), pH 7.2, 300 mM NaCl)의 비율로 재부유(resuspend)시켰다. 세포는 초음파파쇄기(ultrasonicator)로 30분 동안 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 함유한 용해물은 13500rpm(30000g)으로 15분 동안 원심분리하였고, 상층액(즉, 파쇄된 세균세포의 상층액)을 취했다.

[0153] 돌연변이된 단백질의 크로마토그래피 정제(Chromatographic purification)

[0154] 계기장치(Instrument System): GE Healthcare(공식적으로는, Amershan Pharmacia)가 제조한, AKTA 익스플로러 100 제조용 액체 크로마토그래피 시스템(AKTA explorer 100 preparative liquid chromatography system).

[0155] 크로마토그래피 시약: SP 세파로스 4 패스트 플로우(SP Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare), CHT-II (Bio-RAD에서 구매함), 부틸 세파로스 4 패스트 플로우(Butyl Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare)

[0156] 완충 용액: 20mM 인산완충액(phosphate buffers), pH 8.0, 20 mM DTT; 및, 20 mM 인산완충액, pH 8.0, 20 mM DTT, 2 M NaCl.

[0157] 샘플: 각각 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5를 가지고 있는, 파쇄된 세균세포로부터 수득한 상층액

[0158] 용출(Elution) 과정:

[0159] (1) 파쇄된 세균세포의 상층액의 양이온 교환(cation exchange)은 SP 세파로스 4 패스트 플로우(SP Sepharose 4 Fast Flow)를 사용해 수행하였다: 샘플을 칼럼에 로딩하였고, 그리고 나서 불필요한 단백질을 용출하기 위해

400mM NaCl을 포함한 버퍼(buffer)를 사용하였으며, 타겟 단백질을 용출하기 위해 800mM NaCl을 포함한 버퍼를 사용하였고, 800mM NaCl을 포함한 버퍼로 용출한 분획(fraction)을 모았다;

[0160] (2) 이전 단계에서 수득한 상기 용출된 분획의 크로마토그래피 정제(Chromatographic purification)는 CHT II를 사용해 수행하였다(하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피): 이전 단계에서 수득한 상기 용출된 분획을 희석하여 NaCl의 농도를 0.5M로 감소시켰다; 상기 샘플을 칼럼에 로딩하였고, 그리고 나서 불필요한 단백질을 용출하기 위해 500mM NaCl을 포함한 버퍼를 사용하였으며, 타겟 단백질을 용출하기 위해 1000mM NaCl을 포함한 버퍼를 사용하였고, 1000mM NaCl을 포함한 버퍼로 용출한 분획을 모았다;

[0161] (3) 이전 단계에서 수득한 상기 용출된 분획의 크로마토그래피 정제는 HIC를 사용해 수행하였다(소수성 상호작용(hydrophobic interaction) 크로마토그래피): 상기 샘플을 칼럼에 로딩하였고, 그리고 나서 불필요한 단백질을 용출하기 위해 1000mM NaCl을 포함한 버퍼를 사용하였으며, 타겟 단백질을 용출하기 위해 200mM NaCl을 포함한 버퍼를 사용하였고, 200mM NaCl을 포함한 버퍼로 용출한 분획을 모았다;

[0162] 단계 (3)에서 수득한 상기 용출된 분획의 150 µL를 취해, 30 µL의 6X 로딩 버퍼>Loading Buffer)를 첨가하여 섞고, 수조에서 10분 동안 80°C에서 배양하였다. 그리고 나서, 10 µL의 상기 샘플을 10% SDS-폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel)에서 120분 동안 120V로 전기영동하였고; 전기영동 밴드는 쿠마시 블루 염색법(Coomassie blue staining)으로 가시화하였다. 전기영동 결과는 도 1에 나타났다. 결과는 상술한 정제 단계 후, 단백질 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5 모두가 95%보다 높은 순도를 가지고 있음을 보여주었다.

[0163] 유사한 방법으로, 대장균 및 pTO-T7-HPV16L1N30C 플라스미드를 사용해 HPV16N30 단백질을 준비 및 정제하였고; 대장균 및 pTO-T7-HPV35L1 플라스미드를 사용해 HPV35 L1 단백질(SEQ ID 번호: 2)을 준비 및 정제하였으며; 대장균 및 pTO-T7-HPV31L1 플라스미드를 사용해 HPV31 L1 단백질(SEQ ID 번호: 3)을 준비 및 정제하였다.

[0164] 돌연변이된 단백질의 웨스턴 블로팅(Western blotting)

[0165] 정제된 단백질 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5는 상술한 방법대로 전기영동하였다. 전기영동 후, HPV L1 단백질에 대한 광범위 항체(broad-spectrum antibody) 4B3을 이용해 웨스턴 블롯 검출을 수행하였고, 결과는 도 2에 나타났다. 결과는 상기 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5가 광범위 항체 4B3에 의해 특이적으로 인식될 수 있음을 보여주었다.

실시예 2

[0166] HPV 바이러스-유사 입자의 조립(assembly) 및 입자형태(particle morphology) 관측

[0167] HPV 바이러스-유사 입자의 조립

[0168] 일정 용량(약 2mL)의 단백질 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, 또는 H16N30-35T4-31S5를 (1) 2L 보관 버퍼(storage buffer) (20mM 인산나트륨 버퍼, pH 6.5, 0.5M NaCl); (2) 2L 재생 버퍼(renaturation buffer) (50mM 인산나트륨 버퍼, pH 6.0, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 0.5M NaCl); (3) 20mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0, 0.5M NaCl,으로 연속적으로 투석(dialyze)하였다. 투석은 상기 세 가지 버퍼 각각에서 12시간 동안 수행하였다.

[0169] 유사한 방법으로, 상기 단백질 HPV16N30, HPV35 L1 및 HPV31 L1을 각각 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP 및 HPV31 VLP으로 조립하였다.

[0170] 분자체 크로마토그래피 분석(molecular sieve chromatography analysis)

[0171] 투석된 샘플은, 분석용 칼럼(analytical column) TSK Gel PW5000x1 7.8 x 300mm을 사용하여, 미국 소재 Agilent의 1120 콤팩트 LC 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(1120 Compact LC high performance liquid chromatography system)을 이용한 분자체 크로마토그래피로 분석하였다. 상기 분석의 결과는 도 3a내지 3i에 나타났다. 결과는 단백질 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5를 포함한 샘플의 경우, 첫 번째 단백질 피크(peaks)가 12분 근처에서 나타나, 상기 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP 및 HPV31 VLP의 결과와 비슷함을 보여주었다.

이것은 위에서 준비한 상기 단백질들이 VLP로 조립되었음을 나타냈다.

[0172] 침강속도 분석(Sedimentation velocity analysis)

[0173] 침강속도 분석을 위해 사용한 장치는 광학검사(optical inspection) 시스템, 및 An-50Ti 및 An-60Ti 로터(rotor)를 갖춘 벡크만 XL-A 분석용 초원심분리기(Beckman XL-A analytical type ultracentrifuge)이다. 침강속도법(Sedimentation velocity method)을 사용해 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP, HPV31 VLP, H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP, H16N30-35T4-31S5 VLP의 침강계수(sedimentation coefficients)를 분석하였다. 결과는 도 4a 내지 4i에 나타났다. 결과는 상기 H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP, H16N30-35T4-31S5 VLP의 침강계수가 상기 HPV16N30 VLP, HPV35 VLP 및 HPV31 VLP의 침강계수와 유사함을 보여주었다. 이것은 상기 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5가 크기 및 형태학적 관점에서 야생형 VLP와 유사한 바이러스-유사 입자로 조립됨을 나타낸다.

[0174] 바이러스-유사 입자의 형태 관측(morphological detection)

[0175] 투과 전자현미경(transmission electron microscopy) 관측을 위해 VLP를 포함한 샘플 100 μL를 취했다. 사용한 장치는 JEOL에 의해 제조된 100kV 투과 전자현미경이며, 100,000배 확대하였다. 간략히 서술하면, 13.5 μL의 샘플을 취해, pH 7.0에서 2% 텅스토탄산(phosphotungstic acid) 음성염색 하고, 탄소로 코팅된 구리판(carbon-coated copper mesh)에 고정하고나서, 투과 전자현미경으로 관측하였다. 관측 결과는 도 5a 내지 5i에 나타났다. 결과는 상기 H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5가 모두 바이러스-유사 입자로 조립되었다는 것을 보여주었다. 게다가, 결과는 또한 이들 돌연변이된 단백질에 의해 형성된 입자들이 약 30nm의 반경을 가지고 있고, 크기가 일정함을 보여주었다. 이것은 이들 돌연변이된 단백질들이 HPV16, HPV35 및 HPV31의 L1 단백질과 유사하며, 일정한 크기의 VLP를 형성할 수 있음을 나타낸다.

실시예 3

[0176] 바이러스 유사입자의 열안정성(thermal stability) 평가

[0177] H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5로 형성된 VLP의 열안정성은 GE Corporation (공식적으로는, MicroCal Corporation)에서 구매한 시차온도 열량측정계(differential temperature calorimeter) VP Capillary DSC를 이용하여 평가하였으며, 단백질의 보관 버퍼(storage buffer)를 대조군으로 사용하였고, 각 단백질을 10℃ 내지 90℃의 범위 내에서, 1.5℃/분의 가열속도 하에서 검사하였다. 테스트 결과는 도 6a 내지 6i에 나타났다. 결과는 각 단백질로 형성된 VLP가 극히 높은 열안정성을 가지고 있음을 보여주었다.

실시예 4

[0178] 동물에서의 바이러스-유사 입자의 면역방어(immunoprotection) 평가 1

[0179] H16N30-35T1, H16N30-35T2, H16N30-35T3, H16N30-35T4, H16N30-35T5, H16N30-35T4-31S1, H16N30-35T4-31S2, H16N30-35T4-31S3, H16N30-35T4-31S5로 형성된 VLP 면역방어적 특성은 쥐를 사용하여 평가하였다. 면역접종(immunization)을 위해 사용한 동물은 5-6주령의 BalB/c mice이다(일반 등급(ordinary grade)) (상하이 소재의 SLAC 실험동물 유한회사(SLAC Laboratory Animal Co., Ltd.)에서 구매함).

[0180] 위에서 준비한 H16N30-35T1 VLP, H16N30-35T2 VLP, H16N30-35T3 VLP, H16N30-35T4 VLP, H16N30-35T5 VLP, HPV16N30 VLP, HPV35 VLP, 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP(즉, HPV16N30 VLP 및 HPV35 VLP의 혼합물)는 각각 알루미늄 애듀반트에 흡착시켰다. 쥐는 각기 다른 면역원(immunogen)에 따라 8 그룹으로 나누었고, 각 그룹은 5마리의 쥐를 포함했다. 면역접종 과정은 다음과 같다: 최초 면역접종은 0주차에 수행하였다; 그리고 추가 면역접종(booster immunizations)은 2주차 및 4주차에 각각 수행하였다. 면역접종 방법은 복강내 주사(intraperitoneal injection)이며, 사용한 면역원 및 투여량은 표 4에 나타났다. 최초 면역접종 후 8주차가 되었을 때, 안구로부터 정맥혈을 모으고, 혈청을 분리하였으며, 그리고나서 혈청 내 중화항체(neutralizing antibodies)의 역가(titer)를 측정하였다. 테스트 결과는 도 7a에 나타났다. 결과는 상기 H16N30-35T4 VLP가 쥐에서 HPV16 및

HPV35에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하였음을 보여주었다; 그리고 그것의 HPV16에 대한 방어 효과는 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 방어 효과에 필적하며, HPV35 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 그것의 HPV35에 대한 방어 효과는 HPV35 VLP 단독, 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 방어 효과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독의 방어 효과보다 상당히 높았다. 이것은 상기 H16N30-35T4 VLP가 HPV16 감염 및 HPV35 감염에 대한 효과적인 백신으로 사용될 수 있고, HPV16 VLP 및 HPV35 VLP를 포함하는 혼합 백신을 대신하여 사용될 수 있음을 나타낸다.

