(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 14/025
A61K 39/12

(45) 공고일자 2003년08월21일
(11) 등록번호 10-0384922
(24) 등록일자 2003년05월09일

(21) 출원번호	10-1996-0706525	(65) 공개번호	특1997-0703364
(22) 출원일자	1996년11월18일	(43) 공개일자	1997년07월03일
번역문제출일자	1996년11월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/AU1995/00292	(87) 국제공개번호	WO 1995/31476
(86) 국제출원일자	1995년05월17일	(87) 국제공개일자	1995년11월23일

(81) 지정국 국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 케냐
EA 유라시아특허 : 아르메니아 벨라루스 키르기즈
EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국

(30) 우선권주장 PM 5667 1994년05월17일 오스트레일리아(AU)

(73) 특허권자 더 유니버서티 어브 퀸슬랜드
오스트레일리아 퀸슬랜드 4072 세인트 루시아

(72) 발명자 이안 프레이저
오스트레일리아 큐엘디 4067 에스티. 루시아 하이랜드 테라스 110
지안 조우
미합중국 아이엘 60153 메이우드 사우스 퍼스트 애버뉴 2160 로욜라 유니버시티

(74) 대리인 송만호, 유미특허법인

심사관 : 퇴-한현숙

(54) 재조합파필로마바이러스L1

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 L1 단백질 파필로마 바이러스에 관한 것이다. 상세하게는 본 발명은 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 관한 것이고 이것의 용도는 파필로마 바이러스 감염의 검출와 치료를 위한 것이다.

배경기술

<2> 파필로마 바이러스는 인간, 소, 양, 개와 고양이를 포함하는 숙주의 범위를 감염시킨다. 더욱 완전한 목록을 위해서는, *Springer Verlag*, 1987에서 K. Syrjanen, L. Gissman과 L.G. Koss에 의해 간행된 J.P Sundberg의 "Papilloma Virus Infections in Animals"를 참고하라.

<3> 인간 파필로마 바이러스는 피부와 점액성 상피세포의 양성의 과세포분열성 손상을 유도한다. 인간을 감염시키는 70가지 다른 바이러스 종류 중에서 20가지 이상은 이상 생식기 손상에 관련되어 있다(de Villers, 1989, *J. Virol.* 63 4898-4903). 파필로마 바이러스는 또한 다양한 형태의 암들에 관련되어 있다. 인간 파필로마 바이러스 타입 16과 18은 수많은 경부의 내부-상피세포 이상증식과 경부암에 관련되어 있다(Lancaster 외, 1987, *Cancer Metast. Rev.* 6 6653-6664와 Pfister, 1987, *Adv. Cancer Res.* 48 113-147)

<4> 파필로마 바이러스는 8개의 초기와 2개의 후기 유전자들까지를 엔코딩하는 작은 DNA 바이러스이다. 후기 유전자 L1과 L2는 상기 세포내에서 캡시드를 조립하는 구조 단백질들을 코딩한다(Galloway 외, 1989, Adv. Virus Res. 37 125-171). 단일 바이러스 캡시드는 360개의 오중체의(pentameric) 캡소머로 이루어진 T=7d의 정이십면체로서 이들 캡소머들 각각은 주된 캡시드 단백질 L1을 5분자 포함한다(Baker 외, 1991, *Biophys. J.* 60 1445-1456과 Finch 외, 1965, *J. Mol. Bio.* 131-12). 상기 부수적인 캡시드 단백질 L2는 L1의 존재량의 약 1/10 로 존재한다 (Doorbar 외, 1987, *J. Virol.* 61 2793-2799).

<5> 생체 외에서 인간 파필로마 바이러스들은 증식하지 않고(Taichman 외, 1984, J. Invest, Dermatol. 83 25) 단지 소량의 HPV 단백질만이 감염된 조직으로부터 분리되었다(Androphy 외, 1987, *Embo J.* 6 1989; Banks 외, 1987, *J. Gen. Virol.* 68 1351; Firzlaff 외, 1988, *Virology* 164 467; Oltersdorf 외, 1987, *J. Gen. Virol.* 68 2933; Schneider-Gadicke 외, 1988, *Cancer Res.* 48. 2969; Seedorf 외, *Embo J.* 6 139와 Smotkin 외, 1986, *PANS* 83 4680). 그러나 상기 L1 단백질을 코딩하는 유전자는 클론되

고 재조합 백시니아 바이러스를 사용한 진핵생물의 발현 시스템(Browne 외, 1988, *J. Gen Virol.* 69 1263-1273; Zhou 외, 1990, *J. Gen. Virol.* 71 2185-2190과 Zhou 외, 1991, *Virology* 185 251-257), 바큘로바이러스 발현 시스템(Park 외, 1993, *J. Virol. Meth.* 45 303-318)과 박테리아의 발현 시스템(Strike 외, 1989, *J. Gen. Virol.* 70 543-555)으로 발현되었다.

<6> L1 단백질은 주된 캡시드 단백질로서, 이것은 파필로마 바이러스 감염에 대한 방어를 위한 백신의 제조를 위한 기초로서 사용되어 왔다. Zhou 등은 HPV16의 L1과 L2 단백질들을 위한 이중의 재조합 백시니아 바이러스를 사용한 합성 HPV16 바이러스성 입자들(VLPs)을 이용하여 생쥐에게 면역을 가지게 했다. 상기 쥐(murine) 항-VLP 항-혈청은 면역블롯(immunoblot)상에서 ELISA와 바큘로바이러스 재조합 HPV16L1과 L2 단백질에 의해 HPV16 캡시드를 인식하였다. 그러나 상기 쥐 항-VLP 항-혈청은 재조합 L1 융해 단백질에 대항하여 발생한 항-HPV16L1 모노클로날 항체들에 의해 인식된 2개의 펩티드를 인식하지 못했다(Zhou 외, 1992, Virology, 189 592-599). 이들 연구자들은 바이러스성 입자들을 사용하여 규정된 HPV16의 면역반응의 항원결정기(epitopes)는 재조합 HPV16L1 융해 단백질들을 사용하여 규정된 그것들과 확연히 다르다는 결론을 얻었다.

<7> 제시(presentation)의 문제들을 극복하기 위해서 백신들을 바이러스성 입자들을 사용하여 개발하였다. 바이러스성 입자들은 재조합 백시니아 바이러스에 의해 엔코딩된 재조합 L1 또는 L1과 L2 단백질들로부터 세포내적으로 생성되었다(Zhou외, 1991, *Virology*, 185 251-257; Zhou 외, 1991, *Virology*, 181 203-210과 국제 특허 공개 W093/02184). 이들 합성 바이러스성 입자들을 사용한 백신들은 수많은 결점들을 가지고 있다. 첫째, 재조합 L1 또는 L1과 L2유전자들은 백신의 생산을 위해 적당하지 않은 백시니아 바이러스 벡터로부터 발현되었다. 둘째, 세포 내적으로 바이러스성 입자들을 생산하는 것은 속도 제한 단계이다. 세째, 바이러스성 입자들이 세포내적으로 생산되기 때문에 세포의 DNA를 병합할수 있으며 DNA를 병합하는 바이러스성 입자들은 백신으로 사용하기 위해서 적당하지 않다. 네째, 바이러스성 입자들은 그들의 보전(integrity) 및 명확한 항원결정기 제시를 보유할 필요때문에 부분적으로만 정제할 수 있다. 결과적으로 바이러스성 입자들에 관련된 다른 단백질들 또는 물질은 백신 제조를 오염시킬수도 있다. 다섯째, 재조합 백시니아 바이러스로부터 바이러스성 입자들을 사용하여 상업적인 양의 백신을 생산하는 공정은 상대적으로 비용이 많이 든다.

