



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년12월16일
 (11) 등록번호 10-0874552
 (24) 등록일자 2008년12월10일

(51) Int. Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7000847
 (22) 출원일자 2003년01월20일
 심사청구일자 2006년07월20일
 번역문제출일자 2003년01월20일
 (65) 공개번호 10-2003-0074586
 (43) 공개일자 2003년09월19일
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2001/003290
 국제출원일자 2001년07월20일
 (87) 국제공개번호 WO 2002/08435
 국제공개일자 2002년01월31일
 (30) 우선권주장
 0017990.3 2000년07월21일 영국(GB)
 0025802.0 2000년10월20일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌
 Journal of Virology Vol.73(6):4972-4982
 (1999.06.)*
 Journal of Virology Vol.73(8):7039-7043
 (1999.08.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

글락소 그룹 리미티드

영국 유니6 0엔엔 미들섹스 그린포우드 버클리 애
 비뉴 글락소 웰컴 하우스

(72) 발명자

어틀, 피터, 프란츠

영국에스지12엔와이허트포드셔셔스티브니지거널스우
 드로드글락소스미스클라인

거프, 제랄드, 웨인

영국에스지12엔와이허트포드셔셔스티브니지거널스우
 드로드글락소스미스클라인

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 신원혜

(54) 코돈-최적화 파필로마 바이러스 서열

(57) 요약

본 발명은 인간 파필로마 바이러스 감염 및 이와 관련된 징후와 질환을 치료 및 예방하는 데 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 인간 파필로마 바이러스 (HPV) 아미노산 서열을 코딩하며, 코돈 이용도 패턴이 고도로 발현되는 표유동물 유전자의 패턴과 유사한 폴리뉴클레오티드 서열에 관한 것이다.

(72) 발명자

파마, 바니타

영국에스지12엔와이허트포드셔셔스티브니지거널스우드로드글락소스미스클라인

링, 크리스토퍼, 제프리, 알란

영국에스지12엔와이허트포드셔셔스티브니지거널스우드로드글락소스미스클라인

왈코트, 사라, 마리나

영국에스지12엔와이허트포드셔셔스티브니지거널스우드로드글락소스미스클라인

(81) 지정국

국내특허 : 중국, 일본, 대한민국, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아, 엔 몬테네그로, 짐바브웨, 콜롬비아, 미국, 에쿠아도르

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터어키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

특허청구의 범위

청구항 1

인간 파필로마 바이러스의 HPV 초기 항원 또는 그의 단편의 아미노산 서열을 코딩하며, 생체내로 투여될 때 면역 반응을 유발할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열로서, 상기 폴리뉴클레오티드의 고도로 발현되는 인간 유전자에 대한 코돈 이용도 계수가 0.5 초과 내지 1.0 미만인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, DNA 서열인 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 3

제1항에 있어서, 자궁경부암, 양성 피부 사마귀 또는 성기 사마귀와 관련된 HPV 유형 또는 아형의 HPV 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 4

제3항에 있어서, HPV 유형 1 내지 4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26 내지 29, 31, 33, 35, 39, 49, 51, 52, 56, 58, 59 및 68 중 어느 하나의 HPV 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 5

제4항에 있어서, 자궁경부암 또는 성기 사마귀와 관련된 HPV 유형 또는 아형의 HPV 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 6

제5항에 있어서, HPV 유형 6, 11, 16, 18, 33 또는 45 중 어느 하나의 HPV 폴리펩티드, 또는 HPV 바이러스 유형 6, 11, 16, 18, 33 또는 45 중 하나 이상의 폴리펩티드 2개 이상으로 이루어진 융합체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 7

제5항에 있어서, HPV 11, 6a 또는 6b로부터 선택되는 HPV 유형 또는 아형의 HPV 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 코딩된 HPV 폴리펩티드가 HPV 초기 유전자 생성물의 전부 또는 일부를 갖는 것인 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 대장균 (*E. coli*) 유전자에 대한 코돈 이용도 계수가 0.6을 초과하는 것인 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 15

도 5에 도시된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 그의 코돈 이용도를 유지하는 그의 단편 또는 유사체.

청구항 16

도 6에 도시된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 그의 코돈 이용도를 유지하는 그의 단편 또는 유사체.

청구항 17

숙주 세포에 의해 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열과 작동 가능하게 연결된 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 박테리아, 곤충 또는 포유동물 세포에서 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 유도할 수 있는 발현 벡터.

청구항 19

제17항에 있어서, 벡터 주쇄가 도 7에 나타낸 p7313PLc인 발현 벡터.

청구항 20

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포.

청구항 21

제17항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 22

제20항에 있어서, 박테리아, 포유동물 또는 곤충 세포인 숙주 세포.

청구항 23

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, HPV 감염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 24

제17항에 따른 벡터를 포함하는, HPV 감염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, DNA로 코팅된 다수의 입자, 바람직하게는 금 입자를 포함하는, HPV 감염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 제약상 허용되는 부형제 및 DNA 벡터를 포함하는, HPV 감염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 27

제23항에 있어서, 보조제를 더 포함하는, HPV 감염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 보조제가 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 HPV 폴리펩티드와의 융합체로서 코딩되는 것인, HPV 감염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이 K83G, R84G 및 G483D를 갖는 돌연변이 HPV E1 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 39

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이 K111A를 포함하는 돌연변이 HPV E2 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 40

제39항에 있어서, 코딩된 HPV 폴리펩티드가 E1 또는 E2의 전부 또는 일부, 또는 E1 또는 E2의 전부 또는 일부와 다른 HPV 폴리펩티드와의 융합체를 갖는 것인 폴리뉴클레오티드 서열.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 인간 파필로마 바이러스 감염 및 이와 관련된 징후와 질환을 치료 및 예방하는 데 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 파필로마 바이러스 감염은 양, 개, 토끼, 원숭이, 소 및 인간을 비롯한 다양한 종에서 관찰되어 왔다. 인간 파필로마 바이러스 (HPV)는 80가지가 넘는 유형으로 분류되었다 (Epidemiology and Biology of Cervical Cancer. Seminars in Surgical Oncology 1999 16:203-211). 새로운 (신규한) 유형의 바이러스가 정의되었는데, 이 유형은 L1 유전자가 기존에 확인된 유형의 L1 서열과 90% 미만의 서열 동일성을 나타내는 한편, 특정 아형 (sub-type)은 90% 내지 98%의 L1 서열 동일성을 나타내고, 특정 변이체는 (원형 (모 유형)과) 98%를 초과하는 서열 동일성을 나타낸다. 파필로마 바이러스는 일반적으로 상피에 감염되지만, 상이한 HPV 유형은 독특한 질환들을 유발한다. 예를 들어, 유형 1 내지 4, 7, 10 및 26 내지 29는 양성 피부 사마귀를 유발하고, 유형 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68은 자궁경부암과 관련되어 있으며, 유형 6 및 11은 성기 사마귀 (생식로의 비악성 콘딜로마)와 관련되어 있다.
- <3> 대부분의 성기 사마귀 (90% 초과)는 HPV 유전자형 6 및 11을 함유한다. HPV-6이 단일 감염에서 확인되는 가장 우세한 유전자형이지만, HPV-6과 HPV-11 둘 다 동등한 손상부에서 나타날 수도 있다. 사마귀는 일반적으로 감염된 개체의 여러 부위에서 나타나며, 콘딜로마 (성기 사마귀)에 걸린 배우자가 있는 환자 중 60%가 넘는 환자에서 병변이 발생하며 잠복 기간은 평균 3개월이다. 현재, 다양한 치료 옵션이 있다. 그러나, 이들은 절개 또는 제거 및(또는) 국소 겔 및 크림의 사용에 의존하고 있다. 이들은 통증을 수반하고, 병원에 자주 방문해야 하며, 효능이 매우 가변적이다. 질환 재발이 이 질환의 효과적인 치료에 대한 심각한 문제점으로 남아있다.
- <4> 성기 사마귀는 자발적으로 퇴화될 수 있고, 세포 매개의 면역이 사마귀 퇴화에 일차적으로 관여하는 것으로 보인다. 높은 자발 퇴화율은 숙주의 세포성 면역이 임상 질환을 해결할 수 있으며 면역 치료법이 성기 사마귀의 치료 또는 예방을 위한 옵션이 될 수 있음을 나타낸다. 질환 치료의 목적은, 통증이 없고 병원 방문 횟수를 최소화시키며 질환 치료율이 높고 질환 재발율을 감소(최소화)시키는 바이러스-특이적 치료법에 있다.
- <5> HPV는 조직 배양시 성장이 어려운 것으로 증명되었기 때문에, 통상적인 바이러스 생백신 또는 약독화 백신이 없다. 또한, HPV 백신의 개발은 인간 바이러스를 연구할 수 있는 적합한 동물 모델이 없어서 느려지고 있다. 이는 바이러스가 종에 대해 매우 특이적이어서, 면역수용성 동물을 인간 파필로마 바이러스로 감염 (백신을 인간에게 먼저 시험하기 전에 안전성 시험을 위해 필요함)시키는 것이 불가능하기 때문이다.
- <6> 파필로마 바이러스는 E1 내지 E7, L1 및 L2로 치칭되는 "초기" 및 "후기" 유전자를 코딩하는 DNA 게놈을 가지고 있다. 초기 유전자 서열은 바이러스 DNA의 복제와 전사, 숙주 면역의 회피, 및 정상 숙주 세포의 생활사 및 기타 과정들의 변화와 관련된 기능을 갖는 것으로 나타났다. 예를 들어, E1 단백질은 ATP-의존성 DNA 헬리카제 (helicase)로 바이러스 DNA 복제 과정의 개시에 관여하는 한편, E2는 바이러스 유전자 발현과 DNA 복제 둘 다를 조절하는 조절 단백질이다. E1과 바이러스 복제 기점 둘 다에 결합하는 능력을 통해, E2는 복제 기점에서의 E1 농축을 초래하여 바이러스 DNA의 복제 개시를 자극한다. E4 단백질은 다수의 미확인 기능을 가지는 것으로 보이지만 그 중에서도 숙주 세포의 세포 골격에 결합할 수 있는 한편, E5는 엔도솜 (endosome)의 산성화를 지연시켜 세포 표면에서 EGF 수용체의 발현을 증가시키는 것으로 보이며, E6 및 E7은 각각 세포 단백질인 p53 및 pRB에 결합하는 것으로 알려져 있다. 자궁경부암과 관련된 HPV로부터의 E6 및 E7 단백질은 공지의 종양유전자 (oncogene)이다. L1 및 L2는 2가지 바이러스 구조 (캡시드) 단백질을 코딩한다.
- <7> 역사적으로, 백신은 특정 병원체 감염이 발생하는 경우에 면역계를 작동시켜 병원체를 인식하고 이를 중화시킴으로써 병원체에 의한 감염을 예방하는 한가지 방법으로 알려져 있다. 백신은 병원체에서 유래한 1종 이상의 항원을 통상 사멸되거나 약화된 (약독화된) 전체 생물체 형태로 포함하거나, 또는 생물체로부터 선택된 항원 펩티드를 포함한다. 면역계가 항원(들)에 노출되는 경우, 개체의 일생 동안 항원을 면역학적으로 "기억"하는 세포가 생성된다. 그 후에 동일한 항원에 노출 (예를 들어, 병원체에 의한 감염)되면 특이적 면역 반응을 자극하여 감염성 물질을 제거하거나 불활성화시키게 된다.
- <8> 면역 반응에는 체액성 (항체) 반응 및 세포-매개의 반응이라는 두가지 무기가 존재한다. 세포내에서 복제하는 병원체 (바이러스 및 일부 박테리아)에서 유래한 단백질 항원은 감염 숙주 세포 내에서 프로세싱되어 짧은 펩티드를 방출하고, 이후에 이 펩티드는 클래스 I 주요 조직적합성 (MHC I) 분자와 결합한 채로 감염 세포 표면에 표출된다. MHC I과 펩티드가 결합한 복합체는 항원-특이적 CD8+ T 세포와 접촉하는 경우, T 세포는 활성화되어 세포독성 활성을 획득하게 된다. 이들 세포독성 T 세포 (CTL)는 감염된 숙주 세포를 용해시킴으로써 감염성 병원체의 복제 및 전염을 제한할 수 있다. 면역 반응의 또다른 중요한 무기는 CD4+ T 세포에 의해 조절된다. 병원체로부터 유래한 항원이 세포의 환경으로 방출되는 경우, 이들은 특별한 항원-표출 세포 (APC)에 의해 흡수

되어 MHC II 분자와 결합한 채로 이들 세포의 표면에 표출된다. 이 복합체에서의 항원 인식은 CD4+ 세포가 가용성 인자 (사이토카인)를 분비하게끔 자극하고, 그 결과 다른 T 세포의 작용 메커니즘을 조절하게 된다. 항체는 B 세포에 의해 생성된다. 분비된 항체에 항원이 결합함으로써 병원체의 감염성을 중화시킬 수 있고, B 세포 표면의 막-결합 항체에 항원이 결합함으로써 B 세포의 분화를 자극하여 B 세포 반응을 증폭시킨다. 일반적으로, 항체와 세포-매개의 면역 반응 (CD8+ 및 CD4+)은 모두 병원체에 의한 감염을 제어하는 데 필요하다.

<9> 병원체에 의해 감염된 후에도 면역계를 작동시켜 병원체를 불활성화시키거나 제거함으로써 감염을 제어 또는 해결하는 것이 가능할 것이라고 믿어진다. 그러한 면역 치료법 (또한 "치료" 백신 또는 면역요법이라고도 알려짐)은 체액성 및 세포-매개의 면역 반응 둘 다를 유발할 수 있음에도 불구하고, 이상적으로는 세포-매개의 반응이 작동하도록 한다.

<10> 생쥐에게 인산칼슘으로 침전된 DNA를 접종하면 그 DNA에 의해 코딩되는 펩티드가 발현된다는 것이 입증되었다 (Benvenisty, N and Reshaf, L. PNAS 83, 9551-9555). 그 후, 침전되지 않은 플라스미드 DNA를 생쥐에 근육내 주사하면, DNA가 근육 세포 내로 흡수되어 코딩된 단백질을 발현하였다. 이 DNA의 발현은 자연 감염과 같이 숙주 세포 내에서 코딩된 병원체 단백질의 생산을 초래하기 때문에, 이 메커니즘은 면역 치료법 또는 치료 백신화에 필요한 세포 매개의 면역 반응을 자극할 수 있어서 DNA 기체의 약물이 예방용 백신으로서 또는 면역 치료법으로서 적용될 수 있다. DNA 백신은 W090/11092호 (Vical, Inc.)에 기재되어 있다.

<11> DNA 백신은 근육내 주사 이외의 다른 메커니즘에 의해 전달될 수 있다. 예를 들어, 피부 내로의 전달은 면역 메커니즘이 피부 및 점막과 같이 감염에 대한 장벽으로 기능하는 조직에서 매우 활성이 높다는 사실을 이용한 것이다. 피부 내로의 전달은 주사를 통해, 제트 주입기 (근육을 비롯한 하부 조직 또는 피부 내로 액체를 가압하여 강제로 전달함)를 통해, 또는 DNA가 충분한 밀도의 입자에 코딩되어 상피를 통과할 수 있는 입자 충격기 (미국 특허 제5,371,015호)를 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열은 플라스미드 내로 혼입될 수 있고, 이를 금 비드에 코딩한 후, 고압하에서 상피 내로 투여할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Haynes et al J. Biotechnology 44:37-42 (1996)] 참조). 이들 입자를 피부 내로 발사하는 것은 상피 세포와 상피 랑게르한스 세포 둘 다의 직접 형질감염을 초래한다. 랑게르한스 세포는 항원 표출 세포 (APC)로, DNA를 흡수하여 코딩된 펩티드를 발현하며 세포 표면의 MHC 단백질에 표출되도록 프로세싱한다. 형질감염된 랑게르한스 세포는 림프절로 이동하고, 여기서 표출된 항원 단편을 림프 세포에 제공함으로써 면역 반응을 일으킨다. 입자 매개의 피부내 전달을 통한 면역 반응 유도에 매우 소량의 DNA (1 μg 미만, 대개 0.5 μg 미만)가 요구되며, 이는 직접 근육내 주사 이후에 면역 반응을 생성하기 위해 밀리그램 단위의 DNA가 요구되는 것과 대조적이다.

<12> 형질감염된 포유동물 세포, 예를 들어 HeLa, 293 또는 CHO 세포에서 HPV 단백질을 발현 및 검출하는 것은 어려운 것으로 증명되었기 때문에, 검출 가능한 단백질 발현 또는 소정량의 순수한 단백질을 필요로 하는 생화학적 및 면역학적 연구를 위해서는 대체로 이. 콜라이 (*E. coli*), 배컬로바이러스 또는 효모 단백질 발현 시스템이 사용된다. 이들 시스템에서, 단백질의 수율은 기능 분석과 정제 및 그 이후의 생화학적 및 면역학적 연구를 실행하기에 적당하다. 그러나, 직접 단백질 검출 방법 (예를 들어, 웨스턴 블롯팅 (Western blotting))으로는, CMV 또는 SV40과 같은 강력한 프로모터를 지닌 벡터를 사용하는 경우에도 형질감염된 포유동물 세포에서 E1 단백질의 발현이 검출되지 않는다. 포유동물 세포에서 E1 단백질의 발현을 증가시키기 위해 고안된 방법에는 5' 인접 서열을 E1 유전자 바로 옆에 클로닝하는 것 (Remm et al. J. Virol 1999 73, 3062-3070) 및 형질감염 후에 형질감염된 E1 플라스미드 벡터를 증폭하는 것 (Zou et al. J. Virol 1998 72, 3436-3441)이 포함된다. 유입된 벡터 플라스미드를 형질감염 후의 복제에 의해 증폭하는 것은 순수하게 세포 내에서 E1 유전자의 카피수를 증가시키는 효과를 나타내기 때문에, 단백질의 양이 증대되고, 이로 인해 (웨스턴 블롯팅에 의한) 단백질의 검출이 용이해진다. E1 단백질의 발현 및 검출은 포유동물 세포에서 문제점이 있기 때문에, 여러 연구자들은 이 단백질의 발현을 검출하기 위해서 토끼 망상 적혈구 시스템을 이용하여 ³⁵S-표지된 메티오닌을 사용한 시험관내 전사-번역 (Promega)에 의존해 왔다 (Gopalakrishnan et al. Virology 1999 256, 330-339; Safari et al. Virology 1995 211, 385-396). 그러나, 이것은 무세포 시스템이며, 파지 T7에서 유래한 RNA 중합효소에 대한 결합 서열을 함유하는 변형 프로모터의 사용을 필요로 한다.

