(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월14일
(11) 등록번호 10-1145190
(24) 등록일자 2012년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/025 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7005780
(22) 출원일자(국제) 2003년10월02일
심사청구일자 2008년10월02일
(85) 번역문제출일자 2005년04월01일
(65) 공개번호 10-2005-0053732
(43) 공개일자 2005년06월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/031726
(87) 국제공개번호 WO 2004/030636
국제공개일자 2004년04월15일
(30) 우선권주장
60/415,929 2002년10월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Vaccine, Vol.14:16, pp.1485-1494 (1996.11.30.)
Journal of Virology, Vol.70:2, pp.683-688 (1996.02.28.)
US06004557 A1
전체 청구항 수 : 총 39 항

(73) 특허권자
와이어쓰 홀딩스 코포레이션
미합중국 뉴저지 07940 매디슨 파이브 지랄다-팜즈
(72) 발명자
스미스 래리
미국 캘리포니아주 92127 샌 디에고 터틀백 레인 11410
카세티 마리아 크리스티나
미국 매릴랜드주 20854 포토맥 스코치 벤드 웨이 8217
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

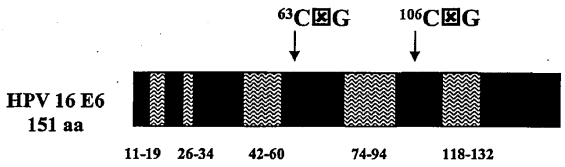
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **사람 파필로마바이러스 폴리펩타이드 및 면역원성 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 사람 파필로마바이러스(HPV)-관련 암 및 특히 자궁경부 암의 치료 및 예방을 위한 면역원성 및 약제학적 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명은 HPV에 대한 면역 반응을 생성시키는데 사용되는 융합 단백질 및 이러한 융합 단백질을 암호화하는 핵산에 관한 것이다. 구체적으로는, 본 발명은 E6 및/또는 E7이 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 HPV E6 및 E7의 융합체를 제공한다. 이러한 돌연변이는 이러한 종양발생성 단백질의 형질전환 활성을 소멸시킴으로써 E6/E7 융합체에 안전성을 부여한다. 또한, 이러한 융합체는 E6 및 E7의 면역원성 효능을 유지하거나 증가시킨다. 어떠한 유전자 또는 단백질 전달 방법을 사용해서도 본 발명의 면역원성 조성물을 전달하고 포장할 수 있다.

대 표 도 - 도1A



(72) 발명자

맥엘리니 수잔 피

미국 뉴욕주 10931 힐번 피오 박스 1039

풀렌 제프리 케이

미국 뉴욕주 10965 펄 리버 노쓰 미들타운 로드 401 와이어쓰리써치 빌딩

특허청구의 범위

청구항 1

사람 파필로마바이러스 E6 및 E7 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드로서, 이때 상기 E7 폴리펩타이드는 서열 번호 14의 아미노산 24번 및 26번에 상응하는 아미노산 또는 아미노산 24번, 26번 및 91번에 상응하는 아미노산에 돌연변이를 포함하고, 상기 E6 폴리펩타이드는 서열 번호 13의 아미노산 63번 및 106번에 상응하는 아미노산에서 돌연변이를 포함하며, 이때 당해 폴리펩타이드가 서열 번호 14 또는 13의 처음 메티오닌에 상응하는 아미노산을 포함하거나 포함하지 않을 수 있고, 당해 돌연변이된 폴리펩타이드가 사람 야생형 파필로마바이러스 E6 및 E7을 포함하는 분리된 폴리펩타이드의 면역원성의 30% 이상을 보유하는, 사람 파필로마바이러스 E6 및 E7 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 돌연변이된 아미노산이 글리신으로 돌연변이된 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, E7 폴리펩타이드가 E6 폴리펩타이드에 선행하는 폴리펩타이드.

청구항 4

제2항에 있어서, E7 폴리펩타이드가 E6 폴리펩타이드에 선행하는 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산.

청구항 6

제5항에 있어서, E7의 뉴클레오타이드 서열이 E6의 뉴클레오타이드 서열에 선행하는 핵산.

청구항 7

발현 조절 서열의 조절하에 있는 제5항에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제5항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 9

제1항에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 숙주 세포.

청구항 10

제7항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

(a) 제1항에 따른 폴리펩타이드; 및

(b) 약제학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 사람 파필로마바이러스(human papillomavirus; HPV)에 의해 유발된 암을 치료 또는 예방하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제5항에 따른 핵산을 포함하는, 사람 파필로마바이러스에 의해 유발된 암을 치료 또는 예방하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 14

제5항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 바이러스.

청구항 15

제14항에 있어서, 변형된 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus)인 재조합 바이러스.

청구항 16

(a) 제1항에 따른 폴리펩타이드; 및

(b) 약제학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, HPV에 대한 면역반응을 생성시키기 위한 면역원성 조성물.

청구항 17

(a) 제1항에 따른 폴리펩타이드; 및

(b) 약제학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 자궁경부 암을 치료하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 18

(a) 제1항에 따른 폴리펩타이드; 및

(b) 약제학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 자궁경부 암을 예방하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 19

제7항에 따른 발현 벡터를 포함하는, 자궁경부 암을 예방하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 20

제7항에 따른 발현 벡터를 포함하는, 자궁경부 암을 치료하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 21

서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 9 또는 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드.

청구항 22

제21항에 있어서, 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드.

청구항 23

서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 9 또는 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산.

청구항 24

제23항에 있어서, 서열 번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산.

청구항 25

제23항에 있어서, 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 10 또는 서열 번호 12의 뉴클레오타이드 서열을 갖는

핵산.

청구항 26

제25항에 있어서, 서열 번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산.

청구항 27

발현 조절 서열의 조절하에 있는 제23항에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 28

발현 조절 서열의 조절하에 있는 제25항에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 29

발현 조절 서열의 조절하에 있는 제24항 또는 제26항에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 30

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 31

제4항, 제21항 또는 제22항의 폴리펩타이드를 발현하는 숙주 세포.

청구항 32

제27항 또는 제28항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 33

제29항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 34

(a) 제4항, 제21항 또는 제22항에 따른 폴리펩타이드; 및

(b) 약제학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 사람 파필로마바이러스(human papillomavirus; HPV)에 대한 면역 반응을 생성시키기 위한 면역원성 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 36

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는, 사람 파필로마바이러스에 대한 면역 반응을 생성시키기 위한 면역원성 조성물.

청구항 37

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 바이러스.

청구항 38

제37항에 있어서, 변형된 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus)인 재조합 바이러스.

청구항 39

제1항에 있어서, 폴리펩타이드가 사람 야생형 파필로마바이러스 E6 및 E7을 포함하는 분리된 폴리펩타이드와 동

일한 면역원성을 보유하는, 폴리펩타이드.

명 세 서

[0001] 본 출원은 본원에서 참조로 인용되는, 2002년 10월 3일자로 출원된 미국 가특허 출원 제60/415,929호의 우선권을 주장한다.

기 술 분 야

[0002] 본 발명은 자궁경부 암 및 사람 파필로마바이러스(human papillomavirus; HPV)에 의해 유발된 기타 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 약제학적 및 면역원성 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 HPV에 대한 면역 반응을 생성시키는데 사용되는 융합 단백질 및 이러한 융합 단백질을 암호화하는 핵산에 관한 것이다. 이들 융합 단백질 및 폴리뉴클레오타이드는 HPV-유도된 암의 치료 및 예방에서 사용된다.

배 경 기 술

[0003] 자궁경부 암은 전세계적으로 해마다 250,000명의 사망의 원인이 되는 종양 관련 사망의 두번째 주된 이유이다. 모든 자궁경부 암 중 99% 이상은 사람 파필로마바이러스(HPV) 감염과 관련이 있는 것으로 공지되어 있으며, 이 중 50%는 HPV 16형(HPV16)과 직접적으로 연관된다[참조: Walboomers et al., J. Path. 1999, 189: 12-19]. 대다수의 HPV16 감염이 증상이 없고 일시적인 반면에, 이들 중 특정 비율은 지속적이 된다. 지속적으로 감염된 개체의 약 1%는 자궁내막상피내 종양(cervical intraepithelial neoplasia; CIN)으로서 공지된 더욱 더 중증인 자궁경부 병변을 거쳐 결국에는 침습성 자궁경부 암종으로 진행한다.

[0004] E6 및 E7로서 공지된 초기 HPV 단백질은 악성 표현형을 유지하는데 요구된다[참조: Von Knebel et al., Int J Cancer 1992, 51: 831-4; Crook et al., Embo J 1989, 8: 513-9; He and Huang, Cancer Res. 1997, 57: 3993-9]. 이들 단백질은 CIN 병변 및 암에서 지속적으로 발현된다[참조: Smotkin and Wettstein, Proc Natl Acad Sci USA 1986,83 : 4680-4; Durst et al., Virology 1992,189 : 132-40]. 이들 단백질은 세포 주기의 조절을 중단시킴으로써 상피의 증식을 유도한다. 상세하게는, E7은 세포성 종양 억제인자 망막모세포종 단백질(Rb)[참조: Dyson et al., Science 1989, 243:934-7]에 결합하여 이를 불활성화시키고, 이로써 세포가 세포주기의 S기로 진행된다[참조: Cobrinik et al., Trends Biochem Sci 1992, 17:312-5]. HPV16의 E6 단백질은 종양 억제 단백질 p53[참조: Scheffner et al., Cell 1990, 63:1129-36]의 분해를 유도하여 세포가 세포자멸(apoptosis)되는 것을 방지한다.

[0005] 종양 세포가 E6 및 E7 단백질을 지속적으로 발현하고 이들 단백질이 정상 세포에는 존재하지 않기 때문에, 이러한 바이러스 단백질은 암 면역요법에 대한 가장 흥미로운 표적이다. 많은 증거들이 사람에서 E6 및 E7에 대한 세포-매개성 면역 반응이 HPV 병변의 자연적 퇴행 및 바이러스 DNA 제거와 상관관계가 있음을 제시하고 있다[참조: Nakagawa et al., J Infect Dis 1997,175 : 927-31 ; Kadish et al., J Natl Cancer Inst 1997,89 : 1285- 93]. 또한, E7에 대한 CTL 반응은 상이한 쥐 모델에서 HPV16-양성 종양으로부터 마우스를 보호하는 것으로 제시되었다[참조: Feltkamp et al., Eur J Immunol 1995, 25: 2638-42; Lin et al., Cancer Res 1996, 56: 21-6].

[0006] 세포-매개성 면역(CMI)이 HPV 감염 및 질환에서 HPV 감염을 조절하는데 있어 중요한 것으로 보이기 때문에[참조: Eiben, G. L. et al., Adv Can Res 2002, 86: 113-148], 치료 백신은 사람 백혈구 항원(HLA) 다양성 집단에서 수많은 HPV E6 및 E7 항원성 펩타이드에 대한 최적의 T 세포 반응을 효과적 적용범위로 생성시켜야 한다.

[0007] E6/E7 항원을 전달하기 위한 전도 유망한 백신 벡터는 베네주엘라 말 뇌염(Venezuelan equine encephalitis, VEE; 참조: Velders M. P. et al., Cancer Res 2001,61 : 7861-7867)의 약독화된 3014 균주로부터 유래된 재조합 알파바이러스(AV) 벡터이다. 복제 불능 VEE 레플리콘 입자(VRP)는 수많은 전임상 감염 질환과 종양 모델에서 매우 효과적인 백신으로 입증되었다[참조: Rayner, J.O. et al., Rev Med Virol 2002, 12 : 279-296]. VEE와 같은 AV-유래된 레플리콘 벡터는 RNA 형태의 이종 유전자를 암호화하여, 초기 감염 이상으로 확산되지 않으

며 감염된 세포의 세포자멸을 유도한다[참조: Griffith, D. E. et al., Annu. Rev. Microbiol. 1997, 51 : 565-592]. 이러한 속성은 연장된 단백질 발현, 또는 천연 감염 후 HPV-유도된 악성종양의 특징인 숙주 DNA로의 통합에 대한 기회를 제한한다. 기존의 항-VEE 면역의 낮은 유병율 및 VRP에 의한 반복적 면역화에 대한 가능성[참조: Pushko, P. et al., Virology 1997, 239: 389-401]은 백신 바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 기타 재조합 바이러스 벡터보다 유리하다.

[0008] 암 면역 요법에 대한 활성 표적인 E6 및 E7은 형질전환 활성을 갖는다. 따라서, 당해 분야에서 통상적으로 의도되는 E6 및 E7를 사용한 면역요법 방법은 잠재적으로 위험한데, 이는 이들 단백질이 세포의 형질전환 및 불멸화를 유도할 수 있기 때문이다.

[0009] CIN 및 자궁경부 암종의 치료 및 예방을 위한 효과적 조성물에 대한 요구는 아직 충족되지 못했다. 보다 상세하게는, CIN, 자궁경부 암종 및 암종 및 기타 이러한 질환을 치료 및/또는 예방하는데 안전하며 효과적인 E6-기본 조성물 및/또는 E7-기본 조성물을 포함하는 면역원성 조성물이 요구되고 있다.

[0010] HPV 면역원성 조성물의 이전의 연구는 마우스에서 HLA I형 발현 종양 모델의 부족에 의해 제한되었다. HPV16 E6/E7 양성 모델이 본원에서 기술되며, 이 모델은 HLA-A*0201 유전자전이된(transgenic) 마우스에서 점진적으로 성장하는 종양을 형성한다.

[0011] 발명의 요약

[0012] 본 발명은 E6 및 E7의 생물학적 활성을 감소시키고 따라서 형질전환 활성 가능성을 감소시키는 돌연변이 및/또는 융합 순서(E7E6)를 보유한 E6 및 E7 폴리펩타타이드의 융합체를 포함하는 약제학적 조성물 및 폴리펩타이드를 제공함으로써 상기한 요구 및 기타 요구를 충족시킨다.

[0013] 특히, 본 발명은 신규한 E6/E7 융합 폴리펩타이드와 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 구체적 양태에서, 본 발명은 사람 파필로마바이러스 E6 및 E7 폴리펩타이드를 포함하며, 이때 상기 E7 폴리펩타이드는 서열 번호 14의 아미노산 24번, 26번 또는 91번에 상응하는 아미노산 중 하나 이상에 돌연변이를 갖고, 상기 E6 폴리펩타이드는 돌연변이를 갖지 않거나 서열 번호 13의 아미노산 63번 또는 106번에 상응하는 하나 이상의 아미노산에 돌연변이를 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 구체적 양태에서, 융합 폴리펩타이드는 서열 번호 14의 아미노산 24번 및 26번에 상응하는 아미노산 중 하나 또는 바람직하게는 이들 둘다가 돌연변이된 E7 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 돌연변이된 폴리펩타이드는 돌연변이된 위치 중 어느 하나에 글리신 잔기를 가질 수 있으며, E6은 E7에 대해 카복시 말단 또는 아미노 말단에 있을 수 있다.

[0014] 본 발명은 이들 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 또한 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 하나의 양태에서, 분리된 핵산은 사람 파필로마바이러스 E6 및 E7 서열을 포함하며, 이때 상기 E6 뉴클레오타이드 서열은 HPV16 E6 유전자의 뉴클레오타이드 187 내지 189번 또는 316 내지 318번에 상응하는 임의의 뉴클레오타이드(들)에 돌연변이를 갖고, 상기 E7 뉴클레오타이드 서열은 HPV16 E7 유전자의 뉴클레오타이드 70 내지 72번, 76 내지 78번 또는 271 내지 273번에 상응하는 임의의 뉴클레오타이드(들)에 돌연변이를 갖고, 상기 돌연변이 또는 돌연변이들로 인해 상이한 아미노산이 암호화된다. 본 발명은 또한 이러한 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 및 면역원성 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 서열 번호 3, 서열 번호 5, 서열 번호 9 또는 서열 번호 11에 제시된 아미노산 서열을 갖는 분리된 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산, 예를 들어 서열 번호 4, 서열 번호 6, 서열 번호 10 또는 서열 번호 12의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 제공한다.

[0016] E6/E7 융합체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터가 또한 제공된다. 예를 들어, 구체적 양태에서, 본 발명은 발현 조절 서열과 작동적으로 결합된(예를 들어, 발현 조절 서열의 조절하에 있는) 서열 번호 4, 6, 10 또는 12를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0017] E6/E7 융합체를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포 뿐만 아니라, E6/E7 융합 폴리펩타이드를 발현하거나 함유하는 숙주 세포가 또한 제공된다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 또는 폴리펩타이드를 포함하고, 예를 들어, 자궁경부 암을 치료 또는 예방하기에 유용한 면역원성 조성물을 제공한다. 이러한 면역원성 조성물은 (a) 본 발명의 폴리펩타이드(예를 들어, E7 폴리펩타이드가 서열 번호 14의 아미노산 24번, 26번 또는 91번에 상응하는 아미노산 중 하

나 이상에 돌연변이를 갖고 E6 폴리펩타이드가 돌연변이를 갖지 않거나 서열 번호 13의 아미노산 63번 또는 106번에 상응하는 아미노산 중 하나 이상에 돌연변이를 갖는 사람 파필로마바이러스 E6 및 E7 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드) 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 임의로 본 발명의 면역원성 조성물은 보조제를 또한 함유할 수도 있다.

[0019] 본 발명의 핵산 하나 이상을 함유하고/하거나 본 발명의 폴리펩타이드 하나 이상을 암호화하는 재조합 바이러스가 또한 제공된다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 재조합 바이러스는 서열 번호 3, 5, 9 또는 11에 제시된 폴리펩타이드를 암호화하고 보다 바람직하게는 서열 번호 4, 6, 10 또는 12 중 어느 하나에 제시된 서열을 갖는 핵산을 포함할 수 있다. 특히 바람직한 양태에서, 본 발명의 재조합 바이러스는 변형된 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(VEEV)이다.

[0020] 상기한 조성물을 사용하는 방법이 추가로 제공되며, 이러한 방법도 본 발명의 일부분으로서 고려된다. 따라서, 본 발명은 개체에게 면역원성 유효량의 본 발명의 폴리펩타이드(예를 들어, 서열 번호 3, 5, 9 또는 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드)와 약제학적으로 유효한 담체를 투여하여 개체에서 면역반응을 생성시키는 방법을 또한 제공한다.