<8> 유사한 결점들은 환자의 혈청에서의 항체 검출를 위한 재조합 백시니아 바이러스로부터 생산된 바이러스성 입자들의 사용에도 적용된다.

발명의 상세한 설명

<9> 본 발명은 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질이 세포외적으로 다중체성 구조물들을 형성하고 천연의 파필로마 바이러스 캡시드를 인식하는 면역 반응을 유도해낼수 있다는 놀라운 발견에 기인한다.

<10> 이와 같이 본 발명의 목적은 면역항원적인 다중체성 구조물을 형성할 수 있는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 제공하는 것이다.

<11> 일 양태로서 본 발명은 $(His)_6$을 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 가진 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질이다. $(His)_6$은 여섯 결합된 히스티딘 잔기들을 나타낸다.

<12> 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은

MetArgGlySerHisHisHisHisHisHisGlyMetAlaSerMetThrGly

GlyGlnGlnMetGlyArgAspLeuTyrAspAspAspAspLysAsp

<14> 을 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 가진다.

<15> 상기 파필로마 바이러스 L1 단백질은 어느 파필로마 바이러스 타입으로부터 유래될 수 있다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 파필로마 바이러스 L1 단백질의 완전하거나 부분적인 아미노산 서열일 수 있다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 파필로마 바이러스 L1 단백질을 인식하는 면역 반응을 유도하는 하나 또는 그 이상의 항원결정기를 코딩하기 위한 아미노산 서열일 수 있다. 예로서 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 HPV 6b로부터 유래되고 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 도 1에 나타내었다.

<16> 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 의해 유도된 상기 면역 반응은 항체반응이고 즉, 세포 매개(mediated) 반응을 동반하는 항체 반응일 수 있다. 상기 유도된 반응은 재조합 및/또는 천연의 파필로마 바이러스 바이러스성 입자 L1 단백질을 인식한다. 상기 항체 반응에서 항체들은 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대항하여 발생하고 이들 항체들은 파필로마 바이러스 바이러스성 입자 L1 단백질을 인식한다. 상기 세포 매개성 및 체액성 반응은 T 세포, 큰 입자 림프구(large granular lymphocytes), 단핵 식세포(mononuclear phagocytes), 호중구(neutrophils), 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils), 유방 세포(mast cells), 다양한 조직 세포, 혈소판(platelets), 보체(complement), 염증성의 유리물질(inflammatory mediators)과 인터페론(interferons), 인터루킨(interleukins), 콜로니 자극 인자(colony stimulating factor), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)와 변형 성장 인자 B(transforming growth factor B)를 포함하는 시토킨(cytokines)을 포함한다. 상기 세포 매개성 및 체액성 반응은 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질로 초회항원자극을 받고(primed) 항원투여(challdnged)됨으로써 발생한다. 세포 매개성 및 체액성 반응의 예는 지연성 과민증의 현상이다.

<17> 두번째 양태로서 본 발명은 다수 개의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들을 포함하는 다중체성 구조물이다; 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질 각각은 $(His)_6$을 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 가진다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질의 하나 또는 그 이상은 상기한 N 말단 아미노산

서열을 가진다.

<18> 상기 다중체성 구조물은 어떤 크기라도 가능하지만 바람직하게는 오중체 구조이다. 다중체성 구조물은 바이러스성 입자이기도하다. 상기 바이러스성 입자라는 용어는 파필로마 바이러스 비리온들가 재조합 파필로마 바이러스성 입자를 포함한다. 상기 다중체성 구조물은 바람직하게는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질이 실질적으로 정제된 후 형성된다. 상기 다중체성 구조물들은 적당한 완충 용액 중에서 세포외에서 자가-조립(self-assemble)된다. 더욱이 상기 다중체성 구조물은 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도할 수 있다.

<19> 본 발명의 세 번째 양태는 본 발명의 첫 번째 양태에 따른 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 엔코딩하는 재조합 DNA 분자이다. 상기 재조합 DNA 분자는 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도하는 항원결정기를 포함하는 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질의 부분을 엔코딩할 수 있다. 다른 방법으로서 상기 재조합 DNA 분자는 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질 또는 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질의 부분을 코딩하는 유사 DNA 서열일 수 있다. 상기 재조합 DNA 분자는 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질 또는 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질의 부분을 엔코딩하는 서열을 위해 표준 조건에서 하이브리드(hybridise)할 수 있는 서열을 엔코딩할 수 있다.

<20> 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 엔코딩하는 상기 재조합 DNA 분자는 트리뉴클레오티드 CAT의 6개의 반복 단위를 포함하는 5'뉴클레오티드 서열을 가진다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 엔코딩하는 상기 재조합 DNA 분자는 바람직하게는 하기한

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCT

AGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTA

CGACGATGACGATAAGGAT

<22> 을 포함하는 5'뉴클레오티드 서열이다.

<23> 적당한 재조합 DNA 분자는 도 1에 제공되어 있다.

<24> 본 발명의 네 번째의 양태는

<25> (I) 박테리아로부터 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 엔코딩하는 재조합 DNA 분자의 발현 공정;

<26> (II) 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질의 실질적인 정제 공정과;

<27> (III) 상기 다중체성 구조물을 세포외에서 형성하는 공정을;

<28> 포함하는 다수 개의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 포함하는 다중체성 구조물의 제조 방법이며 상기 다중체성 구조물은 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도할 수 있다.

<29> 상기 방법은 $(His)_6$을 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 가진 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들을 포함하는 다중체성 구조물을 사용한다. 상기 N 말단 아미노산은

MetArgGlySerHisHisHisHisHisGlyMetAlaSerMetThrGly

GlyGlnGlnMetGlyArgAspLeuTyrAspAspAspLysAsp

<31> 을 포함한다.

<32> 상기 재조합 DNA 분자는 표준 클로닝(cloning) 및/또는 PCR 기술을 사용하여 인간 파필로마 바이러스 또는 소 파필로마 바이러스 등의 파필로마 바이러스 DNA의 적당한 소스(source)로부터 구성될 수 있다. 상기 재조합 DNA 분자는 또한 발현 벡터를 포함할 수 있다. 상기 발현 벡터는 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid), 파아지미드(phagemid) 또는 바이러스일 수 있다. 적당한 발현 벡터는 ATG 부위, $(His)_6$ 펩티드, 클로닝 부위를 엔코딩하며 여기서 파필로마 바이러스 L1 단백질 DNA 서열이 전사로부터 형성하는 $(His)_6$-L1 단백질을 위하여 올바른 리딩 프레임(reading frame)에 삽입될 수 있다. 바람직한 발현 벡터는 플라스미드 pTrcHisA, pTrcHisB와 pTrcHisC 중의 어느 하나이다. 적당한 숙주는 *E. coli* 균주이다.

<33> 상기 바람직한 발현 시스템은 *E. Coli*와 플라스미드 pTrcHisB를 가진 박테리아의 발현 시스템이다. 재조합 DNA 분자의 적당한 숙주로의 도입은 형질 도입(transfection)과 형질 전환(transformation)을 포함한 적당한 방법에 의해 달성될 수 있을 것이다. 바람직한 재조합 DNA 분자는 PTrc6bL1을 형성하기 위하여 올바른 리딩 프레임 방향에서 pTrcHisB로 삽입된 HPV6b L1 단백질의 완전한 DNA 서열이다. 상기 재조합 DNA 분자 pTrc6bL1은 *E. Coli* 균주 DH5로 바람직하게 형질 전환된다.