<13> E1 단백질의 발현은 또한 HPV의 DNA 복제 기점을 함유하는 플라스미드의 시험관내 DNA 복제를 검출함으로써 간접적으로 검출되어 왔다. 복제된 기점을 함유하는 플라스미드의 검출은 E1 (및 E2) 단백질 발현의 대용물로서 작용한다 (Gopalakrishnan et al. Virology 1999 256, 330-339; Lu et al. J. Virol 1993 67, 7131-7139; Del Vecchio et al. J. Virol 1992 66, 5949-5958). E1과 E2 단백질 둘 다는 HPV 복제 기점의 복제를 위해 필요하

기 때문에, 포유동물 세포를 E1과 E2 유전자를 둘 다 코딩하는 플라스미드 및 HPV의 DNA 복제 기점을 포함하는 제3의 플라스미드로 형질감염시키면, 표준 단백질 검출법 (웨스턴 블롯팅)에 의해 검출할 수는 없지만 E1 단백질 (및 E2 단백질)이 성공적으로 발현된다면 복제 기점을 포함하는 플라스미드만이 복제될 것이다.

<14> DNA 코드는 4개의 문자 (A, T, C 및 G)를 가지며, 이들을 사용하여 3개의 문자로 이루어진 "코돈"을 기록하는데, 코돈은 생물체의 유전자에서 코딩되는 단백질들의 아미노산을 나타낸다. DNA 분자에 따른 코돈의 선형 서열은 이들 유전자에 의해 코딩되는 단백질(들)의 선형 아미노산 서열로 번역된다. 코드는 매우 축퇴성 (degenerate)으로, 61개의 코돈이 20개의 천연 아미노산을 코딩하며 3개의 코돈이 "정지" 신호를 나타낸다. 따라서, 대부분의 아미노산은 1개 이상의 코돈에 의해 코딩된다. 실제로는, 여러 아미노산이 4개 이상의 상이한 코돈에 의해 코딩된다.

<15> 주어진 아미노산을 코딩하는 데 1개 이상의 코돈이 이용되는 경우, 생물체의 코돈 이용도 (codon usage) 패턴이 매우 규칙적임이 관찰되었다. 상이한 종들은 그들의 코돈 선택에 있어서 상이한 편향을 나타내고, 더욱이 코돈의 이용은 단일 종에서도 높은 수준과 낮은 수준으로 발현되는 유전자들 사이에서 매우 상이할 수 있다. 이 편향은 바이러스, 식물, 박테리아 및 포유동물 세포에서 상이하하며, 몇몇 종들은 다른 종들보다 더 규칙적으로 코돈을 선택하는, 보다 강력한 편향을 나타낸다. 예를 들어, 인간 및 다른 포유동물은 특정 박테리아 또는 바이러스보다 덜 강력한 편향을 나타낸다. 이러한 이유로, 이. 콜라이에서 발현된 포유동물 유전자 또는 포유동물 세포에서 발현된 바이러스 유전자는 효율적인 발현에 대해 부적절한 코돈 분포를 가질 것이다. 그러나, 이. 콜라이 발현에 적합한 코돈 이용도 패턴을 가진 유전자가 인간에서 효율적으로 발현될 수도 있다. 발현이 일어날 숙주 세포에서 드물게 관찰되는 코돈 클러스터의 이중 DNA 서열이 존재한다면, 그 숙주에서 낮은 수준으로 이중 발현이 일어날 것을 예상할 수 있다.

<16> 숙주에서 드문 코돈을 숙주가 선호하는 코돈으로 변화 ("코돈 최적화 (codon optimisation)")시켜 이중 발현의 수준이 증진된 예가 여러가지 있다. 예를 들어, BPV (소 파필로마 바이러스)의 후기 유전자인 L1 및 L2는 포유동물 코돈 이용도 패턴에 대해 코돈이 최적화되었고, 이로 인해 포유동물 (Cos-1) 세포 배양액에서 야생형 HPV 서열보다 증가된 수준의 발현이 나타났다 (Zhou et. al. J. Virol 1999, 73, 4972-4982). 이 작업에서, 포유동물에서보다 PBV에서 출현 빈도가 2배를 넘는 모든 BPV 코돈 (이용율>2), 및 이용율이 1.5를 초과하는 대부분의 코돈을 포유동물에서 우세하게 사용되는 코돈으로 보존적으로 치환하였다. W097/31115호, W097/48370호 및 W098/34640호 (Merck & Co., Inc.)에서, HIV 유전자 또는 그 단편의 코돈 최적화는 단백질 발현의 증가를 초래하였고, 최적화 조작의 대상인 숙주 포유동물에서 DNA 백신으로서 코돈 최적화 서열을 사용한 경우에 면역성이 향상되었다. 이 작업에서, 서열은 각각의 바이러스 코돈이 의도된 숙주에 대한 최적화 코돈으로 보존적으로 대체되었기 때문에, (최적화가 원치않는 제한 부위, 인트론 스플라이스 부위 등을 생성하는 경우를 제외하고) 전적으로 최적화 코돈으로 이루어져 있었다.

발명의 상세한 설명

<17> 첫번째 측면에 따라, 본 발명은 HPV 아미노산 서열을 코딩하며, 코돈 이용도 패턴이 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 패턴과 유사한 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드 서열이 DNA 서열이다. 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도 패턴은 고도로 발현되는 인간 유전자의 패턴과 유사한 것이 바람직하다. 이상적으로는, 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도 패턴이 고도로 발현되는 이. 콜라이 유전자의 패턴과도 유사하다. 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 서열, 예를 들어 이중 가닥 DNA 서열일 수 있다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드 서열은 자궁경부암, 양성 피부 사마귀 또는 성기 사마귀와 관련된 HPV 유형 또는 아형, 예를 들어 유형 1 내지 4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26 내지 29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68, 바람직하게는 특히 자궁경부암 및 성기 사마귀와 관련된 유형 6, 11, 16, 18, 33 또는 45, 가장 바람직하게는 HPV 11, 6a 또는 6b의 HPV 폴리펩티드를 코딩한다.

<18> 따라서, 아미노산 서열의 코딩에 사용되는 가능한 코돈의 선택을 합성 유전자의 코돈 이용도 빈도가 파필로마 바이러스 유전자의 것보다 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 것과 매우 유사한 최적 포유동물 코돈 이용도와 유사하도록 변화시킨, HPV 아미노산 서열을 코딩하는 다수의 코돈을 함께 포함하는 합성 유전자가 제공된다. 코돈 이용도 패턴이 고도로 발현되는 인간 유전자의 패턴과 실질적으로 동일한 것이 바람직하다.

<19> 특정 실시양태에서, 코딩된 아미노산 서열은 야생형 HPV 아미노산 서열이다. 다른 실시양태에서, 코딩된 아미노산 서열은 아미노산이 변화 (예를 들어, 아미노산 점 돌연변이)된 야생형 서열을 포함하는 돌연변이화 HPV 아미노산 서열로, 폴리펩티드가 지닌 1가지 이상의 생물학적 천연 기능을 감소 또는 불활성화시키기에 충분하다.

돌연변이화 아미노산 서열은 바람직하게는 야생형 폴리펩티드의 면역원성을 보유할 것이다.

- <20> 코딩된 HPV 폴리펩티드는 초기 유전자 생성물, 예를 들어 E1, E2 또는 E7이나 이들의 단편, 유사체 또는 융합체를 포함할 수도 있고, 또는 후기 유전자 생성물, 예를 들어 L1 또는 L2나 이들의 단편, 유사체 또는 융합체일 수도 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 2개 이상의 HPV 초기 유전자 생성물들의 융합체, 또는 HPV 초기 유전자 생성물과 HPV 후기 유전자 생성물의 융합체를 코딩하거나, 또는 2개 이상의 HPV 후기 유전자 생성물들의 융합체, 1개 이상의 HPV 유전자 생성물의 단편들의 융합체, 또는 HPV 유전자 생성물 (또는 그의 단편)과 HPV가 아닌 공급원으로부터 유래한 폴리펩티드 (예를 들어, 보조제 또는 표적화 펩티드, 또는 HBV 코어 펩티드와 같은 폴리펩티드)의 융합체를 코딩할 수 있다. 융합체는 동일하거나 상이한 바이러스 유형 또는 아형으로부터 유래한 HPV 유전자 생성물들로 이루어질 수 있다. 그러한 융합체는 바람직하게는 융합된 폴리펩티드 성분들의 면역원성을 보유할 것이다. 바람직하게는 코딩된 HPV 폴리펩티드가 초기 유전자 생성물의 전부 또는 일부를 포함하며, 가장 바람직하게는 E1 또는 E2를 포함한다. 어느 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 도 1에 도시된 HPV 6b의 야생형 E1 폴리펩티드, 또는 그의 단편 또는 유사체를 코딩한다. 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 도 2에 도시된 돌연변이화 HPV 6b E1 아미노산 서열; HPV 11, 6a 또는 6b의 야생형 E2 아미노산 서열 (도 3); 도 4b의 돌연변이화 HPV 6b E2 아미노산 서열; 및 도 4a의 돌연변이화 HPV 11 E2 서열, 또는 코딩된 폴리펩티드가 면역원성을 보유하는 이들의 단편, 유사체 또는 융합체 중 하나 이상을 코딩할 수 있다.
- <21> 본 발명에 따라, 폴리뉴클레오티드의 코돈 이용도 패턴은, 바람직하게는 표적 생물체의 고도로 발현된 유전자에서 RSCU값이 0.2 미만인 코돈을 배제할 것이다. 상대적 유사 코돈 이용도 (relative synonymous codon usage; RSCU)값은 관찰된 코돈의 수를 해당 아미노산에 대한 모든 코돈이 동등한 빈도로 사용되는 경우에 기대된 수로 나눈 값이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 고도로 발현되는 인간 유전자에 대한 코돈 이용도 계수 (하기 정의됨)가 0.3을 초과하고, 바람직하게는 0.4를 초과하며, 가장 바람직하게는 0.5를 초과하지만, 1을 초과하지는 않을 것이다. 또한, 고도로 발현되는 이. 콜라이 유전자에 대한 폴리뉴클레오티드의 코돈 이용도 계수는 0.5를 초과하고, 바람직하게는 0.6을 초과하며, 가장 바람직하게는 0.7을 초과할 것이다.
- <22> 한 실시양태에서, 본 발명은 도 5 또는 도 6에 도시된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 그의 코돈 이용도 패턴을 유지하는 단편 또는 유사체를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 도 5 또는 도 6에 도시된 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- <23> 본 발명의 두번째 측면에 따라, 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도가 고도로 발현되는 포유동물 유전자 (바람직하게는 고도로 발현되는 인간 유전자)와 유사한 HPV 아미노산 서열을 코딩하는 본 발명 첫번째 측면의 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 유도할 수 있고, 또한 이 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 이 벡터는 박테리아, 곤충 또는 포유동물 세포에서, 특히 인간 세포에서 이중 DNA의 발현을 유도하는 데 적합할 수 있다. 한 실시양태에서, 발현 벡터는 p7313PLc (도 7)이다.
- <24> 본 발명의 세번째 측면에 따라, 본 발명 첫번째 측면의 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 본 발명 두번째 측면의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 숙주 세포는 박테리아, 예를 들어 이. 콜라이; 포유동물, 예를 들어 인간일 수도 있고, 또는 곤충 세포일 수도 있다. 본 발명에 따른 벡터를 포함하는 포유동물 세포는 시험관 내 형질감염된 배양 세포일 수도 있고, 또는 벡터를 포유동물에 투여함으로써 생체내 형질감염될 수도 있다.
- <25> 네번째 측면에서, 본 발명은 본 발명 첫번째 측면의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 이 조성물이 본 발명 두번째 측면의 DNA 벡터를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이 조성물은 HPV 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩하는 벡터가 포함된 DNA로 코딩된 다수의 입자, 바람직하게는 금 입자를 포함하며, 여기서 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도 패턴은 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 패턴, 특히 인간 유전자의 패턴과 유사하다. 다른 실시양태에서, 이 조성물은 제약상 허용되는 부형제 및 본 발명 두번째 측면의 DNA 벡터를 포함한다. 이 조성물은 또한 보조제를 포함할 수도 있다.
- <26> 다른 측면에서, 본 발명은 야생형 HPV 뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도 패턴을 변화시키거나 합성에 의해 폴리뉴클레오티드 서열을 생성하여, 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 것과 유사한 코돈 이용도 패턴을 가지며 야생형 HPV 아미노산 서열 또는 돌연변이화 HPV 아미노산 서열 (폴리펩티드가 지닌 1가지 이상의 천연 기능을 불활성화시키기에 충분한 아미노산 변화를 갖는 야생형 서열을 포함함)을 코딩하는 서열을 생성하는 단계를 포함하는, 제약 조성물의 제조 방법을 제공한다.

- <27> 또한, 본 발명 첫번째 측면에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명 두번째 측면에 따른 벡터의, HPV 감염, 바람직하게는 자궁경부암, 양성 피부 사마귀 또는 성기 사마귀와 관련된 HPV 유형 또는 아형, 예를 들어 유형 1 내지 4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26 내지 29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68에 의한 감염의 치료 또는 예방에 있어서의 용도가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 본 발명 첫번째 측면에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명 두번째 측면에 따른 벡터의, 특히 자궁경부암 및 성기 사마귀와 관련된 HPV 유형 6, 11, 16, 18, 33 또는 45, 가장 바람직하게는 HPV 11, 6a 또는 6b의 감염을 치료 또는 예방함에 있어서의 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명 첫번째 측면에 따른 폴리뉴클레오티드, 본 발명 두번째 측면에 따른 벡터 또는 본 발명 네번째 측면에 따른 제약 조성물의, 피부 사마귀, 성기 사마귀, 중요도 미정의 비정형 편평 세포(ASCUS), 자궁경부 이형성증, 자궁경부 상피내 종양(CIN) 또는 자궁경부암의 치료 또는 예방에 있어서의 용도를 제공한다. 따라서, 본 발명은 본 발명 첫번째 측면에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명 두번째 측면에 따른 벡터의, HPV 유형 1 내지 4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26 내지 29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68 중 하나 이상에 의한 감염, 또는 이와 관련된 임의의 징후 또는 질환을 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조에 있어서의 용도를 제공한다.
- <28> 또한, 본 발명은 본 발명 첫번째 측면에 따른 폴리뉴클레오티드, 본 발명 두번째 측면에 따른 벡터 또는 본 발명 네번째 측면에 따른 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, HPV 감염, 특히 HPV 유형 1 내지 4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26 내지 29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68 중 하나 이상에 의한 감염, 또는 이와 관련된 임의의 징후 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 제약 조성물의 투여는 하나 이상의 개별 투여 형태, 예를 들어 "프라임-부스트(prime-boost)" 치료 백신화의 형태를 취할 수 있다. 특정한 경우, "프라임" 백신화는, 바람직하게는 플라스미드 유래의 벡터로 혼입된 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드의 입자 매개 DNA 전달을 통해 일어날 수 있고, "부스트" 백신화는 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터의 투여에 의해 일어날 수 있다.
- <29> 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에 걸쳐, "포함하는" 및 "비롯한"과 이들의 변형된 단어들은 포함의 의미로 해석해야 한다. 즉, 이들 단어는 구체적으로 인용되지 않은 다른 요소 또는 성분을 정황에 맞게 가능한 포함한다는 것을 알리려는 의도이다.
- <30> 용어 "유사체"는 본 발명의 다른 폴리뉴클레오티드와 동일한 아미노산 서열을 코딩하지만 유전자 코드의 과잉으로 인해 상이한 뉴클레오티드 서열을 가지며 동일한 코돈 이용도 패턴을 유지하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 다른 폴리펩티드의 것과 동일한 코돈 이용도 계수를 갖거나, 또는 0.1 이내의 코돈 이용도 계수, 바람직하게는 0.05 이내의 계수를 갖는 것)를 나타낸다.
- <31> 용어 "코돈 이용도 패턴"은 논의중인 뉴클레오티드 서열, 유전자 또는 유전자 부류(예를 들어, 고도로 발현되는 포유동물 유전자)에서 나타나는 모든 코돈에 대한 평균 빈도를 나타낸다. 인간을 비롯한 포유동물의 코돈 이용도 패턴은 문헌(예를 들어, 문헌 [Nakamura et. al. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215] 참조)에서 찾아볼 수 있다.
- <32> 본 발명의 폴리뉴클레오티드에서, 코돈 이용도 패턴은 통상적인 인간 파필로마 바이러스의 패턴에서 표적 생물체, 예를 들어 이. 콜라이 또는 포유동물, 특히 인간의 코돈 편향과 보다 유사하게 변화되어 있다. "코돈 이용도 계수"는 주어진 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도 패턴이 표적 종의 패턴과 얼마나 많이 유사한지를 측정하는 값이다. 코돈 빈도는 다수 중에서 고도로 발현되는 유전자에 대한 문헌(예를 들어, 문헌 [Nakamura et. al. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215] 참조)에서 찾아볼 수 있다. 61개 코돈 각각에 대한 코돈 빈도(선택된 유전자 부류의 코돈 1000개 마다 나타나는 수로 표시됨)는 20개의 천연 아미노산 각각에 대해 표준화되어 있어서, 각 아미노산에 대해 가장 빈번하게 사용된 코돈에 대한 값이 1로 설정되고 보다 덜 흔하게 사용된 코돈에 대한 빈도는 0과 1 사이로 매겨진다. 따라서, 61개 코돈 각각은 고도로 발현된 표적 종의 유전자에 대해 1 이하의 값을 지정받는다. 동일한 종에서 고도로 발현되는 유전자에 대한 특정 폴리뉴클레오티드의 코돈 이용도 계수를 계산하기 위해, 특정 폴리뉴클레오티드의 각 코돈에 매겨진 값을 기록하고, (이들 값의 자연로그의 합을 총 코돈 수로 나누고 역대수를 취함으로써) 이들 값 모두의 기하평균을 취한다. 계수는 0과 1 사이의 값을 가질 것이며, 계수가 높을수록 폴리뉴클레오티드에서 보다 빈번하게 사용되는 코돈이다. 어느 폴리뉴클레오티드 서열의 코돈 이용도 계수가 1이면, 모든 코돈이 표적 종에서 고도로 발현되는 유전자에 대해 "가장 빈번한" 코돈이다.
- <33> 보다 짧은 뉴클레오티드 서열이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 HPV 단백질의 단편을 코딩할 수 있다. 8개 이상, 예를 들어 8 내지 10개의 아미노산 또는 20, 50, 60, 70, 80,

100, 150 또는 200개 이하의 아미노산 길이를 갖는 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가, 고도로 발현되는 포유동물 유전자의 것과 유사한 코돈 이용도 패턴을 갖고 코딩된 올리고 또는 폴리펩티드가 HPV의 항원성을 나타낸다면, 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 간주된다. 특히, 유일한 것은 아니지만, 본 발명의 이러한 측면은 폴리펩티드가 완전한 HPV 단백질 서열의 단편을 코딩하고 그 단백질의 하나 이상의 별개 에피토프를 나타낼 수도 있는 경우를 포함한다.