[0021] 자궁경부 암을 치료 및/또는 예방하는 방법이 또한 제공된다. 예를 들어, 하나의 양태에서, 본 발명은 자궁경부 암으로 진단된 환자에게 본 발명의 폴리펩타이드(예를 들어, 서열 번호 3, 5, 9 또는 11 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드)와 약제학적으로 허용되는 담체를 투여하는, 자궁경부 암의 치료 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드와 약제학적으로 허용되는 담체를 개체에게 투여하는, 자궁경부 암의 예방 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 환자에게 면역원성 유효량의 본 발명의 핵산(예를 들어, 서열 번호 3, 5, 9 또는 11의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는, 특히 서열 번호 4, 6, 10 또는 12 중 어느 하나에 제시된 서열을 갖는 핵산 서열)을 투여하여, 당해 환자에서 자궁경부 암을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0030] 본 발명은 HPV E6 및 E7 단백질의 융합체, 이러한 융합체의 예를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 돌연변이 형태를 제공한다. 본원에서 확인된 HPV16의 특정한 돌연변이(단, E6 C106G는 제외, 바로 이전에 C106R로 돌연변이되었음, 참조: Dalal et al., J Virol 1996, 70:683-8) 각각이 이미 개시된 바 있으나, 이들 돌연변이의 조합은 제조된 바 없으며 이들 돌연변이의 조합은 형질전환능 또는 불멸화능이 결여된 상태에서 면역원성을 유지하는 능력에 대해 시험되지 않았다. 예를 들어, 2개 이상의 돌연변이의 임의의 다른 조합이 면역원성 효능을 유지한 폴리펩타이드를 초래할 수 있다는 것은 공지되지 않았다. 본 발명은 이들 돌연변이의 독특한 조합을 함유하는 E6/E7(본원에서 "E6/E7"이란 용어는 융합체 E6E7, E7E6 또는 이들 둘다의 순서로 나타내기 위해 사용된다) 단백질이 융합체 및 4 또는 5개의 정의된 돌연변이를 함유하는 E6/E7 융합 단백질이 이의 면역원성 효능을 유지한다는 놀라운 발견을 기술한다. 이 발견은 치료용 면역원성 조성물이 HLA 다양한 집단에서 수많은 HPV E6 및 E7에 대해 최적의 세포 반응을 유효한 적용범위으로 생성시켜야 하기 때문에 특히 중요하다. 본 발명은 또한 이러한 다중 돌연변이를 보유하면서 이의 면역학적 효능을 유지하는 이들 E6E7 융합체가, E6 및 E7의 형질전환능에 필수적인 작용, 즉 p53 및 pRB 분해를 유지하지 않음을 기술한다. 상세하게는, 본 발명의 융합체는 p53 또는 Rb의 분해를 유도하지 않고 따라서 환자에게 전달하거나 환자에서 발현시키는데 있어 비-돌연변이체 대응물에 비해 안전하다.

[0031] 본 발명은 또한 E6이 E7에 대해 카복시 말단에 있는 E7E6 융합체가 이의 E6E7 대응물에 비해 증가된 면역학적 활성을 갖는다는 놀라운 발견을 기술한다.

[0032] 구체적 예로서, HPV16 E6E7 및 E7E6 융합 단백질을 제조하여 면역원성 및 항종양 반응에 대해 시험하였다. 몇몇 점 돌연변이를 E6 및 E7 유전자에 도입시켜 이의 종양 발생 가능성을 불활성화시키면서 공지된 HLA 에피토프를 보존하였다. H-2D^{b} 제한된 E7$_{49-57}$ 에피토프에 대한 유사한 CTL 반응이 야생형 또는 돌연변이 융합 단백질을 암호화하는 VRP의 3 x 10^{5} 감염단위로 면역화된 마우스 간에 관찰되었다. 야생형 및 돌연변이 융합 단백질을 발현하는 VRP 면역원성 조성물은 모두 마우스 중 90% 이상에서 7일-확립된 C3 종양을 박멸시켰다. 또한, E6E7 융합체 작제물은 2개의 다른 E6E7-양성 종양 모델에서 항종양 효능을 입증하였다. 구체적으로는, E7E6 TetM VRP는 HLF16 종양 모델에 완전한 종양 거부를 부여하였다. 야생형 E6 및 E7이 아닌 돌연변이체를 발현하는 VRP

로 감염된 1차 사람 유선 상피세포는 p53 및 망막모세포종 단백질 둘다의 정상 수준을 입증하였다.

[0033] 본 발명의 E6E7 및 E7E6 융합체

[0034] 본 발명은 E7내의 C24G, E26G 및 C91G와 E6내의 C63G 및 C106G와 같은 다중 돌연변이를 포함하는 E6/E7 융합 폴리펩타이드를 제공한다(도 1A 및 1B 참조). 예를 들어, E6E7TetM 및 E7E6TetM 융합 폴리펩타이드는 E7 C24G 및 E26G 돌연변이와 E6 C63G 및 C106G 돌연변이를 포함하며, E6E7PentM 및 E7E6PentM 융합 폴리펩타이드는 TetM 돌연변이체에 존재하는 4개의 돌연변이 이외에 C91G E7 돌연변이를 포함한다. 이러한 돌연변이된 융합 폴리펩타이드가 특히 불안정할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 불안정한 단백질이, 안정한 단백질과 비교하여 CTL 반응을 발생시키는 능력이 증가되어 있음을 이해하고 있다. 당해 분야의 숙련가는 또한 융합 단백질이 적절히 폴딩되지 않는 경향이 있어서 이의 비-융합된 대응물에 비해 덜 안정함을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명에서 기재한 바와 같은 융합 단백질은 이의 비융합된 대응물에 비해서 세포-매개성 면역반응의 생성에 보다 적합하다.

[0035] HPV16 E6E7 및 E7E6 융합 단백질을 제조하여 면역원성 및 항종양 반응에 대해 시험하였다. 몇가지 점 돌연변이를 E6 및 E7 유전자에 도입시켜 종양발생 가능성을 불활성화시키면서 공지된 HLA 에피토프를 보존하였다. 본 발명 전에는, 본원에서 시험된 돌연변이의 조합이 폴리펩타이드의 면역원성을 파괴할 수 있는지 또는 이러한 돌연변이된 폴리펩타이드가 이의 면역원성을 보유할 수 있는지에 관해 공지되어 있지 않았다. H-2D^{b} 제한된 $E7_{49-57}$ 에피토프에 대한 유사한 CTL 반응이 야생형 또는 돌연변이 융합 단백질을 암호화하는 VRP의 3 x 10^{5} 감염단위로 면역화된 마우스 간에 관찰되었다. 야생형 및 돌연변이 융합 단백질을 발현하는 VRP 면역원성 조성물은 모두 마우스 중 90% 이상에서 7일-확립된 C3 종양을 박멸시켰다. 또한, E6E7 융합체 작제물은 2개의 다른 E6E7-양성 종양 모델에서 항종양 효능을 입증하였다.

[0036] 본 발명은 E6이 아미노 말단 또는 카복시 말단에 있는, E6 및 E7을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다. 그러나, 당해 분야의 숙련가라면 본 발명의 기술로부터 E6이 E7에 대해 카복시 말단에 있는, 즉 E6이 E7 다음에 존재하는 융합체(E7E6 융합체), 예를 들어, E7E6TetM 및 E7E6PentM이 E6이 E7에 대해 아미노 말단에 있는 융합체(E6E7 융합체, 예를 들어, E6E7TetM 및 E6E7PentM)에 비해서 증가된 면역원성 효능을 갖는다는 것을 인지할 것이다. 또한, 당해 분야의 숙련가에 의해서, E6이 E7에 대해 카복시 말단에 있는 융합체인 E7E6 융합체가 E6E7 융합체에 비해 감소된 E6 활성을 갖는다는 것이 인지될 것이다. 따라서, E7E6 융합체는 일반적으로 보다 안전한 것으로 예상될 것이다. 따라서, E6이 E7에 대해 카복시 말단에 있는 융합체가 본 발명의 보다 바람직한 양태이다.

[0037] 본 발명은 HPV16 E7의 C24, E26 및 C91과 HPV16 E6의 C63 및 C106에 상응하는 위치에 특정한 뉴클레오타이드 및 아미노산 돌연변이의 예를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 글리신으로 돌연변이되는 시스테인 24(뉴클레오타이드 서열이 CTG에서 CGG로 변화된 상응하는 돌연변이)를 제공한다. 이러한 예들은 제한되지 않는다. 예를 들어, 유사하게 아연 핑거(zinc finger) 또는 Rb 결합을 붕괴시키는 돌연변이를 사용할 수 있다. 예를 들어, 아연 핑거 형성에 중요한 시스테인 잔기에서의 돌연변이를 임의의 다른 아미노산으로 변환시킬 수 있다. 바람직한 돌연변이는 단백질을 탈안정화시켜 당해 단백질의 면역원성을 증가시킨다.

[0038] 본 발명의 구체적 양태에서, 폴리펩타이드는 E7 폴리펩타이드가 서열 번호 14의 24, 26 또는 91번 위치에 상응하는 임의의 아미노산(들)에 돌연변이를 갖고, E6 폴리펩타이드가 돌연변이를 갖지 않거나 서열 번호 13의 63 또는 106번 위치에 상응하는 하나 이상의 아미노산(들)에 돌연변이를 갖는 HPV16 E6 및 E7의 융합체이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 폴리펩타이드는 E7 폴리펩타이드가 서열 번호 14의 24 및 26번에 상응하는 아미노산에 돌연변이를 갖고 E6 폴리펩타이드가 서열 번호 13의 63번 또는 106번 또는 이들 둘다에 상응하는 아미노산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이를 갖는 HPV16 E6 및 E7의 융합체이다.

[0039] 당해 분야에서는 아미노산 수를 심지어 제1 메티오닌이 결실된 경우에도 제1 아미노산으로서 메티오닌을 계수함으로써 측정하는 것으로 이해된다. 예를 들어, E6E7TetM의 G24 돌연변이(서열 번호 3)는 폴리펩타이드내 E7의 24번 잔기에 있는 것으로 고려된다.

[0040] 본 발명의 다른 바람직한 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 E6 폴리뉴클레오타이드가 뉴클레오타이드 187 내지 189번(HPV16 게놈의 뉴클레오타이드 290 내지 292번(진뱅크 승인번호 K02718)에 상응함) 또는 뉴클레오타이드 316 내지 318번(HPV16의 뉴클레오타이드 419 내지 421번에 상응함) 중 어느 하나에 돌연변이를 갖고 E7 뉴클레

오타이드 서열이 뉴클레오타이드 70 내지 72번(HPV16 게놈의 631 내지 633번에 상응함), 76 내지 78번(HPV16 게놈의 뉴클레오타이드 637 내지 639번에 상응함) 또는 271 내지 273번(HPV16 게놈의 뉴클레오타이드 832 내지 834번에 상응함) 중 어느 하나에 돌연변이를 갖는 HPV16 E6 및 E7의 융합체를 갖는다. 이러한 뉴클레오타이드 변화로 넌센스 돌연변이가 아니라 미스센스 돌연변이가 초래된다. 환원하면, 이러한 돌연변이로 상이한 아미노산이 암호화된다.

[0041] 본 발명은 폴리펩타이드, 및 이러한 폴리펩타이드를 포함하거나 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 면역원성 및 약제학적 조성물을 제공한다. 상기한 바와 같이, 이러한 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 본원에 제공된 서열에 기술되어 있다. 예를 들어, E6E7TetM 폴리펩타이드는 서열 번호 3에 기술되어 있다. 당해 분야의 숙련가라면 본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 서열이 본 출원에 기술된 정확한 서열로 제한되지 않음을 인지할 것이다. 예를 들어, E6 및 E7 서열은 HPV16의 ATCC 클론 #45113으로부터 PCR을 수행하여 수득하였다. 상기 ATCC 클론의 E6 및 E7 서열은 진뱅크 HPV16 서열, K02718에 기술된 것과 다소 다르다. 따라서, 당해 분야의 숙련가라면, 본 발명이 본원에서 기술되는 서열과 실질적으로 상동이거나 실질적으로 유사한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열도 또한 포함하고 기술되는 돌연변이의 조합이 임의의 E6 또는 E7 서열 배경하에 발생할 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들어, 이러한 돌연변이 및 이러한 돌연변이의 임의의 수의 조합은 K02718에 기술된 E6 및 E7 서열의 범주내에 있을 수 있다.

[0042] 당해 분야의 숙련가라면 본 발명이 HPV16 이외에도 파필로마바이러스 계열의 다른 구성원에 관한 것일 수도 있음을 인지할 것이다. 암과 관련된 다른 파필로마바이러스 유전형, 특히 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68은 이들의 종양발생능에 대해 중심적인 E6 및 E7에 보존된 모티프를 갖는다[참조: Fields Virology Fourth Edition, 2001, Ch. 65 and 66,2197-2265, Knipe & Howley Eds., Lippincott Williams and Wilkins]. 명백하게, 이러한 E6 및 E7 단백질은 C-X-X-C 아연 핑거 모티프를 가지며, E7의 경우에 추정상의 Rb 결합 모티프 L-X-C-X-E를 갖는다. 따라서, 본 발명의 양태는 본 발명에서 기술하는 돌연변이와 상응하는 돌연변이를 갖는, 파필로마바이러스 계열의 다른 구성원으로부터의 E6 및 E7 융합 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0043] 서열 번호 1 내지 12에 기술한 특정한 아미노산과 뉴클레오타이드의 위치에 상응하는 아미노산과 뉴클레오타이드는 서열 정렬을 수행하여 결정할 수 있다. 이러한 서열 정렬의 예는 도 2A 내지 2E 및 3A 내지 3C에 도시한다. 상기 도면들에는, HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68의 E6 및 E7 폴리펩타이드의 아미노산이 정렬되었고, 컨센서스 서열이 제시되어 있다. E6 컨센서스 아미노산 서열은 서열 번호 39에 나타내며, E7 컨센서스 아미노산 서열은 서열 번호 40에 나타낸다.

[0044] 이러한 정렬로 본 발명에서 시험된 각각의 돌연변이가 상기 HPV 바이러스들 각각에서 보존되고 따라서 이들 HPV 바이러스를 이들의 종양발생 가능성을 넉아웃(knock-out)시키면서 면역반응을 유도하는 능력은 유지하도록 돌연변이시킬 수 있음이 입증된다. 흔히, 아연 핑거 및 결합 모티프와 같은 구조의 형성에 관여하는 아미노산이 보존된다. 예를 들어, HPV 유전형의 각각의 구성원에서 HPV16의 E7의 아미노산 24, 26 및 91번과 HPV16의 E6의 아미노산 63번 또는 106번에 상응하는 보존된 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 확인하여 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 도 2A 내지 2E에 도시된 정렬은 HPV16 E6의 아미노산 63번(^{63}C)에 상응하는 HPV18 E6 아미노산이 시스테인 잔기이고 HPV18의 E6의 65번 위치에 있음을 입증한다. 따라서, HPV18의 E7의 아미노산 24, 26 및 91번과 HPV16의 E6의 아미노산 106번에 상응하는 다른 잔기 이외에, HPV18의 E6의 ^{66}C를 본 발명에서 돌연변이시킬 수 있다. 마찬가지로, E6 컨센서스 서열(서열 번호 39)의 아미노산 65 또는 108번에 상응하는 임의의 HPV E6 폴리펩타이드 또는 E7 컨센서스 서열(서열 번호 40)의 아미노산 25, 27 또는 97번에 상응하는 임의의 HPV E7 폴리펩타이드내의 돌연변이를 본 발명에서 제조할 수 있다.

[0045] 본 발명의 하나의 양태에서, 융합 폴리펩타이드는 이들 돌연변이 중 2개를 포함한다. 추가의 양태에서, 이들 융합 폴리펩타이드는 이들 돌연변이 중 3개를 포함한다. 다른 양태에서, 이들 융합 폴리펩타이드는 이들 돌연변이 중 4개를 포함한다. 또 다른 양태에서, 이들 융합 폴리펩타이드는 이들 돌연변이 중 모든 5개를 포함한다.

[0046] 분자생물학 정의. 본 발명에 따라서, 당해 분야의 기술내에서 통상적인 분자생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기법이 사용될 수 있다. 이러한 기법은 문헌에 충분히 설명되어 있다[참조: Sambrook, Fitsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (본원에서 "Sambrook et al., 1989"로 언급됨); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984);

Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames and S. J. Higgins, eds. 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. E. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984);F. M. Ausubel et al.(eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)].

[0047] 본원에서 폴리뉴클레오타이드는 천연 조절 서열에 의해 플랭킹될 수 있거나, 프로모터, 인핸서, 반응 요소, 시그날 서열, 폴리아데닐화 서열, 인트론 5'- 및 3'-비암호화 영역 등을 포함하는 이종 서열과 결합될 수 있다. 핵산은 또한 당해 분야에 공지된 다수의 수단으로 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적 예에는 예를 들어, 메틸화, "캡(cap)", 하나 이상의 천연 아미노산의 치환(즉, 제3 또는 제1 "워블 (wobble)" 염기의 코돈 최적화), 및 예를 들어, 비하전된 연결(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 및 하전된 연결(예: 포스포로티오에티트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 뉴클레오타이드간 변형이 포함된다. 폴리뉴클레오타이드는 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-라이신 등), 개재제(intercalator)(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제와 같은 하나 이상의 추가의 공유결합된 잔기를 포함된다. 폴리뉴클레오타이드는 메틸 또는 에틸 포스포트리에스테르 또는 알킬 포스포르아미디트 연결을 형성시켜 유도체화할 수 있다. 게다가, 본원에서 폴리뉴클레오타이드는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 시그날을 제공할 수 있는 표지로 변형시킬 수도 있다. 예시적 표지에는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 포함된다. 제조될 수 있는 변형의 다른 비제한적 예는 본 발명의 설명에서 하기에 제공된다.

[0048] "구조 유전자"로서 지칭되기도 하는 "유전자"란 용어는 하나 이상의 단백질 또는 효소의 모두 또는 일부분을 포함하는 아미노산의 특정 서열을 암호화하거나 이에 상응하는 DNA 서열을 의미하며, 예를 들어, 유전자가 발현되는 조건을 결정하는 프로모터와 같은 조절성 DNA 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 구조 유전자가 아닌 일부 유전자는 DNA에서 RNA로 전사될 수 있으나 아미노산 서열로 해독되지 않는다. 기타 유전자는 구조 유전자 또는 DNA 전사의 조절인자로서 작용할 수 있다.

[0049] "암호화 서열" 또는 폴리펩타이드, 단백질 또는 효소를 "암호화하는" 서열은 발현되는 경우에 당해 폴리펩타이드, 단백질 또는 효소를 생상하는 뉴클레오타이드 서열, 즉 당해 폴리펩타이드, 단백질 또는 효소에 대한 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이다. 바람직하게는, 암호화 서열은 적절한 조절성 서열의 조절하에 위치하는 경우에 시험관내 또는 생체내에서 세포내 폴리펩타이드로 해독되는 RNA 서열이다. 암호화 서열의 경계는 5' 말단 부근의 개시코돈 및 하부 전사 종결코돈에 의해 결정된다. 암호화 서열은 원핵생물의 서열, 진핵생물의 mRNA로부터의 cDNA, 원핵생물(예: 포유동물) DNA로부터의 게놈 DNA 서열 및 심지어 합성 DNA 서열을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 암호화 서열이 진핵생물의 세포에서의 발현용으로 의도되는 경우, 폴리아데닐화 시그날 및 전사 종결 서열은 일반적으로 이러한 암호화 서열에 대해 3'에 위치할 수 있다.