표 4

면역접종 프로토콜(protocols)

면역접종 항원(Immunization antigen)	에주번트	면역접종 투여량(Immunization dose)	수	면역접종 프로토콜 (주(week))
H16N30-35T1 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T2 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T3 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T4 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T5 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV16N30 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV35 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV16/HPV35 VLP	알루미늄 에주번트	각 VLP당 5 µg	5	0, 2, 4

[0181]

[0182]

추가로, 위에서 준비한 상기 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 (즉, HPV16N30 VLP, HPV35 VLP 및 HPV31 VLP의 혼합물) 뿐만 아니라 H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP, H16N30-35T4-31S3 VLP, H16N30-35T4-31S5 VLP, HPV16N30 VLP, HPV31 VLP, HPV35 VLP를 각각 알루미늄 에주번트에 흡착시켰다. 쥐는 각기 다른 면역원에 따라 8 그룹으로 나누었고, 각 그룹은 5마리의 쥐를 포함했다. 면역접종 과정은 다음과 같다: 최초 면역접종은 0주차에 수행하였다; 그리고 추가 면역접종은 2주차 및 4주차에 각각 수행하였다. 면역접종 방법은 복강내 주사이며, 사용한 면역원 및 투여량은 표 5에 나타났다. 최초 면역접종 후 8주차가 되었을 때, 안구로부터 정맥혈을 모으고, 혈청을 분리하였으며, 그리고 나서 혈청 내 중화항체의 역가를 측정하였다. 테스트 결과는 도 7b에 나타났다. 결과는 상기 H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP 및 H16N30-35T4-31S3 VLP가 쥐에서 HPV16, HPV35 및 HPV31에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하였음을 보여주었다; 그리고 그들의 HPV16에 대한 보호 효과는 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 보호 효과에 필적하며, HPV35 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 그들의 HPV35에 대한 보호 효과는 HPV35 VLP 단독, 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 보호 효과에 필적하고, HPV16N30 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 그들의 HPV31에 대한 보호 효과는 HPV31 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 보호 효과에 필적하고, HPV16N30 VLP 단독 및 HPV35 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 상기 H16N30-35T4-31S1 VLP, H16N30-35T4-31S2 VLP 및 H16N30-35T4-31S3 VLP가 HPV16 감염, HPV35 감염 및 HPV31 감염에 대한 효과적인 백신으로 사용될 수 있고, HPV16 VLP, HPV35 VLP 및 HPV31 VLP를 포함하는 혼합 백신을 대신하여 사용될 수 있음을 나타낸다.

표 5

면역접종 프로토콜(protocols)

면역접종 항원(Immunization antigen)	에주번트	면역접종 투여량(Immunization dose)	수	면역접종 프로토콜 (주(week))
H16N30-35T4-31S1 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T4-31S2 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T4-31S3 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
H16N30-35T4-31S5 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV16N30 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV31 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV35 VLP	알루미늄 에주번트	5 µg	5	0, 2, 4
HPV16/HPV35/HPV31 VLP	알루미늄 에주번트	각 VLP의 5 µg	5	0, 2, 4

[0183]

실시예 5

[0184] **동물에서의 바이러스-유사 입자의 면역방어(immunoprotection) 평가 2**

[0185] **H16N30-35T4 VLP의 ED50**

[0186] 6주령의 암컷 BalB/c 쥐(8마리)를 한 번의 복강내 주사(intraperitoneal injection)로, 알루미늄 애쥬번트로 면역접종하였으며, 실험군은 H16N30-35T4 VLP를 투여하였고(면역접종 투여량은 0.300 µg, 0.100 µg, 0.033 µg, 0.011 µg, 및 0.004 µg이었다), 대조군은 HPV16N30 VLP 단독 및 HPV35 VLP 단독을 투여하거나(면역접종 투여량은 0.300 µg, 0.100 µg, 0.033 µg, 0.011 µg, 0.004 µg이었다), 혼합된 HPV16/HPV35 VLP를 투여하였다(각 VLP의 면역접종 투여량은 0.300 µg, 0.100 µg, 0.033 µg, 0.011 µg, 0.004 µg이었다); 그리고 상기 면역접종 용량(volume)은 1mL이었다. 면역접종 후 5주차가 되었을 때, 안구로부터 정맥혈을 모으고 혈액 내 HPV 항체를 검출하였다. 각 샘플의 혈청전환(seroconversion) (즉, 쥐에서 항체의 발생을 유도하는 것)을 유도하기 위한 ED50을 리드-무네흐 방법(Reed-Muench method)으로 계산하였다(Reed LJ MH. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493-7). 결과는 표 6 내지 9에 나타났다.

표 6

[0187] 쥐에서 항-HPV16 및 항-HPV35 항체의 발생을 유도하기 위한 HPV16N30 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (µg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수 (마리)	혈청전환율	ED50 (µg)
HPV16	0.300	8	8	100.00%	0.019
	0.100	8	8	100.00%	
	0.033	8	5	72.73%	
	0.011	8	3	27.27%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

표 7

[0188] 쥐에서 항-HPV16 및 항-HPV35 항체의 발생을 유도하기 위한 HPV35 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (µg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수 (마리)	혈청전환율	ED50 (µg)
HPV16	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.300	8	5	70.00%	0.196
	0.100	8	2	18.18%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

표 8

[0189]

쥐에서 항-HPV16 및 항-HPV35 항체의 발생을 유도하기 위한 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (μg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수(마리)	혈청전환율	ED50 (μg)
HPV16	0.300	8	7	95.65%	0.023
	0.100	8	8	93.75%	
	0.033	8	6	70.00%	
	0.011	8	1	9.09%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.300	8	8	100.00%	0.042
	0.100	8	8	100.00%	
	0.033	8	3	37.50%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

표 9

[0190]

쥐에서 항-HPV16 및 항-HPV35 항체의 발생을 유도하기 위한 H16N30-35T4 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (μg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수 (마리)	혈청전환율	ED50 (μg)
HPV16	0.300	8	7	92.86%	0.081
	0.100	8	5	60.00%	
	0.033	8	1	8.33%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.300	8	5	100.00%	0.264
	0.100	8	1	100.00%	
	0.033	8	0	22.22%	
	0.011	8	0	6.67%	
	0.004	8	0	0.00%	

[0191]

결과는 쥐에 면역접종을 하고 5주가 지난 후, 쥐에서 항-HPV16 항체의 발생을 유도하기 위한 H16N30-35T4 VLP의 ED₅₀값이 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 결과에 필적하며, HPV35 VLP 단독의 결과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 쥐에서 항-HPV35 항체의 발생을 유도하기 위한 그것의 ED₅₀값이 HPV35 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 결과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독의 결과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 H16N30-35T4 VLP가 HPV16 및 HPV35에 대해 훌륭한 교차면역원성(cross-immunogenicity) 및 교차방어(cross-protection)를 가진다는 것을 나타낸다.

[0192]

H16N30-35T4-31S3 VLP의 ED50

[0193]

6주령의 암컷 BalB/c 쥐(8마리)를 한 번의 복강내 주사(intraperitoneal injection)로, 알루미늄 애쥬번트로 면역접종하였다. 실험군은 H16N30-35T4-31S3 VLP를 투여하였고(면역접종 투여량은 0.300 μg, 0.100 μg, 0.033 μg, 0.011 μg, 0.004 μg이었다); 대조군은 HPV16N30 VLP 단독, HPV35 VLP 단독, HPV31 VLP 단독(면역접종 투여량은 0.300 μg, 0.100 μg, 0.033 μg, 0.011 μg, 0.004 μg이었다), 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP(각 VLP의 면역접종 투여량은 0.300 μg, 0.100 μg, 0.033 μg, 0.011 μg, 0.004 μg이었다)를 투여하였다; 그리고 상기 면역접종 용량은 1mL이었다. 면역접종 후 5주차가 되었을 때, 안구로부터 정맥혈을 모으고 혈액 내 HPV 항체를 검출하였다. 각 샘플의 혈청전환(seroconversion) (즉, 쥐에서 항체의 발생을 유도하는 것)을 유도하기 위한 ED50을 리드-무네흐 방법(Reed-Muench method)으로 계산하였다 (Reed LJ MH. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493-7). 결과는 표 10 내지 14에 나타났다.

표 10

[0194]

쥐에서 항-HPV16, 항-HPV35, 및 항-HPV31 항체의 발생을 유도하기 위한 HPV16N30 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (μg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수(마리)	혈청전환율	ED50 (μg)
HPV16	0.300	8	7	96.67%	0.008
	0.100	8	8	95.65%	
	0.033	8	8	93.33%	
	0.011	8	6	66.67%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV31	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

표 11

[0195]

쥐에서 항-HPV16, 항-HPV35, 및 항-HPV31 항체의 발생을 유도하기 위한 HPV35 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (μg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수(마리)	혈청전환율	ED50 (μg)
HPV16	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.300	8	8	100.00%	0.017
	0.100	8	8	100.00%	
	0.033	8	7	90.00%	
	0.011	8	2	22.22%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV31	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

표 12

[0196]

쥐에서 항-HPV16, 항-HPV35, 및 항-HPV31 항체의 발생을 유도하기 위한 HPV31 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (μg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수 (마리)	혈청전환율	ED50 (μg)
HPV16	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

HPV35	0.300	8	0	0.00%	>0.3
	0.100	8	0	0.00%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV31	0.300	8	8	100.00%	0.014
	0.100	8	8	100.00%	
	0.033	8	7	91.67%	
	0.011	8	3	40.00%	
	0.004	8	1	7.14%	

표 13

[0197] 귀에서 항-HPV16, 항-HPV35, 및 항-HPV31 항체의 발생을 유도하기 위한 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (µg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수 (마리)	혈청전환율	ED ₅₀ (µg)
HPV16	각 VLP당 0.300	8	7	95.24%	0.043
	각 VLP당 0.100	8	5	76.47%	
	각 VLP당 0.033	8	1	42.11%	
	각 VLP당 0.011	8	5	33.33%	
	각 VLP당 0.004	8	2	9.09%	
HPV35	각 VLP당 0.300	8	8	100.00%	0.011
	각 VLP당 0.100	8	8	100.00%	
	각 VLP당 0.033	8	8	100.00%	
	각 VLP당 0.011	8	4	50.00%	
	각 VLP당 0.004	8	0	0.00%	
HPV31	각 VLP당 0.300	8	8	100.00%	0.006
	각 VLP당 0.100	8	8	100.00%	
	각 VLP당 0.033	8	8	100.00%	
	각 VLP당 0.011	8	7	88.89%	
	각 VLP당 0.004	8	1	11.11%	

표 14

[0198] 귀에서 항-HPV16, 항-HPV35, 및 항-HPV31 항체의 발생을 유도하기 위한 H16N30-35T4-31S3 VLP의 ED₅₀ 값

타입	투여량 (µg)	쥐의 수 (마리)	혈청전환 수 (마리)	혈청전환율	ED ₅₀ (µg)
HPV16	0.300	8	8	100.00%	0.017
	0.100	8	7	94.44%	
	0.033	8	7	83.33%	
	0.011	8	3	30.00%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV35	0.900	8	6	86.67%	0.100
	0.300	8	3	50.00%	
	0.033	8	1	22.22%	
	0.011	8	3	13.64%	
	0.004	8	0	0.00%	
HPV31	0.900	8	5	80.00%	0.121
	0.100	8	2	43.75%	
	0.033	8	5	29.41%	
	0.011	8	0	0.00%	
	0.004	8	0	0.00%	

[0199] 결과는 쥐에 면역접종을 하고 5주가 지난 후, 쥐에서 항-HPV16 항체의 발생을 유도하기 위한 H16N30-35T4-31S3 VLP의 ED₅₀값이 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 결과에 필적하며, HPV35 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독의 결과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 쥐에서 항-HPV35 항체의 발생을 유도하기 위한 그것의 ED₅₀값이 HPV35 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 결과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독의 결과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 쥐에서 항-HPV31 항체의 발생을 유도하기 위한 그것의 ED₅₀값이 HPV31 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 결과에 필적하며, HPV16N30 VLP 단독 및 HPV35 VLP 단독의 결과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 H16N30-35T4-31S3 VLP가 HPV16, HPV35 및 HPV31에 대해 훌륭한 교차면역원성 및 교차방어를 가진다는 것을 나타낸다.