- <34> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이. 콜라이 및 포유동물 세포에서, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 야생형의 상용 서열보다 더 높은 발현율을 나타낸다. 특정 이론에 얽매이려는 것은 아니지만, 이는 적어도 2가지 이유 때문인 것으로 생각된다. 첫째로, 숙주 세포의 것과 보다 가까운 코돈 이용도 패턴을 갖기 때문에 서열이 세포 번역 기구에 의해 보다 용이하게 프로세싱된다. 둘째로, 최대 30%의 뉴클레오티드 서열 (또는 그 이상)이 야생형 서열과 다르기 때문에 전사 또는 번역을 방해하는 부위 (예를 들어, 단백질 결합 부위)가 제거되거나 변화되었을 것이다.
- <35> 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 이. 콜라이 및 포유동물 (예를 들어, 인간) 유전자의 것과 유사한 코돈 이용도 패턴을 나타낸다. 이는 서열이 포유동물의 백신화 및 이. 콜라이를 사용한 상당량의 시험관내 항원 단백질 생성에 사용 (예를 들어, 면역분석법과 같은 분석법에 이용하여 포유동물 또는 인간 조직에서의 발현 수준을 판정하기 위해 사용)되는 경우에 특히 유리하다.
- <36> 상기 논의한 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 그러한 발현 벡터는 분자생물학 분야에서 통상적으로 제조되며, 단백질을 발현하기 위해, 예를 들어 플라스미드 DNA 및 적당한 개시 인자, 프로모터, 인핸서 및 기타 요소들 (예를 들어, 필요할 수 있으며 올바른 방향으로 위치하는 폴리아데닐화 신호)을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 명백할 것이다. 이와 관련한 다른 예로서, 본 발명자들은 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. CSH Laboratory Press. (1989)]을 언급한다.
- <37> 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명의 벡터에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에 의해 코딩 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되어 있다. 즉, 이 벡터는 발현 벡터이다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은 설명된 성분들이 상호작용하여 의도된 방식으로 기능할 수 있도록 병렬 배치된 것을 나타낸다. 코딩 서열에 "작동 가능하게 연결된" 프로모터와 같은 조절 서열은, 조절 서열과 조화를 이루는 조건하에서 코딩 서열의 발현이 달성되도록 위치하고 있다.
- <38> 벡터는, 예를 들어 복제 기점, 임의로 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터 및 임의로 프로모터의 조절 인자가 제공된 플라스미드, 인공 염색체 (예를 들어, BAC, PAC, YAC), 바이러스 또는 파지 벡터일 수 있다. 벡터는, 1종 이상의 선별가능 마커, 예를 들어 박테리아 플라스미드의 경우 앰피실린 또는 카나마이신 내성 유전자, 또는 진균류 벡터를 위한 내성 유전자를 함유할 수 있다. 벡터는 시험관내에서, 예를 들어 DNA 또는 RNA의 제조를 위해 사용되거나, 또는 벡터에 의해 코딩된 단백질의 생성을 위해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물 숙주 세포의 형질감염 또는 형질전환에 사용될 수 있다. 또한, 벡터는 생체내에서, 예를 들어 DNA 백신화 또는 유전자 치료의 방법에 사용되도록 채택될 수도 있다.
- <39> 프로모터 및 다른 발현 조절 신호는 발현하고자 하는 숙주 세포에 적합하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 포유동물 프로모터에는 카드뮴과 같은 중금속에 반응하여 유도될 수 있는 메탈로티오네인 프로모터, 및 β -액틴 프로모터가 포함된다. 또한, SV40의 큰 T 항원 프로모터, 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 (IE) 프로모터, 라우스 육종 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 프로모터, 또는 HPV 프로모터, 특히 HPV 상류 조절 영역 (URR)과 같은 바이러스 프로모터들도 사용될 수 있다. 이들 모든 프로모터는 당업계에 잘 설명되어 있으며, 용이하게 입수할 수 있다.
- <40> 적합한 바이러스 벡터의 예에는 허피스 심플렉스 바이러스 벡터, 백시니아 또는 알파-바이러스 벡터 및 레트로바이러스 (렌티바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 포함) 벡터가 포함된다. 이들 바이러스를 이용한 유전자 전달 기술은 당업자들에게 공지되어 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는, 그러한 재조합이 바람직하지는 않지만 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 숙주의 게놈 내에 안정하게 통합시키는 데 사용할 수 있다. 이와 반대로, 복제-결합 아데노바이러스 벡터는 에피솜으로 남아있기 때문에 일시적 발현을 가능하게 한다. 곤충 세포에서 (예를 들어, 배칼로바이러스 벡터), 인간 세포에서 또는 박테리아에서 발현을 유도할 수 있는 벡터가 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 HPV 단백질을, 예를 들어 서브유닛 백신으로서 사용하거나 면역분석법에 사용하기 위한 소정의 양으로 생산하는 데 사용될 수 있다.

- <41> 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 코딩된 단백질의 발현에 의한 생산에 유용하며, 발현은 시험관내에서, 생체 내에서 또는 생체외에서 일어날 수 있다. 따라서, 이 뉴클레오티드는 수율을 증가시키기 위해 재조합 단백질 합성에 포함될 수도 있고, 또는 DNA 백신화 기술에 사용되어 본래의 특성으로 치료제로서 유용할 수도 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 코딩된 단백질의 시험관내 또는 생체의 생산에 사용되는 경우, 예를 들어 세포 배양액 중의 세포는 발현될 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형될 것이다. 그러한 세포에는 일시적인, 또는 바람직하게는 안정한 포유동물 세포주가 포함된다. 본 발명에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 벡터의 삽입에 의해 변형될 수 있는 세포의 특정 예에는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, 293 및 COS 세포가 포함된다. 바람직하게는, 선택된 세포주가 안정할 뿐만 아니라, 폴리펩티드의 성숙 글리코실화 및 세포 표면 발현을 가능하게 하는 것이다. 발현은 형질전환된 난세포에서 달성될 수도 있다. 폴리펩티드는 본 발명의 폴리뉴클레오티드로부터 트랜스제닉 (transgenic) 비-인간 동물, 바람직하게는 생쥐의 세포에서 발현될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드로부터 폴리펩티드를 발현하는 트랜스제닉 비-인간 동물은 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- <42> 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 DNA 백신화 등에서 치료제로 유용한 경우, 이 핵산은 백신화될 포유동물, 예를 들어 인간에게 투여될 것이다. RNA 또는 DNA와 같은 핵산, 바람직하게는 DNA는 상기 설명한 바와 같이 벡터의 형태로 제공되며, 포유동물의 세포에서 발현될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 가능한 기술에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 주사, 바람직하게는 피부내 주사, 피하 주사 또는 근육내 주사에 의해 도입될 수 있다. 별법으로, 핵산은 입자-매개의 DNA 전달 장치 (PMDD)와 같은 핵산 전달 장치를 이용하여 직접 피부내로 전달될 수 있다. 이 방법에서, 불활성 입자 (예를 들어, 금 비드)를 핵산으로 코팅하고, 예를 들어 발사 장치로부터 고압하의 방출에 의해 수용자의 표면 (예를 들어, 피부)을 통과할 수 있을만큼 충분한 속도로 가속화한다. 본 발명의 핵산 분자로 코딩된 입자는 그러한 입자가 로딩된 전달 장치와 마찬가지로 본 발명의 범위 내에 있다. 조성물은 바람직하게는 평균 직경이 0.5 내지 5 μm , 바람직하게는 약 2 μm 인 금 입자를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 코딩된 금 비드는 카트리지로써 작용하는 튜빙 내에, 각 카트리지가 0.1 내지 5 μg , 바람직하게는 약 0.5 μg DNA/카트리지가 코딩된 금 0.1 내지 1 mg, 바람직하게는 0.5 mg을 함유하도록 로딩된다.
- <43> 미가공 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 환자 내에 도입하기 위해 적합한 기술에는 적당한 비히클과 함께 국소 투여하는 것이 포함된다. 핵산은, 예를 들어 비강내 투여, 경구 투여, 질내 투여 또는 직장내 투여에 의해 피부에 또는 점막 표면에 국소 투여될 수 있다. 미가공 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 제약상 허용되는 부형제, 예를 들어 인산염 완충 염수 (PBS)와 함께 존재할 수 있다. DNA 흡수는 부피바카인과 같은 촉진제를 별도로 또는 DNA 제제 내에 포함시켜 사용함으로써 추가로 용이해질 수 있다. 핵산을 수용자에게 직접 투여하는 다른 방법에는 초음파, 전기 자극, 전기천공법 및 마이크로시딩 (microseeding)(미국 특허 제5,697,901호에 기재됨)이 포함된다.
- <44> 핵산 작제물의 흡수는 여러가지 공지의 형질감염 기술, 예를 들어 형질감염제의 사용을 포함하는 기술에 의해 증진될 수 있다. 그러한 형질감염제의 예에는 양이온제, 예를 들어 인산칼슘 및 DEAE-텍스트란, 및 지질활성제, 예를 들어 리포펙탐 및 트랜스펙탐이 포함된다. 투여될 핵산의 투여량은 변화될 수 있다. 통상, 핵산은 입자 매개의 유전자 전달을 위한 핵산의 경우 1 pg 내지 1 mg 범위의 양으로, 바람직하게는 1 pg 내지 10 μg 범위의 양으로 투여되며, 다른 경로의 경우 10 μg 내지 1 mg 범위의 양으로 투여된다.
- <45> 또한, 본 발명의 핵산 서열은 유전자 치료법에 유용한 특정 전달 벡터에 의해 투여될 수도 있다. 유전자 치료법은, 예를 들어 문헌 [Verme et al, Nature 1997, 389:239-242]에 논의되어 있다. 바이러스성 및 비-바이러스성 벡터 시스템 둘 다 사용될 수 있다. 바이러스 기체의 시스템에는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 허피스 바이러스, 카나리폭스 (Canarypox) 바이러스 및 백시니아 바이러스 기체의 시스템이 포함된다. 비-바이러스 기체의 시스템에는 핵산의 직접 투여, 마이크로스피어 캡슐화 기술 (폴리(락티드-코-글리콜리드) 및 리포솜-기체 시스템이 포함된다. 최초 백신화 이후에 부스터 (booster) 주입이 바람직한 경우, 예를 들어 플라스미드와 같은 비-바이러스성 벡터를 사용하여 최초의 "프라이머" DNA 백신화 이후에 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 기체 시스템을 사용하여 1회 이상 "부스터" 백신화하는 경우, 바이러스성 전달 시스템과 비-바이러스성 전달 시스템을 함께 병용할 수 있다.
- <46> 또한, 본 발명의 핵산 서열은 형질전환 세포에 의해 투여될 수 있다. 그러한 세포에는 대상체에서 수확한 세포들이 포함된다. 본 발명의 미가공 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 시험관내에서 그러한 세포에 도입될 수 있고, 그러한 형질전환 세포를 그 후에 대상체로 복귀시킬 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상동성 재조합에 의해 세포에 기존에 존재하는 핵산 내로 통합될 수 있다. 필요한 경우, 형질전환된 세포는 시험관내에서 배양될 수 있고, 결과의 세포들 중 하나 이상을 본 발명에 사용할 수 있다. 세포는 공지의 수술 또는 미세수술 기

술 (예를 들어, 이식, 미세주입 등)을 이용하여 환자의 적당한 부위에 제공될 수 있다.

- <47> 적합한 세포에는 항원 표출 세포 (APC), 예를 들어 수상 세포 (dendritic cell), 대식 세포, B 세포, 단핵 세포, 및 효율적인 APC로 유전자 조작될 수 있는 다른 세포들이 포함된다. 그러한 세포들은, 반드시 그럴 필요는 없지만, 일반적으로 항원 표출능이 증가되도록 변형되어, T 세포 반응의 활성화 및(또는) 유지 능력을 향상시키고 그 자체의 항-종양 효과 (예를 들어, 자궁경부암 방지 효과)를 가지며(가지거나) 수용자에게 면역학적으로 적합 (즉, 조화로운 HLA 반수체형)하게 된다. APC는 일반적으로 종양 및 종양 주변 조직을 비롯한 다양한 생물학적 유체 및 기관으로부터 단리할 수 있으며, 자가이식, 타가이식, 순계 또는 이종이식 세포일 수 있다.
- <48> 본 발명의 특정 바람직한 실시양태는 수상 세포 또는 그의 조상 세포를 시험관내 형질전환 또는 환자로의 복귀를 위한 항원 표출 세포로서 사용하거나, 또는 입자 매개의 DNA 전달 등에 의해 백신 중에 전달된 뉴클레오티드의 생체내 표적으로서 사용한다. 수상 세포는 매우 효과적인 APC이고 (Banchereau and Steinman, Nature 392:245-251, 1998), 예방 또는 치료 목적의 항-종양 면역성을 도출하기 위한 생리적 보조제로서 효과적인 것으로 입증되었다 (Timmerman and Levy, Ann. Rev. Med. 50:507-529, 1999). 일반적으로, 수상 세포는 그들의 통상적인 형태 (원래 위치에서는 방사형이며, 시험관내에서는 세포질 돌기 (수상 돌기)가 보임), 항원을 높은 효율로 흡수, 프로세싱 및 표출하는 이들 세포의 능력, 및 원시 T 세포 반응을 활성화시키는 이들의 능력에 기초하여 확인할 수 있다. 수상 세포는 물론, 수상 세포에서 흔하게 발견되지 않는 특이적 세포-표면 수용체 또는 리간드, 예를 들어 본 발명의 작제물에서 코딩되는 항원(들)을 시험관내 또는 생체외에서 발현하도록 유전자 조작될 수 있으며, 그러한 변형된 수상 세포는 본 발명의 범위 내에서 고려된다. 수상 세포에 대한 대안으로서, 분비된 소낭 항원-로딩된 수상 세포 (엑소좀 (exosome)으로 언급)가 백신 내에서 사용될 수 있다 (Zitvogel et al., Nature Med. 4:594-600, 1998).
- <49> 수상 세포 및 그 조상은 말초 혈액, 골수, 종양-침윤 세포, 종양 주변 조직-침윤 세포, 림프절, 비장, 피부, 탯줄 혈액, 또는 임의의 적합한 기타 조직 또는 유체로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 수상 세포는 GM-CSF, IL-4, IL-13 및(또는) TNF와 같은 사이토카인의 조합을 첨가함으로써 말초 혈액에서 수확한 단핵 세포의 배양액으로 생체외에서 분화될 수 있다. 별법으로, 말초 혈액, 탯줄 혈액 또는 골수로부터 수확한 CD34+ 세포는 배양 배지에 GM-CSF, IL-3, TNF, CD40 리간드, 리포폴리사카라이드 LPS, flt3 리간드 (전문적인 항원 표출 세포, 특히 수상 세포의 생성에 중요한 사이토카인), 및(또는) 수상 세포의 분화, 성숙 및 증식을 유도하는 다른 성분(들)을 첨가함으로써 수상 세포로 분화될 수 있다.
- <50> APC는 일반적으로 항원성 HPV 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 본 발명의 코돈-최적화 폴리뉴클레오티드로 형질감염될 수 있다. 그러한 형질감염은 생체외에서 발생할 수 있으며, 그러한 형질감염 세포를 포함하는 조성물 또는 백신은 그 후에 본원에 기재된 바와 같이 치료 목적으로 사용될 수 있다. 별법으로, 수상 세포 또는 다른 항원 표출 세포를 표적으로 하는 유전자 전달 비히클을 환자에 투여하여, 형질감염이 생체내에서 발생하도록 할 수 있다. 예를 들어, 수상 세포의 생체내 및 생체외 형질감염은 W097/24447에 기재된 바와 같은 당업계 공지 방법에 의해 수행할 수도 있고, 또는 문헌 [Mahvi et al., Immunology and Cell Biology 75:456-460, 1997]에 기재된 바와 같은 입자 매개의 방법에 의해 수행할 수도 있다.
- <51> 백신 및 제약 조성물은 단일 투여 용기 또는 다중 투여 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 또는 바이알에 존재할 수 있다. 그러한 용기는 바람직하게는 밀봉되어 사용할 때까지 제제의 멸균성을 보존한다. 일반적으로, 제제는 오일성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전으로 보관될 수 있다. 별법으로, 백신 또는 제약 조성물은 사용 직전에 멸균 액체 담체를 첨가하기만 하면 되는 동결 건조 조건으로 보관될 수 있다. 입자 매개의 전달을 통해 투여하고자 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 백신은 압착 가스 전달 기구로 사용하기 적합한 카트리지를 만들어질 수 있으며, 이러한 경우에 카트리지는 내부 표면이 백신 뉴클레오티드 서열 및 임의로 제약상 허용되는 다른 성분을 포함하는 입자로 코팅된 중공 튜브로 이루어질 수 있다.
- <52> 본 발명의 제약 조성물은 보조제 화합물, 또는 DNA에 의해 코딩된 단백질에 의해 유도되는 면역 반응을 조절하거나 증가시키는 작용을 할 수 있는 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 서로 별개로 또는 항원과의 융합체로서 DNA에 의해 코딩될 수도, 또는 제제 중의 비-DNA 성분으로서 포함될 수도 있다. 본 발명의 제제에 포함될 수 있는 보조제 유형의 물질의 예에는 유비퀴틴, 리소좀 결합 막 단백질 (LAMP), B형 간염 바이러스 코어 항원, flt3-리간드 및 다른 사이토카인, 예를 들어 IFN- γ 및 GM-CSF가 포함된다.
- <53> 다른 적합한 보조제는 상업적으로 시판되고 있으며, 그 예로는 프로인트 불완전 보조제 및 완전 보조제 (Difco Laboratories, Detroit, MI); 이미퀴모드 (3M, St. Paul, MN); 레시미퀴모드 (3M, St. Paul, MN); 머크 아주반트 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); 수산화알루미늄

늄 겔 (alum) 또는 인산알루미늄과 같은 알루미늄염; 칼슘, 철, 아연의 염; 아실화 티로신의 불용성 현탁액; 아실화 당; 양이온성 또는 음이온성으로 유도체화된 다당류; 폴리포스파젠; 생분해성 마이크로스피어; 모노포스포릴 지질 A 및 퀴일 (quil) A가 있다. GM-CSF 또는 인터루킨-2, -7 또는 -12와 같은 사이토카인도 보조제로서 사용될 수 있다.