[0050] 전사 및 해독 조절 서열은 DNA 조절성 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 터미네이터 등으로서, 숙주 세포에서의 암호화 서열의 발현을 제공한다. 진핵생물의 세포에서는 폴리아데닐화 시그날이 조절 서열이다. "발현 조절 서열"은 프로모터 및 인핸서와 같이 전사의 개시에 관여하는 전사 조절 서열이다.

[0051] "프로모터 서열"은 세포내에서 RNA 폴리머라제에 결합할 수 있으며 하부(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절성 영역이다. 본 발명을 정의하고자 하는 목적으로, 프로모터 서열은 이의 3' 말단에서 전사 개시 부위에 의해 한정되며 상부(5' 방향)로 신장되어 배경값 이상의 측정가능한 수준에서 전사를 개시한다. 상기한 바와 같이, 프로모터 DNA는 암호화 DNA의 발현을 개시, 조절 또는 다른 방식으로 매개하거나 제어하는 DNA 서열이다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같은 폴리뉴클레오타이드의 "증폭"은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 DNA 서열의 혼합물 중의 특정 DNA 서열의 농도를 증가시킴을 의미한다. PCR의 설명에 대해서는 문헌[참조: Saiki et al., Science 1988,239 : 487]을 참조한다.

[0053] "발현하다" 및 "발현"이란 용어는 유전자 또는 DNA 서열내의 정보가 명백해지도록 허용하거나 유발하는 것, 예를 들어, 상응하는 유전자 또는 DNA 서열의 전사 및 해독에 관여하는 세포 기능을 활성화시켜 단백질을 생산하는 것을 의미한다. DNA 서열은 세포내에서 또는 세포에 의해 발현되어 단백질과 같은 "발현 산물"을 형성한다. 발현 산물 자체, 예를 들어, 생성된 단백질은 세포에 의해 "발현된다"고 말할 수도 있다. 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 예를 들어, 외래 또는 고유한 프로모터의 조절하에 외래 숙주 세포에서 또는 외래 프로모터의 조절하에 고유한 숙주 세포에서 발현되거나 생산되는 경우에 재조합에 의해 발현된다.

[0054] "형질감염"이란 용어는 외래 핵산의 세포내로의 도입을 의미하다. "형질전환"이란 용어는 "외래"(즉, 외인성 또는 세포외) 유전자, DNA 또는 RNA 서열이 숙주 세포로 도입되어 숙주 세포가 상기 도입된 유전자 또는 서열을 발현함으로써 도입된 유전자 또는 서열에 의해 암호화된 목적하는 물질, 전형적으로는 단백질 또는 효소를 생산할 수 있음을 의미한다. "클로닝된" 또는 "외래" 유전자 또는 서열로도 지칭될 수 있는 도입된 유전자 또는 서열은 개시, 종결, 프로모터, 시그날, 선별 또는 또는 세포의 유전자 기구에 의해 사용되는 기타 서열과 같은 조절성 또는 조절 서열을 포함할 수 있다. 유전자 또는 서열은 비기능성 서열 또는 공지되지 않은 기능을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 도입된 DNA 또는 RNA를 수용하거나 발현하는 숙주 세포는 "형질전환된" 것으로서, "형질전환체" 또는 "클론"이다. 숙주 세포로 도입된 DNA 또는 RNA는 숙주 세포와 동일한 속 또는 종의 세포 또는 상이한 속 또는 종의 세포를 포함하여 어떠한 공급원으로부터도 유래될 수 있다.

[0055] "벡터" 및 "발현 벡터"란 용어는 DNA 또는 RNA 서열(예: 외래 유전자)를 숙주 세포로 도입시켜 숙주 세포를 형질전환시키고 도입된 서열의 폴리펩타이드의 발현(예: 전사 및 해독)을 촉진하는 운반체를 의미한다.

[0056] 벡터는 전형적으로 외래 DNA가 삽입되어진 투과제의 DNA를 포함한다. 하나의 DNA 절편을 다른 DNA 절편으로 삽입시키는 통상의 방식은 특정 부위(뉴클레오타이드의 특정 그룹)에서 DNA를 절단하는 제한 효소로 지칭되는 효소의 사용을 포함한다. 일반적으로, 외래 DNA는 벡터 DNA의 하나 이상의 제한 부위로 삽입된 다음, 벡터에 의해 투과성 벡터 DNA와 함께 숙주 세포내로 운반된다. DNA가 삽입되었거나 첨가된 DNA의 절편 또는 서열, 예를 들어, 발현 벡터는 "DNA 작제물"로서 지칭될 수도 있다.

[0057] 벡터의 통상적 유형은 일반적으로 이본쇄 DNA의 독립적(self-contained) 분자인 "플라스미드"이다. 플라스미드는 추가의(외래) DNA를 즉시 수용할 수 있으며, 이를 적합한 숙주 세포내로 즉시 도입시킬 수 있다. 플라스미드 벡터는 흔히 암호화 DNA 및 프로모터 DNA와 외래 DNA를 삽입하기에 적합한 하나 이상의 제한 부위를 함유한다. 프로모터 DNA 및 암호화 DNA는 동일한 유전자 또는 상이한 유전자로부터 유래할 수 있으며, 동일한 또는 상이한 유기체로부터 유래할 수 있다. 플라스미드 및 진균 벡터를 포함하는 다수의 벡터가 다양한 진핵 및 원핵 숙주에서의 복제 및/또는 발현에 대해 기술되었다. 비제한적 예에는 pKK 플라스미드 (Clontech), pUC 플라스미드, pET 플라스미드(Novagen, Inc., Madison, WI), pRSET 또는 pREP 플라스미드(Invitrogen, San Diego, CA) 또는 pMAL 플라스미드(New England Biolabs, Beverly, MA) 및 본원에서 기재되거나 인용된 또는 관련 분야의 숙련가에게 공지된 방법을 사용한 적절한 숙주 세포가 포함된다. 재조합 클로닝 벡터는 흔히 클로닝 또는 발현을 위한 하나 이상의 복제 시스템, 숙주 세포에서의 선별을 위한 하나 이상의 마커, 예를 들어, 항생제 내성 및 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 생명공학에서 통상적인 실험을 사용하여 어떠한 클로닝 벡터가 본 발명에서 사용하기에 가장 적합한지를 결정할 수 있다. 일반적으로, 클로닝 벡터의 선택은 폴리뉴클레오타이드 서열의 크기와 사용되는 숙주 세포에 따라 좌우된다.

[0058] "폴리펩타이드"는 "펩타이드 결합"으로 지칭되는 화학적 결합에 의해 함께 연결되어 있는 아미노산으로 지칭되는 화학적 빌딩 블록의 쇄이다. "단백질"이란 용어는 유전자로부터 직접적으로 또는 간접적으로 전사된, 유전자 또는 핵산 분자(예: mRNA 또는 cDNA)에 의해 암호화된 아미노산 잔기를 함유하는 폴리펩타이드를 의미한다. 임의로, 단백질에는 유전자 또는 mRNA에 의해 암호화되는 특정한 아미노산 잔기가 결여될 수 있다. 효소를 포함하는 단백질 또는 폴리펩타이드는 천연적으로 발생함을 의미하여 "고유한" 또는 "야생형"일 수 있거나, 변경되었거나 유도체화되었음을 의미하여 "돌연변이체", "변이체" 또는 "변형된" 것일 수 있으며, 일부 방식으로는 고유한 단백질 또는 다른 돌연변이체와 상이하거나 변화된다.

[0059] "돌연변이"는 돌연변이체 단백질, 효소, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 유전자 또는 세포를 생성시키는 임의의 과정 또는 기작을 의미한다. 이는 단백질, 효소, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 유전자 서열이 변경된 임의의 돌연변이 및 이러한 돌연변이로부터 발생하는 세포내의 임의의 변화를 포함한다. 변경된 단백질, 효소, 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 "돌연변이체"이며 또한 "변이체"로 지칭되기도 한다. 전형적으로, 돌연변이는 점 돌연변이(치환), 하나 또는 다수의 뉴클레오타이드 잔기의 결실 또는 삽입에 의해 폴리뉴클레오타이드 또는 유전자 서열에서 일어난다. 돌연변이는 유전자의 단백질-암호화 영역내에서 발생하는 폴리뉴클레오타이드 변경 뿐만 아니라, 제한됨이 없이 조절성 또는 프로모터 서열과 같은 단백질-암호화 서열의 외부에 있는 영역내의 변경을 포함한다. 유전자내 돌연변이는 "사일런트(silent)", 즉 발현시 아미노산 변경에 반영되지 않아서, 유전자의 "서열-보존적" 변이체를 초래할 수 있다. 이는 일반적으로 하나의 아미노산이 하나 이상의 코돈에 상응하는 경우에 발생한다. 표 1에는 어떠한 아미노산이 어떠한 코든(들)에 상응하는지가 요약되어 있다.

[0060] 따라서, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해서, 본원에서 기술되는 E6/E7 융합 폴리펩타이드의 돌연변이된 아미노산

잔기를 암호화하는 임의의 3개 뉴클레오타이드 코돈은 본 발명의 범주내에 있다.

[0061] "돌연변이체" 및 "변이체"는 또한 변형된 또는 변경된 유전자, DNA 또는 RNA 서열, 효소, 세포 등, 즉 모든 종류의 돌연변이체를 명시하기 위해 사용할 수 있다. 이러한 변화는 프로모터, 리보좀 결합 부위 등에서의 변화도 포함한다.

[0062] "변이체 아미노산 서열"이란 용어는 면역원성을 감소시키지 않는 변형에 의해서, 구체적으로 예시된 E6 및 E7 융합 폴리펩타이드와 달라질 수 있는 다른 적합한 E6 및 E7 융합 단백질을 의미한다. 이러한 변화의 제조에서, 아미노산의 하이드로패티(hydropathic) 지수를 고려할 수 있다. 폴리펩타이드 상에 상호작용성 생물학적 작용을 부여하는 아미노산의 하이드로패티 지수의 중요성은 당해 분야에 일반적으로 공지되어 있다[참조: Kyte & Doolittle, 1982]. 특정한 아미노산은 유사한 하이드로패티 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산으로 대체될 수 있고 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드를 초래하는 것으로 공지되어 있다. 각각의 아미노산에는 이의 소수성 및 전하 특성을 기준으로 한 하이드로패티 지수가 할당된다. 이들 지수는 다음을 포함한다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0063] 아미노산 잔기의 상대적 하이드로패티 특성은 수득된 폴리펩타이드의 2차원 및 3차원 구조를 결정하며, 이는 차례로 폴리펩타이드와 효소, 기질, 수용체, 항체, 항원 등과 같은 다른 분자와의 상호작용을 정의하는 것으로 사료된다. 당해 분야에 아미노산이 유사한 하이드로패티 지수를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있으며 여전히 기능적으로 동등한 폴리펩타이드가 수득됨이 공지되어 있다. 이러한 변화에서, 하이드로패티 지수가 +/-2 이내인 아미노산 치환이 바람직하며, +/-1 내인 아미노산 치환이 특히 바람직하고, +/-0.5 내인 아미노산 치환이 보다 특히 바람직하다.

[0064] 유사한 아미노산의 치환은 친수성을 기준으로 하여 제조될 수 있으며, 특히 이에 따라 제조된 생물학적 기능이 동일한 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 면역학적 양태에 사용할 것이다. 본원에 참조로 인용되는 문헌, 미국 특허 제4,554,101호에는 이의 인접한 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 폴리펩타이드의 최대 국소 평균 친수성이 이의 면역원성 및 항원성, 즉, 폴리펩타이드의 생물학적 특성과 관련됨이 언급되어 있다.

[0065] 미국 특허 제4,554,101호에 상세히 기술된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 아미노산 잔기에 할당된다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0±1); 글루타메이트(+3.0±1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 프롤린(-0.5±1); 트레오닌(-0.4); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 이소루이신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 및 트립토판(-3.4). 아미노산은 유사한 친수성 값을 가지는 다른 것으로 치환될 수 있으며 여전히 생물학적으로 등가이며 특히, 면역원적으로 등가인 폴리펩타이드가 수득된다. 이러한 변화에서, 친수성 값이 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하며, ±1 이내인 치환이 특히 바람직하고, ±0.5 이내인 치환이 보다 특히 바람직하다.

[0066] 상기 개요한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들면, 이들의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기준으로 한다. 상기한 특징 중 몇가지를 고려하는 치환체의 예가 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있으며 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 루이신 및 이소루이신이 포함된다.

[0067] "기능-보존적 변이체"는 소정의 아미노산 잔기가 단백질 또는 효소의 전반적 구조적 입체형태 및 특정된 기능을 변경시키지 않으면서 변화된 단백질 또는 효소이다. 이는 극성 또는 비극성 특성, 크기, 모양 및 전하를 포함하는 유사한 구조적 또는 물리적 특성을 갖는 아미노산의 대체를 포함하나 이에 제한되지 않는다(하기 표 1 참조).

표 1

[0068] 아미노산, 상응 코돈 및 기능성/특성

아미노산	SLC	DNA 코돈	측쇄 특성
이소류신	I	ATT, ATC, ATA	소수성
류신	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG	소수성

발린	V	GTT, GTC, GTA, GTG	소수성
페닐알라닌	F	TTT, TTC	방향족 측쇄
메티오닌	M	ATG	황 그룹
시스테인	C	TTG, TGC	황 그룹
알라닌	A	GCT, GCC, GCA, GCG	소수성
글리신	G	GGT, GGC, GGA, GGG	소수성
프롤린	P	CCT, CCC, CCA, CCG	2급 아민
트레오닌	T	ACT, ACC, ACA, ACG	지방족 하이드록실
세린	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	지방족 하이드록실
티로신	T	TAT, TAC	방향족 측쇄
트립토판	W	TGG	방향족 측쇄
글루타민	Q	CAA, CAG	아미드 그룹
아스파라긴	N	AAT, AAC	아미드 그룹
히스티딘	H	CAT, CAC	염기성 측쇄
글루탐산	E	GAA, GAG	산성 측쇄
아스파르트산	D	GAT, GAC	산성 측쇄
라이신	K	AAA, AAG	염기성 측쇄
아르기닌	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	염기성 측쇄
종결코돈	Stop	TAA, TAG, TGA	-

[0069] 본원에서 언급되는 바와 같이, "서열 유사성"은 뉴클레오타이드 또는 단백질이 서열이 서로 관련되는 정도를 의미한다. 두 서열 간의 유사성 정도는 서열 동일성% 및/또는 보존에 기초할 수 있다. 보존된 것으로 명시된 것 이외의 아미노산은 단백질 또는 효소에서 상이하여 유사한 기능의 임의의 두 단백질 간의 단백질 또는 아미노산 서열 유사성%는 달라질 수 있으며, 예를 들어, 정렬 체계에 따라 측정되는 바에 의하면 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상일 수 있다.

[0070] 본원에서 "서열 동일성"은 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 불변인 정도를 의미한다.

[0071] 두 DNA 서열은 BLAST, FASTA, DNA Strider 등과 같은 서열 비교 알고리듬으로 측정된 바와 같이 뉴클레오타이드의 약 80% 이상, 가장 바람직하게는 약 90 또는 95% 이상이 한정된 길이의 DNA 서열에 걸쳐서 매치되는 경우에 실질적으로 상동이거나 실질적으로 유사하다. 이러한 서열의 예는 본 발명의 특정 유전자의 대립 또는 종 변이체이다. 실질적으로 상동인 서열은 서열 데이타 뱅크 또는 예를 들어, 특정한 시스템에 대해 정의한 바와 같은 엄격한 조건(stringent condition)하의 서던 하이브리드화 실험에서 유용한 표준 소프트웨어를 사용하여 서열을 비교함으로써 확인할 수 있다.

[0072] 유사하게, 두 아미노산 서열은 80% 초과의 아미노산이 동일하거나 약 90% 초과의 아미노산이 유사한 경우에 실질적으로 상동이거나 실질적으로 유사하다. 바람직하게는, 유사한 또는 상동 서열은 서열 정렬로 확인한다.

[0073] 폴리뉴클레오타이드 서열의 "서열-보존적 변이체"는 소정의 코돈내의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 변화가 상기 코돈에 의해 암호화된 아미노산을 변경시키지 않는 변이체이다.

[0074] "서열 정렬"은 예를 들어, 서열 유사성의 정도를 평가할 목적으로 2개 이상의 서열을 일렬로 정렬시켜 최대 수준의 서열 동일성(및 아미노산 서열의 경우에는 보존)을 달성하는 과정을 의미한다. 서열을 정렬하고 유사성 및/또는 동일성을 평가하는 수많은 방법들이 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 유사성이 MEGALIGN 알고리듬에 기초하는 클러스터 방법 뿐만 아니라 BLASTN, BLASTP 및 FASTA(Lipman and Pearson, 1985; Pearson and Lipman, 1988)가 있다. 이러한 프로그램들 모두를 사용하는 경우에, 바람직한 설정치는 최고의 서열 유사성을 야기하는 설정치이다.

[0075] "이종"이란 용어는 천연적으로 발생하지 않는 요소들의 조합을 의미한다. 예를 들어, 이종 DNA는 세포내 또는 세포의 염색체 부위에 천연적으로 위치하지 않는 DNA를 의미한다. 바람직하게는, 이종 DNA는 세포에 대해 외래인 유전자를 포함한다. 이종 발현 조절성 요소는 천연적으로는 작동작으로 결합되지 않는 상이한 유전자와 작동적으로 결합된 조절성 요소이다.

[0076] 정상적으로는 E6 및 E7 융합 폴리펩타이드의 1차 서열을 변경하지 않는 변형은 폴리펩타이드의 생체내 또는 시

험관내 화학적 유도체화, 예를 들어, 아세틸화, 메틸화 또는 카복실화를 포함한다. 또한, 본 발명의 변이체 폴리펩타이드로서, 글리코실화에 의해 변형된 이러한 폴리펩타이드, 예를 들어, 폴리펩타이드의 합성 및 프로세싱 동안 또는 추가의 프로세싱 단계에서 폴리펩타이드의 글리코실화 패턴을 변형시킴으로써 또는 폴리펩타이드를 포유동물 글리코실화 또는 탈글리코실화 효소와 같은 글리코실화에 영향을 주는 효소에 노출시킴으로써 제조된 변이체 폴리펩타이드가 포함된다. 변이체 폴리펩타이드로서, 인산화된 아미노산 잔기, 예를 들어, 포스포티로신, 포스포세린 또는 포스포트레오닌을 갖는 상기 확인된 돌연변이유발된 서열이 또한 포함된다.