<34> 발현에 이어 상기 발현 시스템은 붕괴될 수 있다. 상기 발현 시스템은 세포시스템이며 상기 세포는 구아니디움 클로라이드를 포함하는 완충 용액 중의 고주파 음에 의한 분해같은 적당한 기술과 시약으로 용균될 수 있다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 부분 또는 완전히 정제될 수 있다. 정제

는 어떤 하나 또는 그 이상의 적당한 크로마토그래피 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 니켈 칼럼을 가진 점착 크로마토그래피 공정을 사용하여 정제할 수 있다. 부가적인 정제 공정은 제조 젤 전기영동을 포함할 수 있다.

<35> 다섯 번째 양태로서 본 발명은 파필로마 바이러스의 존재를 검출하기 위한 방법을 제공한다.

<36> 상기 방법은 상기 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대항하여 발생한 항체를 사용하여 시료에서의 파필로마 바이러스 L1 단백질의 존재를 검출할 수 있다. 상기 방법은 ELISA, RIA 또는 다른 이뮤노어세이(immunoassay) 기술을 사용할 수도 있다. 상기 방법은

<37> (1) 파필로마 바이러스 L1 단백질을 포함하는 것으로 추정되는 시료를 사용하여 마이크로타이터(microtitre) 접시의 관들을 코팅하는 공정과;

<38> (2) 파필로마 바이러스 L1 단백질-항체 복합체를 형성하기 위해 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대항하여 발생한 항혈청을 첨가하는 공정과;

<39> (3) 검출제로 상기 파필로마 바이러스 L1-항체 복합체의 존재를 검출하는 공정을 포함한다.

<40> (1)의 공정에서 상기 마이크로타이터 접시의 관들은 상기 시료의 첨가에 앞서 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대항하여 발생하는 항혈청으로 처음으로 코팅할 수 있다. 상기 검출제는 항체 또는 적당한 레이블(label)이 접합된 다른 적당한 리간드(ligand)일 수 있다. 적당한 레이블은 호오스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 방사성 동위원소(radioactive isotope), 형광측정 분자(fluorometric molecule)같은 어느 적당한 효소를 포함한다.

<41> 여섯 번째 양태로서 본 발명은 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 사용하여 시료 중의 파필로마 바이러스 L1 단백질들에 대해 특이적인 항체들의 존재 검출 방법을 제공한다.

<42> 상기 방법은 ELISA, RIA 또는 다른 이뮤노어세이 기술들을 사용할 수 있다. 상기 방법은

<43> (i) 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 사용하여 마이크로타이터 접시의 관들을 코팅하는 공정과;

<44> (ii) 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질-항체 복합체를 형성하기 위해 파필로마 바이러스 L1 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것으로 추정되는 시료를 첨가하는 공정과;

<45> (iii) 검출제를 사용하여 재조합 파필로마 바이러스 L1-항체 복합체의 존재를 검출하는 공정을 포함한다.

<46> 일곱 번째 양태로서 본 발명은 시료 중의 파필로마 바이러스 L1 단백질의 존재를 검출하기위한 키트(kit)를 제공하고 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대항하여 발생한 항체를 포함한다.

<47> 여덟 번째 양태로서 본 발명은 시료 중의 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대해 특이적인 항체의 존재를 검출하기 위한 키트를 제공하며 파필로마 바이러스 L1 단백질을 포함한다.

<48> 아홉 번째 양태로서 본 발명은 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 포함한 예방적인 또는 치료적인 백신을 제공한다. 상기 백신은 ISCOMS, 알럼(alum), 프로인트 불완전 애쥬번트(Freunds Incomplete adjuvent), 프로인트 완전 애쥬번트(Freunds Complete adjuvent), 퀼 에이(Quil A), 다른 사포닌들, 알루미늄 하이드록사이드, 알개뮬린(algammulin)과 퍼튜시젠(pertussign) 등의 적당한 애쥬번트(adjuvent)를 포함할 수 있다. 다른 방법으로는 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질이 애쥬번트없는 면역항원인 경우 상기 백신은 애쥬번트를 포함하지 않을 수도 있다.

도면의 간단한 설명

<49> 도 1은 HPV6bL1 HEXAHIS의 DNA 뉴클레오티드 서열과 아미노산 서열.

<50> 도 2는 HPV6bL1 HEXAHIS 단백질 집단체의 오중체 구조들의 전자 현미경 사진.

<51> 실시예들은 본 발명의 여러 가지의 바람직한 실시예들을 제시한다. 이들 바람직한 실시예들은 특이적인 파필로마 바이러스들, 백신 및 재조합 DNA의 구성에 대한 예로서 제공되는 것일 뿐이다.

실시예

<52> 실시예 1: HPV6b HEXAHIS 단백질의 생산

<53> pTRC6bL1의 구성

<54> HPV6b의 L1 오픈 리딩 프레임(open reading frame)은 하기의 프라이머들:

GCGGATCCAGATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATATG

와 CGCCCGGGTTACCTTTTAGTTTTGGCCTCGCTTACGTTTTAGG

<56> 을 사용한 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction)을 사용하여 임상적인 분리물로부터 클론하였다(Invitrogen).

<57> 수득되어진 1.5kb PCR 산물을 *Bam*H1과 *Sma*1으로 쪼개고 플라스미드 pTRCHISB내에 만들어진 *Bam*H1/클레노 절단 *Eco*R1 부위로 클론하였다. 상기 결과물인 L1 재조합 플라스미드는 pTRC6bL1이고 하기

의 단백질 서열:

Met.Arg.Gly.Ser.His.His.His.His.His.His.Gly.Met.Ala.Ser.Met.Thr.

Gly.Gly.Gln.Gln.Met.Gly.Arg.Asp.Leu.Tyr.Asp.Asp.Asp.Lys.Asp. (HPV6b L1

<59> aas 1-520)을 엔코딩한다.

<60> HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 엔코딩하는 박테리아의 성장

<61> 암피실린(최종 농도 100㎍/㎖)을 포함하는 100㎖의 2YT 고기 국물(broth) (16mg 트립토판, 10mg 효모, 5mg 염화 나트륨)에 글리세롤 저장한 10㎕의 박테리아 한 루플(loopful)을 접종하였다. 상기 배지를 37℃, 120rpm의 공기 순환하에 6시간 동안 인큐베이션하였다.

<62> 암피실린(최종 농도 100㎍/㎖)을 포함한 200㎖의 2YT 고기 국물에 6시간-10 ㎖ 배지에 접종하였다.

<63> 암피실린(최종 농도 100㎍/㎖)을 포함한 800㎖의 2YT 고기 국물에 200㎖-오버나잇 배지에 접종하였다. 상기 배지를 600nm에서 0.6-0.8 O.D 유니트(unit)사이의 흡수도를 가질 때까지 120rpm의 공기 순환하에 37℃에서 인큐베이션하였다(일반적으로 2-3시간). 상기 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질은 0.5mM의 IPTG의 첨가에 의해 유도될 수 있다.

<64> 상기 박테리아는 원심분리(Beckman JA14 rotor를 사용하여 5000rpm으로 20℃에서 10분간 원심분리하였다)함에 의해 둥글게 뭉쳐졌다. 50㎖의 원심분리 튜브에서 상기 둥글게 뭉쳐진 박테리아 덩어리를 재현탁함으로써 상기 둥글게 뭉쳐진 덩어리를 50㎖의 인산 완충 소금물로 세척하였다. 상기 세척된 박테리아를 원심분리(Beckman TJ-6을 사용하여 3000rpm으로 20℃에서 10분간 원심분리하였다)하여 다시 둥글게 뭉쳐진 덩어리를 형성하였다. 상기 상등액은 버렸다. 상기 둥글게 뭉쳐진 덩어리를 필요할 때까지 -20℃ 내지 -70℃에서 보관하였다.