<54> 본 발명의 제제에 있어서, 보조제 조성물은 Th1 유형의 면역 반응을 우세하게 유도하는 것이 바람직하다. 따라서, 보조제는 DNA 코딩 항원에 반응하여 Th2 면역 반응을 우세하게 조절하는 것에서부터 Th1 유형의 면역 반응을 우세하게 조절하는 것까지의 작용을 할 수 있다. 높은 농도의 Th1-유형 사이토카인 (예를 들어, IFN, TNF, IL-2 및 IL-12)은 투여된 항원에 대해 세포 매개의 면역 반응을 우세하게 유도하는 경향이 있다. 우세하게 Th1-유형의 반응이 유도되는 바람직한 실시양태에서, Th1-유형 사이토카인의 양은 Th2-유형 사이토카인의 양보다 더 많게 증가될 것이다. 이들 사이토카인의 양은 표준 분석법을 이용하여 용이하게 측정할 수 있다. 사이토카인의 측에 대한 고찰을 위해서는 문헌 [Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989]을 참조한다.

<55> 따라서, Th1-유형의 반응을 우세하게 도출하는 데 사용하기 적합한 보조제에는, 예를 들어 모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 3-테-O-아실화 모노포스포릴 지질 A (SD-MPL)와 알루미늄염의 조합이 포함된다. Th1 유형의 면역 반응을 우세하게 유도하는 다른 공지의 보조제에는 CpG 함유 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 이 올리고뉴클레오티드는 CpG 디뉴클레오티드가 메틸화되지 않았다는 특징이 있다. 그러한 올리고뉴클레오티드는 공지되어 있으며, 예를 들어 W096/02555호에 기재되어 있다. 면역 자극성 DNA 서열도, 예를 들어 문헌 [Sato et al., Science 273:352, 1996]에 기재되어 있다. CpG 함유 올리고뉴클레오티드는 동일하거나 상이한 폴리뉴클레오티드 작제물 내에서 과필로마 항원(들)과 별개로 코딩될 수도 있고, 또는 바로 인접한 융합체 동일 수도 있다. 별법으로, CpG 함유 올리고뉴클레오티드는 별도로, 즉 코딩된 항원을 포함하는 조성물의 일부가 아닌 채로 투여될 수 있다. CpG 올리고뉴클레오티드는 단독으로, 또는 다른 보조제와의 조합 제제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 증진된 시스템은 CpG 함유 올리고뉴클레오티드와 사포닌 유도체의 조합 제제, 특히 W000/09159호 및 W000/62800호에 기재된 바와 같은 CpG와 QS21의 조합 제제를 포함한다. 바람직하게는, 제제가 수중유 에멀전 및(또는) 토크페를을 추가적으로 포함한다.

<56> 다른 바람직한 보조제로는 사포닌, 바람직하게는 QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)이 있으며, 이는 단독으로 또는 다른 보조제와의 조합 제제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 증진된 시스템은 모노포스포릴 지질 A와 사포닌 유도체의 조합 제제, 예를 들어 W091/00153호에 기재된 바와 같은 QS21과 3D-MPL의 조합 제제, 또는 W096/33739호에 기재된 바와 같이 QS21이 콜레스테롤로 켄칭된 반응성이 낮은 조성물을 포함한다. 다른 바람직한 제제는 수중유 에멀전 및 토크페를을 포함한다. QS21, 3D-MPL 및 토크페를을 수중유 에멀전에 포함하는 특히 효과적인 보조제 제제는 W095/17210호에 기재되어 있다.

<57> 다른 바람직한 보조제에는 몬타니드 (Montanide) ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CLS), MF-59 (Chiron), Detox (Ribi, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) 및 다른 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트 (AGP)가 포함된다.

<58> 다른 바람직한 보조제에는 하기 화학식 (I)의 보조제 분자가 포함된다.

화학식 I

<59> $HO(CH_2CH_2O)_n-A-R$

<60> 상기 식에서, n은 1 내지 50이고, A는 결합 또는 -C(O)-이고, R은 C₁₋₅₀ 알킬 또는 페닐 C₁₋₅₀ 알킬이다.

<61> 본 발명의 한 실시양태는 화학식 (I)의 폴리옥시에틸렌 에테르 (n은 1 내지 50, 바람직하게는 4 내지 24, 가장 바람직하게는 9이고; R 성분은 C₁₋₅₀ 알킬, 바람직하게는 C₄₋₂₀ 알킬, 가장 바람직하게는 C₁₂ 알킬이며; A는 결합임)를 포함하는 제제로 구성된다. 폴리옥시에틸렌 에테르의 농도는 0.1 내지 20%, 바람직하게는 0.1 내지 10%, 가장 바람직하게는 0.1 내지 1%이어야 한다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 에테르는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-9-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-8-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-35-라우릴 에테르 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르로 이루어진 군으로부터 선택된다. 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르와 같은 폴리옥시에틸렌 에테르는 머크 인덱스 (Merck index; 12판: 연번 7717)에 기재되어 있다. 이들 보조제 분자는 W099/52549호에 기재되어 있다. 화학식 (I)에 따른 폴리옥시에틸렌 에테르는 필요한 경우에 다른 보조제와 조합될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 보조제 조합 제제는 계류중인

영국 특허 출원 9820956.2호에 기재된 바와 같은 CpG와의 조합 제제이다.

- <62> 백신이 보조제를 포함하는 경우, 백신 제제는 2 부분으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항원을 코딩하는 뉴클레오티드 작제물을 함유하는 제제 부분을 피하 주사 또는 근육내 주사, 또는 피부내 입자-매개 전달에 의해 먼저 투여한 후, 보조제를 함유하는 제제 부분을 즉시 또는 적당한 시간 후에 (이는 백신 분야의 숙련자에게 명백할 것임) 투여할 수 있다. 이러한 조건하에서, 보조제는 항원 제제와 동일한 경로에 의해 또는 다른 경로에 의해 투여할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제제의 보조제 부분은 항원 부분의 투여 전에 투여할 수 있다. 한 실시양태에서는, 입자 매개의 전달 전이나 후에, 보조제를 국소 제제로서 피부 중에서 항원(들)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 입자 매개 전달 부위에 도포한다.
- <63> 하기 실시예는 하기 도면을 참고로 본 발명의 보다 상세히 설명하기 위한 것이다.

실시예

- <75> <실시예 1> HPV 6b E1의 코돈 최적화
- <76> 진뱅크로부터 얻은 HPV 6b E1의 야생형 원형 아미노산 서열은 도 1 (아래쪽 서열)에 기재되어 있다. 이 도면은 유형 11, 6a 및 6b의 HPV 바이러스 원형 서열들 사이에서 이들 단백질의 높은 상동성을 보여준다. 이와 유사하게, 도 3에는 HPV 11, 6a 및 6b에 대한 야생형 원형 아미노산 서열이 기재되어 있다. HPV 6b 서열을 사용한 면역 치료법 (치료 백신)은 교차반응하여 모든 3가지 바이러스 유형에 대해 예방적 또는 치료적 면역 반응을 제공할 것으로 기대된다.
- <77> HPV 6b E1 서열의 코돈 이용도를 고도로 발현되는 인간 및 이. 콜라이의 것과 비교하여, 이 두 종들에 대해 코돈 이용도 계수가 높지 않음을 알아냈다. 단순히 각 아미노산 잔기에 대해 가장 빈번한 코돈을 사용하는 것은, 주어진 아미노산에 대해 가장 바람직한 코돈을 독점적으로 사용하는 생물체는 없기 때문에 불균등한 코돈 이용도 패턴을 초래할 것이다. 결국, 코돈은 통계적 방법을 이용하여 지정함으로써 자연적으로 고도로 발현되는 이. 콜라이 및 인간 유전자에서 발견되는 것과 보다 가까운 코돈 빈도를 갖는 합성 유전자를 얻어야 한다.
- <78> 합성 유전자의 코돈은 문헌 [R. S. Hale and G Thompson, Protein Expression and Purification Vol. 12 pp.185-188 (1998)]에 기재되고 칼크진 (Calcgene)이라 불리우는 비주얼 베이직 (Visual Basic) 프로그램을 이용하여 지정하였다. 원래 서열의 각 아미노산 잔기에 대해, 코돈은 고도로 발현되는 이. 콜라이 유전자에서 나타나는 확률에 기초하여 지정하였다. 마이크로소프트 윈도우 3.1에서 구동되는 상기 프로그램에 대한 세부 사항은 저작권자로부터 얻을 수 있다. 이 프로그램은 통계적 방법을 이용하여 합성 유전자에 코돈을 지정하기 때문에, 결과의 코돈 모두가 표적 생물체에서 가장 빈번하게 사용되는 것은 아니다. 오히려, 표적 생물체에서 빈번하게 그리고 빈번하지 않게 사용되는 코돈의 비율은 코돈을 올바른 비율로 지정함으로써 합성 서열에 반영된다. 그러나, 서열의 특정 위치에 특정 코돈을 지정하는 엄중한 규칙은 없기 때문에, 프로그램을 구동할 때마다 상이한 합성 유전자가 생성될 것이다 - 각각의 합성 유전자는 동일한 코돈 이용도 패턴을 가질 것이며 동일한 아미노산 서열을 코딩할 것이다. 이 프로그램이 주어진 아미노산 서열 및 주어진 표적 생물체에 대해 여러번 구동된다면, 수, 제한 부위의 유형 및 위치, 인트론 스플라이스 신호 등이 다를 수 있는 여러가지 상이한 뉴클레오티드 서열이 생성될 것이며, 이들 중 일부는 바람직하지 않을 수도 있다. 당업자는 이들 특징에 기초하여 폴리펩티드의 발현에 사용하기 적당한 서열을 선택할 수 있을 것이다.
- <79> 더욱이, 코돈은 통계에 기초하여 무작위적으로 지정되기 때문에, (아마도 그럴 가능성은 낮지만) 표적 생물체에서 비교적 드물게 사용되는 2개 이상의 코돈이 가까이 근접하여 클러스터링될 수 있다. 그러한 클러스터는 면역 기구를 무능화시켜 매우 낮은 발현율을 초래할 것으로 믿어지며, 따라서 최적화 유전자에서 코돈을 선택하는 연산법은, 임의의 드문 코돈 클러스터가 우연하게 선택되는 것을 방지하기 위해 고도로 발현되는 유전자에 대한 RSCU값이 0.2 미만인 모든 코돈을 배제한다. 그 후, 남아있는 코돈의 분포를 고도로 발현되는 이. 콜라이 유전자에 대한 빈도에 따라 배분하여, 이. 콜라이 유전자의 것과 유사한 (계수 = 0.85), 그리고 고도로 발현되는 인간 유전자의 것과 유사한 (계수 = 0.50) 합성 유전자 내의 전체 분포를 얻는다. 칼크진 프로그램의 개정 버전으로 드문 코돈을 옵션으로 배제하는 신진 (Syngene; Peter Ertl, 비공개)을 이용하여 고도로 발현되는 인간 유전자의 코돈 빈도 패턴에 따라 코돈을 배분한 것을 제외하고, 유사한 방법을 이용하여 HPV 11 E2에 대한 코돈 최적화 뉴클레오티드 서열을 얻었다. E1에 대한 코돈 지정과는 달리, 드문 코돈을 배제하지 않았다. 동시에, 하기 설명하는 바와 같이 K111A 아미노산 변화를 코딩하도록 올리고뉴클레오티드 1개를 변화시켰다.
- <80> 돌연변이를 코돈 최적화 E1 및 E2에 도입하여 E1 (K83G 및 G483D) 및 E2 (K111A) 아미노산 서열에서 점 돌연변이를 일으켰다. 돌연변이 유전자의 아미노산 서열은 (야생형 원형 서열과 정렬된 채로) 도 2 (HPV6bE1) 및 도

4 (HPV6bE2 및 HPV11E2)에 도시되어 있다. HPV 6b E1에 대한 코돈 최적화 뉴클레오티드 서열 및 돌연변이 뉴클레오티드 서열은 도 5에 도시되어 있다. HPV 11 E2에 대한 코돈 최적화 뉴클레오티드 서열 및 돌연변이 뉴클레오티드 서열은 도 6에 도시되어 있다. 도 4에서, 코돈 최적화 및 돌연변이 HPV11E2 유전자의 발현에 의해 얻은 폴리펩티드의 아미노산 서열은, 뉴클레오티드 서열의 코돈 최적화가 코딩되는 아미노산 (돌연변이화 야생형 서열과 동일함)을 변화시키지 않음을 보여주기 위해 원형 야생형 및 돌연변이화 야생형 서열과 정렬된 채로 제시되어 있다.

<81> <실시예 2> 코돈 최적화 HPV 6b E1 폴리뉴클레오티드 서열의 작제

<82> 유전자 고안:

<83> 상기 논의한 최적화 소프트웨어를 이용하여, 증첩되는 40 mer 올리고뉴클레오티드를 최적화 서열로부터 연산하였다. 제한 부위를 함유하는 말단 올리고뉴클레오티드는 60 mer였다. 이 올리고뉴클레오티드를 50 nmol 농도, 탈보호 및 비-인산화된 상태로 라이프 테크놀로지스사 (Life Technologies Ltd)에 주문하였다.

<84> 올리고뉴클레오티드 어셈블리:

<85> 각 올리고뉴클레오티드를 2차 증류수에 최종 농도 100 μM로 용해하고, 동일한 혼합물을 모든 96개 올리고뉴클레오티드에 대해 100 μM로 준비하였다. 합성은 로슈 뵈링거사 (Roche Boehringer)의 Pwo 중합효소 (Cat No. 1 644 955)를 사용하여 아래와 같이 설정하였다.

<86> 2차 증류수 86 μl

<87> Pwo 10X 완충액 10 μl

<88> dNTP 혼합물 1 μl (100 mM dNTP의 동일 혼합물)

<89> 올리고 혼합물 1 μl (100 μM 올리고의 동일 혼합물)

<90> Pwo 중합효소 2 μl

<91> 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 상기 반응 혼합물로 하기 조건을 이용하여 트리오 써모블록 (Trio Thermoblock; Biometra)에서 수행하였다.

<92> 1. 40°C 2분

<93> 2. 72°C 10초

<94> 3. 94°C 15초

<95> 4. 40°C 30초

<96> 5. 72°C 20초 + 주기당 2초

<97> 6. 4°C 무한대

<98> 단계 3과 5 사이의 주기를 25회 반복하였다.

<99> 25 주기를 완료한 후, 10 μl 분취액을 각 튜브로부터 꺼내어 0.8% 트리스 아세테이트 (TAE) 아가로스 겔에서 러닝하여 장파장 UV광 하에서 관찰하였다. 합성된 E1 DNA의 예상된 크기는 대략 2 kb였다.

<100> 유전자 회수:

<101> 합성 유전자를, 합성 올리고의 N 말단에 Not I 제한 부위를 함유하고 합성 올리고의 C 말단에 BamH I 부위를 함유하는 2개의 말단 올리고를 사용한 PCR에 의해 회수하였다.

<102> 2차 증류수 65 μl

<103> Pwo 10X 완충액 10 μl

<104> dNTP 혼합물 1 μl (100 mM dNTP의 동일 혼합물)

<105> 어셈블리 혼합물 20 μl (이전 PCR로부터)

<106> N 말단 올리고 1 μl (100 μM)

- <107> C 말단 올리고 1 μ l (100 μ M)
- <108> Pwo 중합효소 2 μ l
- <109> 1. 94°C 45초
- <110> 2. 72°C 2분 + 500 bp당 1분
- <111> 3. 72°C 10분
- <112> 4. 4°C 무한대
- <113> 단계 2과 1 사이의 주기를 25회 반복하였다.
- <114> 그 후에 PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen Cat No. 28104)로 정제한 후, DNA를 총 50 μ l의 키트 용출 완충액 중에 재현탁하였다. 10 μ l의 분취액을 Not I 및 BamH I 제한 효소 (Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, Scotland)로 37°C에서 2시간 동안 분해하였다. 이 분해물을 0.8% TAE 아가로스 겔에서 겔 정제하여 2 kb의 DNA 생성물을 잘라낸 후, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen Cat No. 28704)로 추출하였다. 최종 분해된 순수한 DNA 단편을 총 50 μ l의 키트 용출 완충액으로 용출하였다.
- <115> PCR 단편을 벡터 p7313PLc (도 7; Powderject Vaccines Inc., 세부 사항은 하기 참조)로 클로닝하여 수용성 JM109 세포 (Promega Cat No. P9751)에 형질전환시켰다. 선택된 클론으로부터의 플라스미드 DNA를 Nco I-BamH I 및 Nco I-EcoR I 으로 분해하여 제한효소 검사를 수행하였다. 2 kb의 단편 삽입체를 가진 올바른 클론 5개를 선별하여, 삽입체 DNA를 서열분석하였다. 단지 3개의 점 돌연변이만을 함유하는 삽입체를 가진 클론 1개를 이후에 사용하기 위해 선택하였다. 3개의 점 돌연변이는 다른 클론으로부터의 작은 상동성 단편을 사용한 라이게이션 교환에 의해 교정하였다.
- <116> 교정된 클론을 제한효소 분해에 의해 다시 검사하고, 삽입체 DNA를 완전히 서열분석하였다. 이 클론을 p6bE1c/o라 명명하였다. 동시에, 그리고 비교 발현 및 면역화 연구를 위해, 야생형 HPV-6b E1 유전자 및 야생형 HPV-11 E1 유전자를 HPV-6b의 계놈 클론 (EMBO J., 2(12) 2314-2318, 1983)으로부터 PCR 증폭하고, 각각의 단편을 Not I-BamH I 으로 분해된 벡터 p7313PLc에 클로닝하였다. 이들 클론을 각각 p6bE1w/t 및 p11E1w/t라 명명하였다.
- <117> 클론 p6bE1c/o 및 p6bE1w/t의 E1 유전자를 더 돌연변이화시켜 아미노산 변화 K83G, R84G 및 G438D를 도입하였다. 원하는 돌연변이를 도입하기 위해 뉴클레오티드가 치환되도록 고안된, 서열분석된 조화로운 3' 및 5' 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여, 퀵체인지 (Quick-Change) 부위-지정 돌연변이 유발 키트 (Stratagene Cat No. 200518)에 기재된 방법에 의해 다른 키트 시약으로 PCR 반응을 수행하였다. 돌연변이 p6bE1c/o 및 p6bE1w/t 클론을 각각 p6bE1c/o mut 및 p6bE1w/t mut라 명명하였다.
- <118> <실시에 3> 코돈 최적화 HPV 11 E2 폴리뉴클레오티드 서열의 작제
- <119> E2 코돈 최적화 유전자의 고안, 어셈블리 및 회수는 상기 E1에 대해 기재한 바와 같이 수행하였지만, 중첩 올리고뉴클레오티드는 그 길이가 40 mer가 아니라 60 mer였으며 18개의 뉴클레오티드가 중첩되었다. E1의 방법과는 달리, 2개의 적당한 야생형 서열 올리고뉴클레오티드를 K111A 변화의 생성에 필요한 뉴클레오티드 치환을 포함하는 2개의 60 mer 올리고뉴클레오티드로 치환함으로써, K111A 아미노산 돌연변이를 함유하는 클론을 코돈 최적화 E2 유전자 클론과 동시에 생성하였다.
- <120> 플라스미드 p7313-PLc의 조성
- <121> 이 플라스미드는 pUC19 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, HP7 9NA로부터 입수 가능)의 Eam1105I-Pst I 단편을 함유하는 베타-락타마제 유전자를 카나마이신 내성 유전자를 함유하는 pUC4K (Amersham-Pharmacia)의 EcoR I 단편으로 치환한 후, T4 DNA 중합효소를 사용하여 양 단편을 평활 말단으로 만들어서 작제하였다. 인간 사이토메갈로바이러스 IE1 프로모터/인핸서, 인트론 A는 메사추세츠 대학의 로빈슨 박사 (Dr. Harriet Robinson)로부터 얻은 플라스미드 JW4303에서 유래하였으며, Xho I-Sal I 단편으로서 pUC19의 Sal I 부위에 삽입하여 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호를 혼입시켰다. 프로모터로부터의 5' Sal I-Ban I 단편을 제거하여 벡터에 사용된 최소 프로모터를 생성하였다 (W000/23592호 - Powderject Vaccines Inc.). HBV 표면 항원 3' UTR은 벡터 pAM6 (Moriarty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78,