[0200] 쥐에서 H16N30-35T4 VLP로 면역접종한 후의 혈청 내 중화항체(neutralizing antibodies)의 역가(titers) 측정

[0201] 본 실험에서, 면역접종 프로토콜은 표 15에 나타났다. 모든 쥐(6주령의 암컷 BalB/c쥐)는 3 그룹으로 나누었다: 10 µg 투여량 그룹(면역접종 투여량이 10 µg이며, 알루미늄 애주번트를 사용), 1 µg 투여량 그룹(면역접종 투여량이 1 µg이며, 알루미늄 애주번트를 사용), 및 0.1 µg 투여량 그룹(면역접종 투여량이 0.1 µg이며, 알루미늄 애주번트를 사용). 각 그룹은 4개 하위그룹으로 다시 나누었으며, 대조군인 하위그룹 1 및 2는 각각 HPV16N30 VLP 단독 및 HPV35 VLP 단독으로 면역접종 하였고, 대조군인 하위그룹 3은 혼합된 HPV16/HPV35 VLP로 면역접종 하였으며, 실험군인 하위그룹은 H16N30-35T4 VLP로 면역접종 하였다.

[0202] 하위그룹별로 여섯 마리의 쥐를 복강내 주사로 면역접종 하였고, 면역접종 투여량은 각각 10 µg, 1 µg, 및 0.1 µg이었으며, 투여 용량은 1mL이었다. 모든 쥐는 0주차에 최초로 면역접종 하였고, 2주차 및 4주차에 각각 추가 접종을 하였다. 8주차에 안와 출혈(orbital bleeding)을 통해 쥐로부터 혈액 샘플을 채취하였고, 혈청 내의 HPV16 및 HPV35에 대한 항체의 역가를 분석하였다. 분석 결과는 도 8a 내지 8c에 나타났다. 결과는 H16N30-35T4 VLP가 쥐에서 HPV16에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하였고, 그것의 보호 효과는 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 보호 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 HPV35 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 그것이 쥐에서 HPV35에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하였고, 그것의 보호 효과는 동일한 투여량에서의 HPV35 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35 VLP의 보호 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 H16N30-35T4 VLP가 HPV16 및 HPV35에 대해 훌륭한 교차면역원성(cross-immunogenicity) 및 교차방어(cross-protection)를 가진다는 것을 나타낸다.

표 15

면역접종 프로토콜

[0203]

그룹	면역접종 항원	애주번트	면역접종 투여량	수	면역접종 프로토콜 (주(week))
10 µg 투여량 그룹	HPV16N30 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
	HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
	HPV16/HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	각 VLP당 10 µg	6	0, 2, 4
	H16N30-35T4 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
1 µg 투여량 그룹	HPV16N30 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
	HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
	HPV16/HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	각 VLP당 1 µg	6	0, 2, 4
	H16N30-35T4 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
0.1 µg 투여량 그룹	HPV16N30 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4
	HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4
	HPV16/HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	각 VLP당 0.1 µg	6	0, 2, 4
	H16N30-35T4 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4

[0204] 쥐에서 H16N30-35T4-31S3 VLP로 면역접종한 후의 혈청 내 중화항체(neutralizing antibodies)의 역가(titers) 측정

[0205] 본 실험에서, 면역접종 프로토콜은 표 16에 나타났다. 모든 쥐(6주령의 암컷 BalB/c쥐)는 3 그룹으로 나누었다: 10 µg 투여량 그룹(면역접종 투여량이 10 µg이며, 알루미늄 애주번트를 사용), 1 µg 투여량 그룹(면역접종 투여량이 1 µg이며, 알루미늄 애주번트를 사용), 및 0.1 µg 투여량 그룹(면역접종 투여량이 0.1 µg이며, 알루미늄 애주번트를 사용).

애주번트를 사용). 각 그룹은 6개 하위그룹으로 다시 나누었으며, 대조군인 하위그룹 1, 2, 및 3은 각각 HPV16N30 VLP 단독, HPV35 VLP 단독 및 HPV31 VLP 단독으로 면역접종 하였고, 대조군인 하위그룹 4는 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP로 면역접종 하였으며, 실험군인 하위그룹은 H16N30-35T4-31S3 VLP 단독으로 면역접종 하였다.

[0206]

하위그룹별로 여섯 마리의 쥐를 복강내 주사로 면역접종 하였고, 투여량은 각각 10 µg, 1 µg, 및 0.1 µg이었으며, 투여 용량은 1mL이었다. 모든 쥐는 0주차에 최초로 면역접종하였고, 2주차 및 4주차에 각각 추가 접종을 하였다. 8주차에 안와 출혈(orbital bleeding)을 통해 쥐로부터 혈액 샘플을 채취하였고, 혈청 내의 HPV16, HPV35 및 HPV31에 대한 항체의 역가를 분석하였다. 분석 결과는 도 8d 내지 8f에 나타났다. 결과는 H16N30-35T4-31S3 VLP가 쥐에서 HPV16에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하였고, 그것의 보호 효과는 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 보호 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 HPV35 VLP 단독 또는 HPV31 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 그것이 쥐에서 HPV35에 대해 높은 역가의 중화항체를 유도하였고, 그것의 보호 효과는 동일한 투여량에서의 HPV35 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 보호 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독 또는 HPV31 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다; 그리고 그것이 쥐에서 HPV31에 대한 높은 역가의 중화항체를 유도하였고, 그것의 보호 효과는 동일한 투여량에서의 HPV31 VLP 단독 및 혼합된 HPV16/HPV35/HPV31 VLP의 보호 효과에 필적하며, 동일한 투여량에서의 HPV16N30 VLP 단독 또는 HPV35 VLP 단독의 보호 효과보다 상당히 높다는 것을 보여주었다. 이것은 H16N30-35T4-31S3 VLP가 HPV16, HPV35 및 HPV31에 대해 훌륭한 교차면역원성 및 교차방어를 가진다는 것을 나타낸다.

표 16

면역접종 프로토콜

[0207]

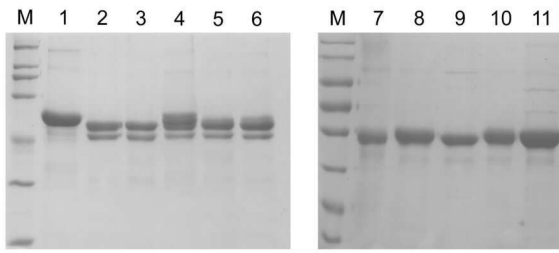
그룹	면역접종 항원	애주번트	면역접종 투여량	수	면역접종 프로토콜 (주(week))
10 µg 투여량 그룹	HPV16N30 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
	HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
	HPV31 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
	HPV16/HPV35/HPV31 VLP	알루미늄 애주번트	각 VLP당 10 µg	6	0, 2, 4
	H16N30-35T4-31S3 VLP	알루미늄 애주번트	10 µg	6	0, 2, 4
1 µg 투여량 그룹	HPV16N30 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
	HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
	HPV31 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
	HPV16/HPV35/HPV31 VLP	알루미늄 애주번트	각 VLP당 1 µg	6	0, 2, 4
	H16N30-35T4-31S3 VLP	알루미늄 애주번트	1 µg	6	0, 2, 4
0.1 µg 투여량 그룹	HPV16N30 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4
	HPV35 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4
	HPV31 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4
	HPV16/HPV35/HPV31 VLP	알루미늄 애주번트	각 VLP당 0.1 µg	6	0, 2, 4
	H16N30-35T4-31S3 VLP	알루미늄 애주번트	0.1 µg	6	0, 2, 4

[0208]

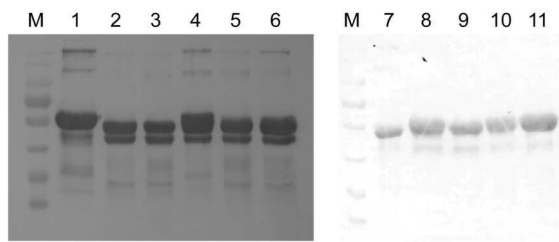
본 발명의 구체적인 구현예가 상세하게 서술되었지만, 본 기술분야의 통상의 기술자는 모든 개시의 교시에 비추어 본 발명의 세부 사항에 대해 다양한 변형 및 변경(alterations)이 만들어질 수 있고, 이러한 모든 변형 및 변경은 본 발명의 범위 내에 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 첨부된 청구범위 및 이의 임의의 등가물에 의해 정해지는 것이다.