<65> HPV6 L1 HEXAHIS 단백질의 정제

<66> 상기 박테리아를 50㎖의 구아니디니움(Guanidinium) 용균 완충 용액(6M 구아니디니움 하이드로클로라이드와 5.8㎖/ℓ의 용액 A[177mM NaH_2PO_4와 5M NaCl] 염산을 사용하여 pH 7.8)에서 재현탁하고 용균시켰다. 상기 상등액은 보유된 상기 HPV6b L1 HEXAHIS을 포함한다.

<67> 상기 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질은 실질적으로 2단계의 정제 공정으로 실질적으로 정제되었다.

<68> 상기 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 포함하는 상등액을 4℃에서 BIORAD ECONO 시스템을 사용하여 니켈 칼럼(2.6cm × 6cm)에 담았다. 상기 상등액을 담기전에 상기 칼럼을 NA 완충 용액을 1㎖/min으로 통과시켜 전체적으로 세척하였다. NA 완충용액은 6M 의 우레아, 5.8㎖/ℓ의 용액 A[177mM NaH_2PO_4와 5M NaCl], 94㎖/ℓ 용액 B[200mM NaH_2PO_4와 5M NaCl]를 포함하며 우레아가 첨가되기 전에 염산을 사용하여 pH7.8로 조정하였다. 상기 상등액을 1㎖/min으로 통과시켜 니켈 칼럼에 담았다. 과하게 담긴 칼럼의 경우는 10㎖ 분획들로 수집되었고 비결합된 단백질은 상기 칼럼을 통과하여 세척하였다. 상등액을 담은 후에 상기 칼럼을 1㎖/min의 유속으로 NA 완충 용액으로 세척하였다. 상기 NA 완충 용액은 6M의 우레아와 100㎖/ℓ의 용액 A[177mM NaH_2PO_4와 5M NaCl]을 포함하며 우레아를 첨가하기 전에 염산을 사용함으로써 pH4.0으로 조정하였다. 상기 칼럼을 표 1에서 나타낸 공정에 따라 NB 완충용액을 사용하여 세척하였으며 여기서 pH성분을 낮추는 것이 오염 단백질을 제거했다. 상기 용출액의 10㎖분획들을 수집하였다.

<69> HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 포함하는 상기 분획들을 도트 블롯(dot blot), 직접 ELISA 또는 SDS PAGE 중의 하나에 의해 측정하였다. 상기 분획들을 규정한 후 pH 수준을 낮출 때까지 100% NB 완충 용액을 사용하여 칼럼의 세척을 계속하였다. 그리고나서 NB 완충 용액을 사용하여 세척하였다(상기 칼럼은 20% 에탄올 중에 보관하였다).

<70> HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 포함하는 상기 분획들을 모으고 5리터의 ddH_2O또는 10mM 트리스 HCl pH7.5를 사용하여 4℃에서 밤새도록 투석하였다(또는 상온에서 2시간동안). 다음으로 상기 단백질을 -70℃에서 2시간동안 또는 -20℃에서 밤새도록 아세톤:시료를 8:2로하여 아세톤을 사용하여 침전시켰다. 상기 단백질-아세톤 용액을 원심분리하였다(Beckman TJ-6을 사용하여 3000rpm으로 4℃에서 20분간). 상기 상등액을 버렸다. 상기 둥글개 뭉쳐진 덩어리를 잔존하는 아세톤을 제거하기 위하여 질소 기체의 흐름하에서 5분간 건조하였다.

<71> 상기 둥글게 뭉쳐진 덩어리를 1㎖의 ddH_2O와 4-5㎖의 4배 정도의 적하(loading) 완충 용액[1.0㎖의 0.5M 트리스 pH6.8, 0.8㎖의 글리세롤, 1.6㎖의 10% SDS w/v, 1.0g의 DTT 1% w/v, 0.2㎖의 0.1% w/v 브로모페놀 블루와 4.4㎖의 dH_2O]에 재현탁하였다. 상기 재현탁된 둥글게 뭉쳐진 덩어리를 65-70℃에서 15분간 열을 가해서 모든 상기 단백질을 용해가 용이하도록 하였다.

<72> 상기 재현탁액을 4% 스태킹(stacking) 젤(직경 4cm, 높이 4cm)과 10% 분리 젤(직경 4cm, 높이 4.5cm)을 포함하는 BIORAD Prep Cell에 담았다. 상기 Prep Cell을 12W 일정한 힘으로 운행시켰다.

<73> 상기 젤의 염색약의 맨 앞이 바닥으로부터의 2cm에 도달했을 때 1㎖/min의 용출 속도에서 10㎖의 분획들을 수집하였다. 도트 블롯, 직접 ELISA, SDS PAGE(Phast 시스템과 함께)중의 하나를 사용하여 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 위하여 분획들을 테스트하였다. 양성의 분획들을 SDS PAGE상에서 테스트하고 단일의 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질 밴드가 만들어지는 것을 확인하였다. 상기 모아진 분획들을 글리신을 제거하기 위하여 5리터의 5리터의 ddH_2O를 사용하여 투석하였다. 4℃의 온도에서 ddH_2O를 두 번 교환하여 사

용하고 밤새도록 투석하였다.

<74> 상기 투석된 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 SDS를 제거하기 위하여 아세톤으로 침전시켰다. 아세톤:시료를 8:2로하여 -70℃에서 2시간 또는 -20℃에서 밤새도록 행하였다. 상기 단백질-아세톤 용액을 원심분리하였다(Beckman TJ-6을 사용하여 3000rpm으로 4℃에서 20분간). 상등액을 버리고 둥글게 뭉쳐진 덩어리를 잔존하는 아세톤을 제거하기 위하여 5분 동안 질소 기체의 흐름하에서 건조하였다.

<75> 상기 단백질을 선택한 완충 용액에 재현탁할 수 있었고 그것의 농도를 측정하였다. 상기한 바대로 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 정제, 10mM의 트리스 염산 pH7.5를 사용한 투석에 의한 점차적인 우레아의 제거와 전자 현미경을 사용한 스캐닝에 의한 면역침전 결과물의 검사를 함으로써 캡소머들을 형성하기 위한 이 단백질을 연속적으로 증명하였다. 도 2는 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질 집합체들의 전형적인 오각형 구조들을 보여준다.

<76> 실시예 2: HP6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하는 항체 생산의 증명

<77> HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하는 항체를 생산하기 위하여 생쥐(C57Bl/6)를 표 2에 나타낸 실험 계획에 따라 4주에 두 번의 간격으로 50㎍ 단백질/생쥐로 피하에 주입하였다. 두 번째의 주입 2 주후에 상기 생쥐의 피를 채혈하였다. 표준 방법을 사용하여 추출된 피로부터 혈청을 얻었다.

<78> 상기 혈청을 인간 파필로마 바이러스 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대한 항체의 생산을 위하여 테스트하였다. 상기 혈청을 200:1로 희석하고 RIPA 완충 용액(20mM 트리스-염산 pH7.6; 2mM EDTA; 50mM NaCl; 1% 데옥시콜레이트; 1% 트리톤 엑스-100; 0.25% SDS; 1% 아프로티닌; 1mM PMSF)중에서 HPV6B 캡시드에 대항하여 테스트하였다. 상기 항체-항원 침전은 이 면역 복합체의 각각의 성분들을 분리하는 10% SDS PAGE상에서 이동시켰다. 상기 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질의 존재는 토끼 항-HPV6b L1 항체를 사용함으로써 검출하였다. HPV6b L1 단백질의 존재는 상기 생쥐의 내부에서 6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하여 항-HPV6b L1 항체가 생산된다는 것을 지시한다. A, B, C, D, E와 F군들은 양성 결과를 나타내었다.