2606-2610, 1981)의 B형 간염 바이러스 혈청형 adw로부터 유래하였다. pAM6 (pBR322 기체의 벡터)는 ATCC 45020의 카탈로그 번호로 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 얻었다. 이 3' UTR을 1.4 kb의 BamHI 단편으로서 폴리아데닐화 신호의 5'에 삽입하였는데, 삽입을 위해 평활 말단을 만듦으로써 BamHI 부위를 제거하였다. 일련의 단계 (BglII로의 분해, 클레나우 (Klenow) 중합효소 처리, BstXI 으로의 분해, NcoI 으로의 분해, 돌출부 제거를 위한 멍빈 (mung bean) 뉴클레아제 처리, 및 BstXI 으로의 추가 분해 포함)에 있어서, HBV S 유전자의 3' 비번역 인핸서 영역과 bGHpA 신호 사이의 영역을 변형시켜 X 유전자 프로모터와 bGHpA 신호 사이에서 5개가 넘는 코돈의 모든 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)을 제거하였다. 그 결과, X 단백질의 번역 가능한 부분을 코딩하는 서열 (9개 아미노산) 및 X 유전자 출발 코돈이 결실되었다. 그러나, X 유전자의 약한 인핸서/프로모터 영역은 유지되었는데, 이는 이 영역이 CMV 프로모터로부터의 HBsAg 발현을 증진시키는 것으로 알려졌기 때문이다. 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호를 토끼의 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호로 치환하였다. S 항원의 5' 비코딩 및 코딩 서열을 절개하고 올리고클레오티드 링커로 대체함으로써 하기 도시된 바와 같은 다중 클로닝 부위가 생겨나, 플라스미드 p7313-PL을 생성하였다.

```

Hind  -- Not I --      -EcoRV      -NdeI-      --BamHI
AGCTTGCGGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC . . .
. . . ACGCCGCGCATCGCTATAGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG
      --NheI--      --KpnI--      --Sall --      ΔNotI
    
```

<122>

<123>

ColE1 cer 서열은 호지슨 (David Hodgesson; Warwick University)으로부터 얻은 플라스미드 pDAH212의 서브클론에서 얻었으며, 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭하여 서열의 말단에 EcoRI 제한 부위를 위치시켰다. 그 후, cer 서열을 p7313-PL의 EcoRI 부위에 삽입하여 플라스미드 p7313-PLc (도 7)를 생성하였다. 증폭된 cer 서열은 진뱅크 연번 M11411과 비교하여 확인하였다.

<124>

<실시예 4> 포유동물 293T 세포에서 E1의 발현

<125>

5% CO₂ 중 37°C에서 포유동물 293T 세포를 6웰 코닝 코스타 (상표명, Corning Costar)(Corning Science Products, 10 The Valley Centre, Gordon Road, High Wycombe, Bucks, UK) 조직 배양 플레이트당 2×10⁵개 세포의 최종 농도의 로그기로 배양하였다. 하기 형질전환 혼합물을 제조하여 25분 동안 복합체를 형성하게 하였다.

<126>

16μl의 멸균 2차 증류수 중 2 μg의 플라스미드 DNA (벡터, p6bE1c/o, p6bE1)

<127>

+

<128>

OPTI-mem™ (Gibco BRL, Paisley, Scotland) 8 μl

<129>

리포펙타민 (상표명, Lipofectamine; Gibco BRL) 6 μl.

<130>

각 세포 단일층을 OPTI-mem™으로 조심스럽게 2회 세척하였다. OPTI-mem™ 800 μl를 각 웰에 첨가하였다. OPTI-mem™ 200 μl를 각 형질감염 혼합물에 첨가하여 혼합한 후, 이를 세포 단일층에 부드럽게 첨가하였다. 플레이트를 5% CO₂ 중 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션시킨 후, 형질감염 혼합물 및 OPTI-mem™을 제거하였다. 세포 단일층을 세포 배양 배지로 부드럽게 2회 세척하고, 마지막으로 형질감염된 세포를 10% 소 태아 혈청 및 29.2 mg/ml의 L-글루타민을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 5% CO₂ 중 37°C로 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 끊어서 마이크로튜브에 넣고, PBS로 2회 세척한 후, 세포를 가라 앉히고, 세포 펠렛을 SDS PAGE 램피 (Laemmli) 염료에 재현탁하였다. 세포 펠렛을 끊이고, 10% SDS PAGE 겔에 로딩한 후, 1X 트리스 글리신 SDS 완충액 중에서 전기영동하였다. 전기영동 후, 겔을 니트로셀룰로스 막 (Amersham)에 블러팅시켜 웨스턴 블러팅을 수행하였다. 니트로셀룰로스 막을 PBS 중의 5% 마블 (상표명, Marvel; Premier Beverages, Knighton, Adbaston, Stafford, UK)로 실온에서 30분 동안 블로킹하고, PBS 및 0.1% 트윈 (Tween) 20으로 2회 세척하였다. 토끼에서 HPV6bE1의 C 말단 단백질 서열 (단백질 서열: CSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFR)에 대해 생성된 폴리클로날 항체를 PBS 중 5% 마블 (상표명)에 희석하여 니트로셀룰로스 막에 첨가하였다. 이를 부드럽게 교반하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 희석된 항체를 제거하고, 막을 PBS 및 0.1% 트윈 20으로 3회 세척하였다. 2차 접합체인 돼지 항-토끼 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP) (DAKO)를 PBS 및 0.1% 트윈 20에 1 대 20000으로 희석하였다. 이를 세척된 막에 첨가하고, 부드럽게 교반하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 막을 PBS 및 0.1% 트윈 20으로 강력하게

세척하였다. 화학발광 HRP 키트 (Amersham)을 사용하여 막에 전달된 단백질을 검출하였다.

<131> 결과:

<132> E1에 대해 번역된 단백질의 예상된 크기는 68 kDa 내지 72 kDa이다. 실험 결과 (도 8)는 코돈 최적화 HPV6bE1 (레인 4)을 함유하는 p7313-PLc에 의해 발현된 올바른 단백질 크기를 보여준다. 야생형 E1을 함유하는 벡터는 레인 3에 있으며, 이는 야생형 뉴클레오티드 서열로부터는 인간 세포에서 E1의 발현이 전혀 검출되지 않음을 보여준다. 이와 유사하게, 레인 2 (빈 벡터) 및 레인 1 (형질감염되지 않은 세포)에서 E1은 검출되지 않는다. 레인 1 내지 4에 나타난 대략 60 kDa의 밴드는 항-E1 항체와 교차반응하는 미확인 세포 단백질이다. 밴드는 각 레인에 걸쳐 대략 일정한 강도를 나타내는데, 이는 로딩된 샘플의 양이 일정했음을 의미한다.

<133> <실시예 5> HPV E1 및 HPV E2 단백질을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스의 작제

<134> HPV-6b E1 단백질을 발현하는 백시니아 바이러스는 글락소 웰컴 (Glaxo Wellcome, Stevenage, UK)에서 생성하였다. HPV-11 E1 및 HPV-11 E2 단백질을 발현하는 백시니아 바이러스는 친절하게 앵글러 (Jeff Engler, University of Alabama at Birmingham, US)가 제공하였다.

<135> 요컨대, p6bE1w/t의 E1 유전자를 백시니아 바이러스 벡터인 pTM3에 클로닝한 후, 제한효소로 검사하고, DNA 서열분석된 재조합 벡터를 사용하여 HTk⁻ 세포를 형질감염시켰다. 재조합 백시니아 바이러스 벡터를 단리하고, 플라크를 정제하였다. E1 단백질 발현은, HPV-6b E1을 발현하는 재조합 바이러스와 박테리오파지 T7 RNA 중합효소를 발현하는 제2 백시니아 바이러스 (vTF7-3) 둘 다로 세포를 감염시킨 후에 펩티드 항혈청을 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 검사하였다. 세포를 백시니아 바이러스 vTF7-3으로 동시 감염시키는 것도, HPV-11 E1 및 E2 재조합 백시니아 바이러스로부터 E1 및 E2 단백질을 직접 발현하기 위해 필요하다. 백시니아 바이러스 균주인 WR을 음성 대조군 실험에 사용하였다. 벡터 pTM3 및 바이러스 vTF7-3은 미국 국립보건원 (National Institute of Health, Maryland, US)에서 얻었다.

<136> <실시예 6> 면역학 - HPV 항원에 대한 세포성 반응의 검출

<137> 달리 언급하지 않는 한, 모든 시약은 깁코 비알엘 (Gibco BRL, Paisley, Scotland) 또는 시그마 (Sigma, Poole, Dorset)에서 얻었다.

<138> A. 면역화 프로토콜

<139> 암컷 C57BL/6 생쥐를 PMDD에 의해 1.0 내지 2.0 μ g의 DNA (p6bE1c/o, p6bE1w/t, p6bE1c/o mut, p6bE1w/t mut 또는 빈 플라스미드 p7313PLc 중 어느 하나)로 면역화시키고, 14일 후에 동일한 투여량으로 부스팅시켰다. 동물을 경추탈골법으로 죽이고, HPV 항원에 대한 세포성 반응을 조사하기 위해 비장을 분리하였다.

<140> B. 비장세포의 단일 세포 현탁액 제조

<141> 분쇄된 유리 슬라이드 (BDH), 용혈된 적혈구 세포 (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) 및 완전한 RPMI 중에 재현탁된 세포들 사이에서 비장을 "분쇄 (mash)"하였다. RPMI-1640 배지에는 10% 소 태아 혈청 (FCS), 2 mM 글루타민, 100 단위/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 5×10^{-5} M 2-머캅토에탄올이 보충되었다.

<142> C. MC57 표적 세포의 감염

<143> HPV 항원으로부터 유래한 면역우성 에피토프는 미확인 상태로 남아있기 때문에, 항원 특이적 시험관내 반응의 검출은 전체 단백질(들)을 코딩하는 cDNA로 형질감염된 표적 세포 내에서 생성된 전체 항원의 천연 프로세싱에 의존한다. 감염 다중도 5로, MC57 세포 (K^b 양성)를 HPV-6b E1, HPV-11 E2 또는 HPV-11 E1을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스로 37°C에서 1시간 동안 감염시켰다. 과량의 바이러스를 세척 제거하고, 세포를 재조합 인간 IL-2 (Glaxo Wellcome, Geneva) 50 ng/ml을 함유하는 완전 RPMI에 재현탁하였다.

<144> D. ELISPOT

<145> ELISPOT 플레이트 (96웰, Millipore MAIP S 45 1 0)를 PBS 중에서 15 μ g/ml의 쥐 항-생쥐 IFN 감마 (Pharmingen 18181D)로 밤새 (4°C) 코팅한 후, 실험군으로부터 얻은 비장 세포 4×10^5 개를 첨가하였다. 항원은 1×10^4 개의 재조합 백시니아 바이러스 감염 MC57 세포의 첨가에 의해 제공하였다. 야생형 백시니아 균주인 WR을 음성 대조군으로 사용하였다. 분석물을 37°C (5% CO₂)에서 밤새 인큐베이션시켰다.

- <146> 분석 2일째, 반점 형성 세포를 바이오터닐화 쥐 항-생쥐 IFN 감마 (Pharminggen 18112D) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 그 이후의 PBS 중 1 대 1000으로 희석된 스트렙타비딘 알칼리성 포스파타제 접합체 (TCS biologicals SA 1008)를 사용하여 검출하였다. 이를 알칼리성 포스파타제 기질 키트 (Biorad 170-6432)로 가시화하고, 영상 분석법에 의해 정량하였다. 그 결과를 도 9에 도시하였다.
- <147> 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, 백시니아 백신 (vacc.E1(11) 또는 vacc.E1(6b))에 포함된 E1으로 접종했을 때, 강력한 세포성 반응이 HPV-6b 코돈 최적화 E1 서열을 코딩하는 플라스미드로 백신화된 모든 3가지 생쥐에서 나타났다. 이들 생쥐를 야생형 백시니아 (vacc.WT) 또는 HPV-11 E2 발현 백시니아 (vacc.E2(11))로 접종했을 때는 반응이 나타나지 않았다. 이와 반대로, 생쥐를 야생형 E1 서열로 백신화하면 T 세포 반응이 나타나지 않았다. 이들 생쥐로부터의 비장 세포는 E1 유전자를 포함하는 백시니아에 의한 접종에 대해서도, 임의의 다른 접종에 대해서도 반응하지 않았다 (데이터 도시하지 않음). E1 유전자의 돌연변이는 생쥐의 세포성 반응을 변화시키지 않았다. 또한, p6bE1c/o 및 p6bE1c/o mut로 번역화된 생쥐는 HPV-11로부터의 E1 단백질을 발현하는 백시니아로 감염된 표적 세포에 대해 강력한 세포성 반응을 나타내기 때문에, 본 발명자들은 HPV-6b E1과 HPV-11 E1 사이에 높은 수준의 면역학적 교차 반응성이 있을 것으로 가정할 수 있다. 빈 p7313-PLc 벡터로 백신화된 생쥐는 모든 접종에 대해 반응을 나타내지 않았다.
- <148> <실시에 7> 포유동물 293T 세포에서 HPV 6b E2의 발현
- <149> 표준 프로토콜 (상기 실시예 4 참조)에 따라, 형질감염당 2.5 μl 의 리포펙타민 2000 (Life Technologies)을 사용하여 24 웰 플레이트에서 293T 세포 단일층 (80% 조밀도)을 각 플라스미드 (p6bw/t, p6bc/o, p6bw/t mut, p6bc/o mut) 1 μg 으로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후, 세포를 수확하고, 인산염 완충 염수에서 세정 한 후, SDS-PAGE에 의해 조사하고, HPV-6b N-말단 아미노산 서열인 MEAIAKRLDACQEQLLELYEEC에 대해 생성된 항-E2 펩티드 항혈청 (#1100)을 사용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다 (도 10).

<150> 결과

- <151> 그 결과, 트랙 3 (코돈 최적화 E2) 및 트랙 5 (코돈 최적화 및 돌연변이화 E2)에서 예상된 크기 (40 kd 내지 45 kd)의 주요 단백질 밴드가 나타났다. 동일한 크기의 주요 밴드가 트랙 4에서도 나타났는데, 이는 돌연변이화 야생형 E2 플라스미드로부터 매우 낮은 수준의 발현이 일어남을 의미하며, 이 밴드는 트랙 1 (음성 대조군) 또는 트랙 2 (야생형 E2 단백질)에서는 나타나지 않았다. 약 25 kd의 교차 반응하는 단백질 밴드가 모든 트랙에서 나타났는데, 이는 단백질 용해물이 동일한 양으로 로딩되었음을 의미한다. E2의 돌연변이는 코돈-최적화에 의해 상당히 향상된 E2 단백질 발현을 변화시키지 않은 것으로 보인다.

도면의 간단한 설명

- <64> 도 1은 진뱅크 (Genbank)에서 유래한 HPV 유형 11, 6a 및 6b로부터의 E1의 원형 야생형 아미노산 서열을 나타낸다.
- <65> 도 2는 점 돌연변이를 포함하여 생물학적 활성이 제거된 HPV 6b E1 아미노산 서열 (6b-e1 mut)과 정렬된, 도 1로부터의 HPV 6b E1의 원형 야생형 아미노산 서열 (6b-e1)을 나타낸다.
- <66> 도 3은 진뱅크에서 유래한 HPV 유형 11, 6a 및 6b로부터의 E2의 원형 야생형 아미노산 서열을 나타낸다.
- <67> 도 4a는 점 돌연변이를 포함하여 생물학적 활성이 제거된 HPV 11 E2 아미노산 서열 (Hpv-11e2-mut) 및 도 6의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 (Hpv-11e2-comut)과 정렬된, 도 3으로부터의 HPV 11 E2의 원형 야생형 아미노산 서열 (Hpv-11e2-wt)을 나타낸다.
- <68> 도 4b는 점 돌연변이를 포함하여 생물학적 활성이 제거된 HPV 6b E2 아미노산 서열 (Hpv-6be2-mut)과 정렬된, 도 3로부터의 HPV 6b E2의 원형 야생형 아미노산 서열 (Hpv-6be2-wt)을 나타낸다.
- <69> 도 5는 도 2로부터의 HPV 6b E1의 돌연변이 아미노산 서열을 코딩하는, 고도로 발현되는 인간 유전자의 것과 유사한 코돈 이용도 패턴을 갖는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <70> 도 6은 도 4로부터의 HPV 11 E2의 돌연변이 아미노산 서열을 코딩하는, 고도로 발현되는 인간 유전자의 것과 유사한 코돈 이용도 패턴을 갖는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <71> 도 7은 DNA 벡터인 p7313-PLc를 나타낸다.
- <72> 도 8은 실시예 4로부터의 세포 용해물 샘플을 아크릴아미드 겔에서 러닝하여 염색함으로써, 발현된 E1 단백질에

대한 항체 결합이 나타나도록 한 것이다.