[0077] "숙주 세포"란 용어는 세포에 의한 물질 생산, 예를 들어, 유전자, DNA 또는 RNA 서열, 단백질 또는 효소의 세포에 의한 발현을 위해 선별, 변형, 형질전환, 증식 또는 사용되거나 어떠한 방식으로든 조작된 임의의 유기체의 임의의 세포를 의미한다.

[0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, "분리된"이란 용어는 인용된 물질이 이것이 정상적으로 발견되는 환경으로부터 제거됨을 의미한다. 따라서, 분리된 생물학적 물질은 세포 성분, 즉 이러한 물질이 발견되거나 생산되는 세포의 성분을 함유하지 않을 수 있다. 핵산 분자의 경우, 분리된 핵산은 PCR 산물, 분리된 mRNA, cDNA 또는 제한 단편을 포함한다. 다른 양태에서, 분리된 핵산은 바람직하게는 이것이 발견될 수 있는 염색체로부터 절단되며, 보다 바람직하게는 염색체에서 발견되는 경우에 분리된 핵산 분자에 의해 함유된 유전자의 상부 또는 하부에 위치하는 비-조절성, 비-암호화 영역 또는 기타 유전자에 더이상 결합되지 않는다. 또 다른 양태에서, 분리된 핵산에는 하나 이상의 인트론이 결여되어 있다. 분리된 핵산 분자는 플라스미드, 코스미드, 인공 염색체 등에 삽입된 서열을 포함한다. 따라서, 구체적 양태에서, 재조합 핵산은 분리된 핵산이다. 분리된 단백질은 다른 단백질 또는 핵산 또는 이들 둘다와, 세포내에서 이것이 결합되어 있는 어떠한 것과 또는 이것이 막-결합형 단백질인 경우에는 세포 막과 결합될 수 있다. 분리된 소기관, 세포 또는 조직은 이것이 유기체에서 발견되는 해부학적 부위로부터 제거된다. 분리된 물질은 필수적이지는 않으나 정제될 수 있다.

[0079] 본원에서 사용되는 바와 같은 "정제된"이란 용어는 물질이 수득되어진 고유한 물질을 포함하여 비관련 물질, 즉 오염원의 존재를 감소시키거나 제거하는 조건하에 분리된 물질을 의미한다. 예를 들어, 정제된 단백질은 바람직하게는 이것이 세포내에서는 결합되어 있는 다른 단백질 또는 핵산을 실질적으로 함유하지 않으며, 정제된 핵산 분자는 바람직하게는 이것이 세포내에서 함께 발견될 수 있는 단백질 또는 다른 비관련 핵산 분자를 실질적으로 함유하지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적으로 함유하지 않는"이란 용어는 물질의 분석 시험의 범주에서 조작상 사용된다. 바람직하게는, 오염원을 실질적으로 함유하지 않는 정제된 물질은 50% 이상 순수한, 보다 바람직하게는 90% 이상 순수한, 보다 더욱 바람직하게는 99% 이상 순수하다. 순도는 크로마토그래피, 겔 전기영동, 면역검정, 조성 분석, 생물학적 분석 및 당해 분야에 공지된 기타 방법으로 평가할 수 있다.

[0080] 정제 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 핵산은 침전법, 크로마토그래피(분취용 고체상 크로마토그래피, 올리고뉴클레오타이드 하이브리드화 및 3중 나선 크로마토그래피), 초원심분리 및 기타 수단을 사용하여 정제할 수 있다. 폴리펩타이드 및 단백질은 분취용 불연속 겔 전기영동, 등전압초점맞추기, HPLC, 역상 HPLC, 겔 여과, 이온 교환 및 분배 크로마토그래피, 침전 및 염석 크로마토그래피, 추출 및 역류 분포를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 방법들로 정제할 수 있다. 몇가지 목적상, 단백질이 이로 제한됨이 없이, 폴리히스티딘 서열 또는 항체에 특이적으로 결합하는 서열(예: FLAG 및 GST)과 같이 정제를 촉진하는 추가의 서열 태그를 함유하는 재조합 시스템에서 폴리펩타이드를 생산하는 것이 바람직하다. 이어서, 폴리펩타이드를 적절한 고체상 매트릭스에서 크로마토그래피하여 숙주 세포의 조 용해물로부터 정제할 수 있다. 또는, 단백질 또는 이로부터 유도된 펩타이드에 대해 생성된 항체를 정제 시약으로서 사용할 수 있다. 세포는 원심분리, 매트릭스 분리(예: 나일론 울 분리), 패닝(panning) 및 기타 면역선별 기법, 고갈법(예: 오염성 세포의 완전한 고갈) 및 세포 분류(예: 형광 활성화된 세포 분류[FACS])를 포함하는 다양한 기법으로 정제할 수 있다. 다른 정제방법이 가능하다. 정제된 물질은 이것이 본래 결합되어 있는 세포 성분의 약 50% 미만, 바람직하게는 75% 미만, 가장 바람직하게는 약 90% 미만을 함유할 수 있다. "실질적으로 순수한"은 당해 분야에 공지된 통상의 정제 기법을 사용하여 달성할 수 있는 고도의 순도를 나타낸다.

[0081] 폴리뉴클레오타이드는 하나의 폴리뉴클레오타이드의 적어도 하나의 쇄가 정의된 엄격성 조건하에 다른 폴리뉴클레오타이드에 어닐링될 수 있는 경우에 서로 "하이브리드화"될 수 있다. 하이브리드화의 엄격성은 예를 들어, (a) 하이브리드화 및/또는 세척이 수행되는 온도 및 (b) 하이브리드화 및 세척 용액의 이온 강도 및 극성(예: 포름아미드) 뿐만 아니라 다른 파라미터에 의해 결정된다. 하이브리드화는 2개의 폴리뉴클레오타이드가 하이브리드화의 엄격성에 따라 실질적으로 상보적인 서열을 함유함을 필요로 하지만, 미스매치가 허용될 수 있다. 전형적으로, 높은 엄격성(예를 들어, 65℃에서의 0.5xSSC)에서의 두 서열의 하이브리드화는 서열이 이의 전체 서

열에 걸쳐서 일부 고도의 상보성을 나타내는 것을 필요로 한다. 중간 정도의 엄격성(예를 들어, 65℃에서의 2xSSC) 및 낮은 엄격성(예를 들어, 55℃에서의 2xSSC의 수용액)의 조건은 상응하게 하이브리드화 서열 간의 낮은 전체 상보성을 필요로 한다(1xSSC는 0.15 M NaCl, 0.015M Na 시트레이트이다). 본원에서 폴리뉴클레오타이드에 "하이브리드화"되는 폴리뉴클레오타이드는 어떠한 길이의 것이라도 될 수 있다. 하나의 양태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드는 길이가 10개 이상, 바람직하게는 15개 이상, 가장 바람직하게는 20개 이상의 뉴클레오타이드이다. 다른 양태에서, 하이브리드화되는 폴리뉴클레오타이드는 거의 동일한 길이의 것이다. 또 다른 양태에서, 하이브리드화되는 폴리뉴클레오타이드는 엄격성 조건하에 어닐링되고 p53(E6의 경우)에 결합하거나 Rb(E7의 경우)에 결합하는 능력과 같은 동일한 기능을 갖는 폴리펩타이드 또는 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0082] 형질전환과 발현, 숙주 세포, 벡터, 발현 시스템 등의 사용을 포함하여 본원에서 논의되는 일반적 유전자 공학 도구 및 기법은 당해 분야에 익히 공지되어 있다.

[0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약"이란 용어는 소정의 값 또는 범위의 50% 이내, 바람직하게는 20% 이내, 보다 바람직하게는 10% 이내, 보다 더욱 바람직하게는 5% 이내, 가장 바람직하게는 1% 이내를 의미한다. 또는, "약" 또는 "대략"이란 용어는 값이 이러한 유형의 값의 과학적으로 허용되는 오차범위내에 포함될 수 있음을 의미하며, 이용가능한 도구를 고려하여 측정이 얼마나 정량적일 수 있는지에 따라 좌우될 것이다. "약" 또는 "대략"은 단일 값이 아니라 평균값 부근의 분포를 정의할 수 있다.

[0084] 본 발명의 면역원성 및 약제학적 조성물

[0085] 본 발명은 사람 파필로마바이러스 E6 및 E7의 융합 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 면역원성 및 약제학적 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 자궁경부 암과 같은 파필로마바이러스-유도된 암 및 CIN과 같은 자궁경부 병변을 치료 및/또는 예방하는데 사용할 수 있다. 이러한 조성물은 또한 항문 암과 같은 하부 위장관 암 및 음경 및 외음부 암과 같은 생식계통의 기타 암을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0086] 추가의 양태에서, 본 발명은 다수의 파필로마바이러스의 폴리펩타이드의 융합체와 폴리뉴클레오타이드의 융합체를 포함하는 면역원성 및 약제학적 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68과 같은 HPV 계열의 다수의 구성원으로부터의 E6과 E7 단백질의 융합체를 포함하는 면역원성 및 약제학적 조성물을 제공한다. HPV E6 폴리펩타이드의 예는 도 2A 내지 2E에 도시하며, HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68으로부터의 E6의 아미노산 서열은 각각 서열 번호 15 내지 26에 제시한다. 이러한 HPV E6 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열 번호 42 내지 53에 제시한다. HPV E7 폴리펩타이드의 예는 도 3A 내지 3C에 도시하며, HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68로부터의 E7의 아미노산 서열은 각각 서열 번호 27 내지 38에 제시한다. 이러한 HPV E7 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열 번호 54 내지 65에 제시한다. 이들 융합체는 면역반응을 유도하는 능력은 방해하지 않으면서 단백질의 종양발생 특성을 방해하는, 본원에서 기술하는 HPV16내의 돌연변이된 잔기에 상응하거나 E6 및 E7 컨센서스 서열(각각, 서열 번호 39 및 40)에 도시한 바와 같은 보존된 서열에 상응하는 것으로 정렬에 의해 확인된 잔기내 돌연변이를 함유한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 면역원성 및 약제학적 조성물은 파필로마바이러스 계열의 상이한 구성원으로부터의 E6 및 E7 폴리펩타이드를 포함한 하나의 융합체를 포함한다. 예를 들어, 융합체는 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68로부터의 E6과 E7의 모든 가능한 조합을 단일 작제물로서 포함할 수 있다.

[0087] 하나의 융합체 중에 존재하는 E6/E7의 수는 이들 조성물을 전달하는 전달 기작 또는 벡터의 크기에 의해서만 제한된다. 예를 들어, 구조적 제한으로 한정되는 바이러스는 특정 양의 핵산만을 포장할수 있다. 당해 분야의 숙련가는 핵산을 포장하는 상이한 바이러스의 능력을 인식하고 있으며 포장하기에 적절한 크기의 핵산을 스크리닝하는 것이 통상적임을 인식하고 있다.

[0088] 또는, 본 발명의 면역원성 및 약제학적 조성물은 E6/E6의 다수의 상이한 융합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역원성 또는 약제학적 조성물은 다수의 바이러스 입자를 함유할 수 있는데, 이들 바이러스 입자 각각은 상이한 파필로마바이러스로부터의 E6 및 E7 서열의 상이한 융합체를 함유한다.

[0089] 다수의 파필로마바이러스로부터의 E6/E7의 융합체를 포함하는 면역원성 및 약제학적 조성물이 특히 유리한데, 이는 이러한 조성물이 다수의 E6 및 E7 단백질에 대한 면역반응을 생성시켜 이러한 바이러스 각각에 의해 유발된 암과 종양을 예방하기 때문이다. 예를 들어, 각각의 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

및 68은 자궁경부 암종 및/또는 상피내 종양[참조: Harrison's Principles of Internal Medicine Fifteenth Edition, 2001,1119 ; Braunwald et al., Eds., McGraw-Hill]과 관련되었다. 따라서, 예를 들어, HPV16 및 18 E6 및 E7 폴리펩타이드의 융합체는 2가지 상이한 병인론의 암을 예방 및 치료할 수 있다. 다수의 상이한 바이러스로부터의 E6 및 E7 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 자궁경부 암, 자궁경부 병변(예: CIN), 하부 위장관 암(예: 항문 암) 및 생식계통의 기타 암(예: 음경 및 외음부 암)과 같은 광범위한 파필로마바이러스-유도된 암을 치료 및/또는 예방하는 특히 강력한 수단이다.

[0090] 당해 분야의 숙련가라면 면역원성 조성물의 안정성을 결정하는 방법을 인지할 것이다. 예를 들어, E6/E7 융합체의 형질전환능 및 불멸화능이 감소되었거나 저지되었는지를 결정하는 방법은, 예를 들어, 웨스턴 블롯, 연한천 검정으로 p53 및/또는 Rb 수준을 측정하고, 1차 각질세포 또는 유선 상피세포를 형질감염시키고, 노화의 상실을 확인하고, 세포를 형질감염시키고, 세포 형태의 변화를 확인함을 포함한다. 이러한 기능적 검정 이외에도 생물학적 검정을 사용할 수 있다. 예를 들어, p53, E6 TP-1, 텔로머라제 및 Rb와 같은 세포성 단백질에의 E6 및 E7의 결합을 측정할 수 있다.

[0091] p53 및 Rb 수준의 검정은 E6/E7 융합체를 포함한 VEE와 같은 재조합 바이러스 입자의 안전성을 결정하기 위한 한 방법이다. 1차 사람 MEC에서의 p53 및 Rb의 정상상태 수준은 융합 또는 단독 단백질로서 야생형 HPV16 E6 및 E7, E7E6 TetM 융합 단백질 또는 음성 대조군으로서 GFP를 발현하는 VRP로 감염시킨 후 평가하였다. MEC의 VRP 감염으로 각각 E6 및 E7의 야생형을 함유하는 배양물 중의 p53 및 Rb의 수준이 전체적으로 감소되었고, 단순히 E6에 E7을 융합시키는 것으로는 어느 한 단백질의 활성을 손상시키기에 충분하지 않다는 것이 밝혀졌다(도 8A 및 8B). 대조적으로, E6(^{63}C 및 ^{106}C) 및 E7(^{24}C 및 ^{26}E) 돌연변이를 함유한 E7E6 TetM VRP로 감염된 MEC는 정상 수준의 p53 및 Rb(도 8A 및 8B)를 함유하였으며, 이는 이러한 4개의 돌연변이가 이들 단백질의 1차 종양발생 활성을 소멸시켰음을 나타낸다.

[0092] 확립된 종양의 박멸이 종양 특이적 바이러스 항원 E6 및 E7에 대한 강력한 T 세포 매개성 면역반응의 유도를 필요로 하기 때문에, 베네주엘라 말 뇌염(VEE) 레플리콘을 면역원성 조성물 벡터로서 클로닝하였다. 그러나, 어떠한 유전자 또는 단백질 전달 방법을 사용해서도 본 발명의 면역원성 조성물을 전달하고 포장할 수 있다. 예를 들어, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 기타 바이러스 벡터를 사용할 수 있거나, 돌연변이체 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드를 플라스미드에 의해 직접 전달시킬 수 있다.

[0093] VEE가 구성원인 재조합 AV 벡터가 특히 유용한데, 이는 이러한 벡터를 나(裸)형 RNA, 나형 플라스미드 DNA 또는 입자로서 시작할 수 있기 때문이며, 여기서 입자인 경우가 면역원성 조성물에서 사용하기에 가장 효과적인 제형이 된다. 다른 AV 레플리콘과 대조적인 VRP의 한가지 구별되는 특성은 수지상 세포에 대한 지향성이다[참조: MacDonald, G. H. et al., "J Virol 2000, 74: 914-922]. VRP에 의해 표적화되는 수지상세포는 항원을 림프절로 수송하기 위한 가장 효과적인 비히클일 수 있으며 효과적인 용량-보존(dose-sparing) 전략일 수 있다.

[0094] 본 발명의 면역원성 조성물, 특히 핵산은 렌티바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 아데노바이러스, 아데노바이러스 관련 바이러스, 백시니아 바이러스, 배큘로바이러스, 알파바이러스 및 목적하는 세포 지향성을 갖는 기타 재조합 바이러스와 같은 바이러스 벡터를 통해서 전달할 수 있다. 예를 들어, 신드비스 바이러스 벡터, 셈리키 포레스트 바이러스(Semliki forest virus)(ATCC VR 67; ATCC VR 1247), 로스 리버 바이러스(Ross River virus)(ATCC VR 373; ATCC VR 1246) 및 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(ATCC VR 923; ATCC VR 1250; ATCC VR 1249; ATCC VR 532)를 포함하여 광범위한 알파바이러스를 바이러스 벡터로서 사용할 수 있다. 이러한 벡터의 대표적 예에는 미국 특허 제5,091,309호; 제5,217,879호; 및 제5,185 440호; 및 국제 특허 공개공보 제WO 92/10578호; 제WO 94/21792호; 제 WO95/27069호; 제WO 95/27044호; 및 제WO 95/07994호에 기술된 것들이 포함된다. 세포의 특정 영역으로의 표적화, 예를 들어, 미국 특허 제6,228,621호에 기재된 바와 같은 융합 단백질이 세포 막으로 국소화되도록 하는 표적화가 또한 제공된다.

[0095] 따라서, E6/E7 폴리펩타이드 융합체를 암호화하는 유전자는 바이러스 벡터를 사용하거나 DNA 또는 레플리콘 RNA와 같은 핵산의 직접적 도입을 통해서 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 도입시킬 수 있다. 표적화된 조직에서의 발현은, 바이러스 벡터 또는 수용체 리간드를 이용해서 재조합 벡터를 특정 세포로 표적화시키거나, 조직-특이적 프로모터를 사용하여 달성할 수 있다. 표적화된 유전자 전달은 국제 특허 공개공보 제WO 95/28494호에 기재되어 있다.