<79> 혈청은 또한 바큘로바이러스에 의해 생산된 HPV6b L1을 사용한 웨스턴 블롯 분석에 의해서도 테스트되었다. 양성의 결과는 생쥐의 내부에서 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항한 항-HPV6b L1 항체가 생산된다는 것을 지시한다. A, B, C, D, E와 F군들은 알루미늄 하이드록사이드가 애쥬번트로 사용되는 경우 가장 좋은 결과를 나타내었다. 상기 대조군 A, B, C, D와 E는 음성의 결과를 나타내었다.

<80> 상기 혈청을 소 파필로마 바이러스 L1 단백질에 대항하는 표준 기술을 사용하는 도트 블롯와 ELISA에 의해 테스트하였다. 가장 좋은 결과는 OD값 0.96을 가진 D군 생쥐(즉 알루미늄이 애쥬번트로 사용되는 경우)로부터 얻어진 혈청으로부터 달성되었고, 다음으로는 OD값 0.70을 가진 C군 생쥐(즉 프로인트 완전 애쥬번트가 사용되는 경우)로부터 얻어진 혈청, OD값 0.34를 가진 E군 생쥐(즉 알개뮬린이 사용되는 경우)로부터 얻어진 혈청, OD값 0.24를 가진 B군 생쥐(즉 1% SDS 중에서 끓이고 식힌 경우)로부터 얻어진 혈청, OD값 0.34를 가진 A군 생쥐(즉 애쥬번트가 없는 경우)로부터 얻어진 혈청 순서로 좋은 결과를 얻었다. 모든 대조군은 OD값 0.05를 가졌다.

<81> 3가지의 다른 항원들에 대항하는 혈청 테스트는 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질이 면역항원성이고 애쥬번트가 있거나 없는 항원으로서 사용되는 경우 항-HPV6b L1 항체들을 생산하였다는 것을 보여주었다.

<82> 실시예 3: HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 의한 생쥐 내부에서의 지연성 타입 과민성(delayed type hypersensitivity)의 증명(항체 생산의 확인)

<83> 지연성 타입 과민성은 몇몇 체액성 면역 반응 뿐만 아니라 세포 매개성 면역반응에도 관여한다. 생쥐들(BALB/c)을 표 3에서 나타낸 다양한 조건 아래에서 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질로 처리하였다(복강내 주입). 11일째 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질 또는 HEXAHIS 단백질을 사용하여 귀에 항원투여를 하였다(피부내부로 주입). 귀의 두께를 13일과 14일에 측정하였다. 14일에 양성 반응을 나타내는 생쥐들을 죽이고 귀의 조직을 검사하였다.

<84> 이 실시예는 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질이 애쥬번트없이 초기 투여량이 5㎍/생쥐가 아닌 50㎍/생쥐를 사용할 경우 좋은 지연성 타입 과민성을 유도하였다. 그러나 생쥐들을 지연성 타입 과민성 반응을 유도하기 위해 퍼튜시젠이 처리될 필요가 있었다.

<85> 3가지 실시예들의 경우 HPV6b L1 단백질을 발현하였고 캡소머의 집합체를 형성하는 실시예 1의 방법으로 분리되었고, 더욱이 애쥬번트없이도 상기 HPV6b L1 단백질 캡소머 집합체는 항체 반응과 세포 매개성 반응을 생산하는 면역항원성임을 보여주었다. 그러므로 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질은 중화된 항체의 도입에 의한 인간 파필로마 바이러스 감염을 저지시키기 위한 또는 L1 단백질 특이적인 세포 매개성 면역의 유도에 의해 존재하는 손상들을 치료하기 위한 백신을 위한 적당한 기초로써 제공될 수 있다. 실시예 1에서 3은 상기 제조품의 면역항원성을 증명하기 위한 예로서 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 사용하였다. 본 발명은 상기 실시예들에 제한되지 않고 어떤 파필로마 바이러스 L1 단백질도 사용될 수 있다.

<86> 실시예 4: HPV6b L1 바이러스성 입자들을 인식하는 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하는 항체들의 증명

<87> 접시들의 관들을 *E. Coli*로부터 생산된 HPV6b L1 HEXAHIS, 바큘로바이러스로부터 생산된 HPV6b VLP-L1, 대조군으로서 바큘로바이러스와 *E. Coli* 제조품(세포발효 상등액)을 0.2㎍ 단백질/관으로 코팅해서 pH7.2에서 PBS중에서 상온에서 밤새 인큐베이션하였다. pH7.2에서 PBS를 사용하여 한 번 세척하였다. 비-특이적 결합이 상온에서 1시간 동안 1%(w/v) 카제인을 사용하여 상기 접시들을 인큐베이션함에 의해 차단되었다.

<88> 토끼 HPV6b L1 HEXAHIS 항혈청을 HPV6b L1 HEXAHIS, HPV6b VLP-L1, 바큘로바이러스 제조된 대조군들 또는 *E. Coli* 제조된 대조군들(두배로 제조된)로 코팅된 관들 각각에 첨가하였고 상기 접시들을 2배로 희석하였다. 인플루엔자 바이러스 A/PR-8에 대항하는 혈청을 HPV6b VLP-L1 접시들에 대한 양성 대조군으로써 사용하였다. 접시들을 상온에서 1시간동안 인큐베이션하였다. 그리고나서 pH7.2에서 0.05%(v/v) 트윈 20을 포함하는 PBS를 사용하여 3번 세척하였다. 염소-토끼 IgG-HRP 접합물을 각각의 관에 첨가하고

접시들을 세척하여 인큐베이션하였다. 항원에 대한 항혈청의 특이적 결합은 TMB를 사용함으로써 검출될 수 있다. 상기 반응을 0.5M 염산을 사용하여 5분후에 반응을 종료시켰다.

<89> 결과

<90> 실험 결과를 표 4에서 나타내었다. HPV6b L1 HEXAHIS와 HPV6b VLP-L1 둘다가 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하는 항체와 결합하였다는 것은 HPV6b HEXAHIS L1이 생체내에서 HPV6b VLP-L1에 의해 제시된 하나 또는 그 이상의 항원결정기를 나타낸다는 것을 지시한다. 또한 HPV6 L1 단백질에 대항하여 발생한 상기 혈청이 바큘로바이러스 또는 *E. Coli*에 음성인 것은 반응의 특이성을 증명하는 것이다. 이것은 상호 작용하고 잠재적으로 바이러스를 중화하는 항체를 유도하기 위한 적당한 백신 면역항원으로서 HPV6b L1 HEXAHIS를 사용할수 있는 근거를 제공한다. 더욱이 이 실시예들은 관들에 담긴 다양한 단백질들의 코팅과 재조합 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하여 발생한 항체의 사용으로 증명된 파필로마 바이러스 L1 단백질의 검출를 위한 이뮤노어세이를 위한 근거를 제공한다. 항원으로부터 유래된 각각 HPV6b를 포함하는 관들은 양성 결과를 나타내었다. 이들 실시예는 또한 재조합 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질을 사용하여 관을 코팅한 것과 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하여 발생한 혈청과 인플루엔자 바이러스 A/PR-8에 대항하여 발생한 혈청의 사용으로 증명된 파필로마 바이러스 L1 단백질의 특이적 항체의 검출를 위한 이뮤노어세이를 위한 근거를 제공한다. 이 경우 HPV6b L1 HEXAHIS 단백질에 대항하여 발생한 혈청을 포함하는 관들은 양성의 결과를 나타내는 반면 인플루엔자 바이러스에 대항하여 발생한 혈청은 음성 결과를 나타내었다.

<91> 실시예 5: 다중체성 구조물-항체 복합체의 형성을 증명하기 위한 ELISA 포획(capture) 어세이

<92> 웨스턴 블롯과 ELISA 실험은 전술한 또는 하기의 표준 방법에 따라 수행하였다.