도면

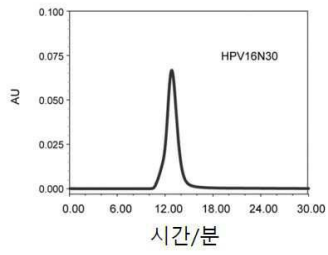
도면1



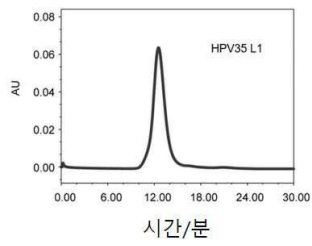
도면2



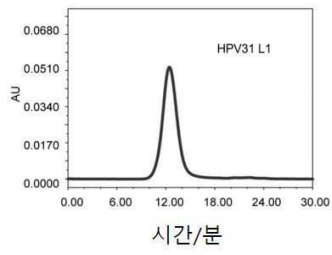
도면3a



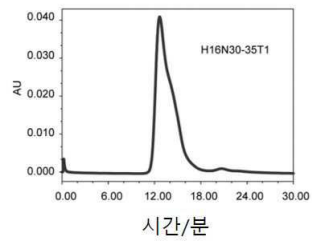
도면3b



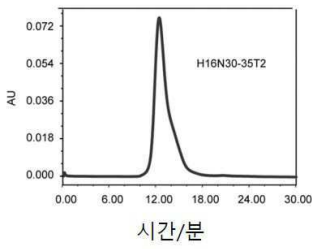
도면3c



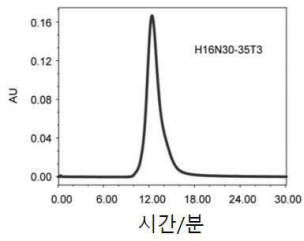
도면3d



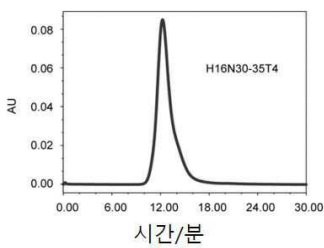
도면3e



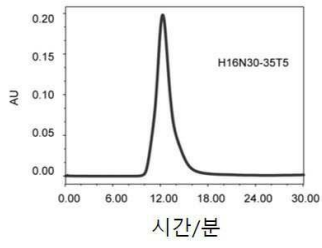
도면3f



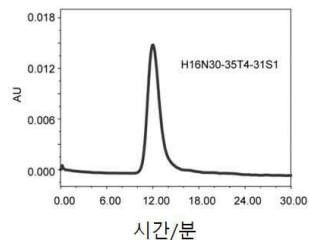
도면3g



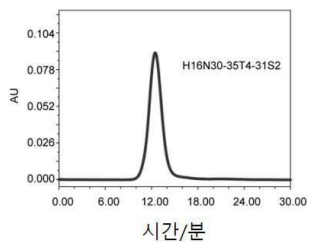
도면3h



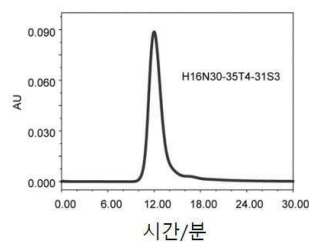
도면3i



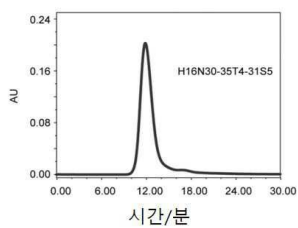
도면3j



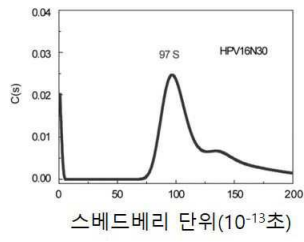
도면3k



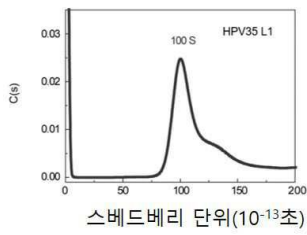
도면3l



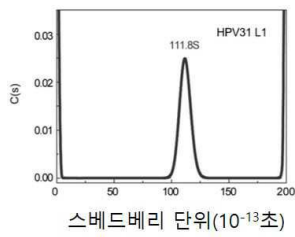
도면4a



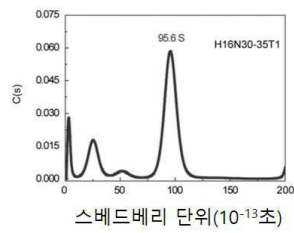
도면4b



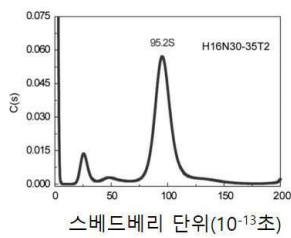
도면4c



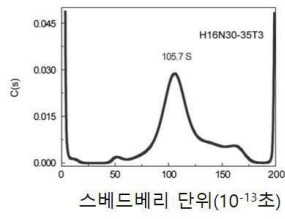
도면4d



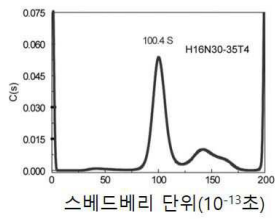
도면4e



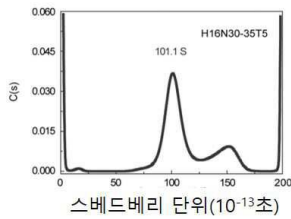
도면4f



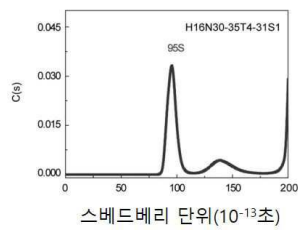
도면4g



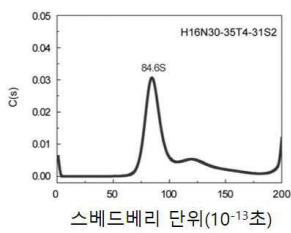
도면4h



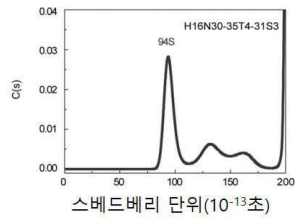
도면4i



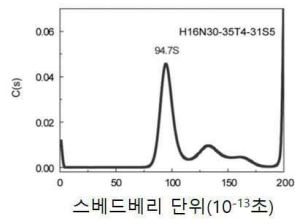
도면4j



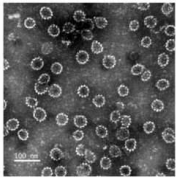
도면4k



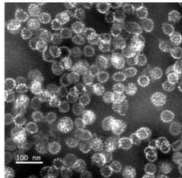
도면4l



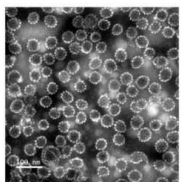
도면5a



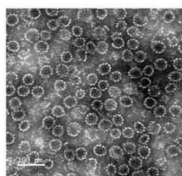
도면5b



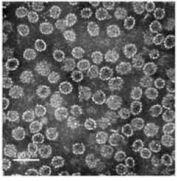
도면5c



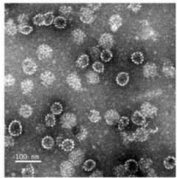
도면5d



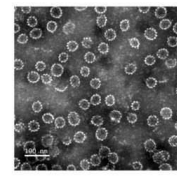
도면5e



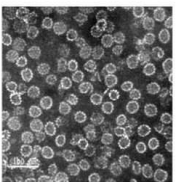
도면5f



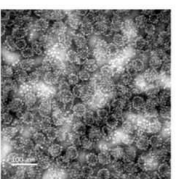
도면5g



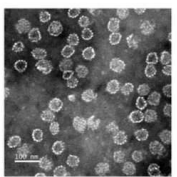
도면5h



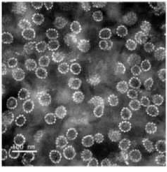
도면5i



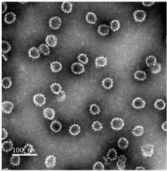
도면5j



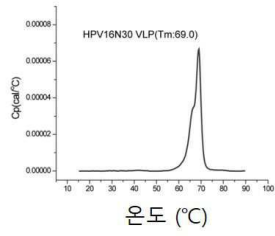
도면5k



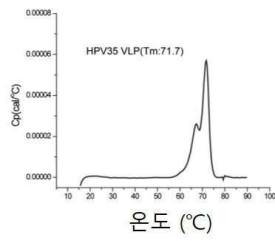
도면5l



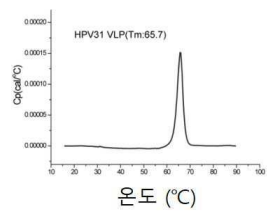
도면6a



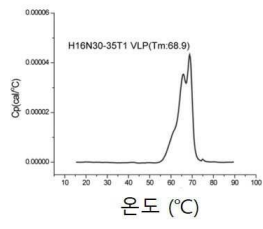
도면6b



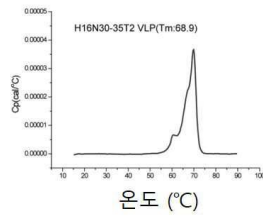
도면6c



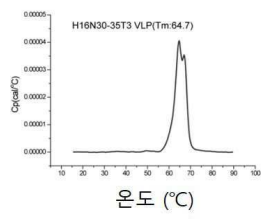
도면6d



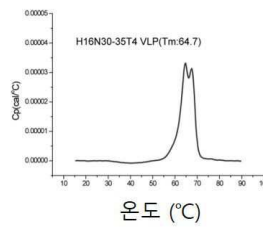
도면6e



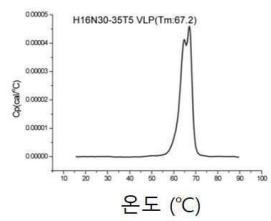
도면6f



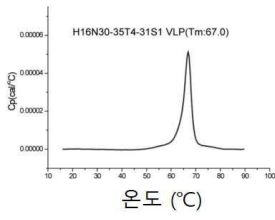
도면6g



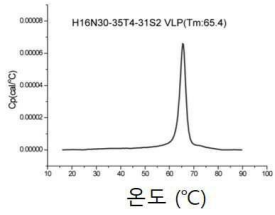
도면6h



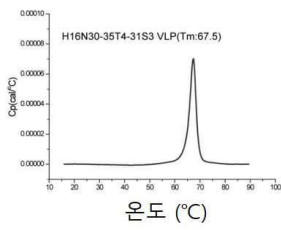
도면6i



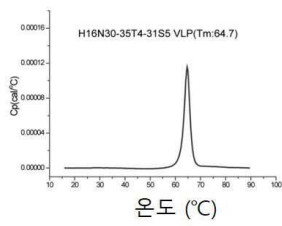
도면6j



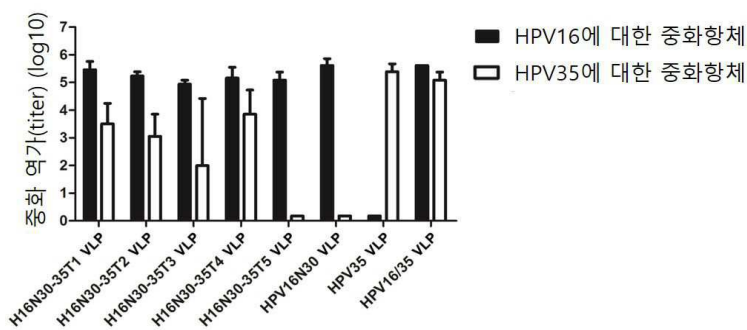
도면6k



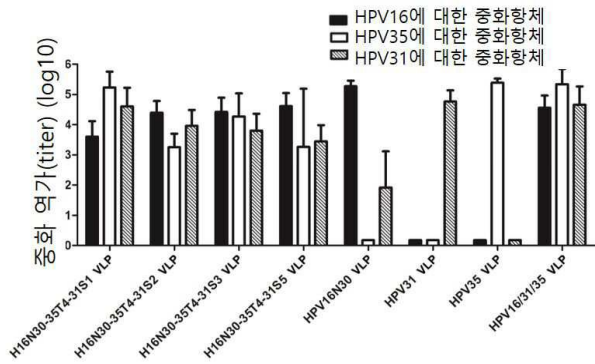
도면6l



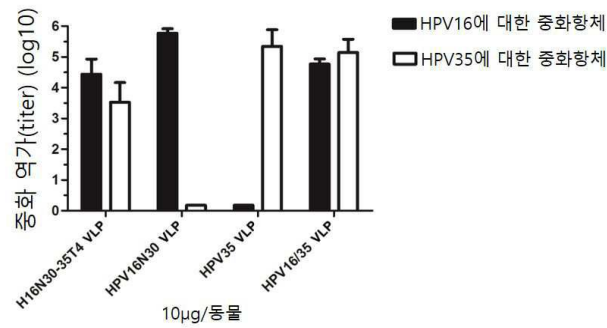
도면7a



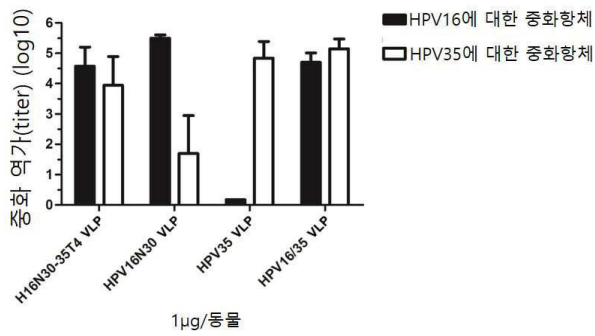
도면7b



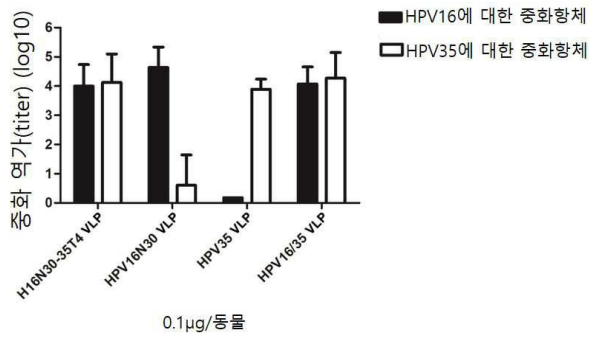
도면8a



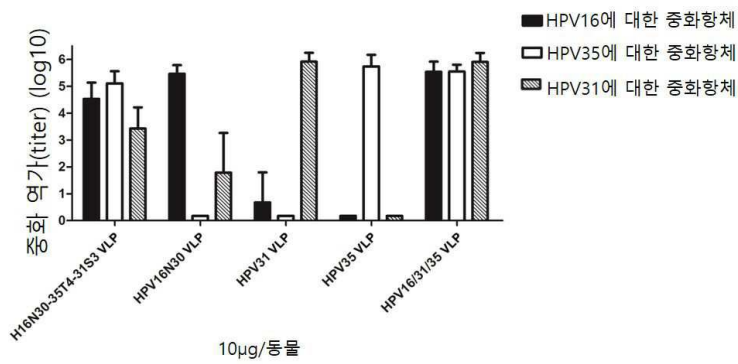
도면8b



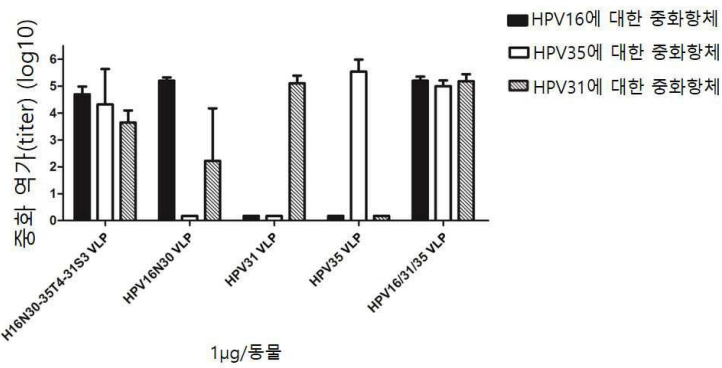
도면8c



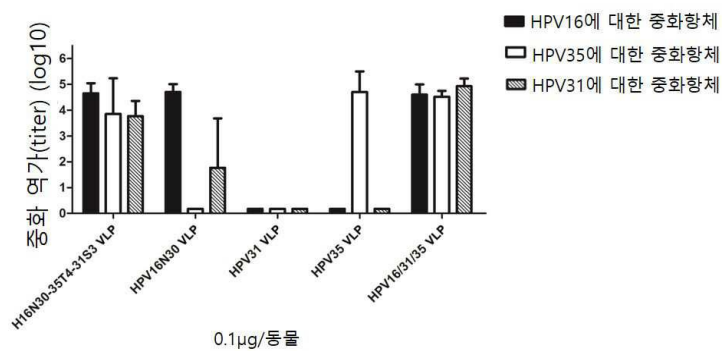
도면8d



도면8e



도면8f



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> XIAMEN UNIVERSITY; XIAMEN INNOVAX BIOTECH CO. , LTD.