[0096] 생체내 또는 생체외 표적화 및 요법 과정을 위해 통상적으로 사용되는 바이러스 벡터는 DNA-기본 벡터 및 레트로바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터를 작제하고 사용하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Miller and Rosman, BioTechniques 1992, 7: 980-990]. 바람직하게는, 바이러스 벡터는 복제 결손, 즉 이들은 표적

세포에서 자율적으로 복제할 수 없다. 일반적으로, 본 발명의 범주내에서 사용되는 복제 결손 바이러스 벡터의 게놈은 감염된 세포에서의 바이러스 복제에 필수적인 하나 이상의 영역이 결여되어 있다. 이러한 영역은 당해 분야에 공지된 어떠한 기법을 사용해서도 (전체적으로 또는 부분적으로) 제거할 수 있거나 비-기능성이 되게 할 수 있다. 상기 기법에는 전체 결실, 치환(기타 서열, 특히 삽입된 핵산에 의해), 부분적 결실 또는 (복제에) 필수적 영역에의 하나 이상의 염기의 첨가(프레임 이동을 유발하기 위해)이 포함된다. 이러한 기법은 시험관내(분리된 DNA 상에서) 또는 원위치(in situ)에서 유전자 조작 기법을 이용하거나 돌연변이유발제로 처리하여 수행할 수 있다. 바람직하게는, 복제 결손 바이러스는 바이러스 입자를 캡시드화하기 위해 필수적인 이의 게놈의 서열을 보유한다.

[0097] 바이러스 벡터는 단순포진 바이러스(HSV), 엡스타인 바르 바이러스(EBV), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), VEE 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 약독화된 또는 결손 DNA 또는 RNA 바이러스를 포함한다. 결손 바이러스는 세포내로 도입된 후에 자손을 생산하지 않는다. 결손 바이러스 벡터를 사용함으로써 바이러스 벡터가 확산되어 다른 세포를 감염시킬 수 있다는 염려 없이 특정한 국소적 영역내의 세포에 투여할 수 있다. 따라서, 특정한 조직을 특이적으로 표적화시킬 수 있다. 특정한 벡터의 예에는 문헌[참조; Pushko et al. (Virology 1997,239 : 389-401)]에 기술된 복제 결손 VEE 시스템, 및 문헌[참조: Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 1992, 90: 626-630; 또한, La Salle et al., Science 1993, 259 : 988-990]에 기술된 벡터와 같은 약독화된 아데노바이러스 벡터, 및 결손 아데노-관련 바이러스 벡터[참조: Samulski et al., J. Virol. 1987,61: 3096-3101; Samulski et al., J. Virol. 1989,63 : 3822-3828; Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol. 1988, 8: 3988-3996]가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0098] Avigen, Inc.(Alameda, CA; AAV 벡터), Cell Genesys (Foster City, CA; retroviral, adenoviral, AAV 벡터 및 렌티바이러스 벡터), Clontech(레트로바이러스 및 배큘로바이러스 벡터), Genovo, Inc.(Sharon Hill, PA; 아데노바이러스 및AAV 벡터), Genvec(아데노바이러스 벡터), IntroGene(Leiden, Netherlands; 아데노바이러스 벡터), Molecular Medicine(레트로바이러스, 아데노바이러스 및 AAV 벡터), Norgen(아데노바이러스 벡터), Oxford BioMedica(Oxford, United Kingdom; 렌티바이러스 벡터), Transgene(Strasbourg, France; 아데노바이러스, 백시니아, 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터), AlphaVax(알파바이러스 벡터, 예를 들어, VEE 벡터) 및 Invitrogen(Carlsbad, California)을 포함하여 다양한 회사들이 상업적으로 바이러스 벡터를 제조하고 있다.

[0099] 다른 양태에서, 벡터는 나형 DNA로서 리포펙션(lipofection)에 의해 또는 다른 형질감염 촉진제(펩타이드, 중합체, 부피바카인 등)을 사용하여 생체내에서 도입시킬 수 있다. 합성 양이온성 지질을 사용하여 마커를 암호화하는 유전자의 생체내 형질감염을 위한 리포좀을 제조할 수 있다[참조: Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1987,84 : 7413-7417; Felgner and Ringold, Science 1989,337 : 387-388 ; Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988, 85: 8027-8031; Ulmer et al., Science 1993,259: 1745-1748]. 핵산의 전이에 유용한 지질 화합물 및 조성물은 국제 특허 공개공보 제WO 95/18863호 및 제WO 96/17823호 및 미국 특허 제5,459,127호에 기재되어 있다. 표적화의 목적으로 지질을 다른 분자에 화학적으로 커플링시킬 수 있다[참조: Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988, 85: 8027-8031]. 표적화된 펩타이드, 예를 들어, 호르몬 또는 신경전달물질, 및 항체와 같은 단백질 또는 비-펩타이드 분자는 리포좀에 화학적으로 커플링시킬 수 있다. 양이온성 올리고펩타이드[참조: 국제 특허 공개공보 제WO 95/21931호], DNA 결합 단백질로부터 유래된 펩타이드[참조: 국제 특허 공개공보 제WO 96/25508호) 또는 양이온성 중합체 국제 특허 공개공보 제WO 95/21931호]와 같은 다른 분자도 또한 핵산의 생체내 형질감염을 촉진하는데 유용하다.

[0100] 벡터를 생체내에서 나형 DNA 플라스미드로서 도입시킬 수도 있다. 유전자 요법을 위한 나형 DNA 벡터는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어, 전기천공, 마이크로인젝션, 세포 융합, DEAE 덱스트란, 인산칼슘 침전법, 유전자 총의 사용(예를 들어, Helios 유전자 총 시스템(제조원: Bio-Rad; Hercules, CA)이 표피 유전자 전달을 위해 사용될 수 있다) 또는 DNA 벡터 수송체의 사용[참조: Wu et al., J. Biol. Chem. 1992, 267: 963-967; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 1988,263 : 14621-14624; Hartmut et al., 캐나다 특허 출원 제2,012,311, 1990년 3월 15일자로 출원; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991, 88: 2726-2730]에 의해 목적하는 숙주 세포내로 도입시킬 수 있다. 수용체-매개된 DNA 전달 접근법을 또한 사용할 수 있다[참조: Curiel et al., Hum. Gene Ther. 1992, 3: 147-154; Wu and Wu, J. Biol. Chem. 1987, 262: 4429-4432]. 미국 특허 제5,580,859호 및 제5,589,466호에는 포유동물에서 형질감염 촉진제를 사용하지 않은 외인성 DNA 서열의 전달이 기재되어 있다. 또는, DNA는 면역화를 촉진하는 형질감염 촉진제, 예를 들어, 부피비카인 및 기타 국소 마취제를 함유하는 조성물로 제형화한다[참조: 미국 특허 제6,127,170호]. 최근에는, 전기전달법(electrotransfer)이라 지칭되는 비교적 낮은 전압, 높은 효능의 생체내 DNA 전달 기법이 기술된 바 있다[참조: Mir et al., C.P.

Acad. Sci. 1998, 321: 893; 제WO 99/01157호; 제WO 99/01158호; 제WO99/01175호].

[0101] 본원에서 사용되는 바와 같은 "면역원성 조성물"은, 투여되어 수용자에서 면역원성 반응을 유도할 수 있는 임의의 조성물을 광범위하게 지칭한다. 면역원성 조성물은 일반적으로 면역학적 유효량의 면역원(예: 감염성인자의 항원)과 약제학적으로 허용되는 담체 및 임의로 보조제를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균수 또는 멸균된 등장성 염수 뿐만 아니라, 사람에의 투여에 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 피복제, 항세균제, 항진균제, 등장성제, 흡수 지연제 등 일 수 있다. 적절한 담체는 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이며 대부분 투여 경로에 따라 좌우될 것이다.

[0102] 면역원성 조성물은 예를 들어, 흡입 또는 취입 (입 또는 코를 통해)에 의해 또는 경구, 구강, 질, 직장 또는 비경구 투여(예: 피하, 피내, 근육내, 안와내, 수정체내, 척추내, 흉골내, 복막내 또는 정맥내 주사 등)에 의해 유기체에게 투여할 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 입자-매개된 전이(예를 들어, "입자 총"을 사용함)에 의해 투여할 수 있다[참조: Gainer et al., J. Neurooncol 2000,47 : 23-30; Koide et al., Jpn J. Pharmacol 2000,83 : 167-174; Kuriyama et al., Gene Ther. 2000,7 : 1132-1136; and Yamauchi et al., J. Exp. Zool. 2000, 287 : 285-293]. 이러한 입자 전이 방법은 예를 들어, "유전자 총"을 사용한 DNA 또는 벡터 면역원성 조성물에 특히 바람직하다. 적절한 투여 경로는 사용되는 면역원성 조성물의 성질, 환자의 연령, 체중, 성별 및 전반적 건강 평가 및 면역원성 조성물 중에 존재하는 항원 및 유사 요인에 따라 담당 주치의에 의해 선택된다.

[0103] 면역원성 조성물은 예를 들어, 감염성 질환을 유발하는 약독화된 또는 사멸된 감염성 인자(예: 세균 또는 바이러스, 기생충 또는 기타 병원체 등과 같은 미생물)의 현탁액을 포함할 수 있다. 또는, 본 발명의 면역원성 조성물은 폴리펩타이드 면역원성 조성물 또는 DNA 면역원성 조성물일 수 있다. "폴리펩타이드 면역원성 조성물"이란 용어는 면역원성 폴리펩타이드, 예를 들어, 항원일 수 있는 감염인자로부터 유래되어 유기체에서 면역반응을 활성화시키는 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 지칭한다. "DNA 면역원성 조성물"이란 용어는 본원에서 재조합 벡터에 의해 전달되는 면역원성 조성물을 지칭하기 위해 사용된다. 본원에서 사용되는 대안적 용어는 "벡터 면역원성 조성물"(몇가지 가능한 벡터, 예를 들어, 알파바이러스가 RNA 바이러스이고 일부 경우에 DNA 대신에 비-바이러스 RNA가 세포로 전달될 수 있기 때문에)이다.

[0104] "면역학적 유효량"이란 용어는 목적하는 활성을 야기하기에 충분한 화합물 또는 조성물의 양을 지칭한다. 따라서, 면역원성 조성물을 기술하기 위해 사용되는 바와 같이, 면역학적 유효량은 효과적 면역반응을 생성시키기에 충분한 화합물 또는 조성물(예: 항원)의 양을 지칭한다. 일반적으로, 본 발명의 면역원성 조성물에 적절한 면역학적 유효량 또는 유효 용량의 선택은 또한 사용되는 특정한 면역원성 조성물 뿐만 아니라, 가장 특히 면역화된 피험자의 전반적 건강 및 체중을 포함한 피험자의 신체 상태에 기초할 것이다. 이러한 유효량의 선택 및 상향 또는 하향 조절은 당해 분야의 기술내에 있다. 현저한 유해 부작용 없이 면역반응을 유도하는데 요구되는 활성 성분의 양은 사용되는 조성물에 따라 다르다.

[0105] 본 발명의 돌연변이 E6/E7 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 재조합, 바람직하게는 복제 결손 바이러스의 경우, 면역학적 유효량은 피험자의 목적하는 세포를 형질감염시키고 선택된 유전자의 충분한 발현 수준을 제공하여 목적하는 효과를 생성시키는 투여 경로에서 유효한 재조합 바이러스의 양이다. 면역 수준을 모니터하여 부스터에 대한 필요성을 결정할 수 있다.

[0106] "보조제"란 용어는 항원에 대한 면역반응을 증진시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 임의의 보조제를 예를 들어, 항원을 서서히 방출시키는 조직 데포우(depot)로서 및 면역반응을 증진시키는 림프계 활성화제로서 사용할 수 있다[참조: Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384]. 이러한 보조제는 특히, 미국 특허 제4,912,094호[이는 본원에서 참조로 인용된다]에 기술된 MPL™(3-O-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A; Corixa, Hamilton, MT)를 또한 포함한다. 또한, 보조제로서 사용하기에 적합한 것은 코릭사(Corixa, Hamilton, MT)로부터 입수 가능하고 미국 특허 제6,113, 918호[이는 본원에서 참조로 인용된다]에 기술된 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물(AGP) 또는 이의 유도체 또는 유사체이다. 한가지 이러한 AGP는 529(이전에는 RC529로서 공지됨)로서도 공지된 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노이옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시드이다. 상기 529 보조제는 수성 형태 또는 안정한 에멀젼으로서 제형화한다.

[0107] 다른 보조제에는 광유 및 물 에멀젼, 알루미늄 염(alum), 예를 들어, 수산화알루미늄, 인산알류미늄 등, 암피겐, 아비리딘, L121/스쿠알렌, D-락티드-폴리락티드/글루코시드, 무라밀 디펩타이드, 사멸된 보르데텔라, 미국 특허 제5,057,540호[이는 본원에서 참조로 인용된다]에 기술된 사포닌(예: Quil A 또는 Stimulon QS-21(제조원: Antigenics, Framingham, MA.) 및 이로부터 생성된 입자, 예를 들어, ISCOMS(면역자극성 복합체), 결핵

균(*Mycobacterium tuberculosis*), 세균 지질다당류, 합성 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오타이드[참조: 미국 특허 제6,207,646호; 이는 본원에서 참조로 인용된다], 콜레라 독소(야생형 또는 돌연변이체 형태, 예를 들어, 본원에서 참조로 인용되는 국제 특허 공개공보 제 WO 00/18434호에 따라서 29번 아미노산 위치의 글루탐산이 다른 아미노산, 바람직하게는 히스티딘으로 대체된 돌연변이체), 백일해 독소(PT) 또는 이. 콜라이 열-불안정성 독소(LT), 특히 LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; 참조: 국제 특허 공개공보 제WO 93/13302호 및 제WO 92/19265호, 이는 본원에서 참조로 인용된다]가 포함된다. 다양한 사이토킨과 림포킨이 보조제로서 사용하기에 적합하다. 한가지 이러한 보조제는 미국 특허 제5,078,996[이는 본원에서 참조로 인용된다]에 기술된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)이다. GM-CSF cDNA를 함유하는 플라스미드는 이. 콜라이로 형질전환되고 수탁 번호 39900으로 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)에 기탁되었다. 사이토킨 인터류킨-12(IL-12)는 미국 특허 제5,723,127호[이는 본원에서 참조로 인용된다]에 기재되어 있는 또 다른 보조제이다. 인터류킨 1-알파, 1-베타, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 및 18, 인터페론-알파, 베타 및 감마, 과립구 콜로니 자극 인자, 및 종양 괴사 인자 알파 및 베타를 포함하여 다른 사이토킨 또는 림포킨이 보조제로서 사용하기에 적합하다.

[0108] 다른 적합한 보조제에는 표면활성 물질(예: 헥사데실아민, 옥타데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 리소류시틴, 디메틸-디옥타데실암모늄 브로마이드), 메톡시헥사데실글리세롤 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예를 들어, 피란, 덱스트란설페이트, 폴리 IC, 카보폴; 펩타이드, 예를 들어, 무라밀 디펩타이드, 디메틸글리신, 투프트신; 오일 에멀젼; 및 미네랄 겔, 예를 들어, 인산알루미늄 등 및 면역 자극성 복합체가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 또한, 면역원을 리포좀내로 혼입시키거나 다당류, 지질다당류 및/또는 면역원성 조성물에서 사용하기에 적합한 다른 중합체에 접합시킬 수 있다.

[0109] 예시적 보조제에는 완전 프로인트 보조제, 표면활성 물질(예: 리소레시틴), 플루로닉 중합체, 다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀젼이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 예시적 보조제에는 또한 잠재적으로 유용한 사람 보조제, 예를 들어, BCG(bacille Calmette-Guerin; 칼메트-게랭균) 및 코리네박테리움 파라붐(*Corynebacterium parvum*)이 포함된다. 또한, 케모킨과 같은 면역자극성 단백질 또는 케모킨을 암호화하는 핵산 서열은 면역원성 조성물에 대한 면역반응을 증가시키는 보조제로서 제공될 수 있다.

[0110] "약제학적으로 허용되는"이란 어구는 개체에 투여되는 경우에 생리학적으로 허용되고 전형적으로 알레르기 또는 유사한 원치않는 반응(예: 위장 전도, 현기증 등)을 유발하지 않는 분자 실재물 및 조성물을 의미한다. 바람직하게는, 특히 면역원성 조성물이 사람에서 사용되는 경우, "생리학적으로 허용되는"이란 용어는 규제기관(예: 미국 식품의약청)에 의해 승인되거나 동물에서의 사용하기 위한 일반적으로 허가된 약전(예: 미국 약전)에 기재됨을 의미할 수 있다.

[0111] "담체"란 용어는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 바람직하게는, 멸균수 또는 수성 식염 용액 및 수성 덱스트로즈 및 글리세롤 용액이 특히 주사액용 담체로서 사용된다. 예시적인 적합한 약제학적 담체는 문헌[참조: "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다.

[0112] 화합물의 독성 및 치료학적 효능은 예를 들어, LD50 및 ED50을 측정하기 위한, 세포 배양물 검정으로 또는 실험 동물을 사용한 표준 약제학적 과정에 의해 결정할 수 있다. 파라미터 LD50 및 ED50은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며, 각각 집단의 50%를 치사시키는 화합물의 용량 및 집단의 50%에서 치료학적으로 유효한 화합물의 용량을 의미한다. 독성과 치료학적 효과 사이의 용량 비는 치료 지수로서 언급되며 비: LD50/ED50으로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 한편 독성 부작용을 나타내는 화합물을 사용할 수 있다. 그러나, 이러한 경우에는, 이러한 화합물을 영향을 받은 조직 부위로 특이적으로 표적화시켜 다른 세포, 조직 또는 기관에 대한 잠재적 손상을 최소화하고 부작용을 감소시키는 전달 시스템을 사용하는 것이 특히 바람직하다.

[0113] 세포 배양물 검정 또는 동물 연구로부터 수득된 데이타를 사용하여 사람에서 사용하기 위한 용량 범위를 공식화할 수 있다. 본 발명의 치료 방법에서 사용되는 화합물의 용량은 바람직하게는 ED50 농도를 포함하나 독성을 거의 갖지 않거나 전혀 갖지 않는(예를 들어, LD50 농도 이하인) 순환 농도 범위내에 있다. 임의의 적용시 사용되는 특정한 용량은 사용되는 특정한 투여 형태, 사용되는 투여 경로, 개체(예: 환자)의 상태 등과 같은 요인들에 따라서 상기 범위내에서 다양할 수 있다.

[0114] 비-사람 동물에는, 제한됨이 없이, 마우스, 랫트, 래빗트, 햄스터, 기니아 피그 등과 같은 실험실 동물; 개 및

고양이와 같은 애완 동물; 양, 염소, 돼지, 말 및 소와 같은 농장 동물; 및 비-사람 영장류가 포함된다.

[0115] 치료학적 유효량을 초기에 세포 배양물 검정으로부터 산정하고 동물 모델에서 공식화하여 IC50을 포함하는 순환 농도를 달성할 수 있다. 화합물의 IC50 농도는 증상의 최대 억제의 절반을 달성하는 농도(예를 들어, 세포 배양물 검정으로부터 측정되는 바에 의한)이다. 이어서, 특정한 개체, 예를 들어, 사람 환자에서 사용하기에 적절한 용량을 이러한 정보를 사용하여 정확하게 측정할 수 있다.