<73> 도 9는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드로 생쥐를 면역화 (실시에 6)시킨 후에 항원 집중에 대한 세포의 반응을 보여준다.

<74> 도 10은 실시예 7로부터의 세포 용해물 샘플을 아크릴아미드 겔에서 러닝하여 염색함으로써, 발현된 E2 단백질에 대한 항체 결합이 나타나도록 한 것이다.

도면

도면1

	1	60
Hpv11-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFVMEAIVEHTTGTQISEDEEEVEEDSGYDMVDFIDDRHITQNS	
Hpv6a-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFVMEAIVQHPTGTQISDDEDEEVEDSGYDMVDFIDDSNI THNS	
6b-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFVMEAIVQHPTGTQISDDEDEEVEDSGYDMVDFIDDSNI THNS	
	61	120
Hpv11-e1	VEAQUALFNRQEADAHYATVQDLKRRKYLGSYPVSPISNVANAVESEISPRLDAIKLTTQPK	
Hpv6a-e1	LEAQUALFNRQEADTHYATVQDLKRRKYLGSYPVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
6b-e1	LEAQUALFNRQEADTHYATVQDLKRRKYLGSYPVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
	121	180
Hpv11-e1	KVKRRLFETRELTDSGYGYSEVEA. .ATQVEKHGDPENGGDQERDTGRDIEGEGVEHRE	
Hpv6a-e1	KVKRRLFQTRRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDQEKDTRDIEG. .EEHTE	
6b-e1	KVKRRLFQTRRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDQEKDTRDIEG. .EEHTE	
	181	240
Hpv11-e1	AEAVDSTREHADTSGILELLKCKDIRSTLHGKFKDCFGLSFVDLIRPFKSDRTTCADWV	
Hpv6a-e1	AEAPTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDRTTCADWV	
6b-e1	AEAPTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDRTTCADWV	
	241	300
Hpv11-e1	VAGFGIHHSIADAFQKLI EPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLRFKVNSRSTVARTLGLTL	
Hpv6a-e1	VAGFGIHHSISEAFQKLI EPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLRFKVNSRSTVARTLGLTL	
6b-e1	VAGFGIHHSISEAFQKLI EPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLRFKVNSRSTVARTLGLTL	
	301	360
Hpv11-e1	LNI PENHMLIEPPKIQSGVRALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEHGLADSQFKL	
Hpv6a-e1	LNI PDNQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEHGLADSQFKL	
6b-e1	LNI PENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEHGLADSQFKL	
	361	420
Hpv11-e1	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNNSMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
Hpv6a-e1	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNNSMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
6b-e1	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNNSMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
	421	480
Hpv11-e1	KKMSIKQWIKYRGTKVDSVGNWKP IVQFLRHQNI EFIPFLSKLKLWLHGT PPKNC IAI VG	
Hpv6a-e1	RKMSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKP IVQFLRHQNI EFIPFLSKFLWLHGT PPKNC IAI VG	
6b-e1	RKMSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKP IVQFLRHQNI EFIPFLTKFLWLHGT PPKNC IAI VG	
	481	540
Hpv11-e1	PPDTGKSCFCMSLIKFLGGTVISYVNSCSHFWLQPLTDAKVALDDATQPCWYMDTYMR	
Hpv6a-e1	PPDTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALDDATQPCWIYMDTYMR	
6b-e1	PPDTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALDDATQPCWIYMDTYMR	
	541	600
Hpv11-e1	NLLDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTSNIDISKEEKYKYLHTRVTTFTFPNPF PFDRN	
Hpv6a-e1	NLLDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTSNIDITKEEKYKYLHTRVTTFTFPNPF PFDRN	
6b-e1	NLLDGNPMSIDRKHKALTLLIKCPPLLVTSNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNPF PFDRN	
	601	651
Hpv11-e1	GNAVYELSDANWKCF FERLSSSLDIEDSEDEEDGSNSQAFRCVPGSVVRTL	
Hpv6a-e1	GNAVYELSNANWKCF FERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFRCVPGTVVRTL	
6b-e1	GNAVYELSNANWKCF FERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFRCVPGTVVRTL	

도면2

	1	60
6b-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFVMEAIVQHPTGTQISDDEDEEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
6b-e1 mut	MADDSGTENEGSGCTGWFVMEAIVQHPTGTQISDDEDEEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
	61	120
6b-e1	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLKRRKYLGSYPVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
6b-e1 mut	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLGGKYLGSYPVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
	121	180
6b-e1	KVKRRRLFQTRELTSYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDQEKDTRDIEGEEHTEAE	
6b-e1 mut	KVKRRRLFQTRELTSYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDQEKDTRDIEGEEHTEAE	
	181	240
6b-e1	APTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTCLDWVVA	
6b-e1 mut	APTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTCLDWVVA	
	241	300
6b-e1	GFGIHHSISEAFQKLIIEPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLLRFKVNKSRSTVARTLATLLN	
6b-e1 mut	GFGIHHSISEAFQKLIIEPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLLRFKVNKSRSTVARTLATLLN	
	301	360
6b-e1	IPENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEHGLADSQFKLTE	
6b-e1 mut	IPENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPEWITRQTVIEHGLADSQFKLTE	
	361	420
6b-e1	MVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFNLNSNQAKYVKDCATMCRHYKHAEMRK	
6b-e1 mut	MVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFNLNSNQAKYVKDCATMCRHYKHAEMRK	
	421	480
6b-e1	MSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKPVIQFLRHQNIIEFIPFLTQFKLWLGTPPKKNCIAIVGPP	
6b-e1 mut	MSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKPVIQFLRHQNIIEFIPFLTQFKLWLGTPPKKNCIAIVGPP	
	481	540
6b-e1	DTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDATQPCWIYMDTYMRNL	
6b-e1 mut	DTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDATQPCWIYMDTYMRNL	
	541	600
6b-e1	LDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTNSNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNPPFDRNGN	
6b-e1 mut	LDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTNSNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNPPFDRNGN	
	601	649
6b-e1	AVYELSNWNKCFERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFCRCVPGTVVRTL	
6b-e1 mut	AVYELSNWNKCFERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFCRCVPGTVVRTL	

도면3

	1	60
Hpv-11e2	MEAIAKRLDACQDQLELLEYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGSLHIGLQVVP	
Hpv6a-e2	MEAIAKRLDACQEQLELLEYEENSTDLNKHVHLHWKCMRHESVLLYKAKQMGSLHIGMQVVP	
Hpv6b-e2	MEAIAKRLDACQEQLELLEYEENSTDLNKHVHLHWKCMRHESVLLYKAKQMGSLHIGMQVVP	
	61	120
Hpv-11e2	PLTVSETKGNHAIEMQMHELESLLKTEYSMEPWTLQETS YEMWQTPPKRCFKKRGKTVEVK	
Hpv6a-e2	PLKVSEAKGNHAIEMQMHELESLLKTEYSMEPWTLQETS YEMWQTPPKRCFKKRGKTVEVK	
Hpv6b-e2	PLKVSEAKGNHAIEMQMHELESLLRTEYSMEPWTLQETS YEMWQTPPKRCFKKRGKTVEVK	
	121	180
Hpv-11e2	FDGCEDNVMEYVWVTHIYLQDNDNSWVKVTSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
Hpv6a-e2	FDGCANNTMDYVWVTDVYVQDSDSWVKVHSMVDAGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
Hpv6b-e2	FDGCANNTMDYVWVTDVYVQDNDTWVKVHSMVDAGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
	181	240
Hpv-11e2	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQTTAPTVSACTTEDGVSAPPRKR	
Hpv6a-e2	TKQWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIPESTTYTPAQTTSTP.VSSSTQEDAVQTPPRKR	
Hpv6b-e2	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIPESTTYTPAQTTSTL.VSSSTKEDAVQTPPRKR	
	241	300
Hpv-11e2	ARGPSTN.NTLCVANIRSDSTINNIIVTDNYNKHQRRNNSHSAATPIVQLQGDSNCLKC	
Hpv6a-e2	ARGVQSSPCNALCVAHIGPVDSGNHNLTNNHDQHQRNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv6b-e2	ARGVQSSPCNALCVAHIGPVDSGNHNLTNNHDQHQRNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
	301	360
Hpv-11e2	FRYRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSSEQRQQFLNSVKIPTIRHK	
Hpv6a-e2	FRYRLNDKHRHLFDLISSTWHWASPKAPHKHAIVTVTYHSEQRQQFLNVVKIPTIRHK	
Hpv6b-e2	FRYRLNDRHRHLFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEQRQQFLDVKIPTIRHK	
	361	369
Hpv-11e2	VGFMSLHLL	
Hpv6a-e2	LGFMSLHLL	
Hpv6b-e2	LGFMSLHLL	

도면4a

	1	60
Hpv-11e2-comut	MEAI AKRLDACQDQLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv-11e2-mut	MEAI AKRLDACQDQLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv-11e2-wt	MEAI AKRLDACQDQLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
	61	120
Hpv-11e2-comut	PLTVSETKGHNAIEMQMHLES LAKTQYGVPEPWT LQDTSYEMWLT PPKRCFAKQGN TVEVK	
Hpv-11e2-mut	PLTVSETKGHNAIEMQMHLES LAKTQYGVPEPWT LQDTSYEMWLT PPKRCFAKQGN TVEVK	
Hpv-11e2-wt	PLTVSETKGHNAIEMQMHLES LAKTQYGVPEPWT LQDTSYEMWLT PPKRCFAKQGN TVEVK	
	121	180
Hpv-11e2-comut	FDGCEDNVMEYV VVWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
Hpv-11e2-mut	FDGCEDNVMEYV VVWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
Hpv-11e2-wt	FDGCEDNVMEYV VVWTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
	181	240
Hpv-11e2-comut	TNHWEVCYGSTVICS PASVSSTVREVSIAEPTTYT PAQTTAPT VSACTEDGVSAPP RKR	
Hpv-11e2-mut	TNHWEVCYGSTVICS PASVSSTVREVSIAEPTTYT PAQTTAPT VSACTEDGVSAPP RKR	
Hpv-11e2-wt	TNHWEVCYGSTVICS PASVSSTVREVSIAEPTTYT PAQTTAPT VSACTEDGVSAPP RKR	
	241	300
Hpv-11e2-comut	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIIVTDNYNKHQRRNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR	
Hpv-11e2-mut	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIIVTDNYNKHQRRNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR	
Hpv-11e2-wt	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIIVTDNYNKHQRRNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR	
	301	360
Hpv-11e2-comut	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQLNSVKIPPTIRHKVG	
Hpv-11e2-mut	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQLNSVKIPPTIRHKVG	
Hpv-11e2-wt	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQLNSVKIPPTIRHKVG	
	361	367
Hpv-11e2-comut	FMSLHLL	
Hpv-11e2-mut	FMSLHLL	
Hpv-11e2-wt	FMSLHLL	

도면4b

	1	60
Hpv-6be2-wt	MEAI AKRLDACQEQLLELYEENSTDLHKHVLHWKCMRHESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
Hpv-6be2-mut	MEAI AKRLDACQEQLLELYEENSTDLHKHVLHWKCMRHESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
	61	120
Hpv-6be2-wt	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLES LLRTEYSMEPWT LQETS YEMWQT PPKRCFKKRGKTVEVK	
Hpv-6be2-mut	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLES LLRTEYSMEPWT LQETS YEMWQT PPKRCFAKRGKTVEVK	
	121	180
Hpv-6be2-wt	FDGCANN TMDYV VVWTDVYVQDN DTWVKVHSMVD A KGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
Hpv-6be2-mut	FDGCANN TMDYV VVWTDVYVQDN DTWVKVHSMVD A KGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
	181	240
Hpv-6be2-wt	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVS IPESTTYT PAQTSTL. VSSSTKEDAVQTPPRKR	
Hpv-6be2-mut	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVS IPESTTYT PAQTSTL. VSSSTKEDAVQTPPRKR	
	241	300
Hpv-6be2-wt	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHN LITNNHDQHQRNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv-6be2-mut	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHN LITNNHDQHQRNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
	301	360
Hpv-6be2-wt	FRYRLNDRHRH LFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVYDSEEQRQQLD VVKIPPTISHK	
Hpv-6be2-mut	FRYRLNDRHRH LFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVYDSEEQRQQLD VVKIPPTISHK	
	361	369
Hpv-6be2-wt	LGFMSLHLL	
Hpv-6be2-mut	LGFMSLHLL	

도면5a

1 60
 HPV6be1-comut GCGGCCGCCATGGCAGACGATTCCGGTACTGAGAACGAAGTTCTGGTTGTACCGGTTGG
 61 120
 HPV6be1-comut TTCATGGTTGAAGCAATCGTTCAGCATCCGACTGGTACCCAGATCTCCGATGACGAAGAC
 121 180
 HPV6be1-comut GAAGAAGTTGAAGATTCTGGTTACGACATGGTTGACTTCATCGATGACTCCAACATCACT
 181 240
 HPV6be1-comut CATAACTCTCTGGAAGCACAGGCTCTGTTTAACCGCCAGGAAGCTGATACCCATTACGCT
 241 300
 HPV6be1-comut ACTGTTCCAGACCTGGGAGGCAAATATCTGGGCTCTCCGTACGTTTCCCGATCAACACT
 301 360
 HPV6be1-comut ATCGCAGAAGCAGTTGAGTCTGAAATCTCCCGCGCCTGGACGCTATCAAACACTGACTCGT
 361 420
 HPV6be1-comut CAGCCGAAGAAGTTAAACGTCGCTCTGTTCAGACTCGTGAACGACCGACTCCGGTTAC
 421 480
 HPV6be1-comut GGTATAGCGAAGTTGAGGCTGGCACCAGGTTGAAAAACACGGTGTACCGGAA
 481 540
 HPV6be1-comut AACGGCGCGACGGTCAGGAAAAGGACACCGGCCGCGACATCGAGGGTGAGGAACACACC
 541 600
 HPV6be1-comut GAAGCTGAAGCTCCGACTAACTCTGTTTCGTGAACACGCAGGTAAGTGGGGTATCCTGGAA
 601 660
 HPV6be1-comut CTGCTGAAATGCAAAGACCTGCGCGCGGCTCTGCTGGGCAAATTCAAAGAATGCTTCGGC
 661 720
 HPV6be1-comut CTGCTTTCATTGACCTGATCCGTCGGTTAAGTCTGACAAACTACCTGTCTGGACTGG
 721 780
 HPV6be1-comut GTTGTAGCAGGCTTCGGCATCCACCCTCTATCTCTGAAGCATTCAGAAACTGATCGAG
 781 840
 HPV6be1-comut CCGCTGTCTCTGTACGCGCACATCCAGTGGCTGACTAACGCTTGGGGTATGGTTCTGCTG
 841 900
 HPV6be1-comut GTAAGTCTGCGCTTTAAAGTAAACAAATCTCGTCCACTGTTGCTCGTACTCTGGCTACC
 901 960
 HPV6be1-comut CTGCTGAACATCCCGGAGAACAGATGCTGATCGAACCGCCGAAAAATCCAGTCTGGTGTGA
 961 1020
 HPV6be1-comut GCTGCACGTACTGGTTTCGTAAGTGGCATCTCTAACGCTAGCACTGTTATCGGTGAAGCA
 1021 1080
 HPV6be1-comut CCGGAATGGATCACTCGTCAGACCGTTATCGAACACGGTCTGGCAGATTCTCAGTTCAA
 1081 1140
 HPV6be1-comut CTGACTGAAATGGTTCTGAGGTCATACGACAACGACATCTGCGAGGAATCTGAAATGCG