<120> MUTANT OF L1 PROTEIN OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16

<130> IEC170066PCT

<150> CN201710573731.9

<151> 2017-07-14

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 531

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 1

Met Gln Val Thr Phe Ile Tyr Ile Leu Val Ile Thr Cys Tyr Glu Asn
 1 5 10 15

Asp Val Asn Val Tyr His Ile Phe Phe Gln Met Ser Leu Trp Leu Pro
 20 25 30

Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser Lys Val Val
 35 40 45

Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr His Ala Gly
 50 55 60

Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Pro Ile Lys Lys
 65 70 75 80

Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly Leu Gln Tyr
 85 90 95

Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Gly Phe Pro
 100 105 110

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

Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val Gly Ile Ser
 130 135 140

Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn Ala Ser Ala

145 150 155 160

Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile Ser Met Asp

 165 170 175

Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro Pro Ile Gly

 180 185 190

Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val Ala Val Asn Pro

 195 200 205

Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val Ile Gln Asp Gly

 210 215 220

Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe Thr Thr Leu Gln

225 230 235 240

Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser Ile Cys Lys

 245 250 255

Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr Gly Asp Ser Leu

 260 265 270

Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg His Leu Phe Asn

 275 280 285

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

 290 295 300

Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser Ser Asn Tyr Phe Pro Thr

305 310 315 320

Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn Lys Pro

 325 330 335

Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly

 340 345 350

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

 355 360 365

Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu Thr Thr Tyr Lys Asn Thr

 370 375 380

Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe

385 390 395 400
 Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Ile Met Thr Tyr

 405 410 415
 Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu

 420 425 430
 Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val Thr

 435 440 445
 Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys Glu

 450 455 460
 Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys

465 470 475 480
 Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu

 485 490 495
 Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly Lys Arg Lys

 500 505 510
 Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg Lys Lys

 515 520 525
 Arg Lys Leu

530

<210> 2

<211> 502

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 35

<400> 2

Met Ser Leu Trp Arg Ser Asn Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
 1 5 10 15

Ser Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Thr Arg Thr Asn
 20 25 30

Ile Tyr Tyr His Ala Gly Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ile Lys Lys Gln Asp Ser Asn Lys Ile Ala Val Pro Lys

Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly

305 310 315 320

Ile Cys Trp Ser Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg

325 330 335

Ser Thr Asn Met Ser Val Cys Ser Ala Val Ser Ser Ser Asp Ser Thr

340 345 350

Tyr Lys Asn Asp Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr

355 360 365

Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp

370 375 380

Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Pro Ser Ile Leu Glu Asp Trp

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Tyr Val Thr Ser Gln Ala Val Thr Cys Gln Lys Pro Ser Ala Pro

420 425 430

Lys Pro Lys Asp Asp Pro Leu Lys Asn Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asp

435 440 445

Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg

450 455 460

Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Arg Pro Asn Phe Arg Leu

465 470 475 480

Gly Lys Arg Ala Ala Pro Ala Ser Thr Ser Lys Lys Ser Ser Thr Lys

485 490 495

Arg Arg Lys Val Lys Ser

500

<210> 3

<211> 504

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 31

<400> 3

Met Ser Leu Trp Arg Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Thr Arg Thr Asn
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr His Ala Gly Ser Ala Arg Leu Leu Thr Val Gly His Pro
 35 40 45
 Tyr Tyr Ser Ile Pro Lys Ser Asp Asn Pro Lys Lys Ile Val Val Pro
 50 55 60
 Lys Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Val Arg Leu Pro Asp
 65 70 75 80
 Pro Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Glu Thr
 85 90 95
 Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln
 100 105 110
 Pro Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Phe Asp
 115 120 125
 Asp Thr Glu Asn Ser Asn Arg Tyr Ala Gly Gly Pro Gly Thr Asp Asn
 130 135 140
 Arg Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys
 165 170 175
 Ser Asn Asn Ala Ile Thr Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Lys
 180 185 190
 Asn Ser Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala
 195 200 205
 Met Asp Phe Thr Ala Leu Gln Asp Thr Lys Ser Asn Val Pro Leu Asp
 210 215 220
 Ile Cys Asn Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Lys Met Val Ala
 225 230 235 240
 Glu Pro Tyr Gly Asp Thr Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met

500

<210> 4

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H16N30-35T1

<400> 4

Met Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser

1 5 10 15

Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr

 20 25 30

His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Tyr Ala

 35 40 45

Ile Lys Lys Gln Asp Ser Asn Lys Ile Ala Val Pro Lys Val Ser Gly

 50 55 60

Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe

65 70 75 80

Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val

 85 90 95

Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val

 100 105 110

Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn

 115 120 125

Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile

 130 135 140

Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro

145 150 155 160

Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val Ala

 165 170 175

Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val Ile

 180 185 190

Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe Thr
 195 200 205

Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser
 210 215 220

Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr Gly
 225 230 235 240

Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg His
 245 250 255

Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Asp Asn Val Pro Asp Asp Leu
 260 265 270

Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser Ser Asn Tyr
 275 280 285

Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe
 290 295 300

Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile
 305 310 315 320

Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser
 325 330 335

Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu Thr Thr Tyr
 340 345 350

Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp
 355 360 365

Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Ile
 370 375 380

Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn
 385 390 395 400

Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg
 405 410 415

Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala
 420 425 430

Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu

435 440 445
 Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys
 450 455 460
 Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly
 465 470 475 480
 Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys
 485 490 495
 Arg Lys Lys Arg Lys Leu
 500

<210> 5

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H16N30-35T2

<400> 5

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

50 55 60
 Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
 65 70 75 80
 Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val
 85 90 95
 Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110
 Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn

115 120 125
 Ser Asn Lys Tyr Val Gly Asn Ser Gly Thr Asp Asn Arg Glu Cys Ile

Tyr Ile Lys Gly Thr Thr Gly Thr Leu Pro Ser Thr Ser Tyr Phe Pro
 275 280 285
 Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn Lys
 290 295 300
 Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp

 305 310 315 320
 Ser Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn
 325 330 335
 Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu Thr Thr Tyr Lys Asn
 340 345 350
 Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
 355 360 365
 Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Ile Met Thr

 370 375 380
 Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
 385 390 395 400
 Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val
 405 410 415
 Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys
 420 425 430
 Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu

 435 440 445
 Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
 450 455 460
 Leu Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly Lys Arg
 465 470 475 480
 Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg Lys
 485 490 495
 Lys Arg Lys Leu
 500

<210> 8

<

211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H16N30-35T5

<400> 8

Met Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser
1 5 10 15

Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr
 20 25 30

His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Pro
 35 40 45

Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly

50 55 60

Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65 70 75 80

Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val
 85 90 95

Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110

Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn

115 120 125

Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile
130 135 140

Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro
145 150 155 160

Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val Ala
 165 170 175

Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val Ile

180 185 190

Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe Thr
195 200 205

Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser

Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly
 465 470 475 480
 Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys
 485 490 495
 Arg Lys Lys Arg Lys Leu
 500

<210> 9

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H16N30-35T4-31S1

<400> 9

Met Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Tyr Ser
 35 40 45
 Ile Pro Lys Ser Asp Asn Pro Lys Lys Ile Val Val Pro Lys Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys
 65 70 75 80
 Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu
 85 90 95
 Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly
 100 105 110
 Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu
 115 120 125
 Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys
 130 135 140
 Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys
 145 150 155 160

Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val
 165 170 175

Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val
 180 185 190

Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe
 195 200 205

Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr
 210 215 220

Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr
 225 230 235 240

Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg
 245 250 255

His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Thr Val Pro Ala Asp
 260 265 270

Leu Tyr Ile Lys Gly Thr Thr Gly Thr Leu Pro Ser Thr Ser Tyr Phe
 275 280 285

Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn
 290 295 300

Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
 305 310 315 320

Trp Ser Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
 325 330 335

Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu Thr Thr Tyr Lys
 340 345 350

Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu
 355 360 365

Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Ile Met
 370 375 380

Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe
 385 390 395 400

Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe

405 410 415
 Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala Pro
 420 425 430

Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys

435 440 445
 Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe
 450 455 460

Leu Leu Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly Lys
 465 470 475 480

Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg
 485 490 495

Lys Lys Arg Lys Leu

500

<210

> 10

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H16N30-35T4-31S2

<400> 10

Met Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser
 1 5 10 15

Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr
 20 25 30

His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Pro
 35 40 45

Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly

50 55 60

Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
 65 70 75 80

Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val
 85 90 95

Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val

Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
 355 360 365
 Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Ile Met Thr
 370 375 380
 Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
 385 390 395 400
 Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val
 405 410 415
 Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys
 420 425 430
 Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
 435 440 445
 Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
 450 455 460
 Leu Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly Lys Arg
 465 470 475 480
 Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg Lys
 485 490 495
 Lys Arg Lys Leu
 500
 <210> 11

 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> H16N30-35T4-31S3
 <400> 11
 Met Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Pro
 35 40 45

Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly
 50 55 60
 Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
 65 70 75 80
 Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val
 85 90 95
 Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110
 Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn
 115 120 125
 Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile
 130 135 140
 Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro
 145 150 155 160
 Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Ser Asn Asn Ala
 165 170 175
 Ile Thr Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val Ile
 180 185 190
 Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe Thr
 195 200 205
 Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser
 210 215 220
 Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr Gly
 225 230 235 240
 Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg His
 245 250 255
 Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Thr Val Pro Ala Asp Leu
 260 265 270
 Tyr Ile Lys Gly Thr Thr Gly Thr Leu Pro Ser Thr Ser Tyr Phe Pro
 275 280 285
 Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn Lys

<220><223> H16N30-35T4-31S5

<400> 12

Met Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Pro
 35 40 45
 Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly
 50 55 60
 Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
 65 70 75 80
 Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val
 85 90 95
 Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110
 Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn
 115 120 125
 Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile
 130 135 140
 Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro
 145 150 155 160
 Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val Ala
 165 170 175
 Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn Thr Val Ile
 180 185 190
 Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asp Phe Thr
 195 200 205
 Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser
 210 215 220
 Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr Gly
 225 230 235 240

Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg His
 245 250 255
 Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Thr Val Pro Ala Asp Leu
 260 265 270
 Tyr Ile Lys Gly Thr Thr Gly Thr Leu Pro Ser Thr Ser Tyr Phe Pro
 275 280 285
 Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn Lys
 290 295 300
 Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp

 305 310 315 320
 Ser Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn
 325 330 335
 Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ala Asn Ser Asp Thr Thr Phe Lys Ser
 340 345 350
 Ser Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
 355 360 365
 Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Ile Met Thr

 370 375 380
 Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
 385 390 395 400
 Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val
 405 410 415
 Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys
 420 425 430
 Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu

 435 440 445
 Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
 450 455 460
 Leu Gln Ala Gly Leu Glu Ala Lys Pro Lys Phe Thr Leu Gly Lys Arg
 465 470 475 480
 Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg Lys

485

490

495

Lys Arg Lys Leu

500

<210> 13

<211> 1596

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:1

<400> 13

```

atgcaggtga cttttattta catcctagtt attacatgtt acgaaaacga cgtaaacgtt      60
taccatattt tttttcagat gtctctttgg ctctcctagtg aggccactgt ctacttgctt     120
cctgtcccag taictaaggt tgtaagcacg gatgaatatg ttgcacgcac aaacatatat      180
tatcatgcag gaacatccag actacttgca gttggacatc cctatitttc tattaaaaaa     240
cctaacaata acaaaatatt agttcctaaa gtatcaggat tacaatacag ggtattttaga     300
atacatttac ctgaccccaa taagtttggg tttcctgaca cctcatttta taatccagat      360

acacagcggc tggtttgggc ctgtgtaggt gttgaggtag gtcgtggtca gccattaggt      420
gtgggcatta gtggccatcc tttattaaat aaattggatg acacagaaaa tgctagtgct      480
tatgcagcaa atgcagggtg ggataataga gaatgtatat ctatggatta caaacaacaa     540
caattgtgtt taattggttg caaacacact ataggggaac actggggcaa aggatcccca     600
tgtaccaatg ttgcagtaaa tccaggtgat tgtccacat tagagttaat aaacacagtt     660
attcaggatg gtgatatggt tgatactggc tttggtgcta tggactttac tacattacag     720
gctaacaaaa gtgaagtcc actggatatt tgtacatcta tttgcaaata tccagattat      780

attaaaatgg tgcagaacc atatggcgac agcttatttt tttatctacg aagggaacaa     840
atgtttgtta gacatttatt taatagggct ggtgctgttg gtgataatgt accagacgat     900
ttatacatta aaggctctgg gtctactgca aatttagcca gttcaaatta ttttctaca     960
cctagtgggt ctatggttac ctctgatgcc caaatattca ataaacctta ctggttacia    1020
cgagcacagg gccacaataa tggcatttgt tgggtaacc aactatttgt tactgttgtt    1080
gatactacac gcagtacaaa tatgicatta tigtctgcca tatctacttc agaaaactaca    1140
tataaaaata ctaactttaa ggagtaccta cgacatgggg aggaatatga ttacagttt     1200

atttttcaac tgtgcaaaat aaccttaact gcagacatta tgacatacat acattctatg     1260
aattccacta ttttggagga ctggaatttt ggtctacaac ctccccagg aggcacacta     1320

```

gaagatactt ataggtttgt aacatcccag gcaattgctt gtcaaaaaca tacacctcca 1380
 gcacctaaag aagatccctt taaaaaatac actttttggg aagtaaattt aaaggaaaag 1440
 ttttctgcag acctagatca gtttccttta ggacgcaaat ttttactaca agcaggattg 1500
 gaggccaaac caaaatttac attaggaaaa cgaaaagcta caccaccac ctcactacc 1560
 tctacaactg ctaaacgcaa aaaacgtaag ctgtaa 1596

<210> 14

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:2

<400> 14

atgagcctgt ggaggagcaa cgaggccacc gtgtacctgc ccccgtgag cgtgagcaag 60
 gtggtgagca ccgacgagta cgtgaccagg accaacatct actaccacgc cggcagcagc 120
 aggctgctgg ccgtgggcca cccctactac gccatcaaga agcaggacag caacaagatc 180
 gccgtgccca aggtgagcgg cctgcagtac aggggtgtca ggggaagct gcccgacccc 240
 aacaagttcg gcttccccga caccagcttc tacgaccccg ccagccagag gctggtgtgg 300

 gcctgcaccg gcgtggaggt gggcaggggc cagcccctgg gcgtgggcat cagcggccac 360
 ccctgctga acaagctgga cgacaccgag aacagcaaca agtacgtggg caacagcggc 420
 accgacaaca gggagtgcac cagcatggac tacaagcaga cccagctgtg cctgatcggc 480
 tgcaggcccc ccatcggcga gcactggggc aagggcaccc cctgcaacgc caaccaggtg 540
 aaggccggcg agtcccccc cctggagctg ctgaacaccg tgctgcagga cggcgacatg 600
 gtggacaccg gcttcgggcg catggacttc accaccctgc aggccaaca gagcgacgtg 660
 ccctggaca tctgcagcag catctgcaag taccccgact acctgaagat ggtgagcgag 720

 ccctacggcg acatgctggt cttctacctg aggagggagc agatgttcgt gaggcacctg 780
 ttcaacaggg ccggcacctg gggcgagacc gtgcccggc acctgtacat caaggcacc 840
 accggcacc tgcccagcac cagctacttc cccacccca gcggcagcat ggtgaccagc 900
 gagccccaga tttcaaca gcccactgg ctgcagaggg cccagggcca caacaacggc 960
 atctgctgga gcaaccagct gttctgacc gtggtggaca ccaccaggag caccaacatg 1020
 agcgtgtgca gcgccgtgag cagcagcgac agcacctaca agaacgaca cttcaaggag 1080
 tactgagge acggcgagga gtacgacctg cagttcatct tccagctgtg caagatcacc 1140

 ctgaccgccc acgtgatgac ctacatccac agcatgaacc ccagcatcct ggaggactgg 1200

aacttcggcc tgaccccccc ccccagcggc accctggagg acacctacag gtacgtgacc 1260
 agccaggccg tgacctgcca gaagcccagc gcccccaagc ccaaggacga cccctgaag 1320
 aactacacct tctgggaggt ggacctgaag gagaagtca ggcgccacct ggaccagttc 1380
 cccctgggca ggaagttcct gctgcaggcc ggctgaagg ccaggcccaa cttcaggctg 1440
 ggcaagaggg ccgccccgc cagcaccagc aagaagagca gcaccaagag gaggaaggtg 1500
 aagagctga 1509

<210> 15

<211> 1515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:3

<400> 15

atgagcctgt ggaggcccag cgaggccacc gtgtacctgc cccccgtgcc cgtgagcaag 60
 gtggtgagca ccgacagta cgtgaccagg accaacatct actaccacgc cggcagcgcc 120
 aggctgctga ccgtgggcca cccctactac agcatccca agagcgacaa cccaagaag 180
 atcgtggtgc ccaaggtgag cggcctgcag tacagggtgt tcagggtgag gctgcccac 240
 cccaacaagt tcggcttccc cgacaccagc ttctacaacc ccgagacca gaggtggtg 300

 tgggcctgcg tgggcctgga ggtgggcagg ggccagcccc tgggcgtggg catcagcggc 360
 caccctctgc tgaacaagtt cgacgacacc gagaacagca acaggtacgc cggcggcccc 420
 ggaccgaca acaggagtg catcagcatg gactacaagc agaccagct gtgcctgctg 480
 ggctgaagc cccccatcgg cgagcactgg ggcaagggca gccctgcag caacaacgcc 540
 atcaccctcg gcgactgccc cccctggag ctgaagaaca gcgtgatcca ggacggcgac 600
 atggtggaca ccggcttcgg cgccatggac ttaccgccc tgcaggacac caagagcaac 660
 gtgcccttg acatctgcaa cagcatctgc aagtaccctg actacctgaa gatggtggcc 720

 gagcctacg ggcacacct gttcttctac ctgaggaggg agcagatgtt cgtgaggcac 780
 ttcttaaca ggagcggcac cgtgggcgag agcgtgcca ccgacctgta catcaagggc 840
 agcggcagca ccgccacct ggccaacagc acctacttcc ccacccccag cggcagcatg 900
 gtgaccagcg acgcccagat cttcaacaag ccctactgga tgcagagggc ccagggccac 960
 aacaacggca tctgctgggg caaccagctg ttcgtgaccg tggtggacac caccaggagc 1020
 accaatga gcgtgtgcmc gcgcatgcc aacagcagca ccaccttcaa gacgagcaac 1080
 ttcaaggagt acctgaggca cggcaggag ttcgacctgc agttcatctt ccagctgtgc 1140

aagatcacc tgagcgccga catcatgacc tacatccaca gcatgaaccc cgccatcctg 1200
 gaggactgga acttcggcct gaccaccccc ccagcggca gcctggagga cacctacagg 1260
 ttcgtgacca gccaggccat cacctgccag aagaccgccc cccagaagcc caaggaggac 1320
 cccttcaagg actacgtgtt ctgggagggtg aacctgaagg agaagttcag cgccgacctg 1380
 gaccagttec ccctgggcag gaagttcctg ctgcaggccg gctacagggc caggcccaag 1440
 ttcaaggccg gcaagaggag cgcccccagc gccagcacca ccacccccgc caagaggaag 1500
 aagaccaaga agtaa 1515

<210> 16

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:4

<400> 16

atgcttcta gtgaggccac tgtctacttg cctcctgtcc cagtatctaa ggttgtaagc 60
 acggatgaat atgttgacg cacaacata tattatcatg caggaacaag caggctgctg 120
 gccgtgggcc acccctacta cgccatcaag aagcaggaca gcaacaagat cgccgtgcc 180
 aaggtgagcg gctgcagta cagggtgttc aggatacatt tacctgacct caataagttt 240
 ggttttcctg acacctcatt ttataatcca gatacacagc ggctggttg gcctgtgta 300

 ggtgttgagg taggtcgtgg tcagccatta ggtgtgggca ttagtgcca tcctttatta 360
 aataaattgg atgacacaga aaatgctagt gcttatgcag caaatgcagg tgtggataat 420
 agagaatgta tatctatgga ttacaacaa acacaattgt gtttaattgg ttgcaacca 480
 cctatagggg aacctgggg caaaggatcc ccatgtacca atgttcagt aaatccaggt 540
 gattgtccac cattagatt aataaacaca gttattcagg atggtgatat ggttgatact 600
 ggctttgggt ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
 atttgtacat ctatgtgcaa atatccagat tatattaataa tgggtgcaga accatacggc 720

 gacagcttat tttttatct acgaaggga caaatgttg ttagacattt atttaatagg 780
 gctgggtgctg ttggtgataa tgtaccagac gatttataca ttaaaggctc tgggtctact 840
 gcaaatttag ccagttcaaa ttattttcct acacctagtg gttctatggt tacctctgat 900
 gcccaaatat tcaataaacc ttactgggta caacgagcac agggccacaa taatggcatt 960
 tgttggggta accaactatt tgttactgtt gttgatacta cacgcagtac aaatatgtca 1020
 ttatgtgctg ccatatctac ttcagaaact acatataaaa atactaactt taaggagtac 1080

ctacgacatg gggaggaata tgatttacag tttatTTTTc aactgtgcaa aataacCTTA 1140
 actgcagaca ttatgacata catacattct atgaattcca ctatTTTtga ggactggaat 1200
 ttTggtctac aacctcccc aggaggcaca ctagaagata cttataggTt tgtaacatec 1260
 caggcaattg ctTgtcaaaa acatacacct ccagcaccta aagaagatcc ccttaaaaaa 1320
 tacactTTTT gggagTaa tttaaaggaa aagTTTTctg cagacctaga tcagTtTct 1380
 ttaggacgca aatTTTtact acaagcagga ttggaggcca aaccAAAatt tacattagga 1440
 aaacgaaaag ctacaccac cacctcatct acctctaaa ctgctaaacg caaaaaacgt 1500
 aagctgtaa 1509