[0116] "치료하다"란 용어는 종양, 즉 암 세포에 대한 항-종양 반응을 유도하고자 시도함을 의미한다. 항-종양 반응에는 증가된 생존 시간, 종양 전이의 억제, 종양 증식의 억제, 종양 퇴행 및 변형되지 않은 종양 세포에 대한 지연성 과민증(DTH) 반응의 발달이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0117] 혈장 중 화합물의 양은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 가스 크로마토그래피와 같은 기법을 사용하여 환자와 같은 개체에서 통상적으로 측정할 수 있다.

[0118] 본 발명에 따라서 사용하기 위한 약제학적 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여 통상의 방식으로 제형화할 수 있다.

[0119] 따라서, 화합물과 생리학적으로 허용되는 이의 염 및 용매화물은 상기한 경로에 의한 투여용으로 제형화할 수 있다.

[0120] 경구 투여의 경우, 약제학적 조성물은 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들어, 결합제(예: 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈); 충전제(예: 락토즈, 미정질 셀룰로즈 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예: 마그네슘 스테아레이트, 활석 또는 실리카); 붕해제(예: 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예: 나트륨 라우릴 설페이트)를 이용하여 통상의 수단으로 제조한 정제 또는 캡슐제의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당해 분야에 익히 공지된 방법으로 피복할 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예를 들어, 용제, 시럽제 또는 현탁제의 형태를 취할 수 있거나 사용 전에 물 또는 기타 적합한 비히클로 구성하기 위한 무수 생성물로서 제시될 수 있다. 이러한 액체 제제는 약제학적으로 허용되는 첨가제, 예를 들어, 현탁화제(예: 솔비톨 시럽, 셀룰로즈 유도체 또는 수소화 식용 지방); 유화제(예: 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예: 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알콜 또는 분획화 식물성 오일); 및 방부제(예: 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)을 이용하여 통상의 수단으로 제조할 수 있다. 제제는 경우에 따라 완충제 염, 풍미제, 착색제 및 감미제를 함유할 수도 있다.

[0121] 경구 투여용 제제는 활성 화합물의 서방출을 제공하기 위해 적합하게 제형화할 수 있다. 구강 투여의 경우, 조성물은 통상의 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지제의 형태를 취할 수 있다.

[0122] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 적합한 추진제, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스를 함유하는 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 제시 형태로 적절히 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정할 수 있다. 예를 들어, 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐제 및 카트리지를 화합물과 적합한 분말 기재(예: 락토즈 또는 전분)의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.

[0123] 화합물은 주사, 예를 들어, 일시 주사 또는 연속적 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화할 수 있다. 주사용 제형은 방부제가 첨가된 단위 투여 형태, 예를 들어, 앰풀 또는 다중 투여량 용기로 제시될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁제, 용제 또는 에멀젼과 같은 형태를 취할 수 있으며 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 함유할 수 있다. 또는, 활성 성분은 사용전에 적합한 비히클, 예를 들어, 멸균 피로겐 비함유 물로 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

[0124] 화합물은 또한 예를 들어, 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드와 같은 통상의 좌제 기제를 함유하는 좌제 또는 관장제와 같은 직장 조성물로 제형화할 수도 있다.

[0125] 이미 기술한 제형 이외에, 화합물은 또한 데포우 제제로서 제형화할 수 있다. 이러한 지효성 제형은 이식(예를 들어, 피하로 또는 근육내로) 또는 근육내 주사에 의해 투여할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 화합물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용되는 오일 중의 에멀젼으로서) 또는 이온 교환 수지를 사용하거나 난용성 유도체, 예를 들어, 난용성 염으로서 제형화할 수 있다.

[0126] 조성물은 경우에 따라 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치 중에 존재할 수 있다. 팩은 예를 들어, 블리스터 팩과 같이 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다.

팩 또는 디스펜서 장치에는 투여 지침서가 첨부될 수 있다.

[0127] 본 명세서에서 사용되는 용어는 일반적으로 본 발명의 정황 및 각각의 용어가 사용되는 특정 정황에서 당해 분야에서 통상적 의미를 갖는다. 본 발명의 조성물 및 방법과 이를 제조하고 사용하는 방법을 기술하는데 있어 실시자에게 추가의 안내를 제공하기 위해 본 명세서에서 특정한 용어가 논의된다.

실 시 예

[0128] 본 발명은 하기 실시예로 기술한다. 그러나, 명세서 전반에 걸쳐 이러한 또는 다른 실시예의 사용은 단지 예시적이며 본 발명의 범주와 의미 또는 임의의 예시된 용어를 제한하지 않는다. 마찬가지로, 본 발명은 본원에서 기술하는 임의의 바람직한 양태로 제한되지 않는다. 게다가, 본 발명의 많은 변형 및 변화는 본 명세서를 읽어 본다면 당해 분야의 숙련가에게 명백할 수 있으며 본 발명의 취지와 범주에서 벗어남이 없이 이루어질 수 있다.

[0129] 실시예 1. HPV16 면역원성 조성물 작제물의 고안 및 제조

[0130] 재료 및 방법

[0131] VEE-레플리콘 작제물의 제조. HPV16 E6 및 E7 유전자를 PCR 방법[참조: orton et al., Gene 1989,77 : 61-8]에 의해 HPV-16(ATCC, #45113)로부터 수득하고 2개의 상이한 배향으로 융합시켜, 모든 작제물에 대해 248개의 아미노산을 암호화하는 744 염기쌍(bp)의 개방 판독 프레임(open reading frame; ORF)을 생성시켰다. 각 하부 ORF의 메티오닌 개시코돈을 제거하여 모든 내부 시작 가능성을 제거하였다. 융합된 ORF의 특정 뉴클레오타이드를 QuikChange^{R} 부위 특이적 돌연변이유발 키트(제조원: Stratagene; La Jolla, CA)를 사용하여 돌연변이시켰다. 야생형(wt) 및 돌연변이된(mut) 융합된 유전자를 베네주엘라 말 뇌염(VEE)의 트리니다드 당나귀(Trinidad Donkey) 균주의 고도로 약독화된, 비-향신경 돌연변이체(V3014)로부터 유래된 플라스미드인 벡터 pVR200(AlphaVax; Durham, NC)내로 서브클로닝시켰다[참조: Grieder, F. B. et al., Virology 1995,206 : 994-1006]. pVR200 플라스미드는 문헌[참조: Pushko et al., (Virology 1997,239 : 389-401, 특히, p. 390-391 "Cell lines and plasmids" 및 p. 393 Figurelb)]에 기재되어 있다. 간략하게 언급하면, 상기 플라스미드는 T7 프로모터 다음에 VEE의 비-구조 유전자, 서브게놈 프로모터 26S, 관심대상의 유전자(들)에 대한 클로닝 부위(본 발명에서는 E6/E7 융합체) 및 NotI 선형화 부위를 갖는다.

[0132] 복제-불능 VEE 레플리콘 입자(VRP)를 보조 방법으로 제조하고 기술된 바와 같이 역가측정하였다[참조: Pushko et al., Virology 1997, 239: 389-401]. 간략하게 언급하면, pVR200 플라스미드(관심되상의 융합체가 클로닝되어 있음)를 (1) 캡시드-암호화 보조 작제물 및 (2) 당단백질-암호화 보조 작제물과 함께 세포내로 공동 형질감염시켰다. 이들 보조 작제물 어떠한 것도 포장 서열을 갖지 않았고 따라서 VRP로 혼입되지 않았다. 따라서, 수득된 VRP는 복제 결손이었다. 감염단위/밀리리터(IU/ml)로서 표현되는, 각각의 VRP 제제의 역가는 어린 햄스터 신장(BHK)-21 세포에 대한 역가측정으로 측정된 E7-양성 입자의 수로서 정의되었다. 모든 VRP 제제의 역가는 이러한 연구 전반에 걸쳐 사용되었으며 이미 기재되어 있다[참조: Velders M. P. et al., Cancer Res 2001,61 : 7861-7867].

[0133] 웨스턴 블롯 및 면역형광: BHK-21 세포를 명시된 VRP로 감염시켰다. 감염시킨지 24시간 후, 세포를 웨스턴 블롯 분석을 위해 SDS 샘플 완충액에서 수거하거나, 면역형광을 위해 메탄올-아세톤으로 고정시켰다. 웨스턴 블롯으로 단백질을 검출하기 위해, 세포 용해물 중의 단백질을 SDS-PAGE로 분리시키고 폴리비닐리덴(PVD) 막으로 전이시키고, 항-HPV16 E7 모노클로날 항체(제조원: Zymed ; San Francisco, CA)를 사용하여 웨스턴 브리즈(Western Breeze) 검출 시스템(제조원: Invitrogen; Carlsbad, CA)으로 분석하였다. 면역형광 분석을 위해, 고정된 세포를 1차 항-E7 항체에 이어서 FITC-표지된 염소 항-마우스 2차 항체(# 554001, Pharmingen; San Diego, CA)와 함께 항온처리하였다. 세포 핵을 비아프로브(Viaprobe)(#555815, Pharmingen)를 사용하여 염색하였다.

[0134] 결과

[0135] HPV16-유도된 자궁경부 암에 대한 효과적이고 안전한 면역원성 조성물을 고안하기 위해서, 항원 다양성을 E6 및 E7 종양 특이적 항원 둘다를 발현시켜 증가시켰다. VRP 면역원성 조성물 중의 전체길이 E6 및 E7 유전자는 HLA I형 및 II형-다양성 사람 집단내의 $CD8^{+}$ 및 $CD4^{+}$ T 세포를 자극시키기 위한 모든 가능한 에피토프를 발현할 가능

성을 최대화시키는데 바람직하다. E6 및 E7 ORF의 융합은 PCR을 사용하여 2가지 상이한 배향으로 달성하고, 5개 이하의 아미노산을 돌연변이시켜(도 1A 및 1B) 특정한 E6/E7 융합 폴리펩타이드를 생산하기 위한 발현 작제물을 수득하였다.

[0136] 위치 ^{63}C에서의 단일 아미노산 치환은 다음과 같은 몇몇 HPV16 E6 기능을 파괴하는 것으로 나타났다: p53 분해, E6TP-1 분해, 텔로머라제의 활성화 및 이에 따른 1차 상피세포의 불멸화[참조: Gao, Q. et al., J Virol 2001, 75: 4459- 4466]. ^{106}C에 단일 점 돌연변이를 함유하는 HPV16 E6는 p53에 결합하지도 p53의 분해를 촉진시키지도 않으며 p53 분해에 의존적인 표현형인 사람 MEC를 불멸화시킬 수 없다[참조: Dalal et al., J Virol 1996,70 : 683-688]. 98개 아미노산 HPV16 E7 단백질은 L-X-C-X-E 모티프를 통해 Rb에 결합하며, 상기 모티프의 ^{24}C 및 ^{26}E 위치에서의 돌연변이는 Rb 결합 및 분해를 파괴시킨다[참조: Munger, K, et al., Oncogene 2001, 20:7888-7898]. 이러한 제3 아미노산인 E7에서의 2가지 점 돌연변이 이외에, ^{91}C를 돌연변이시켜 E7내 단일 아연 핑거를 파괴하였다.

[0137] 본원에서 E6E7wt로서 지칭되는 제1 융합 단백질은 아미노 말단에 야생형 E6 폴리펩타이드 서열의 아미노산 서열(서열 번호 13)을 포함하고 카복시 말단에 야생형 E7 폴리펩타이드 서열의 아미노산 서열(서열 번호 14)를 포함한다. 이러한 융합 단백질의 대표적 아미노산 서열은 서열 번호 1에 제공한다. 이러한 야생형 E6E7 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 2에 제시한다.

[0138] E6E7TetM으로 지칭되는 제2 융합 단백질을 또한 제조하였다. E6E7wt 융합 폴리펩타이드와 마찬가지로, E6E7TetM는 아미노 말단에 E6 폴리펩타이드 서열을 포함하고 카복시 말단에 E7 폴리펩타이드를 포함한다. 그러나, 본 작제물의 E6 폴리펩타이드는 E6 폴리펩타이드의 잔기 63번 및 106번에, 야생형 E6 아미노산 서열(서열 번호 13)에서 발견되는 시스테인 아미노산이 아니라 글리신 아미노산을 함유한다. 또한, 본 작제물의 E7 폴리펩타이드 서열은 E7 폴리펩타이드의 잔기 24번 및 26번에, 야생형 E7 아미노산 서열(서열 번호 14)에서 발견되는 시스테인(24) 및 글루타메이트(26) 아미노산이 아니라 글리신을 함유한다. 이러한 융합 폴리펩타이드의 대표적 아미노산 서열은 서열 번호 3에 제공한다. 이러한 E6E7TetM 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 4에 제시한다.

[0139] E6E7PentM로서 지칭되는 제3 융합 폴리펩타이드를 또한 제조하였다. E6E7TetM 융합 폴리펩타이드와 마찬가지로, E6E7PentM는 이의 아미노 말단에, 잔기 63번 및 106번에 글리신 아미노산을 포함하는 E6 폴리펩타이드 서열을 포함하고, 이의 카복시 말단에, 잔기 24번 및 26번에 글리신 아미노산을 포함하는 E7 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 그러나, 본 융합 단백질의 E7 폴리펩타이드 서열은 E7 폴리펩타이드 서열의 잔기 91번에, 야생형 E7 아미노산 서열(서열 번호 14)에서 발견되는 시스테인 아미노산이 아니라 글리신 아미노산을 포함한다. 이러한 융합 폴리펩타이드에 대한 대표적 아미노산 서열은 서열 번호 5에 제공한다. 이러한 E6E7PentM 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 6에 제시한다.

[0140] E7E6wt로서 지칭되는 제4 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단에 야생형 E7 폴리펩타이드의 아미노산 서열(서열 번호 14)의 서열을 포함하고 카복시 말단에 야생형 E6 폴리펩타이드의 아미노산 서열(서열 번호 13)의 서열을 포함한다. 융합 폴리펩타이드에 대한 대표적 아미노산 서열은 서열 번호 7에 제공한다. 이러한 E7E6wt 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 8에 제시한다.

[0141] E7E6TetM로서 지칭되는 제5 융합 폴리펩타이드를 또한 제조하였다. E7E6wt 융합 폴리펩타이드와 마찬가지로, E7E6TetM는 아미노 말단에 E7 폴리펩타이드 서열을 포함하고 카복시 말단에 E6 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 그러나, 본 작제물의 E7 폴리펩타이드는 이러한 E7 폴리펩타이드의 아미노산 24번 및 26번, 야생형 E7 아미노산 서열(서열 번호 14)에서 발견되는 시스테인(24) 및 글루타메이트(26) 아미노산이 아니라 글리신 잔기를 함유한다. 또한, 본 작제물의 E6 폴리펩타이드는 이러한 E6 폴리펩타이드의 아미노산 63번 및 106번에, 야생형 E6 아미노산 서열(서열 번호 13)에서 발견되는 시스테인 잔기가 아니라 글리신 잔기를 함유한다. 이러한 융합 폴리펩타이드의 대표적 아미노산 서열은 서열 번호 9에 제공한다. 이러한 E7E6TetM 융합 폴리펩타이드는 서열 번호 10에 제시한다.

[0142] E7E6PentM로서 지칭되는 제6 융합 폴리펩타이드를 또한 제조하였다. E7E6TetM와 마찬가지로, E7E6PentM는 이의 아미노 말단에, E7 폴리펩타이드의 잔기 24번 및 26번에 글리신 아미노산을 포함하는 E7 폴리펩타이드를 포함하고, 이의 카복시 말단에, E6 폴리펩타이드의 잔기 63번 및 106번에 글리신 아미노산을 포함하는 E6 폴리펩타이드를 포함한다. 그러나, 본 작제물의 E7 폴리펩타이드는 E7 폴리펩타이드의 잔기 91번에, 야생형 E7 아미노산

서열(서열 번호 14)에서 발견되는 시스테인 아미노산이 아니라 글리신 잔기를 함유한다. 이러한 융합 단백질에 대한 대표적 아미노산 서열은 서열 번호 11에 제공한다. 이러한 E7E6TetM 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 예시적 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 12에 제시한다.

[0143] E6 및 E7내 돌연변이는, (1) 3개의 아연 핑거를 파괴함으로써 단백질을 탈안정화시키고 분해를 가속화시키고(따라서 면역원성을 증가시킴)(E6의 ^{63}C 및 ^{106}C; E7의 ^{91}C[참조; Dalal et al., J Virol 1996, 70: 683-8; Shi et al., J Virol 1999, 73: 7877- 81)]; (2) p53의 E6-유도된 분해(^{106}C; 참조: Dalal et al., J Virol 1996,70 : 683-8)) 및 E6-TP1-결합[참조: Gao et al., J Virol 2001, 75: 4459-66]; (3) E7에 의한 Rb 결합 및 분해를 중단시키도록(^{24}C 및 ^{26}E; 참조: Edmonds and Vousden, J Virol 1989,63 : 2650-6)) 고안하였다. 이들 돌연변이는 ^{91}C를 제외하고는, 공지된 HLA 에피토프 외부에 위치하도록 신중하게 선택하였다. ^{91}C가 E7의 아미노산 86번 내지 93번에 걸쳐 있는 HLA A2 에피토프의 일부분인 것으로 공지되어 있으나[참조: Ressing et al., J Immunol 1995,154 : 5934-43; Ressing et al., Cancer Res 1996, 56: 582-8; Evans et al., Cancer Res 1997, 57: 2943-50], 최대의 면역원성 조성물 안정성을 달성하기 위해 상기 아미노산을 돌연변이시키기로 결정하였으며, 이는 상기 돌연변이가 E7의 불멸화 활성을 위해 요구되는 것으로 공지된 E7의 아연 핑거를 붕괴시키기 때문이다[참조: Jewers et al., J. Virol 1992,66 : 1329-1335]. 상기 돌연변이가 공지된 HLA-A*0201 결합 특성을 갖는 펩타이드의 P2 아미노산 고정 영역(anchor region)에 위치하지 않기 때문에[참조: Rammensee et al., Annu Rev Immunol 1993, 11: 213-44], C91G 돌연변이된 폴리펩타이드가 HLA-A*0201 분자에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 또한, C91 돌연변이가 E7의 아미노산 82번 내지 90번에 걸쳐있는 또 다른 HLA 에피토프의 절단에 영향을 미칠 가능성이 있다. 이러한 5개의 아미노산 돌연변이를 함유하는 융합 작제물은 PentM이라 명명하였다.

[0144] HPV16 E6 및 E7의 상기 부위들 각각에서의 돌연변이가 개별적으로 이미 기술되었으나, 이들 돌연변이의 조합이 이의 면역원성을 유지할 수 있는지는 공지되지 않았다.