<93> (1) 바이러스성 입자들에 특이적인 모노클로날 항체(moAb 8)가 마이크로타이터 접시의 관들을 코팅하기 위해 사용되는 공정과;

<94> (2) 적당한 조건 하에서 HPV VLP L1 단백질을 첨가하고 인큐베이션하고 pH7.4에서 0.1% 트윈 20을 포함하는 PBS로 세척하는 공정과;

<95> (3) 다양한 동물들(표 5의 칼럼 1에서 나타낸)에서 다양한 면역항원(표 5의 칼럼 2에서 나타낸)에 대항하는 항체를 첨가하는 공정과;

<96> (4) 다중체성 구조물/바이러스성 입자-항체 복합체를 검출하기 위해 적당한 검출제(토끼 항혈청의 경우는 염소-항-토끼 퍼옥시다제 접합물이 사용됨)가 첨가되는 공정을;

<97> 포함하여 ELISA 포획 어세이를 수행하였다.

<98> 결과

<99> 관당(per well) 포획된 재조합 파필로마 바이러스 HEXAHIS의 양은 표 5에서 나타내었다. 이들 실험들은 재조합 파필로마 바이러스 L1 HEXAHIS 단백질들에 대항하여 발생한 항혈청이 L1 단백질을 포함하는 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도한다는 것을 증명한다.

<100> L1 단백질을 포함한 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도하기 위한 파필로마 바이러스 L1 단백질의 능력은 적당한 항원결정기들의 정확한 제시를 요구한다. 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들은 L1 단백질을 포함하는 파필로마 바이러스 바이러스성 입자들을 인식하는 면역 반응을 유도하지 않는 바이러스성 입자를 형성하지 않는다. 재조합 GST 파필로마 바이러스 L1 단백질, 재조합 MS2 파필로마 바이러스 L1 단백질과 변성된 파필로마 바이러스 L1 단백질은 L1 단백질을 포함한 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도하지 않는다. 지금까지의 모든 바이러스성 입자들은 파필로마 바이러스 L1 또는 L1 및 L2 유전자들의 발현으로 세포내에서 생산되어져왔다. 본 발명의 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 L1 단백질을 포함한 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도하기 위한 하나 또는 그 이상의 항원결정기를 명확히 제시한다. 본 발명의 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질은 세포외적으로 다중체성 구조물들 또는 바이러스성 입자들을 형성할 수 있다. 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질로부터 형성된 다중체성 구조물의 바이러스성 입자들은 L1 단백질을 포함한 파필로마 바이러스 바이러스성 입자들을 인식하는 면역 반응을 유도하기 위한 하나 또는 그 이상의 항원결정기를 명확히 제시하는 것으로 믿어진다. 그러므로 본 발명은 L1 단백질을 포함한 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도할 수 있는 다중체성 구조물 또는 바이러스성 입자를 세포외에서 형성할 수 있으며 여기서 다중체성 구조물은 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들의 다수를 포함하는 것이다.

<101> 상기 다중체성 구조물들 또는 바이러스성 입자들이 세포외에서 형성될 수 있다는 사실은 세포내에서 바이러스성 입자 형성과 관련된 많은 문제들을 극복할 수 있다. 이 문제들은 낮은 바이러스성 입자 수준, 바이러스성 입자중의 DNA 병합 가능성과 정제로 인한 바이러스성 입자 보전의 손실 가능성이다.

<102> [표 1]

<103> NB 완충 용액을 사용한 니켈 칼럼 세척 계획

시간(분)	%NB 완충 용액
0	0
30	0
300	100
310	100
320	100
330	100

<105> [표 2]

<106> 항체 생산을 위해 6b L1 HEXAHIS 단백질을 생쥐에 주입하기 위한 실험

생쥐 군[a]	6b L1 HEXAHIS 단백질[b]의 첨가	다른 조건
A	+	애쥬번트 없음
A_1	-	애쥬번트 없음
B	+	1% SDS 중에서 끓이고 식힘
B_1	-	1% SDS 중에서 끓이고 식힘
C	+	프로인트 완전 애쥬번트 사용
C_1	-	프로인트 완전 애쥬번트 사용
D	+	알루미늄 하이드록사이드에 흡수시킴
D_1	-	알루미늄 하이드록사이드에 흡수시킴
E	+	알개뮬린 사용
E_1	-	알개뮬린 사용
F	+	애쥬번트 없이 L2(50㎍)사용

<108> [표 3]

<109> 생쥐의 6b L1 HEXAHIS에 대한 지연성 타입 과민성을 생산하기 위한 실험

생쥐 군[a]	항원[a]	애쥬번트[c]	항원 투여량	투여항원[b, d]	퍼튜시젠	항원 투여량	14일째 부푼 귀의 평균
1	L1	PBS	50㎍	L1	+	4	4.5
2	L1	PBS	50㎍	L1	+	13.8	8
3	L1	PBS	50㎍	L1	-	3.8	1.5
4	L1	PBS	50㎍	L1	-	2.4	3.8
5	L1	PBS	50㎍	IRR	+		
6	소금물	PBS		L1	+	4.7	1.3
7	소금물	PBS		L1	-	2.3	1
8	L1	CFA(0.1㎖)	50㎍	L1	+	19.3	16.8
9	소금물	CFA(0.1㎖)		L1	+	4.8	2
10	L1	퀼 에이(㎍)	50㎍	L1	+	15.7	8.7
11	L1	퀼 에이(㎍)	50㎍	L1	-	7.2	0.2
12	L1	퀼 에이(㎍)	50㎍	IRR	+		
13	소금물	퀼 에이(㎍)	50㎍	L1	+		

<111> [표 4]

<112> 토끼 HPV6b HEXAHIS 항혈청을 사용한 ELISA의 결과

항원	토끼 HPV6b L1 HEXAHIS 항혈청을 사용한 ELISA
HPV6 VLP-L1	〉 4.0 제한 초과 @1:4000
HPV6b L1 HEXAHIS	2.12±0.1 @1:4000
바큘로바이러스 대조군	0.63±0.01 @1:4000
E. Coli 대조군	0.12±0.00 @1:4000

<114> [표 5]

<115> 표 5에서의 수행된 실험의 결과

동물 NO.	면역항원	애쥬번트	L1 단백질과의 면역활성			세포들상의 L1과의 면역활성	
			웨스턴 블롯	ELISA (VLPs)	포획 ELISA	VLP인 L1	HEXAHIS인 L1
토끼 31	HEXAHIS L1	CFA	++++	1.712 @ 1:100	0.538 @ 1:100	+++	+++
토끼 39	HEXAHIS L1	Nil	++	0.095 @ 1:100	0.050 @ 1:100	+++	?
토끼 10	VLPs (바큘로바이러스 유래)	Nil	+++	0.972 @ 1:100	0.487 @ 1:100	?	?
생쥐	HEXAHIS L1	Nil	++	?	ND	?	?
생쥐	HEXAHIS L1	CFA	++++	0.400 @ 1:100	ND	?	?
MoAb 8	GST L1 융해 단백질	CFA/IFA	++++	++++	ND	+++	?

<117> 설명

<118> 표 2

<119> [a] 4마리의 생쥐를 포함하는 각각의 생쥐군.

<120> [b] 생쥐당 50㎍ 단백질의 비율로 6b L1 HEXAHIS 단백질을 투여함.

<121> 표 3

<122> [a] 4 내지 6 Balb/C 생쥐로 구성된 군들(68-102).

<123> [b] L1은 6b HEXAHIS를 의미하고 IRR은 부적절한 HEXAHIS 단백질을 의미함.