<210> 17

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:5

<400> 17

atgcttCcta gtgaggccac tgtctactTg cctcctgtcc cagtatctaa ggttTgtaagc 60
 acggatgaat atgtTgcag cacaaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagttggac atccctattt tcctattaaa aaacctaaaca ataacaaaat attagtTct 180
 aaagtatcag gattacaata cagggtattt agaatacatt tacctgaccc caataagttt 240
 ggTTTTctg acacctcatt ttataatcca gatcacacgc ggctggTttg ggctctgtga 300
 ggCgtggagg tgggcagggg ccagcccctg ggcgtgggca tcagcggcca ccccTgctg 360
 aacaagctgg acgacaccga gaacagcaac aagtacgtgg gcaacagcgg caccgacaac 420
 agggagtgca tcagcatgga ctacaagcag acccagetgt gcctgatcgg ctgcaaacca 480
 cctatagggg aacctggggg caaaggatcc ccatgtacca atgtTgcagt aaatccaggt 540
 gattgtccac cattagagtt aataaacaca gtTattcagg atggTgatat ggtTgatact 600
 ggctTtggTg ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
 atTgtacat ctatTtTgcaa atatccagat tatattaaa tggTgtcaga accatacggc 720
 gacagcttat tttttatct acgaagggaa caaatgtTtTg ttagacattt atttaatagg 780
 gctggTgctg ttggTgataa tgtaccagac gatttataca ttaaaggctc tgggtctact 840
 gcaaatttag ccagTtcaaa ttatTtTctt acacctagtg gTtctatggT tacctctgat 900
 gcccAAatat tcaataaac ttactggTta caacgagcac agggccacaa taatggcatt 960
 tgtTggggta accaactatt tgtTactgtt gTtgatacta cacgcagtac aaatatgtca 1020

ttatgtgctg ccatatctac ttcagaaact acatataaaa atactaactt taaggagtac 1080
ctacgacatg gggaggaata tgatttacag tttatTTTTc aactgtgcaa aataacctta 1140

actgcagaca ttatgacata catacattct atgaattcca ctatTTTtga ggactggaat 1200
tttggTctac aacctcccc aggaggcaca ctagaagata cttataggtt tgtaacatcc 1260
caggcaattg cttgtcaaaa acatacacct ccagcaccta aagaagatcc ccttaaaaaa 1320
tacactTTTT gggaagtaaa tttaaaggaa aagTTTTctg cagacctaga tcagtttctt 1380
ttaggacgca aatTTTTact acaagcagga ttggaggcca aaccaaatt tacattagga 1440
aaacgaaaag ctacaccac cacctcatct acctctacaa ctgctaaacg caaaaaacgt 1500
aagctgtaa 1509

<210> 18

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:6

<400> 18

atgcttcta gtgaggccac tgtctacttg cctcctgtcc cagtatctaa gtttgaagc 60
acggatgaat atgtgcacg cacaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
gcagttggac atcctatTTt tctattaaa aaacctaaca ataacaaaat attagtctct 180
aaagtatcag gattacaata cagggtatTTt agaatacatt tacctgacct caataagttt 240
ggTTTTcttg acacctcatt ttataatcca gatacacagc ggctggTTtg gcctgtgta 300

ggtgttgagg taggtcgtgg tcagccatta ggtgtgggca ttagtggcca tcctttatta 360
aataaattgg atgacacaga aaatgctagt gcttatgcag caaatgcagg tgtggataat 420
agagaatgta tatctatgga ttacaacaa acacaattgt gTTtaattgg ttgcaacca 480
cctatagggg aacctgggg caaaggaacc ccatgtaacg ctaatcaagt aaagcaggt 540
gagtgccac cattagagtt aataaacaca gttattcagg atggtgatat gtttgatact 600
ggctTTggTg ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
atTTgtacat ctatTTgcaa atatccagat tatattaaaa tggTgtcaga accatacggc 720

gacagcttat tTTTTatct acgaagggaa caaatgTTTg ttagacattt atttaatagg 780
gctggTgctg ttggTgataa tgtaccagac gatttataca ttaaaggctc tgggtctact 840
gcaaatttag ccagttcaaa tTatTTtctt acacctagtg gTTctatggt tacctctgat 900
gcccaaatat tcaataaacc ttactggtta caacgagcac agggccacaa taatggcatt 960

tgttgggta accaactatt tgttactggt gttgatacta cacgcagtac aaatatgtca 1020
 ttatgtgctg ccatatctac ttcagaaact acatataaaa atactaactt taaggagtac 1080
 ctacgacatg gggaggaata tgatttacag tttatTTTTc aactgtgcaa aataacctta 1140

actgcagaca ttatgacata catacattct atgaattcca ctatTTTgga ggactggaat 1200
 tttggtctac aaactcccc aggaggcaca ctagaagata cttataggtt tgtaacatcc 1260
 caggcaattg cttgtcaaaa acatacacct ccagcaccta aagaagatcc ccttaaaaaa 1320
 tacactTTTT gggaaagtaa tttaaaggaa aagTTTTctg cagacctaga tcagtttctt 1380
 ttaggacgca aatTTTTact acaagcagga ttggaggcca aaccaaatt tacattagga 1440
 aaacgaaaag ctacaccac cacctcatct acctctaaa ctgctaaacg caaaaaacgt 1500
 aagctgtaa 1509

<210> 19

<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:7

<400> 19

atgcttcta gtgaggccac tgttacttgc cctcctgtcc cagtatctaa ggttgtaagc 60
 acggatgaat atgttcacg cacaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagttggac atccctatTT tctattaaa aaacctaaaca ataacaaaat attagttcct 180
 aaagtatcag gattacaata cagggtatTT agaatacatt tacctgacct caataagttt 240
 ggTTTTcctg acacctcatt ttataatcca gatacacagc ggctggTTTg gcctgtgta 300

ggtgttgagg taggtcgtgg tcagccatta ggtgtgggca ttagtggcca tctttatta 360
 aataaattgg atgacacaga aaatgctagt gcttatgcag caaatgcagg tgtggataat 420
 agagaatgta tatctatgga ttacaacaa acacaattgt gtttaattgg ttgcaaacca 480
 cctatagggg aacctgggg caaaggatcc ccatgtacca atgttcagtt aaatccaggt 540
 gattgtccac cattagagtt aataaacaca gttattcagg atggtgatat ggttgatact 600
 ggctTTTggtg ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
 atttgtacat ctatTTTgca atateccagat tatattaaaa tgggtgcaga accatatggc 720

gacagcttat tcttctacct gaggaggag cagatgttcg tgaggcacct gttcaacagg 780
 gccggcaccg tggcgagac cgtgccgcc gacctgtaca tcaaggcac caccgcaacc 840
 ctgcccgca ccagctactt cccccccc agcggcagca tggtgaccag cgacgccag 900

atcttcaaca agcctactg gctgcagagg gccagggcc acaacaacgg catctgctgg 960
 agtaaccaac tattgttac tgtgttgat actacacgca gtacaaatat gtattatgt 1020
 gctgccatat ctacttcaga aactacatat aaaaatacta actttaagga gtacctacga 1080
 catggggagg aatatgattt acagtttatt tttcaactgt gcaaaataac cttactgca 1140

gacattatga catacatata ttctatgaat tccactattt tggaggactg gaattttggt 1200
 ctacaacctc ccccaggagg cacactagaa gatattata ggtttgtaac atcccaggca 1260
 attgcttgtc aaaaacatac acctccagca cctaaagaag atccccttaa aaaatacact 1320
 ttttggaag taaatttaa ggaaaagttt tctgcagacc tagatcagtt tcctttagga 1380
 cgcaaat tttt tactacaagc aggattggag gccaaaccaa aatttacatt aggaaaacga 1440
 aaagctacac ccaccacctc atctacctct acaactgcta aacgcaaaaa acgtaagctg 1500
 taa 1503

<210> 20

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:8

<400> 20

atgcttecta gtgaggccac tgtctacttg cctcctgtcc cagtatctaa ggttgtaagc 60
 acggatgaat atgttgacag cacaaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagttggac atccctattt tcctattaaa aaacctaaaca ataacaaaat attagttcct 180
 aaagtatcag gattacaata cagggtattt agaatacatt tacctgacct caataagttt 240
 ggttttcctg acacctcatt ttataatcca gatcacacagc ggctggtttg ggctctgtga 300

ggtgttgagg taggtcgtgg tcagccatta ggtgtgggca ttagtggcca tcctttatta 360
 aataaattgg atgacacaga aaatgctagt gcttatgcag caaatgcagg tgttgataat 420
 agagaatgta tatctatgga ttacaacaaa acacaattgt gtttaattgg ttgcaaacca 480
 cctatagggg aacctgggg caaaggatcc ccatgtacca atgttcagc aaatccaggc 540
 gattgtccac cattagattt aataaacaca gttattcagg atggtgatat ggttgatact 600
 ggctttggtg ctatggactt tactacattt caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
 atttgtacat ctatttgcaa atatccagat tatattaaaa tgggtgcaga accatacggc 720

gacagcttat tttttatct acgaagggaa caaatgtttg ttagacattt atttaatagg 780
 gctggtgctg ttggtgataa tgtaccagac gatttataca ttaaaggctc tgggtctact 840

gcaaatttag ccagttcaaa ttattttcct acacctagtg gttctatggt tacctctgat 900
 gcccaaatat tcaataaacc ttactgggta caacgagcac agggccacaa taatggcatt 960
 tgttgagca accaactatt tgttactgtt gttgatacta cacgcagtac aaatatgtca 1020
 ttatgtgctg ccgtatctag ttcagacagt acatataaaa atgataaact taaggagtac 1080
 ctacgacatg gggaggaata tgatttacag tttatttttc aactgtgcaa aataacctta 1140

 actgcagaca ttatgacata catacattct atgaattcca ctattttgga ggactggaat 1200
 tttggctctac aacctcccc aggaggcaca ctagaagata cttatagggt tgtaacatcc 1260
 caggcaattg cttgtcaaaa acatacacct ccagcaccta aagaagatcc ccttaaaaaa 1320
 tacacttttt gggaagtaaa tttaaaggaa aagttttctg cagacctaga tcagtttctt 1380
 ttaggacgca aatttttact acaagcagga ttggaggcca aaccaaatt tacattagga 1440
 aaacgaaaag ctacaccac cacctcatct acctctacaa ctgctaaacg caaaaaacgt 1500
 aagctgtaa 1509

<210> 21

<211> 1506

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:9

<400> 21

atgcttcta gtgaggccac tgtctacttg cctcctgtcc cagtatctaa ggttgtaagc 60
 acggatgaat atgtgcacg cacaaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagtgggcc acccctacta cagcatcccc aagagcgaca accccaagaa gatcgtgggtg 180
 cccaaggtga gcggcctgca gtacaggggtg ttcaggatac atttacctga cccaataag 240
 tttggttttc ctgacacctc attttataat ccagatacac agcggctggt ttgggcctgt 300

 gtaggtgttg aggtaggctg tggtcagcca ttaggtgtgg gcattagtgg ccatccttta 360
 ttaaataaat tggatgacac agaaaatgct agtgcttatg cagcaaatgc aggtgtggat 420
 aatagagaat gtatatctat ggattacaaa caaacacaat tgtgtttaat tggttgcaaa 480
 ccacctatag gggaaactg gggcaaagga tccccatgta ccaatgttgc agtaaatcca 540
 ggtgattgtc caccattaga gtttaataaac acagttattc aggatggtga tatggttgat 600
 actggctttg gtgctatgga ctttactaca ttacaggcta acaaaagtga agttccactg 660
 gatatttgta catctatttg caaatatcca gattatatta aatgggtgc agaaccatat 720

 ggcgacagct tattcttcta cctgaggagg gacgagatgt tcgtgaggca cctgttcaac 780

agggccggca ccgtgggcga gaccgtgcc gccgacctgt acatcaaggg caccaccggc 840
 accctgccca gcaccagcta cttccccacc cccagcggca gcatggtgac cagcgacgcc 900
 cagatcttca acaagcccta ctggetgcag agggcccagg gccacaaca cggcatctgc 960
 tggagtaacc aactatttgt tactgttgtt gatactacac gcagtacaaa tatgtcatta 1020
 tgtgctgccca tatctacttc agaaactaca tataaaaata ctaactttaa ggagtaccta 1080
 cgacatgggg aggaatatga tttacagttt atttttcaac tgtgcaaat aaccttaact 1140

 gcagacatta tgacatacat acattctatg aattcacta ttttggagga ctggaatfff 1200
 ggtctacaac ctccccagg aggcacacta gaagatactt ataggtttgt aacatcccag 1260
 gcaattgctt gtcaaaaaca tacacctcca gcacctaaag aagatcccct taaaaaatac 1320
 actttttggg aagtaaattt aaaggaaaag ttttctgcag acctagatca gtttccttta 1380
 ggacgcaaat ttttactaca agcaggattg gagcccaac caaaatttac attaggaaaa 1440
 cgaaaagcta cacccaccac ctcatctacc tctacaactg ctaaacgcaa aaaacgtaag 1500
 ctgtaa 1506