[0145] E6 및 E7의 바이러스 종양유전자 산물에 대한 활발한 세포-매개성 반응을 유도하는 치료용 자궁경부 암 면역원성 조성물을 개발하기 위해서, 이들 융합체를 베네주엘라 말 뇌염(VEE) 바이러스 레플리콘-기본 시스템으로 클로닝시켰다. 재조합 VEE 면역원성 조성물의 잇점에는 고수준의 이종 유전자 발현, 수지상 세포 지향성(이로써 면역을 유도하는데 중요한 부위인 림프 조직으로 발현을 표적화시킨다), 세포자멸의 유도 및 활발한 세포성 면역반응 및 체액성 면역반응 및 효과적인 반복적 면역화가 포함되는데, 이는 사람에서 VEE에 대한 확산된 기존 면역이 없기 때문이다. 또한, VEE와 같은 알파바이러스는 세포의 세포질에서 RNA를 복제하며 세포변성이어서 세포 게놈내로 E6 및 E7이 통합될 위험을 현저하게 감소시킨다.

[0146] 이러한 융합된 작제물의 발현을 평가하기 위해, BHK를 재조합 VRP로 감염시키고 이어서 웨스턴 블롯팅과 형광면으로 분석하였다. 웨스턴 블롯 분석으로, E6E7 융합 단백질이 SDS-PAGE상에서 일반적으로 약 30 kDa의 분자량에서 이동한 것으로 드러났다. 야생형 및 돌연변이된 작제물의 발현 수준이 유사하였지만, 이들의 세포내 국소화는 현격하게 상이하였다. 이들 융합 단백질의 면역형광 염색으로, 야생형 E6 및 E7 VRP 둘다에 있어 핵이 중복되는 점상 염색 패턴이 드러난 반면에 보다 확산성인 핵주위 염색이 모든 TetM 및 PentM VRP(데이타는 제시하지 않음)에서 관찰되었다. 이러한 확산성 핵주위 국소화는 단백질 응집/잘못된 폴딩을 시사한다. 이러한 잘못된 폴딩은 단백질 불안정성을 시사하며, 이는 이러한 융합체에서 CTL 반응을 유도하는 능력이 증가되었음을 추가로 뒷받침한다.

[0147] 실시예 2: 상이한 면역원성 조성물 작제물에 의해 유도된 세포성 면역반응

[0148] 물질 및 방법

[0149] 마우스 및 세포주. 특정 병원체 부재의 6 내지 12주령 암컷 C57BL/6 마우스를 타코닉 팜(Taconic Farms, Germantown, NY)으로부터 입수하였다. 마우스를 와이스 로욜라 대학(Wyeth and Loyola University, Chicago) 동물 사육시설에서 필터탑 조건하에 사육하고, 물과 음식을 자유롭게 공급하였다. 특정 병원체 부재의 6 내지 12주령 암컷 HLA-A*0201 마우스를 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)로부터 구입하였다. MC57G 및 EL4 세포는 세포독성 검정을 위해 사용하였다. BHK-21 세포는 VEE RNA 발현, VEE 레플리콘 입자(VRP) 포장 및 역가측정(역가 검정)을 위해 사용하였다. 종양 시험접종 연구는 E6E7-양성 종양 세포주 C3[참조: Feltkamp, M. C. W. et al., Eur J Immun 1993,23 : 2242-2249], TC-1 [참조: Lin, K. Y. et al., Cancer Res 1996, 56:21-26] 및 HLF16를 사용하여 수행하였다. 모든 세포주(HLF16, C3 및 TC-1 세포 제외)는

아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC; Manassas, VA)으로부터 입수하였다.

[0150] 세포독성(CTL) 검정. C57BL/6 마우스를 3 x 10^5 감염단위의 VRP로 피하로 면역화시켰다. 3 x10^5의 명시된 VRP의 1회 투여량을 뒷발에 투여하여 마우스를 면역화시킨지 4주 후에 세포독성 검정을 수행하였다. 단일-세포 비장세포 현탁액을 E7 또는 E6를 암호화하는 재조합 변형된 백시니아 바이러스 안카라(MVA) 벡터(E7-MVA or E6-MVA)로 5의 감염다중도(MOI)로 감염된, 미토마이신-C 처리된 MC57G 세포로 재자극하였다(20:1). CTL 활성을 5일후에 측정하였다. E7- 또는 E6-MVA-감염된 MC57G 세포 및 HPV16 $E7_{49-57}$ H-$2D^b$-제한된 펩타이드(RAHYNIVTF (서열 번호 41, 이는 서열 번호 14의 아미노산 49 내지 57번에 상응한다); 참조: Lin et al., Cancer Res 1996,56, 21-6)-펄스된 EL-4 세포(ATCC)를 표적으로서 사용하였다. MC57G 세포를 1시간 동안 E7-MVA 또는 E6-MVA로 5의 MOI로 감염시켰다. EL-4 세포(1x10^7개)를 1시간 동안 펩타이드(20 pg/ml)와 함께 항온처리하였다. 이어서, 3시간 후에 표적 세포를 전기천공에 의해 유로퓸(Eu^{+3}; 제조원: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 표지하였다. 이펙터 및 표적 세포를 3시간 동안 명시된 비로 항온처리한 후, 현탁액을 수거하고 인핸서 용액(Wallac; Turku, Finland)와 혼합하였다. Eu^{+3} 방출을 1234 델피아 형광광도계(Wallac)를 사용하여 시간차 형광으로 정량하였다. 특이적 용해%를 (실험적-자발적 방출/최대-자발적 방출)x 100으로 계산하였다. 자발적 방출%는 5 내지 10%의 범위였다.

[0151] 결과

[0152] 상이한 면역원성 조성물 작제물에 의해 유도된 면역반응을 특정하기 위해, C57BL/6 마우스를 3x10^5 감염단위의 wt 및 PentM VRP 작제물로 뒷발에 피하로 면역화시켰다. 면역화시킨지 1개월 후, CTL 매개성 용해를 E6 또는 E7을 암호화하는 MVA로 감염된 MC57G 표적을 사용하여 유로퓸 방출 검정으로 측정하였다. 도 4에는 야생형 또는 PentM VRP로 면역화된 마우스로부터의 CTL이 E7 발현 표적을 치사시켰음이 밝혀져 있다. 동일한 결과가 $E7_{49-57}$ 펩타이드 펄스된 EL-4 표적에서 발견되었다(데이타는 제시하지 않음). CTL 매개성 용해는 모든 VRP 형태로 면역화된 마우스로부터의 E6 표적에 대해서도 명백하였으나, 용해가 돌연변이체 VRP의 수용자에서 실질적으로 감소되었다(도 4B). E7 및 E6 특이적 용해에 대한 이러한 결과는 2개의 추가 실험에서 재현되었으며, TetM VRP 면역화된 마우스를 사용한 경우에도 관찰되었다(데이타는 제시하지 않음).

[0153] 이러한 결과는 돌연변이체 및 야생형 융합 단백질을 암호화하는 VRP로의 면역화가 종양 거부에서 중요한 면역우세 $E7_{49-57}$ 에피토프에 대한 유사한 CTL 반응을 생성시켰음을 나타낸다. CTL 반응이 야생형 유전자를 발현하는 VRP로 면역화된 동물로부터의 E6 표적화에 대해 명백히 검출할 수 있었던 반면에, 감소된 CTL 반응이 E6의 돌연변이 형태를 수용한 마우스에서 관찰되었으며, 이는 ^{63}C 및/또는 ^{106}C가 H-2^b-제한 에피토프의 중요한 성분임을 제시한다.

[0154] 실시예 3: C3 및 TC1 종양 모델에서 면역원성 조성물 작제물의 종양 보호 및 치료 효능

[0155] 재료 및 방법

[0156] 종양 보호 및 치료 실험. 14마리의 C57BL/6 마우스의 그룹에게 10 mg/kg의 크실라진(제조원: Sigma, St. Louis, MO) 및 100 mg/kg의 케타민(제조원: Abbott Laboratories, Chicago, IL)을 복막내 주사하여 마취시키고, -21일째 및 -7일째에 3x10^5 VRP를 뒷발에 주사하여 면역화시켰다. 음성 대조군 마우스에게는 3x10^5 IU의 녹색 형광 단백질을 투여하였다. 1주일 후, 각 그룹의 마우스의 절반에게 5x10^5개 C3 세포[참조: Feltkamp et al., Eur J Immunol 1995, 25: 2638-42]를 옆구리에 피하 주사하여 시험접종시키고, 나머지 절반은 5x10^4개 TC-1 세포[참조: Lin et al., Cancer Res 1996, 56: 21-6]로 시험접종시켰다. 종양 증식을 3일마다 모니터하였다. C3 치료 실험을 위해, 마우스를 5x10^5개 C3 세포로 옆구리에 최초로 시험접종시킨 다음, 7일, 14일 및 21일 후에, 명시된 VRP로 면역당 3x10^5 용량으로 시험접종시켰다. 사람 폐 섬유모세포(HLF) 치료 실험을 위해, 0일째에 HLA-A*0201 유전자전이된 마우스에게 좌측 옆구리에 2x10^6 HLF16 세포를 피하 주사하여 시험접종시켰다. 시험접종한 후 5일, 10일 및 15일째에, 마우스를 상기한 바와 같이 마취시키고 뒷발에 3x10^5

VRP를 주사하여 면역화시켰다. 종양 증식을 5일마다 모니터하였다.

[0157] 참조: 마우스 및 세포주(상기)

[0158] 결과

[0159] 야생형 E7E6 및 E7E6PentM 융합 단백질을 암호화하는 VRP를 예방적 생체내 항종양 효능에 대해 비교하였다. 모든 그룹의 마우스를 0일 및 21일째에 3 x 10^5의 명시된 VRP로 면역화시킨 다음, C3 또는 TC-1 종양 세포주를 시험접종시켰다. 음성 대조군으로서 GFP-VRP를 수용하는 마우스에서는 종양 시험접종한지 약 7일 후에 종양이 발달하였다(도 5A 및 5B). 대조적으로, E7E6 야생형 또는 PentM를 수용한 모든 마우스는 이들에게 C3($5x10^5$)(도 5A) 또는 TC-1($5x10^4$)(도 5B) 종양 세포가 투여되었음에도 불구하고 종양 시험접종으로부터 보호되었다. 이들 데이터는 이러한 보호가 특정 쥐 종양 시험접종 모델로 제한되지 않았으며 보호가 결정적으로 VRP-암호화된 E6 및 E7 유전자 산물에 의존적임을 제시한다.

[0160] 항종양 효능의 보다 엄격한 척도로서, 다음 실험에서는 7일, 14일 및 21일째에 E7E6 야생형, PentM 또는 TetM VRP로 면역화시키기 전에 마우스에게 C3 종양 세포를 시험접종하였다. 도 6은 음성 대조군 마우스의 0% 내지 12%가 C3 종양을 거부한 것과는 대조적으로 임의의 돌연변이체 또는 야생형 E6 및 E7 융합-단백질-발현 VRP를 수용한 마우스의 85 내지 100%가 C3 종양을 거부하였음을 나타낸다. 문헌[참조: Velders et al. (Cancer Res 2001, 61: 7861-7)] 및 도 6에 이미 도시된 바와 같이, E7 만을 발현하는 VRP 면역원성 조성물은 마우스의 65% 내지 75%에서만 거부를 촉진하였다.

[0161] 결론적으로, E7과의 융합 파트너로서 E6을 암호화하는 유전자의 포함은 E6가 야생형인지 또는 돌연변이되었는지에 관계없이, 단독의 E7 (67% 내지 75%, 도 6)과 비교하여 치료학적 항종양 효능을 재현적으로 증진시켰다(85% 내지 100%, 도 6). 따라서, E6내 돌연변이는 E7과의 융합체로서 발현된 경우에 이러한 종양 모델에서 항종양 효과를 감소시키지 않았다. 그러나, 본 결과는 돌연변이체 아미노산을 함유하는 에피토프에 대한 최적의 CTL 반응이 돌연변이체 VRP로 면역화된 일부 개체에서는 유도될 수 없었음을 예시한다. 사람에서, C57BL/6 마우스에 의해 발현되는 제한된 수의 H-2 대립유전자와 비교하여 HLA I형 및 II형 대립유전자의 다양성을 고려하면 이는 관심대상이 될 수 없다.,

[0162] 실시예 4: HLF16 종양 모델에서 면역원성 조성물 작제물의 치료 효능

[0163] 실시예 2와 3의 결과가 호의적인 결과를 보여주고 있으나, C57BL/6 마우스에서 HPV 항원의 H-2b 제한된 T 세포 인식은 HLA 제한된 항종양 반응에 대한 제한된 예측치를 제공한다. 따라서, HLA-A*0201 유전자전이된 마우스에서 동일한 면역원성 조성물이 HPV16 E6 및 E7에 대한 HLA-A*0201 제한된 반응을 유도할 수 있다는 입증이 특히 중요하다[참조: Ressing et al., J Immunol 1995,154 : 5934- 5943].

[0164] HLA-A*0201 유전자전이된 마우스로부터의 *$CD8^+$ T 세포는 HLA-A*0201 제한된 사람 CTL에 의해 인식되는 항원과 동일한 HLA-A*0201 제한 항원을 인식하는 것으로 나타났다[참조: Engelhard et al., J Immunol 1991, 146: 1226-1232; Shirai et al., J Immunol 1995, 154: 2733- 2742]. 따라서, HLA 유전자전이된 마우스를 사용하여 H-2 제한된 종양 거부의 한계를 극복할 수 있다. 그러나, HPV 종양 모델은 HLA-A*0201 제한된 항종양 반응을 시험하는데 이용할 수 없었다. 본원에서는, 최초의 HLA-A*0201 유전자전이된 마우스에 대한 HPV16 종양 모델을 제시한다(또한, 문헌[참조: Eiben GL et al., Cancer Research, Oct. 15 2002, 62, No. 20]에 기재되어 있음]. E6/E7 융합체의 면역원성을 상기 모델에서 시험하였다.

[0165] 상기 종양 모델은 HLA-A 0201 유전자전이된 C57BL/6 마우스로부터의 섬유모세포를 HPV16 E6 및 E7과 Ras V12로 형질감염시켜, HLA-A 0201 마우스에서 종양발생성인 세포주(HLF16)를 제조함으로써 개발하였다. 항종양 반응이 49-57 에피토프와 독립적이고 HLA-A*0201를 통해 매개될 수 있음을 보장하기 위해 우세한 H-2Db 에피토프를 E7 유전자로부터 제거하였다.

[0166] 작제물의 TetM 세트를 HLF 종양 모델에서 사용하였다. 이들 작제물은 다음의 4개의 돌연변이만을 함유하였다: E6내의 C63G 및 C106G; E7내의 C24G 및 E26G. E7내의 돌연변이 C91G(PentM 작제물에 존재함)는 E7의 아미노산 86번 내지 93번에 걸쳐있는 HLA-A*0201 에피토프의 일부분으로서 공지되어 있기 때문에[참조: Ressing et al., J Immunol 1995, 154: 5934-43; Ressing et al., Cancer Res 1996,56: 582-8; Evans et al., Cancer Res 1997, 57: 2943-50] 제외시켰다. II형 결합 알고리듬(www.imtech.res.in/raghava/propred)을 사용함으로써,

E7의 아미노산 87번 및 95번 간에 몇몇 II형 일배체형에 대해 무차별적인, 예상된 에피토프가 존재하는 것으로 결정되었다. II형 매개성 면역반응은 C3 종양 모델에서 VRP 면역원성 조성물의 치료학적 효과에 필수적인 것으로 밝혀졌으며, PentM 면역원성 조성물 작제물 중에 존재하는 C91G 돌연변이가 사람 II형 에피토프를 붕괴시킬 수 있다고 가정하였다.

[0167] 재료 및 방법

[0168] HLF16 종양 모델의 작제 및 특성화. HLF16 종양 세포주는 HLA-A2 Dd 유전자전이된 C57BL/6 마우스로부터 절개한 심장 폐 조직으로부터 유래하였다. 배양물 중에서 수주일 후, 부착성 섬유모세포를, 제네시틴 내성을 부여하면서 E6/E7를 함유하는 pIRES 2시스트론성(bi-cistronic) 벡터 및 활성화된 H-ras로 형질전환시켰다. HPV16 E749-57 유전자 산물로부터의 공지된 H-2b I형 제한된 에피토프[참조: Velders et al., Cancer Res 1997,61 : 7861-7867]만을 제거하여, 종양이 이러한 면역우세 HPV16 E7 에피토프를 제시하지 않음을 보장하였다. 형질감염체를 G418에서 선별하여 클론 확장시켰다. 이어서, 개별적 클론을 FACS 분석에 의해 HLA-A*0201 발현에 대해 시험하였다. 이어서, 최고 수준의 HLA-A*0201 발현을 나타낸 클론을 연한천에서 콜로니를 형성하는 능력에 대해 시험하였다. 심장 폐 섬유모세포 클론 16(HLF16)은 연한천에서 비부착 증식을 나타냈으며 추가의 연구를 위해 선택하였다. E7 발현은 항-E7 모노클로날 항체로 면역형광 염색한 후 HLF16의 세포질과 핵에서 명백하였다. HLF16 세포주가 마우스에서 실제로 종양을 형성할 수 있는지를 결정하기 위해, HLA-A*0201 유전자전이된 마우스에게 상이한 농도의 종양 세포를 주사하고 35일 동안 모니터하였다. 모든 마우스에서 종양이 발달하였지만, 최고 용량인 $2x10^6$개 HLF16 세포가 시험접종된 마우스에서만 시간 경과에 따라 종양이 유지되었다. HLF16 종양은 약 5일째에 발생하였고 35일까지 약 12x12x12mm이 될 때까지 점진적이며 지속적으로 증식하였는데, 이 시점에서 마우스를 희생시켰다. HLF16 종양 세포주의 작제 및 특성화는 문헌[참조: Eiben GL et al. (Cancer Research, Oct. 15 2002, 62, No. 20)]에도 기재되어 있다.

[0169] 연한천 검정. 연한천 속에 현탁된 세포의 콜로니 형성 효능을 평가하여 비부착 증식 능력을 측정하였다. 형질전환된 세포 및 대조군 세포($0.5x10^6$, $0.25x10^6$ 및 $0.1x10^6$)를 0.3% 오버레이 한천 5ml에 씨딩하고 0.6% 언더레이 한천 20ml으로 피복된 10mm 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 건조시키고 37℃에서 항온처리하였다. 콜로니를 플레이팅한지 3주 후에 계수하였다.

[0170] 참조: 마우스 및 세포주, 종양 보호 및 치료 실험, 및 웨스턴 블롯 및 면역형광(상기).