<124> [c] PBS는 인산 완충 소금물이고 CFA는 완전 프로인트 애쥬번트임.

<125> [d] 6b L1 HEXAHIS 단백질을 최대 부피 2㎕에서 10㎍으로 투여함.

<126> [e] 퍼튜시젠 30㎍이 첨가됨.

<127> [f] 귀 측정값(㎛ × 10)

<128> 표 5

<129> ND: 기술적으로 측정 불가능.

<130> 도 1

<131> HPV6b L1 HEXAHIS 단백질의 DNA 뉴클레오티드와 아미노산 서열.

<132> 도 2

<133> HPV6b L1 HEXAHIS 단백질 집합체의 오중체 구조의 전자 현미경 사진.

(57) 청구의 범위

청구항 1

MetArgGlySerHisHisHisHisHisGlyMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMet

GlyArgAspLeuTyrAspAspAspAspLysAsp

를 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 가지는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질.

청구항 2

도 1에 나타낸 아미노산 서열을 가지는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질.

청구항 3

복수의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들을 포함하는 다중체성 구조체(multimeric structure)로서, 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들 각각이 제1항의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질인 다중체성 구조체.

청구항 4

복수의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들을 포함하는 다중체성 구조체로서, 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들 각각이 제2항의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질인 다중체성 구조체.

청구항 5

복수의 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들을 포함하는 다중체성 구조체로서, 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들 각각이 $(His)_6$을 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 가지는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질인 다중체성 구조체.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 다중체성 구조체가 오중체(pentamer)인 다중체성 구조체.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 다중체성 구조체가 오중체인 다중체성 구조체.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 다중체성 구조체가 오중체인 다중체성 구조체.

청구항 9

제3항에 있어서, 파필로마 바이러스 VLP를 인식하는 면역 반응(immune response)을 유도할 수 있는 다중체성 구조체.

청구항 10

제4항에 있어서, 파필로마 바이러스 VLP를 인식하는 면역 반응을 유도할 수 있는 다중체성 구조체.

청구항 11

제5항에 있어서, 파필로마 바이러스 VLP를 인식하는 면역 반응을 유도할 수 있는 다중체성 구조체.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 재조합 L1 단백질이 박테리아에서 발현되는 다중체성 구조체.

청구항 13

제4항에 있어서, 상기 재조합 L1 단백질이 박테리아에서 발현되는 다중체성 구조체.

청구항 14

제5항에 있어서, 상기 재조합 L1 단백질이 박테리아에서 발현되는 다중체성 구조체.

청구항 15

(a) $(His)_6$을 포함하는 N 말단 아미노산 서열을 갖는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;

(b) 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 코딩하고

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAG

CATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGAC

GATGACGATAAGGAT

를 포함하는 5' 뉴클레오티드 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열;

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열; 및

(d) 상기 (b)의 서열과 유사한 뉴클레오티드 서열

중의 어느 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 재조합 DNA 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자가 도 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 가지는 재조합 DNA 분자.

청구항 17

(i) 박테리아에서 재조합 DNA 분자를 발현하는 단계—여기서 DNA 서열이 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 코딩함—;

(ii) 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질을 실질적으로 정제하는 단계; 및

(iii) 상기 다중체성 구조체를 세포외에서 형성하는 단계

를 포함하는 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 다중체성 구조체를 제조하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자가 제15항의 재조합 DNA 분자인 다중체성 구조체의 제조 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 재조합 DNA 분자가 제16항의 재조합 DNA 분자인 다중체성 구조체의 제조 방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 파필로마 바이러스 L1 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 정확한 리딩 프레임(reading frame)의 pTrcHisB로 삽입됨으로써 상기 파필로마 바이러스 L1 단백질의 발현을 가능하게 하고,

상기 박테리아는 *E.coli* 균주

인 다중체성 구조체의 제조 방법.

청구항 21

상기 L1 단백질을 검출하기 위해 제3항 내지 제14항 중 어느 한 항의 하나 또는 그 이상의 다중체성 구조체에 대항하는 항체를 사용하는 단계를 포함하는 시료 중의 파필로마 바이러스 L1 단백질의 존재 검출 방법.

청구항 22

상기 L1 단백질을 검출하기 위해 제3항 내지 제14항 중 어느 한 항의 다중체성 구조체를 사용하는 단계를 포함하는 시료 중의 파필로마 바이러스 L1 단백질에 특이적인 항체의 존재 검출 방법.

청구항 23

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항의 다중체성 구조체를 포함하는 백신.

요약

본 발명은 L1 단백질을 포함하는 파필로마 바이러스 바이러스성 입자를 인식하는 면역 반응을 유도하고 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들의 다수를 포함하는 다중체성 구조물을 세포외에서 형성할 수 있는 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질에 관한 것으로서 상기에서 다중체 구조물은 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질들의 다수를 포함한다. 또한 본 발명은 파필로마 바이러스의 존재를 검출하기 위한 상기 재조합 파필로마 바이러스 L1 단백질의 사용을 포함하고 예방적이고 치료 목적의 백신의 기초로 사용될 수 있다.