도면6

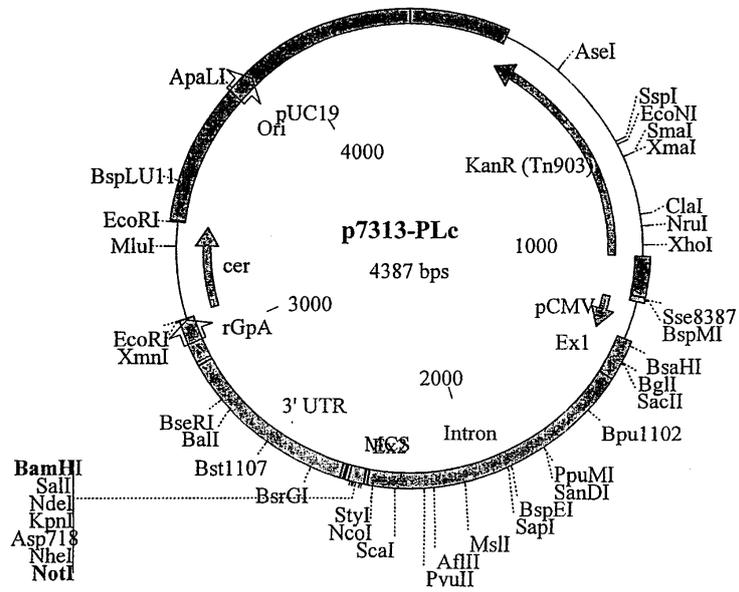
```

1 60
Hpv11e2-comut 'GCGGCCGCCATGGAAGCCATCGCGAAGAGGCTCGACGCCCTGCCAGGACCAGCTGCTCG
61 120
Hpv11e2-comut AGCTGTACGAGGAGAACAGCATTGACATCCATAAGCACATCATGCACTGGAAGTGCATT
121 180
Hpv11e2-comut GCCTGGAGAGCGTGCTGTTGCAÇAAGGCCAAGCAGATGGGCCTGTCCCACATAGGCCTTC
181 240
Hpv11e2-comut AGGTGGTCCCCCTCTGACCGTGTGAGAGACAAAGGGCCATAACGCAATCGAGATGCAGA
241 300
Hpv11e2-comut TGCACCTCGAGTCGCTGGCGAAAACACAGTACGGCGTGGAGCCATGGACCCTGCAGGACA
301 360
Hpv11e2-comut CCTCGTACGAAATGTGGCTGACCCACCTAAGCGATGCTTCGCCAAACAGGGCAACACAG
361 420
Hpv11e2-comut TGGAGGTGAAGTTCGACGGCTGTGAGGATAACGTTATGGAGTATGTCGTGGACGCACA
421 480
Hpv11e2-comut TCTATCTGCAGGACAACGACAGTTGGGTGAAGGTGACCAGCTCCGTGGACGCGAAGGGCA
481 540
Hpv11e2-comut TCTACTATACCTGTGGGCAGTTTAAAACCTACTATGTGAACTTCAACAAAGAGGCCAAA
541 600
Hpv11e2-comut AGTATGGCTCCACCAACCCTGGGAGGTCTGCTATGGGAGCACGGTGATTTGCTCTCCCG
601 660
Hpv11e2-comut CCAGCGTGTCTAGCACTGTGCGCGAGGTGAGCATTGCCGAGCCGACCACGTACACCCTG
661 720
Hpv11e2-comut CCCAGACGACCGCTCCGACCGTGTCTGCTTGTACTACCGAGGACGGCGTGAGCGCTCCAC
721 780
Hpv11e2-comut CCAGGAAGCGTGGCAGGGGCCCAAGCACCAACAACACCCTCTGTGTGGCGAACATTCGCA
781 840
Hpv11e2-comut GCGTCGACAGTACCATCAATAACATCGTGACGGATAACTATAACAAGCACCAGAGGCGTA
841 900
Hpv11e2-comut ACAACTGTCACTCTGCCGCAACCCCATCGTGACGCTCCAGGGAGACAGCAATGCCTTA
901 960
Hpv11e2-comut AGTGCTTCCGCTATCGCCTCAACGACAAGTACAAGCACCTCTTTGAGCTCGCCTCGTCGA
961 1020
Hpv11e2-comut CGTGGCACTGGGCCTCACCCGAGGCACCTCACAAGAAGCCATCGTCACTCTCACTTACT
1021 1080
Hpv11e2-comut CCAGTGAGGAGCAGACAGCAGTTTCTGAACAGCGTGAAGATCCCACCGACGATCCGTC
1081 1123
Hpv11e2-comut ATAAGGTCGGCTTCATGTCACCTGCATCTCCTGTGAGGATCC'

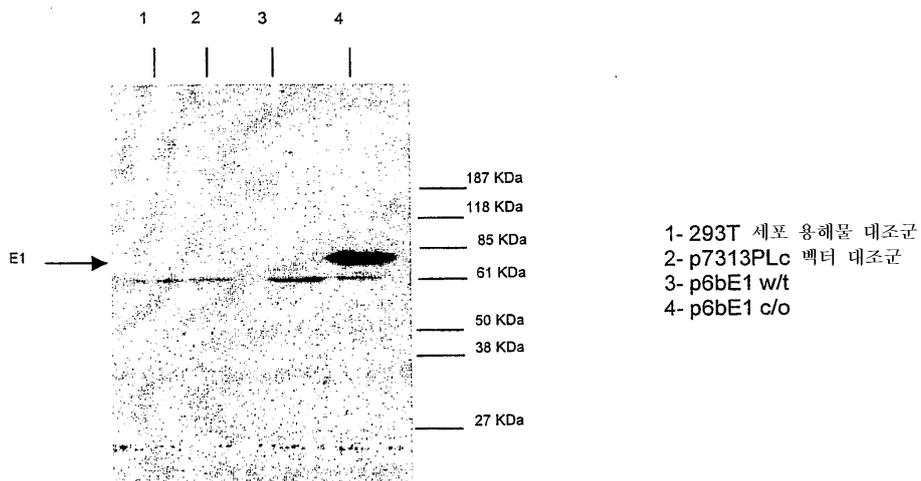
```

도면7

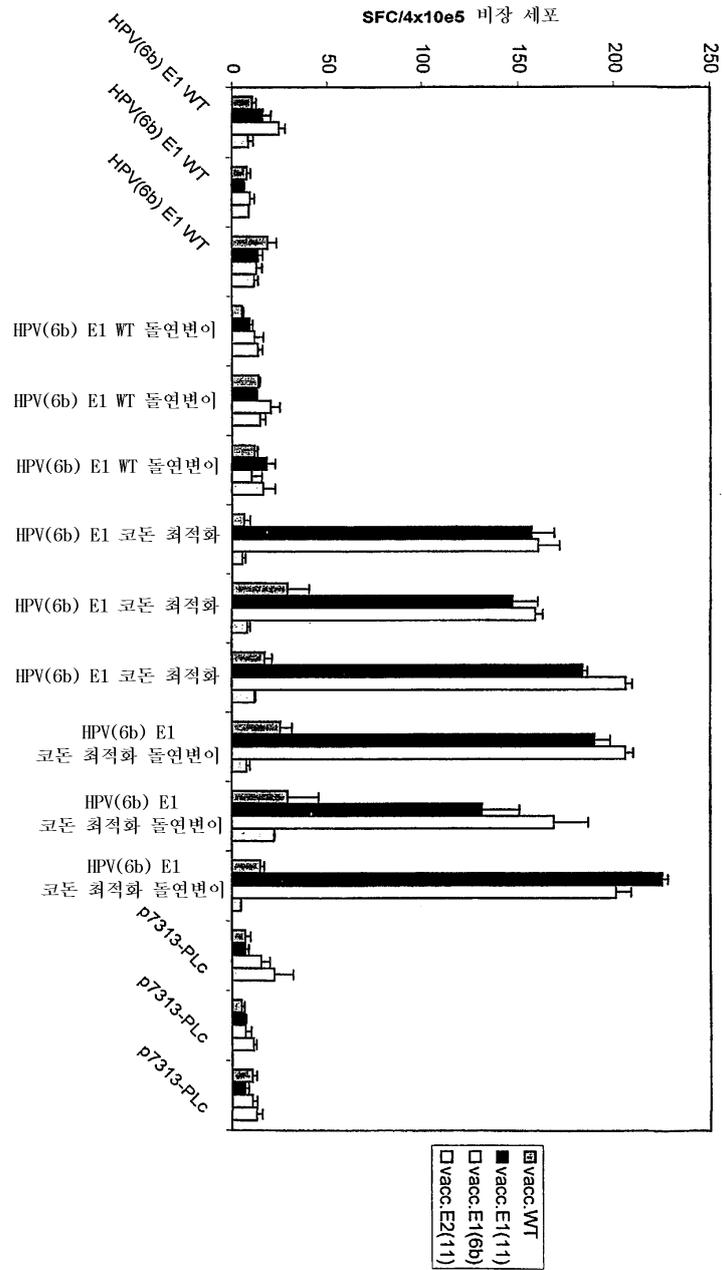
WRG7313plc



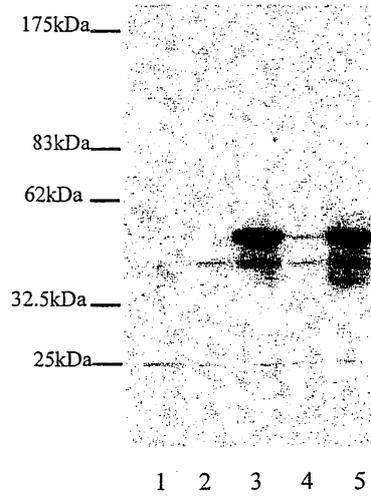
도면8



도면9



도면10



- 1 p7313PLc
- 2 p6bE2 w/t
- 3 p6bE2 c/o
- 4 p6bE2 w/t 돌연변이
- 5 p6bE2 c/o 돌연변이

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Glaxo Group Limited
 Ertl, Peter F
 Gough, Gerald W

<120> Papilloma virus sequences

<130> PG4082

<140> PCT/GB01/03290

<141> 2001-07-20

<150> GB 0017990.3

<151> 2000-07-21

<150> GB 0025802.0

<151> 2000-10-20

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 649

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 6b

<400> 1

Met Ala Asp Asp Ser Gly Thr Glu Asn Glu Gly Ser Gly Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Trp Phe Met Val Glu Ala Ile Val Gln His Pro Thr Gly Thr Gln Ile
 20 25 30

Ser Asp Asp Glu Asp Glu Glu Val Glu Asp Ser Gly Tyr Asp Met Val
 35 40 45

Asp Phe Ile Asp Asp Ser Asn Ile Thr His Asn Ser Leu Glu Ala Gln
 50 55 60

Ala Leu Phe Asn Arg Gln Glu Ala Asp Thr His Tyr Ala Thr Val Gln
 65 70 75 80

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

Thr Ile Ala Glu Ala Val Glu Ser Glu Ile Ser Pro Arg Leu Asp Ala
 100 105 110

Ile Lys Leu Thr Arg Gln Pro Lys Lys Val Lys Arg Arg Leu Phe Gln
 115 120 125

Thr Arg Glu Leu Thr Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Ser Glu Val Glu Ala
 130 135 140

Gly Thr Gly Thr Gln Val Glu Lys His Gly Val Pro Glu Asn Gly Gly
 145 150 155 160

Asp Gly Gln Glu Lys Asp Thr Gly Arg Asp Ile Glu Gly Glu Glu His
 165 170 175

Thr Glu Ala Glu Ala Pro Thr Asn Ser Val Arg Glu His Ala Gly Thr

Lys Tyr Val Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Arg His Tyr Lys His Ala
 405 410 415

Glu Met Arg Lys Met Ser Ile Lys Gln Trp Ile Lys His Arg Gly Ser
 420 425 430

Lys Ile Glu Gly Thr Gly Asn Trp Lys Pro Ile Val Gln Phe Leu Arg
 435 440 445

His Gln Asn Ile Glu Phe Ile Pro Phe Leu Thr Lys Phe Lys Leu Trp
 450 455 460

Leu His Gly Thr Pro Lys Lys Asn Cys Ile Ala Ile Val Gly Pro Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Lys Ser Tyr Phe Cys Met Ser Leu Ile Ser Phe Leu Gly
 485 490 495

Gly Thr Val Ile Ser His Val Asn Ser Ser Ser His Phe Trp Leu Gln
 500 505 510

Pro Leu Val Asp Ala Lys Val Ala Leu Leu Asp Asp Ala Thr Gln Pro
 515 520 525

Cys Trp Ile Tyr Met Asp Thr Tyr Met Arg Asn Leu Leu Asp Gly Asn
 530 535 540

Pro Met Ser Ile Asp Arg Lys His Lys Ala Leu Thr Leu Ile Lys Cys
 545 550 555 560

Pro Pro Leu Leu Val Thr Ser Asn Ile Asp Ile Thr Lys Glu Asp Lys
 565 570 575

Tyr Lys Tyr Leu His Thr Arg Val Thr Thr Phe Thr Phe Pro Asn Pro
 580 585 590

Phe Pro Phe Asp Arg Asn Gly Asn Ala Val Tyr Glu Leu Ser Asn Thr
 595 600 605

Asn Trp Lys Cys Phe Phe Glu Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asp Ile Gln
 610 615 620

Asp Ile Cys Glu Glu Ser Glu Ile Ala Phe Glu Tyr Ala Gln Arg Gly
 370 375 380

Asp Phe Asp Ser Asn Ala Arg Ala Phe Leu Asn Ser Asn Met Gln Ala
 385 390 395 400

Lys Tyr Val Lys Asp Cys Ala Thr Met Cys Arg His Tyr Lys His Ala
 405 410 415

Glu Met Arg Lys Met Ser Ile Lys Gln Trp Ile Lys His Arg Gly Ser
 420 425 430

Lys Ile Glu Gly Thr Gly Asn Trp Lys Pro Ile Val Gln Phe Leu Arg
 435 440 445

His Gln Asn Ile Glu Phe Ile Pro Phe Leu Ser Lys Phe Lys Leu Trp
 450 455 460

Leu His Gly Thr Pro Lys Lys Asn Cys Ile Ala Ile Val Gly Pro Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Lys Ser Tyr Phe Cys Met Ser Leu Ile Ser Phe Leu Gly
 485 490 495

Gly Thr Val Ile Ser His Val Asn Ser Ser Ser His Phe Trp Leu Gln
 500 505 510

Pro Leu Val Asp Ala Lys Val Ala Leu Leu Asp Asp Ala Thr Gln Pro
 515 520 525

Cys Trp Ile Tyr Met Asp Thr Tyr Met Arg Asn Leu Leu Asp Gly Asn
 530 535 540

Pro Met Ser Ile Asp Arg Lys His Lys Ala Leu Thr Leu Ile Lys Cys
 545 550 555 560

Pro Pro Leu Leu Val Thr Ser Asn Ile Asp Ile Thr Lys Glu Glu Lys
 565 570 575

Tyr Lys Tyr Leu His Thr Arg Val Thr Thr Phe Thr Phe Pro Asn Pro
 580 585 590

Phe Pro Phe Asp Arg Asn Gly Asn Ala Val Tyr Glu Leu Ser Asn Ala
 595 600 605

Asn Trp Lys Cys Phe Phe Glu Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asp Ile Gln
 610 615 620

Asp Ser Glu Asp Glu Glu Asp Gly Ser Asn Ser Gln Ala Phe Arg Cys
 625 630 635 640

Val Pro Gly Thr Val Val Arg Thr Leu
 645

<210> 3
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus type 11

<400> 3
 Met Ala Asp Asp Ser Gly Thr Glu Asn Glu Gly Ser Gly Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Trp Phe Met Val Glu Ala Ile Val Glu His Thr Thr Gly Thr Gln Ile
 20 25 30

Ser Glu Asp Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Ser Gly Tyr Asp Met Val
 35 40 45

Asp Phe Ile Asp Asp Arg His Ile Thr Gln Asn Ser Val Glu Ala Gln
 50 55 60

Ala Leu Phe Asn Arg Gln Glu Ala Asp Ala His Tyr Ala Thr Val Gln
 65 70 75 80

Asp Leu Lys Arg Lys Tyr Leu Gly Ser Pro Tyr Val Ser Pro Ile Ser
 85 90 95

Asn Val Ala Asn Ala Val Glu Ser Glu Ile Ser Pro Arg Leu Asp Ala
 100 105 110

Ile Lys Leu Thr Thr Gln Pro Lys Lys Val Lys Arg Arg Leu Phe Glu

Ala Pro Glu Trp Ile Thr Arg Gln Thr Val Ile Glu His Ser Leu Ala
 340 345 350

Asp Ser Gln Phe Lys Leu Thr Glu Met Val Gln Trp Ala Tyr Asp Asn
 355 360 365

Asp Ile Cys Glu Glu Ser Glu Ile Ala Phe Glu Tyr Ala Gln Arg Gly
 370 375 380

Asp Phe Asp Ser Asn Ala Arg Ala Phe Leu Asn Ser Asn Met Gln Ala
 385 390 395 400

Lys Tyr Val Lys Asp Cys Ala Ile Met Cys Arg His Tyr Lys His Ala
 405 410 415

Glu Met Lys Lys Met Ser Ile Lys Gln Trp Ile Lys Tyr Arg Gly Thr
 420 425 430

Lys Val Asp Ser Val Gly Asn Trp Lys Pro Ile Val Gln Phe Leu Arg
 435 440 445

His Gln Asn Ile Glu Phe Ile Pro Phe Leu Ser Lys Leu Lys Leu Trp
 450 455 460

Leu His Gly Thr Pro Lys Lys Asn Cys Ile Ala Ile Val Gly Pro Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Lys Ser Cys Phe Cys Met Ser Leu Ile Lys Phe Leu Gly
 485 490 495

Gly Thr Val Ile Ser Tyr Val Asn Ser Cys Ser His Phe Trp Leu Gln
 500 505 510

Pro Leu Thr Asp Ala Lys Val Ala Leu Leu Asp Asp Ala Thr Gln Pro
 515 520 525

Cys Trp Thr Tyr Met Asp Thr Tyr Met Arg Asn Leu Leu Asp Gly Asn
 530 535 540

Pro Met Ser Ile Asp Arg Lys His Arg Ala Leu Thr Leu Ile Lys Cys
 545 550 555 560

Pro Pro Leu Leu Val Thr Ser Asn Ile Asp Ile Ser Lys Glu Glu Lys
 565 570 575

Tyr Lys Tyr Leu His Ser Arg Val Thr Thr Phe Thr Phe Pro Asn Pro
 580 585 590

Phe Pro Phe Asp Arg Asn Gly Asn Ala Val Tyr Glu Leu Ser Asp Ala
 595 600 605

Asn Trp Lys Cys Phe Phe Glu Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asp Ile Glu
 610 615 620

Asp Ser Glu Asp Glu Glu Asp Gly Ser Asn Ser Gln Ala Phe Arg Cys
 625 630 635 640

Val Pro Gly Ser Val Val Arg Thr Leu
 645

<210> 4

<211> 649

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HPV6b E1 amino acid sequence including point mutations to remove biological activity

<400> 4

Met Ala Asp Asp Ser Gly Thr Glu Asn Glu Gly Ser Gly Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Trp Phe Met Val Glu Ala Ile Val Gln His Pro Thr Gly Thr Gln Ile
 20 25 30

Ser Asp Asp Glu Asp Glu Glu Val Glu Asp Ser Gly Tyr Asp Met Val
 35 40 45

Asp Phe Ile Asp Asp Ser Asn Ile Thr His Asn Ser Leu Glu Ala Gln
 50 55 60

Gly Thr Val Ile Ser His Val Asn Ser Ser Ser His Phe Trp Leu Gln
 500 505 510

Pro Leu Val Asp Ala Lys Val Ala Leu Leu Asp Asp Ala Thr Gln Pro
 515 520 525

Cys Trp Ile Tyr Met Asp Thr Tyr Met Arg Asn Leu Leu Asp Gly Asn
 530 535 540

Pro Met Ser Ile Asp Arg Lys His Lys Ala Leu Thr Leu Ile Lys Cys
 545 550 555 560

Pro Pro Leu Leu Val Thr Ser Asn Ile Asp Ile Thr Lys Glu Asp Lys
 565 570 575

Tyr Lys Tyr Leu His Thr Arg Val Thr Thr Phe Thr Phe Pro Asn Pro
 580 585 590

Phe Pro Phe Asp Arg Asn Gly Asn Ala Val Tyr Glu Leu Ser Asn Thr
 595 600 605

Asn Trp Lys Cys Phe Phe Glu Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asp Ile Gln
 610 615 620

Asp Ser Glu Asp Glu Glu Asp Gly Ser Asn Ser Gln Ala Phe Arg Cys
 625 630 635 640

Val Pro Gly Thr Val Val Arg Thr Leu
 645

<210> 5
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus type 11

<400> 5
 Met Glu Ala Ile Ala Lys Arg Leu Asp Ala Cys Gln Asp Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Tyr Glu Glu Asn Ser Ile Asp Ile His Lys His Ile Met His
 20 25 30