<210> 22

<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:10

<400> 22

atgcttccta gtgaggccac tgtctacttg cctcctgtcc cagtatctaa ggttgtaagc 60
 acggatgaat atgttcacg cacaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagttggac atccctatff tctattaaa aaacctaaaca ataacaaaat attagttcct 180
 aaagtatcag gattacaata cagggtatff agaatacatt tacctgacct caataagttt 240
 ggttttctg acacctcatt ttataatcca gatacacagc ggctggtttg gcctgtgta 300

 ggtgttgagg tgggcagggg ccagccctg ggcgtgggca tcagcggcca cccctgctg 360
 aacaagttcg acgacaccga gaacagcaac aggtacgccg gcggccccgg caccgacaac 420
 agggagtgca tcagcatgga ctacaagcag acccagctgt gcctgattgg ttgcaaacca 480
 cctatagggg aacctgggg caaaggatcc ccatgtacca atgttcagtt aatccaggt 540
 gattgtccac cattagagtt aataaacaca gttattcagg atggtgatat ggttgatact 600
 ggctttggtg ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
 atttgtacat ctatttgcaa atatccagat tatattaaaa tgggtgcaga accatatggc 720

gacagcttat tcttctacct gaggagggag cagatgttcg tgaggcacct gttcaacagg 780
 gccggcaccg tggcgagac cgtgcccgc gacctgtaca tcaagggcac caccggcacc 840
 ctgcccagca ccagctactt ccccccccc agcggcagca tggtgaccag cgacgccag 900
 atcttcaaca agccctactg gctgcagagg gccagggcc acaacaacgg catctgctgg 960
 agtaaccaac tatttgttac tgttgtgat actacacgca gtacaatat gtattatgt 1020
 gctgccatat ctacttcaga aactacatat aaaaatacta actttaagga gtacctacga 1080
 catggggagg aatatgattt acagtttatt ttcaactgt gcaaaataac cttactgca 1140

gacattatga catacatata ttctatgaat tccactattt tggaggactg gaattttggt 1200
 ctacaacctc cccaggagg cacactagaa gatacttata ggtttgtaac atcccaggca 1260
 attgcttgtc aaaaacatac acctccagca cctaaagaag atccccttaa aaaatacact 1320
 ttttgggaag taaatthaa ggaaaagttt tctgcagacc tagatcagtt tcctttagga 1380
 cgcaaattht tactacaagc aggattggag gccaaacca aatttacatt aggaaaacga 1440
 aaagctacac ccaccacctc atctacctct acaactgcta aacgcaaaaa acgtaagctg 1500
 taa 1503

<210> 23

<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:11

<400> 23

atgcttcta gtgaggccac tgttacttg cctcctgtcc cagtatctaa ggttgtaagc 60
 acggatgaat atgttgacag cacaaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagttggac atccctattt tcctatthaa aaaccthaca athacaaat attagttcct 180
 aaagtatcag gattacaata cagggtattt agaatacatt tacctgacct caataagttt 240
 ggthttcctg acacctcatt ttataatcca gatacacagc ggctggthtg ggcctgtgta 300

ggtgttgagg taggtcgtgg tcagccatta ggtgtgggca ttagtggcca tcctthatta 360
 aataaattgg atgacacaga aatgctagt gcttatgcag caaatgcagg tgttgataat 420
 agagaatgta taictatgga ttacaacaaa acacaattgt gthtaattgg ctgcaagccc 480
 cccatcggcg agcactgggg caagggcagc cctgcagca acaacgcat cccccggc 540
 gactgcccc cctggagct gataaacaca gttattcagg atggtgatat ggttgatact 600
 ggctthggtg ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660

attgtacat ctatttcaa atatccagat tatattaataa tgggtgcaga accatatggc 720
 gacagcttat tcttctacct gaggaggag cagatgttcg tgaggcacct gttcaacagg 780
 gccggcaccg tggcgagac cgtgccgcc gacctgtaca tcaaggcac caccggcacc 840
 ctgcccagca ccagctactt cccaccccc agcggcagca tggtgaccag cgacgccag 900
 atcttcaaca agcctactg gctgcagagg gccagggcc acaacaacgg catctgctgg 960
 agtaaccaac tatttgttac tgttgtgat actacacgca gtacaatat gtcattatgt 1020
 gctgccatat ctacttcaga aactacatat aaaaacta actttaagga gtacctacga 1080
 catggggagg aatatgattt acagtattt tttcaactgt gcaaaataac cttactgca 1140
 gacattatga catacataca ttctatgaat tccactattt tggaggactg gaattttggt 1200
 ctacaacctc cccaggagg cactagaa gatacttata ggtttgtaac atcccaggca 1260
 atgcttgcg aaaaacatac acctccagca cctaaagaag atcccctaa aaaatacact 1320
 ttttgggaag taaatttaa ggaaaagttt tctgcagacc tagatcagtt tccttagga 1380
 cgcaaatttt tactacaagc aggattggag gccaaaccaa aatttacatt aggaaaacga 1440
 aaagctacac ccaccacctc atctacctc acaactgcta aacgcaaaaa acgtaagctg 1500
 taa 1503

<210> 24

<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence encoding SEQ ID NO:12

<400> 24

atgcttecta gtgaggccac tgtctacttg cctcctgtcc cagtatctaa gtttgaagc 60
 acggatgaat atgttcacg cacaacata tattatcatg caggaacatc cagactactt 120
 gcagttggac atccctattt tctattaaa aaacctaca ataacaaat attagttcct 180
 aaagtatcag gattacaata cagggtattt agaatacatt tacctgacce caataagttt 240
 ggttttctg acacctcatt ttataatcca gatacacagc ggctggtttg gcctgtgta 300
 ggtgttgagg taggtcgtgg tcagccatta ggtgtgggca ttagtggcca tcctttatta 360
 aataaattgg atgacacaga aaatgctagt gcttatgcag caaatgcagg tgtggataat 420
 agagaatgta tatctatgga ttacaacaa acacaattgt gtttaattgg ttgcaaacca 480
 cctatagggg aacctggggg caaaggatcc ccatgtacca atgttcagtt aatccaggt 540
 gattgtccac cattagagtt aataaacaca gttattcagg atggtgatat ggttgatact 600

ggctttggtg ctatggactt tactacatta caggctaaca aaagtgaagt tccactggat 660
 atttgtacat ctatttgcaa atatccagat tatattaaaa tgggtgcaga accatatggc 720

gacagettat tcttctacct gaggagggag cagatgttcg tgaggcacct gttcaacagg 780
 gccggcaccg tgggcgagac cgtgccccgc gacctgtaca tcaaggcac caccggcacc 840
 ctgcccgca ccagctactt cccaccccc agcggcagca tggtgaccag cgacgccag 900
 atcttcaaca agccctactg gctgcagagg gcccagggcc acaacaacgg catctgctgg 960
 agtaaccaac tatttgttac tgttgttgat actacacgca gtacaaatat gtcattatgc 1020
 gccgccatcg ccaacagcga caccaccttc aagagcagca acttcaagga gtacctgagg 1080
 cacggcgagg agiatgattt acagtttatt tttcaactgt gcaaaataac cttactgca 1140

gacattatga catacataca ttctatgaat tccactatnt tggaggactg gaattttggt 1200
 ctacaaccte ccccaggagg cacactagaa gatacttata ggtttgtaac atcccagga 1260
 attgcttgtc aaaacatac acctccagca cctaaagaag atcccctta aaaatacact 1320
 ttttggaag taaatttaa ggaaaagttt tctgcagacc tagatcagtt tccttagga 1380
 cgcaaatttt tactacaagc aggattggag gccaaacca aatttacatt aggaaaacga 1440
 aaagctacac ccaccacctc atctacctct acaactgcta aacgcaaaaa acgtaagctg 1500
 taa 1503

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence of amino acid residues at positions 266-288 of wild-type HPV35 L1 protein

<400> 25

Thr Val Gly Glu Thr Val Pro Ala Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Thr Thr

1 5 10 15

Gly Thr Leu Pro Ser Thr Ser

20

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence of amino acid residues at positions 50-62 of wild-type HPV31 L1 protein

<400> 26

Tyr Ser Ile Pro Lys Ser Asp Asn Pro Lys Lys Ile Val

1 5 10

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence of amino acid residues at positions 127-142 of wild-type HPV31 L1 protein

<400> 27

Phe Asp Asp Thr Glu Asn Ser Asn Arg Tyr Ala Gly Gly Pro Gly Thr

1 5 10 15

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequence of amino acid residues at positions 177-182 of wild-type HPV31 L1 protein

<400> 28

Ser Asn Asn Ala Ile Thr

1 5

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 29

atacatttac ctgaccccaa taag 24

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 30

tgttcctgca tgataatata tgtttg 26

<210> 31

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 31

 aacatatatt atcatgcagg aacaagcagg ctgctggccg tgggc 45
 <210> 32
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 32

 cttattgggg tcaggtaaat gtatcctgaa caccctgtac tgcaggc 47
 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 33

 aaaccaccta taggggaaca ctg 23
 <210> 34
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer

 <400> 34

 tacacaggcc caaaccagcc gc 22
 <210> 35
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 35

gcggtctggtt tggcctgtg taggcgtgga ggtgggcagg ggcc 44

<210> 36

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 36

cagtgtccc ctataggtgg ttgcagccg atcaggcaca gctggg 46

<210> 37

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Primer

<400> 37

ggcaaaggaa ccccatgtaa cgctaataca gtaaaggcag gtgagtgtcc accat 55

<210> 38

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 38

atggtggaca ctcaactgcc ttacttgat tagcgttaca tggggttctt ttgcc 55

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 39

tggggtaacc aactatttgt tactg 25

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 40
 taagctgtcg ccatatggtt ctg 23
 <210> 41
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 41
 cagaaccata tggcgacagc ttattcttct acctgaggag ggagc 45
 <210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 42
 cagtaacaaa tagttggtta ccccagcaga tgccgttggt gtgg 44
 <210> 43
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 43
 atgtgctgcc gtatctagtt cagacagtac atataaaaat gataacttta aggag 55
 <210> 44
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 44
 ctccctaaag ttatcatttt tatatgtact gtctgaacta gatacggcag cacat 55
 <210> 45
 <211> 26
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 45

atacatttac ctgaccccaa taagtt 26

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 46

tgcaagtagt ctggatgttc ctgc 24

<210> 47

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 47

caggaacatc cagactactt gcagtgggcc acccctacta cagcat 46

<210> 48

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 48

cttattgggg tcaggtaat gtatcctgaa cacctgtac tgcaggc 47

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 49

attggttgca aaccacctat agggg 25

<210> 50

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 50
 aacacctaca caggcccaaa ccage 25
 <210> 51
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 51
 tggtttgggc ctgtgtaggt gttgaggtgg gcaggggcca gcc 43
 <210> 52
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 52
 cctataggtg gtttgaacc aatcaggcac agctgggtct gcttg 45
 <210> 53
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 53
 ataaacacag ttattcagga tgg 23
 <210> 54
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 54
 aattaaacac aattgtgttt gtttgt 26

<210> 55
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 55
 aacaacaca attgtgttta attggctgca agcccccat cggcg 45
 <210> 56
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 56
 ccatcctgaa taactgtgtt tadcagctcc aggggggggc agtcgc 46
 <210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 57
 tatgatttac agtttatttt tc 22
 <210> 58
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 58
 taatgacata tttgtactgc gtg 23
 <210> 59
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 59

cacgcagtac aaatatgtca ttatgcgccg ccatcgccaa cagcg

45

<210> 60

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 60

tgaaaaataa actgtaaatac atactcctcg cgtgcctca ggtact

46