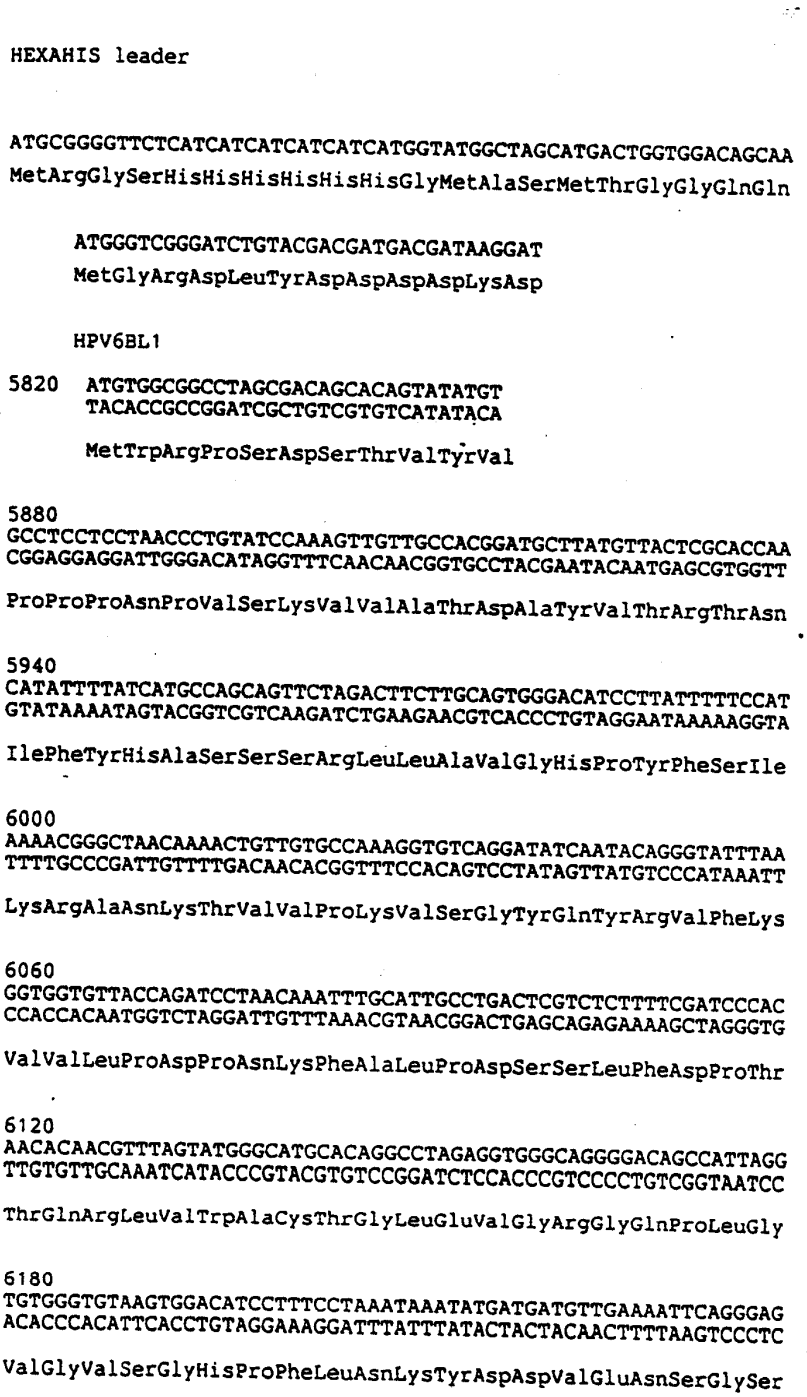
대표도

도 1

도면

도면1a

【도 1】



도면1b

```
6240
TGGTGGTAACCCTGGACAGGATAACAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACACA
ACCACCATTGGGACCTGTCCTATTGTCCCAATTACATCCATACCTAATATTTGTTTGTGT

GlyGlyAsnProGlyGlnAspAsnArgValAsnValGlyMetAspTyrLysGlnThrGln


6300
ATTATGCATGGTTGGATGTGCCCCCCCTTTGGGCGAGCATTGGGGTAAAGGTAAACAGTG
TAATACGTACCAACCTACACGGGGGGGAAACCCGCTCGTAACCCCATTTCCATTTGTCAC

LeuCysMetValGlyCysAlaProProLeuGlyGluHisTrpGlyLysGlyLysGlnCys


6360
TACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGACTGCCCGCCCTTAGAACTTATTACCAGTGTTAT
ATGATTATGTGGACATGTCCGACCACTGACGGGCGGGAATCTTGAATAATGGTCACAATA

ThrAsnThrProValGlnAlaGlyAspCysProProLeuGluLeuIleThrSerValIle


6420
ACAGGATGGCGATATGGTTGACACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTTGCTGATTTGCAGAC
TGTCCTACCGCTATACCAACTGTGTCCGAAACCACGATACTTAAAACGACTAAACGTCTG

GlnAspGlyAspMetValAspThrGlyPheGlyAlaMetAsnPheAlaAspLeuGlnThr


6480
CAATAAATCAGATGTTCCTATTGACATATGTGGCACTACATGTAAATATCCAGATTATTT
GTTATTTAGTCTACAAGGATAACTGTATACACCGTGATGTACATTTATAGGTCTAATAAA

AsnLysSerAspValProIleAspIleCysGlyThrThrCysLysTyrProAspTyrLeu


6540
ACAAATGGCTGCAGACCCATATGGTGATAGATTATTTTTTTTTCTACGGAAGGAACAAAT
TGTTTACCGACGTCTGGGTATACCACTATCTAATAAAAAAAAAGATGCCTTCCTTGTTTA

GlnMetAlaAlaAspProTyrGlyAspArgLeuPhePhePheLeuArgLysGluGlnMet


6600
GTTTGCCAGACATTTTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGATACACT
CAAACGGTCTGTAAAAAAATTGTCCCGACCGCTCCACCCCCTTGGACACGGACTATGTGA

PheAlaArgHisPhePheAsnArgAlaGlyGluValGlyGluProValProAspThrLeu


6660
TATAATTAAGGGTAGTGGAAATCGCACGTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTTAACACCCC
ATATTAATTCCCATCACCTTTAGCGTGCAGACATCCCTCATCATATATACAATTGTGGGG

IleIleLysGlySerGlyAsnArgThrSerValGlySerSerIleTyrValAsnThrPro


6720
GAGCGGCTCTTTGGTGTCCTCTGAGGCACAATTGTTTAATAAGCCATATTGGCTACAAAA
CTCGCCGAGAAACCACAGGAGACTCCGTGTTAACAAATTATTCGGTATAACCGATGTTTT

SerGlySerLeuValSerSerGluAlaGlnLeuPheAsnLysProTyrTrpLeuGlnLys


6780
AGCCCAGGGACATAACAATGGTATTTGTTGGGGTAATCAACTGTTTGTTACTGTGGTAGA
TCGGGTCCCTGTATTGTTACCATAAACAACCCCATTAGTTGACAAACAATGACACCATCT

AlaGlnGlyHisAsnAsnGlyIleCysTrpGlyAsnGlnLeuPheValThrValValAsp
```

도면1c

```
6840
TACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTAACTACATCTTCCACATACAC
ATGGTGTGCGTCATGGTTGTACTGTAATACACGTAGGCATTGATGTAGAAGGTGTATGTG

ThrThrArgSerThrAsnMetThrLeuCysAlaSerValThrThrSerSerThrTyrThr


6900
CAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAATTTATTTT
GTTAAGACTAATATTTCTCATGTACGCAGTACACCTTCTCATACTAAATGTTAAATAAAA

AsnSerAspTyrLysGluTyrMetArgHisValGluGluTyrAspLeuGlnPheIlePhe


6960
TCAATTATGTAGCATTACATTGTCTGCTGAAGTAATGGCCTATATTCACACAATGAATCC
AGTTAATACATCGTAATGTAACAGACGACTTCATTACCGGATATAAGTGTGTTACTTAGG

GlnLeuCysSerIleThrLeuSerAlaGluValMetAlaTyrIleHisThrMetAsnPro


7020
CTCTGTTTTGGAAGACTGGAACTTTGGGTTATCGCCTCCCCCAAATGGTACATTAGAAGA
GAGACAAAACCTTCTGACCTTGAAACCCAATAGCGGAGGGGGTTTACCATGTAATCTTCT

SerValLeuGluAspTrpAsnPheGlyLeuSerProProProAsnGlyThrLeuGluAsp


7080
TACCTATAGGTATGTGCAGTCACAGGCCATTACCTGTCAAAAGCCCACTCCTGAAAAGGA
ATGGATATCCATACACGTCAGTGTCCGGTAATGGACAGTTTTCGGGTGAGGACTTTTCCT

ThrTyrArgTyrValGlnSerGlnAlaIleThrCysGlnLysProThrProGluLysGlu


7140
AAAGCCAGATCCCTATAAGAACCTTAGTTTTTGGGAGGTTAATTTAAAAGAAAAGTTTTC
TTTCGGTCTAGGGATATTCTTGGAATCAAAAACCCTCCAATTAAATTTTCTTTTCAAAAG

LysProAspProTyrLysAsnLeuSerPheTrpGluValAsnLeuLysGluLysPheSer


7200
TAGTGAATTGGATCAGTATCCTTTGGGACGCAAGTTTTTGTTACAAAGTGGATATAGGGG
ATCACTTAACCTAGTCATAGGAAACCCTGCGTTCAAAAACAATGTTTCACCTATATCCCC

SerGluLeuAspGlnTyrProLeuGlyArgLysPheLeuLeuGlnSerGlyTyrArgGly


7260
ACGGTCCTCTATTCGTACAGGTGTTAAGCGCCCTGCTGTTTCCAAAGCCTCTGCTGCCCC
TGCCAGGAGATAAGCATGTCCACAATTCGCGGGACGACAAAGGTTTCGGAGACGACGGGG

ArgSerSerIleArgThrGlyValLysArgProAlaValSerLysAlaSerAlaAlaPro

          TAAACGTAAGCGCGCCAAAACTAAAAGGTAA  7291
          ATTTGCATTCGCGCGGTTTTGATTTTCCATT

          LysArgLysArgAlaLysThrLysArgTer
```

도면2