Trp Lys Cys Ile Arg Leu Glu Ser Val Leu Leu His Lys Ala Lys Gln
 35 40 45

Met Gly Leu Ser His Ile Gly Leu Gln Val Val Pro Pro Leu Thr Val
 50 55 60

Ser Glu Thr Lys Gly His Asn Ala Ile Glu Met Gln Met His Leu Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Lys Thr Gln Tyr Gly Val Glu Pro Trp Thr Leu Gln Asp
 85 90 95

Thr Ser Tyr Glu Met Trp Leu Thr Pro Pro Lys Arg Cys Phe Lys Lys
 100 105 110

Gln Gly Asn Thr Val Glu Val Lys Phe Asp Gly Cys Glu Asp Asn Val
 115 120 125

Met Glu Tyr Val Val Trp Thr His Ile Tyr Leu Gln Asp Asn Asp Ser
 130 135 140

Trp Val Lys Val Thr Ser Ser Val Asp Ala Lys Gly Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160

Cys Gly Gln Phe Lys Thr Tyr Tyr Val Asn Phe Asn Lys Glu Ala Gln
 165 170 175

Lys Tyr Gly Ser Thr Asn His Trp Glu Val Cys Tyr Gly Ser Thr Val
 180 185 190

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Val Ser Ser Thr Val Arg Glu Val Ser Ile
 195 200 205

Ala Glu Pro Thr Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ala Pro Thr Val
 210 215 220

Ser Ala Cys Thr Thr Glu Asp Gly Val Ser Ala Pro Pro Arg Lys Arg
 225 230 235 240

Ala Arg Gly Pro Ser Thr Asn Asn Thr Leu Cys Val Ala Asn Ile Arg

245 250 255

Ser Val Asp Ser Thr Ile Asn Asn Ile Val Thr Asp Asn Tyr Asn Lys
 260 265 270

His Gln Arg Arg Asn Asn Cys His Ser Ala Ala Thr Pro Ile Val Gln
 275 280 285

Leu Gln Gly Asp Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe Arg Tyr Arg Leu Asn
 290 295 300

Asp Lys Tyr Lys His Leu Phe Glu Leu Ala Ser Ser Thr Trp His Trp
 305 310 315 320

Ala Ser Pro Glu Ala Pro His Lys Asn Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr
 325 330 335

Ser Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asn Ser Val Lys Ile Pro
 340 345 350

Pro Thr Ile Arg His Lys Val Gly Phe Met Ser Leu His Leu Leu
 355 360 365

<210> 6
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus type 6a

<400> 6
 Met Glu Ala Ile Ala Lys Arg Leu Asp Ala Cys Gln Glu Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Tyr Glu Glu Asn Ser Thr Asp Leu Asn Lys His Val Leu His
 20 25 30

Trp Lys Cys Met Arg His Glu Ser Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Gln
 35 40 45

Met Gly Leu Ser His Ile Gly Met Gln Val Val Pro Pro Leu Lys Val
 50 55 60

Ser Glu Ala Lys Gly His Asn Ala Ile Glu Met Gln Met His Leu Glu
65 70 75 80

Ser Leu Leu Lys Thr Glu Tyr Ser Met Glu Pro Trp Thr Leu Gln Glu
85 90 95

Thr Ser Tyr Glu Met Trp Gln Thr Pro Pro Lys Arg Cys Phe Lys Lys
100 105 110

Arg Gly Lys Thr Val Glu Val Lys Phe Asp Gly Cys Ala Asn Asn Thr
115 120 125

Met Asp Tyr Val Val Trp Thr Asp Val Tyr Val Gln Asp Thr Asp Ser
130 135 140

Trp Val Lys Val His Ser Met Val Asp Ala Lys Gly Ile Tyr Tyr Thr
145 150 155 160

Cys Gly Gln Phe Lys Thr Tyr Tyr Val Asn Phe Val Lys Glu Ala Glu
165 170 175

Lys Tyr Gly Ser Thr Lys Gln Trp Glu Val Cys Tyr Gly Ser Thr Val
180 185 190

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Val Ser Ser Thr Thr Gln Glu Val Ser Ile
195 200 205

Pro Glu Ser Thr Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ser Thr Pro Val Ser
210 215 220

Ser Ser Thr Gln Glu Asp Ala Val Gln Thr Pro Pro Arg Lys Arg Ala
225 230 235 240

Arg Gly Val Gln Gln Ser Pro Cys Asn Ala Leu Cys Val Ala His Ile
245 250 255

Gly Pro Val Asp Ser Gly Asn His Asn Leu Ile Thr Asn Asn His Asp
260 265 270

Gln His Gln Arg Arg Asn Asn Ser Asn Ser Ser Ala Thr Pro Ile Val
275 280 285

Gln Phe Gln Gly Glu Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe Arg Tyr Arg Leu
 290 295 300

Asn Asp Lys His Arg His Leu Phe Asp Leu Ile Ser Ser Thr Trp His
 305 310 315 320

Trp Ala Ser Pro Lys Ala Pro His Lys His Ala Ile Val Thr Val Thr
 325 330 335

Tyr His Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asn Val Val Lys Ile
 340 345 350

Pro Pro Thr Ile Arg His Lys Leu Gly Phe Met Ser Leu His Leu Leu
 355 360 365

<210> 7

<211> 368

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 6b

<400> 7

Met Glu Ala Ile Ala Lys Arg Leu Asp Ala Cys Gln Glu Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Tyr Glu Glu Asn Ser Thr Asp Leu His Lys His Val Leu His
 20 25 30

Trp Lys Cys Met Arg His Glu Ser Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Gln
 35 40 45

Met Gly Leu Ser His Ile Gly Met Gln Val Val Pro Pro Leu Lys Val
 50 55 60

Ser Glu Ala Lys Gly His Asn Ala Ile Glu Met Gln Met His Leu Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Arg Thr Glu Tyr Ser Met Glu Pro Trp Thr Leu Gln Glu

85

90

95

Thr Ser Tyr Glu Met Trp Gln Thr Pro Pro Lys Arg Cys Phe Lys Lys
100 105 110

Arg Gly Lys Thr Val Glu Val Lys Phe Asp Gly Cys Ala Asn Asn Thr
115 120 125

Met Asp Tyr Val Val Trp Thr Asp Val Tyr Val Gln Asp Asn Asp Thr
130 135 140

Trp Val Lys Val His Ser Met Val Asp Ala Lys Gly Ile Tyr Tyr Thr
145 150 155 160

Cys Gly Gln Phe Lys Thr Tyr Tyr Val Asn Phe Val Lys Glu Ala Glu
165 170 175

Lys Tyr Gly Ser Thr Lys His Trp Glu Val Cys Tyr Gly Ser Thr Val
180 185 190

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Val Ser Ser Thr Thr Gln Glu Val Ser Ile
195 200 205

Pro Glu Ser Thr Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ser Thr Leu Val Ser
210 215 220

Ser Ser Thr Lys Glu Asp Ala Val Gln Thr Pro Pro Arg Lys Arg Ala
225 230 235 240

Arg Gly Val Gln Gln Ser Pro Cys Asn Ala Leu Cys Val Ala His Ile
245 250 255

Gly Pro Val Asp Ser Gly Asn His Asn Leu Ile Thr Asn Asn His Asp
260 265 270

Gln His Gln Arg Arg Asn Asn Ser Asn Ser Ser Ala Thr Pro Ile Val
275 280 285

Gln Phe Gln Gly Glu Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe Arg Tyr Arg Leu
290 295 300

Asn Asp Arg His Arg His Leu Phe Asp Leu Ile Ser Ser Thr Trp His
 305 310 315 320

Trp Ala Ser Ser Lys Ala Pro His Lys His Ala Ile Val Thr Val Thr
 325 330 335

Tyr Asp Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asp Val Val Lys Ile
 340 345 350

Pro Pro Thr Ile Ser His Lys Leu Gly Phe Met Ser Leu His Leu Leu
 355 360 365

<210> 8
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: HPV11 E2 amino acid sequence including a point mutation to remove biological activity

<400> 8
 Met Glu Ala Ile Ala Lys Arg Leu Asp Ala Cys Gln Asp Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Tyr Glu Glu Asn Ser Ile Asp Ile His Lys His Ile Met His
 20 25 30

Trp Lys Cys Ile Arg Leu Glu Ser Val Leu Leu His Lys Ala Lys Gln
 35 40 45

Met Gly Leu Ser His Ile Gly Leu Gln Val Val Pro Pro Leu Thr Val
 50 55 60

Ser Glu Thr Lys Gly His Asn Ala Ile Glu Met Gln Met His Leu Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Lys Thr Gln Tyr Gly Val Glu Pro Trp Thr Leu Gln Asp

85

90

95

Thr Ser Tyr Glu Met Trp Leu Thr Pro Pro Lys Arg Cys Phe Ala Lys
 100 105 110

Gln Gly Asn Thr Val Glu Val Lys Phe Asp Gly Cys Glu Asp Asn Val
 115 120 125

Met Glu Tyr Val Val Trp Thr His Ile Tyr Leu Gln Asp Asn Asp Ser
 130 135 140

Trp Val Lys Val Thr Ser Ser Val Asp Ala Lys Gly Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160

Cys Gly Gln Phe Lys Thr Tyr Tyr Val Asn Phe Asn Lys Glu Ala Gln
 165 170 175

Lys Tyr Gly Ser Thr Asn His Trp Glu Val Cys Tyr Gly Ser Thr Val
 180 185 190

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Val Ser Ser Thr Val Arg Glu Val Ser Ile
 195 200 205

Ala Glu Pro Thr Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Thr Ala Pro Thr Val
 210 215 220

Ser Ala Cys Thr Thr Glu Asp Gly Val Ser Ala Pro Pro Arg Lys Arg
 225 230 235 240

Ala Arg Gly Pro Ser Thr Asn Asn Thr Leu Cys Val Ala Asn Ile Arg
 245 250 255

Ser Val Asp Ser Thr Ile Asn Asn Ile Val Thr Asp Asn Tyr Asn Lys
 260 265 270

His Gln Arg Arg Asn Asn Cys His Ser Ala Ala Thr Pro Ile Val Gln
 275 280 285

Leu Gln Gly Asp Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe Arg Tyr Arg Leu Asn
 290 295 300

Asp Lys Tyr Lys His Leu Phe Glu Leu Ala Ser Ser Thr Trp His Trp
 305 310 315 320

Ala Ser Pro Glu Ala Pro His Lys Asn Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr
 325 330 335

Ser Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asn Ser Val Lys Ile Pro
 340 345 350

Pro Thr Ile Arg His Lys Val Gly Phe Met Ser Leu His Leu Leu
 355 360 365

<210> 9

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HPV6b E2 amino acid sequence including a point mutation to remove biological activity

<400> 9

Met Glu Ala Ile Ala Lys Arg Leu Asp Ala Cys Gln Glu Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Tyr Glu Glu Asn Ser Thr Asp Leu His Lys His Val Leu His
 20 25 30

Trp Lys Cys Met Arg His Glu Ser Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Gln
 35 40 45

Met Gly Leu Ser His Ile Gly Met Gln Val Val Pro Pro Leu Lys Val
 50 55 60

Ser Glu Ala Lys Gly His Asn Ala Ile Glu Met Gln Met His Leu Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Arg Thr Glu Tyr Ser Met Glu Pro Trp Thr Leu Gln Glu
 85 90 95

Thr Ser Tyr Glu Met Trp Gln Thr Pro Pro Lys Arg Cys Phe Ala Lys

Trp Ala Ser Ser Lys Ala Pro His Lys His Ala Ile Val Thr Val Thr
 325 330 335

Tyr Asp Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asp Val Val Lys Ile
 340 345 350

Pro Pro Thr Ile Ser His Lys Leu Gly Phe Met Ser Leu His Leu Leu
 355 360 365

<210> 10
 <211> 1965
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Codon
 optimised and mutated nucleotide sequence for
 HPV6b E1

<400> 10
 gcggccgcca tggcagacga ttccggtact gagaacgaag gttctggttg taccggttgg 60
 ttcattggtt aagcaatcgt tcagcatccg actggtacc agatctccga tgacgaagac 120
 gaagaagtgg aagattctgg ttacgacatg gttgacttca tcgatgactc caacatcact 180
 cataactctc tggaaagcaca ggctctgttt aaccgccagg aagctgatac ccattacgct 240
 actgttcagg acctgggagg caaatatctg ggctctccgt acgtttcccc gatcaacact 300
 atcgcagaag cagttgagtc tgaatctcc ccgcgcctgg acgctatcaa actgactcgt 360
 cagccgaaga aggttaaacg tcgtctgttc cagactcgtg aactgaccga
 ctccggttac 420
 ggttatagcg aagttgaggc tggcaccggc acccaggttg aaaaacacgg tgtaccggaa 480
 aacggcggcg acggtcagga aaaggacacc ggccgcgaca tcgagggtga ggaacacacc 540
 gaagctgaag ctccgactaa ctctgttctg gaacacgcag gtactgcggg tatcctggaa 600
 ctgctgaaat gcaaagacct gcgcgcggct ctgctgggca aattcaaaga atgcttcggc 660
 ctgtcttcca ttgacctgat ccgtccgttt aagtctgaca aaactacctg tctggactgg 720
 gttgtagcag gcttcggcat ccaccactct atctctgaag cattccagaa actgatcgag 780
 ccgctgtctc tgtacgcga catccagtgg ctgactaacg
 cttggggtat ggttctgctg 840
 gtactgctgc gctttaaagt aaacaaatct cgttccactg ttgctcgtac tctggctacc 900
 ctgctgaaca tcccggagaa ccagatgctg atcgaaccgc cgaatatcca gctctggtgta 960
 gctgcaactg actggtttcg tactggcact tctaacgcta gcactgttat cggatgaagca 1020
 ccggaatgga tcaactgctc gaccgttacc gaacacggtc tggcagattc tcagttaaaa 1080
 ctgactgaaa tggttcagtg ggcatacgac aacgacatct gcgaggaatc tgaattgcg 1140
 ttcgaatacg ctacgcgtgg cgacttcgac tccaacgctc gtgctttcct gaacagcaac 1200
 atgcaggcta aatacgtaaa agactgcgct
 accatgtgcc gtcactaaa acacgcggaa 1260
 atgcgtaaaa tgtctatcaa acagtggatc aagcaccgcg gttctaaaat cgaaggtacc 1320
 ggtaactgga aaccgatcgt tcagttcctg cgccatcaga acatcgaatt catcccgctc 1380
 ctgaccaaat tcaagctgtg gctgcacggf accccgaaaa aaaactgcat cgctatcgta 1440

ggtccaccgg aactgacaa gtcttacttc tgtatgtccc tgatctcttt cctgggcggc 1500
 actgtaatct ctacggttaa ctcttcctcc cttttctggc tgcagccact ggtagacgcg 1560
 aaagtagctc tgetggacga cgcgacccag ccgtgctgga tctacatgga tacttacatg 1620
 cgcaacctgc tggacggtaa
 cccgatgtct atcgaccgta aacacaaagc gctgactctg 1680
 atcaagtgcc cgccgctgct ggtaacttct aacatcgaca tcaccaagga agataaatac 1740
 aagtacctgc ataccggtgt tactaccttt actttcccga acccgttccc gtttgatcgt 1800
 aacggtaacg ctgtttacga actgtccaac actaactgga aatgcttctt cgagcgtctg 1860
 tcttcctccc tggacatcca ggactctgaa gatgaagaag atggttctaa ctctcaggct 1920
 ttccgttgtg ttccgggtac tgttgttcgt actctgtgag gatcc 1965

<210> 11
 <211> 1119
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Codon
 optimised and mutated nucleotide sequence for
 HPV11 E2

<400> 11
 gcggccgcca tgaagccat cgcaagagg ctcgacgct gccaggacca gctgctcgag 60
 ctgtacgagg agaacagcat tgacatccat aagcacatca tgcactggaa gtgcattcgc 120
 ctggagagcg tgetgttga caaggccaag cagatgggccc tgtcccacat aggcttcag 180
 gtggtcccc ctctgaccgt gtcagagaca aaggccata acgcaatcga gatgcagatg 240
 cacctcgagt cgetggcgaa aacacagtac ggcgtggagc catggaccct gcaggacacc 300
 tctgacgaaa tgtggctgac cccacctaaag cgatgcttcg ccaaacaggg caacacagtg 360
 gaggtgaagt tgcacggctg tgaggataac gttatggagt atgtcgtgtg
 gacgcacatc 420
 tatctgcagg acaacgacag ttgggtgaag gtgaccagct ccgtggacgc gaagggcac 480
 tactatacct gtgggcagtt taaaacctac tatgtgaact tcaacaaaga ggcccaaaag 540
 tatggctcca ccaaccactg ggaggtctgc tatgggagca cgggtatttg ctctcccgcc 600
 agcgtgtcta gcaactgtgcg cgaggtgagc attgccgagc cgaccacgta caccctgcc 660
 cagacgaccg ctccgaccgt gtctgcttgt actaccgagg acggcgtgag cgctccacc 720
 aggaagcgtg cgaggggcc c aagcaccaac aacacctct gtgtggcgaa cattcgcagc 780
 gtcgacagta ccatcaataa catcgtgacg gataactata
 acaagcacca gaggcgtaac 840
 aactgtcact ctgccgcaac ccccatcgtg cagctccagg gagacagcaa ttgccttaag 900
 tgcttccgct atcgctcaa cgacaagtac aagcacctct ttgagctcgc ctctcgcagc 960
 tggcactggg cctcaccga ggcaacctcag aagaacgcca tctgctcctc cacttactec 1020
 agtgaggagc agagacagca gtttctgaac agcgtgaaga tcccaccgac gatccgctcat 1080
 aaggtcggct tcatgtcact gcatctcctg tgaggatcc 1119

<210> 12
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide linker

<400> 12

agcttgccgc cgctagcgat atcggtagca tatgtcgacg gatcc 45

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide linker

<400> 13

ggccggatcc gtcgacatct ggtaccgata tcgctagcgg ccgca 45

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 6b

<400> 14

Cys Ser Ser Ser Leu Asp Ile Gln Asp Ser Glu Asp Glu Glu Asp Gly
1 5 10 15

Ser Asn Ser Gln Ala Phe Arg
20

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 6b

<400> 15

Met Glu Ala Ile Ala Lys Arg Leu Asp Ala Cys Gln Glu Gln Leu Leu
1 5 10 15

Glu Leu Tyr Glu Glu Cys
20