[0171] 결과

[0172] TetM 작제물을 BHK-감염된 세포의 웨스턴 블롯 및 면역형광에 의해 발현에 대해 점검하였다. E6E7 및 E7E6 TetM 단백질은 둘다 SDS-PAGE상에서 약 30kDa에서 이동하였으며 PentM 작제물과 매우 유사한 확산성 핵주위 국소화를 나타냈다.

[0173] PentM 및 TetM 면역원성 조성물 작제물을 둘다 HLF 종양 모델에서 이들의 종양 치료 효과에 대해 분석하였다(도 7). 유전자전이된 마우스를 $2x10^6$개 HLF 16 세포로 피하로 시험접종시키고, 시험접종 후 5일, 10일 및 15일째에 마우스를 GFP VRP, TetM VRP 또는 PentM VRP로 면역화시켰다. E7E6 TetM VRP로 면역화시킨 후에 완전한 종양 거부가 나타난 반면에, E6E7 TetM를 제외한 E7E6 PentM VRP 및 E6E7 PentM VRP는 마우스 중 90%의 종양 퇴행을 유도하였다(도 7). 이러한 결과는 본원에서 시험된 몇가지 VRP에 의한 치료학적 면역화가 $E7_{49-57}$에 특이적인 T 세포에 의한 기여도와 독립적인 고도의 항종양 효능을 야기하였음을 입증한다. 게다가, 이러한 결과는 E6이 E7에 대해 카복시 말단에 있는 융합체(E7E6 융합체)가 E6이 아미노 말단에 있는 이의 대응물(E6E7 융합체)보다 큰 면역 보호를 제공함을 입증한다.

[0174] C3 및 HLF16 종양 모델을 포함한 총체적 치료 효능 데이타(도 6 및 도 7)로부터, 본 발명자들은 어떠한 보조 단백질, 사이토킨 또는 보조제 없이도 HPV16 E6 및 E7를 암호화하는 VRP가 확립된 쥐 종양을 박멸시키는데 있어 매우 효과적이라고 결론지을 수 있다.

[0175] 실시예 5: 돌연변이체 E6 및 E7 발현 VRP는 p53 Rb의 분해를 유도하지 않는다.

[0176] 융합 또는 단독 단백질로서 야생형 HPV16 E6 및 E7, E7E6 TetM 또는 음성 대조군으로서 GFP를 발현하는 VRP로 감염시킨 후 1차 사람 MEC에서의 p53 및 Rb의 정상상태 수준을 평가하였다.

[0177] 재료 및 방법

[0178] p53 및 Rb의 검출. 1차 사람 유선 상피세포(MEC, 제조원: Clonetics, San Diego, CA)를 E6 및 E7의 야생형 또는 돌연변이 형태를 암호화하는 VRP로 MOI=10으로 감염시키고, 전체 세포 단백질을 16 내지 20시간 후에 수거하였다. p53 검출을 증진시키기 위해, 세포를 1.0nM 악티노마이신 D(제조원: Sigma, St. Louis, MO)로 처리하였다. 전체 단백질 25㎍을 레인마다 부하하고, SDS-PAGE로 전기영동시키고, PVDF 막으로 블롯팅시켰다. 웨스턴 블롯을 항-p53 항체(FL-393, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) 또는 항-Rb 항체(카탈로그 번호 554136, BD Pharmingen, San Diego, CA)를 사용하여 프로빙하였다. 항-튜불린 항체(H-235, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)로 프로빙하여 튜불린 수준을 부하 대조군으로서 모니터하였다.

[0179] 결과

[0180] E6 및 E7 융합 단백질의 돌연변이 형태가, VRP 감염의 범주에서 발현되는 경우에 이들 단백질의 야생형와 비교하여 p53 및 Rb를 기능적으로 불활성화시킬 수 있는지를 결정하였다. E7E6 TetM를 선별하였는데, 이는 E7E6 TetM가 높은 항종양 효능을 나타내고(도 6 및 7) 최소 수의 돌연변이를 함유하기 때문이다.

[0181] 1차 사람 유선 상피세포(MEC)를 HPV16 E6 단독, E7 단독, E7E6 야생형 또는 E7E6 TetM를 암호화하는 VRP로 감염시켰다. 이들 VRP 각각으로 MOI = 10으로 감염시킨지 약 24시간 후, 동량의 전체 세포 단백질을 함유하는 세포 용해물을 SDS-PAGE에 의해 전기영동시키고, PVDF 막으로 전이시키고, p53(도 8A), Rb(도 8B) 및 부하 대조군으로서의 튜불린에 특이적인 항체로 프로빙하였다. 이들 웨스턴 블롯의 결과는 도 8A 및 8B에 도시되어 있으며 2개의 독립적 실험을 대표한다.

[0182] E6 단독 또는 E7E6 야생형 융합 단백질을 암호화하는 VRP로 감염된 MEC는, 음성 대조군 GFP-VRP 감염된 샘플과 유사한 p53 수준을 함유한 E7E6 TetM로 감염된 MEC와 대조적으로 측정불가능한 수준의 p53을 함유하였다(도 8A). E7 단독 또는 E7E6 야생형 융합 단백질을 암호화하는 VRP로 감염된 MEC는, E7E6 TetM VRP 또는 GFP-VRP로 감염된 MEC와 대조적으로 측정 불가능한 수준의 Rb를 함유하였다. E7E6 야생형 및 E7E6 TetM VRP 감염된 샘플 중의 E7-함유 융합 단백질의 존재는 이러한 레인을 항-E7 모노클로날 항체로 프로빙하여 확인하였다(도 8A 및 8B). 본 결과는 p53 및 Rb 수준이, VRP 감염의 범주에서 E6 및 E6의 야생형을 발현하는 1차 MEC에서 전체적으로 감소되지만 VRP 감염 후에 E7E6 TetM VRP를 발현하는 MEC에서는 정상적임을 나타낸다.

[0183] 요약하면, MEC의 VRP 감염으로 각각 E6 및 E7의 야생형을 함유하는 배양물 중의 p53 및 Rb의 수준이 전체적으로 감소되었고, 단순히 E6에 E7을 융합시키는 것으로는 어느 한 단백질의 활성을 손상시키기에 충분하지 않다는 것이 밝혀졌다(도 8A 및 8B). 대조적으로, E6(^{63}C 및 ^{106}C) 및 E7(^{24}C 및 ^{26}E) 돌연변이를 함유한 E7E6 TetM VRP로 감염된 MEC는 정상 수준의 p53 및 Rb(도 8A 및 8B)를 함유하였으며, 이는 이러한 4개의 돌연변이가 이들 단백질의 1차 종양발생 활성을 소멸시켰음을 나타낸다. E7E6 TetM VRP의 불멸화 가능성을 평가한 결과, 감염 후 MEC가 사멸한 것으로 밝혀졌는데, 이는 레플리콘에 의해 발현된 AV 비구조 단백질 발현의 예상된 결과이며[참조: Griffith et al., Annu. Rev. Microbiol. 1997, 51: 565-592] 상기 벡터의 안전성을 추가로 뒷받침한다.

[0184] 본 발명은 본원에서 기술하는 구체적 양태에 의해 범주가 제한되지 않는다. 게다가, 본원에서 기술하는 것 이외에 본 발명의 다양한 변형은 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구의 범위내에 포함된다.

[0185] 특허, 특허원 및 다양한 공보를 포함하는 수많은 참조문헌이 본 발명의 설명에서 인용되고 논의된다. 이러한 참조문헌의 인용 및/또는 논의는 본 발명의 설명을 명료화하기 위함이며 이러한 참조문헌이 본원에서 기술되는 본 발명에 대한 "종래 기술"이라는 것이 허용되지 않는다. 본 명세서에서 인용되고/되거나 논의된 모든 참조문헌은 이의 전문이 각각의 참조문헌이 개별적으로 참조로 인용되는 것과 동일한 정도로 본원에서 참조로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1A 및 1B는 주요 HLA-A I형 대립유전자에 대한 추정상 에피토프와 관련하여 HPV16 E6 및 E7 단백질로 도입된 점 돌연변이의 위치를 도시하는 개략도이다. 도 1A는 각각 글리신으로 돌연변이되는 E6, ^{63}C 및 ^{106}C내의 천연 아미노산을 도시한 것이다. 도 1B는 각각 글리신으로 돌연변이되는 E7, ^{24}C, ^{26}E 및 ^{91}C내의 천연 아미노산을 도시한 것이다. HLA-A1, A2, A3, A11 및 A24 대립유전자에 결합할 수 있는 이미 정의한 I형 에피토프는 점상 박

스에 도시한다[참조: Kast, W. M. et al., J Immunol 1994,152 : 3904-3912].

[0023] 도 2A 내지 2E는 사람 파필로마바이러스 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68의 E6 폴리펩타이드의 아미노산 서열(각각 서열 번호 15 내지 26)의 정렬 및 컨센서스(consensus) 서열을 도시하는 도식이다. 컨센서스 서열(서열 번호 39)은 하기에 제시한 정렬이다. 컨센서스 서열에서 대문자는 완전한 컨센서스를 나타내며, 컨센서스 서열에서 소문자는 고빈도이지만 완전하지 않은 컨센서스를 나타낸다.

[0024] 도 3A 내지 3C는 사람 파필로마바이러스 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 및 68의 E7 폴리펩타이드의 아미노산 서열(각각 서열 번호 27 내지 38)의 배열 및 컨센서스 서열을 도시하는 도식이다. 컨센서스 서열(서열 번호 40)은 하기 제시한 정렬이다. 컨센서스 서열에서 대문자는 완전한 컨센서스를 나타내며, 컨센서스 서열에서 소문자는 고빈도이지만 완전하지 않은 컨센서스를 나타낸다.

[0025] 도 4A 및 4B는 이펙터(effector) 대 세포 비(E:T)에 대한 특이적 용해%를 도시하는 그래프이며, 이러한 특이적 용해%는 VRP 면역화 후의 CTL 반응을 나타낸다. C57BL/6 마우스는 3 x 10^5 IU의 명시한 VRP로 피하 면역화시키고, CTL 검정은 1개월 후에 수행하였다. 세포독성을 E7-MVA(A) 또는 E6-MVA (B) 감염된 MC57G 표적 세포의 유로퓸 방출로 측정하였다. 이러한 결과는 2개의 추가 실험(데이타는 제시하지 않음)에서 재현되었다.

[0026] 도 5A 및 5B는 종양 시험접종(challenge) 후 경과일수에 대한 종양 비보유 마우스%를 입증하는 그래프이다. C57BL/6 마우스(n = 8/그룹)을 초회 감작시키고, -21일째 및 -7일째에 3 x 10^5 IU의 명시된 VRP 면역원성 조성물로 부스트(boost)시키고, 0일째에 5x 10^5 C3(A) 또는 5 x10^4 TC-1(B) 종양 세포를 옆구리에 시험접종시켰다. 종양을 매 3일마다 모니터하였다.

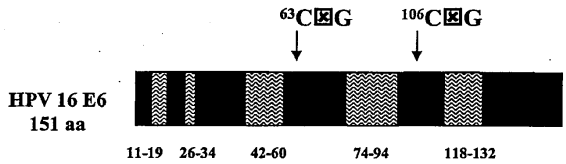
[0027] 도 6은 종양 시험접종 후 경과일수에 대한 종양 비보유 마우스%를 입증하는 그래프이다. 0일째에 C57BL/6 마우스(n = 8 내지 16/그룹)에게 5x 10^5 C3 종양 세포를 투여하고, 7일, 14일 및 21일째에 명시된 VRP로 면역화시켰다. 종양을 45일에 걸쳐 3일마다 모니터하였다.

[0028] 도 7은 종양 시험접종 후 경과일수에 대한 종양 비보유 마우스%를 입증하는 그래프이다. HLA-A*0201 유전자전이된 마우스(n = 10/그룹)에게 0일째에 2 x 10^6 HLF16 종양 세포를 투여하고 5일, 10일 및 15일째에 명시된 VRP로 면역화시켰다. 종양을 5일마다 모니터하였다.

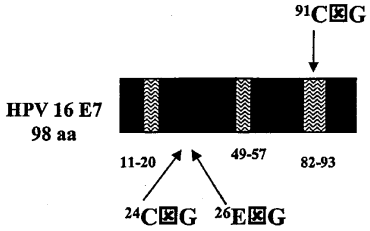
[0029] 도 8 A 및 8B는 상이한 VRP 제제로 감염된 1차 사람 유선 상피 세포(MEC)에서의 p53 (A) 및 Rb (B) 발현을 검출하는 웨스턴 블롯이다. 명시된 VRP(MOI= 10에서)로 감염한지 24시간 후에, 각각의 MEC 세포 용해물 25㎍을 SDS-PAGE 상에 전개시키고 p53 (A) 및 Rb (B)의 수준에 대해 프로빙하였다. 동등한 단백질 부하량은 항-튜불린 항체로 프로빙하여 확인하였다. E7 단백질의 존재는 명시된 레인을 항-E7 항체로 프로빙하여 확인하였다.

도면

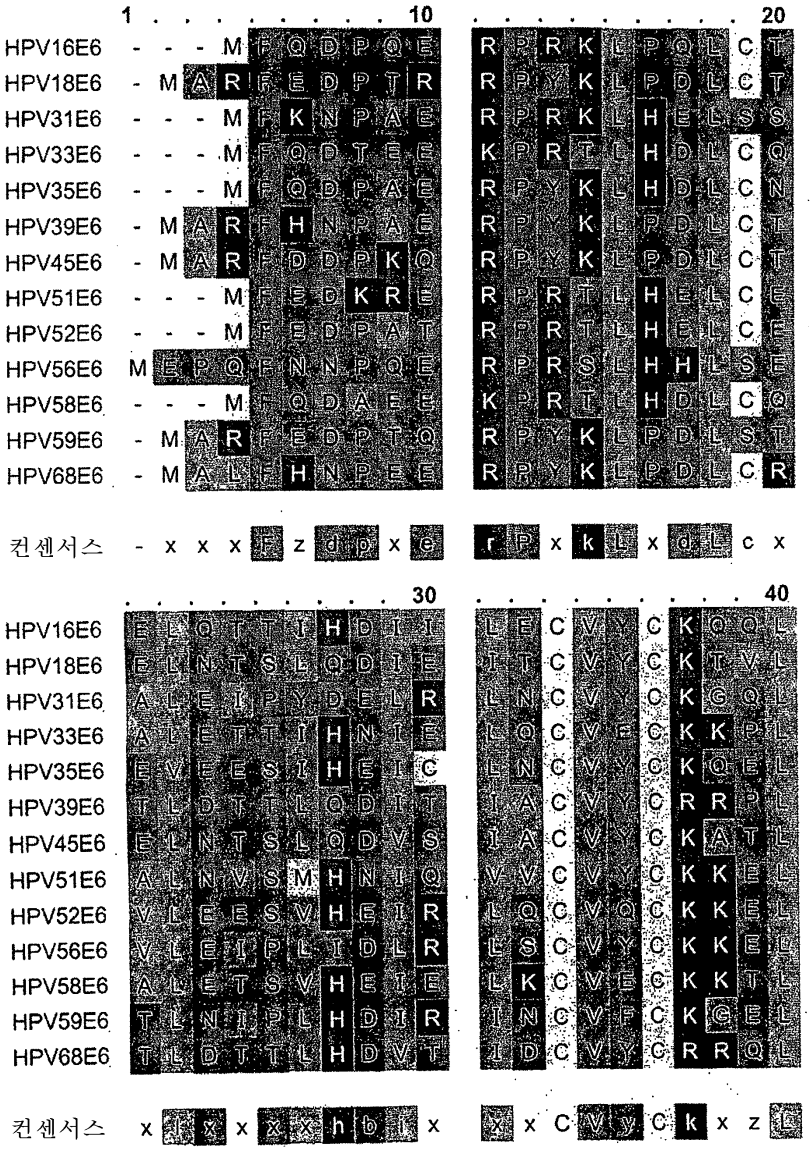
도면1A



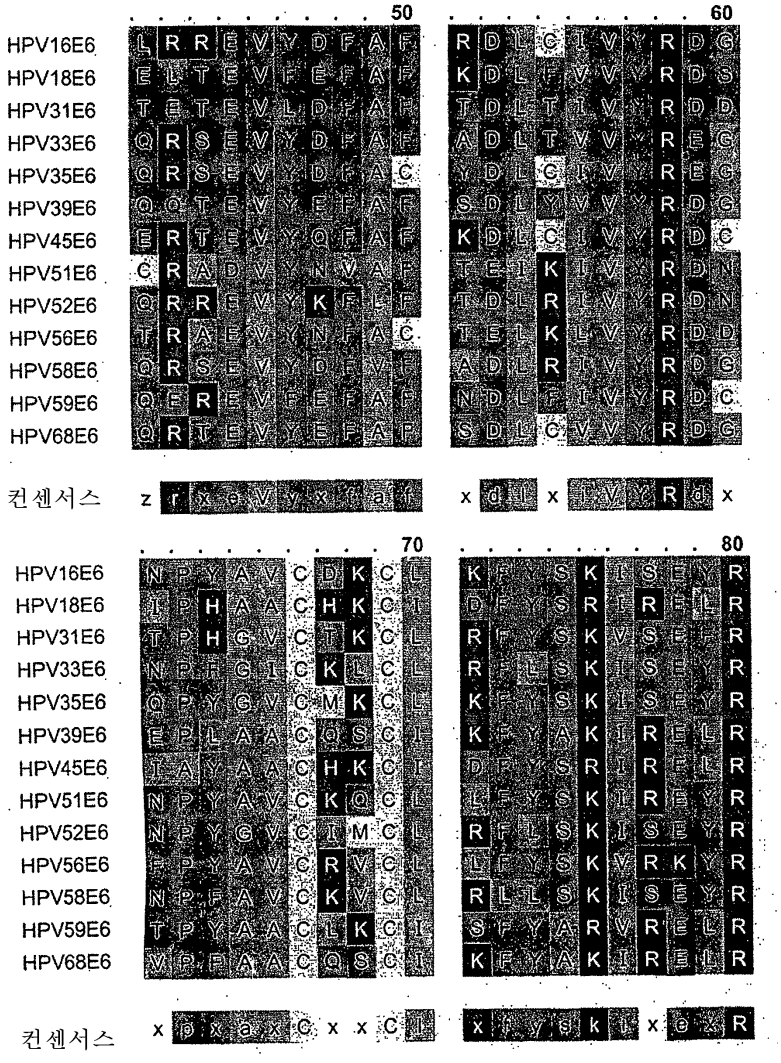
도면1B


91CXXG
HPV 16 E7
98 aa
11-20
49-57
82-93
24CXXG
26EXXG

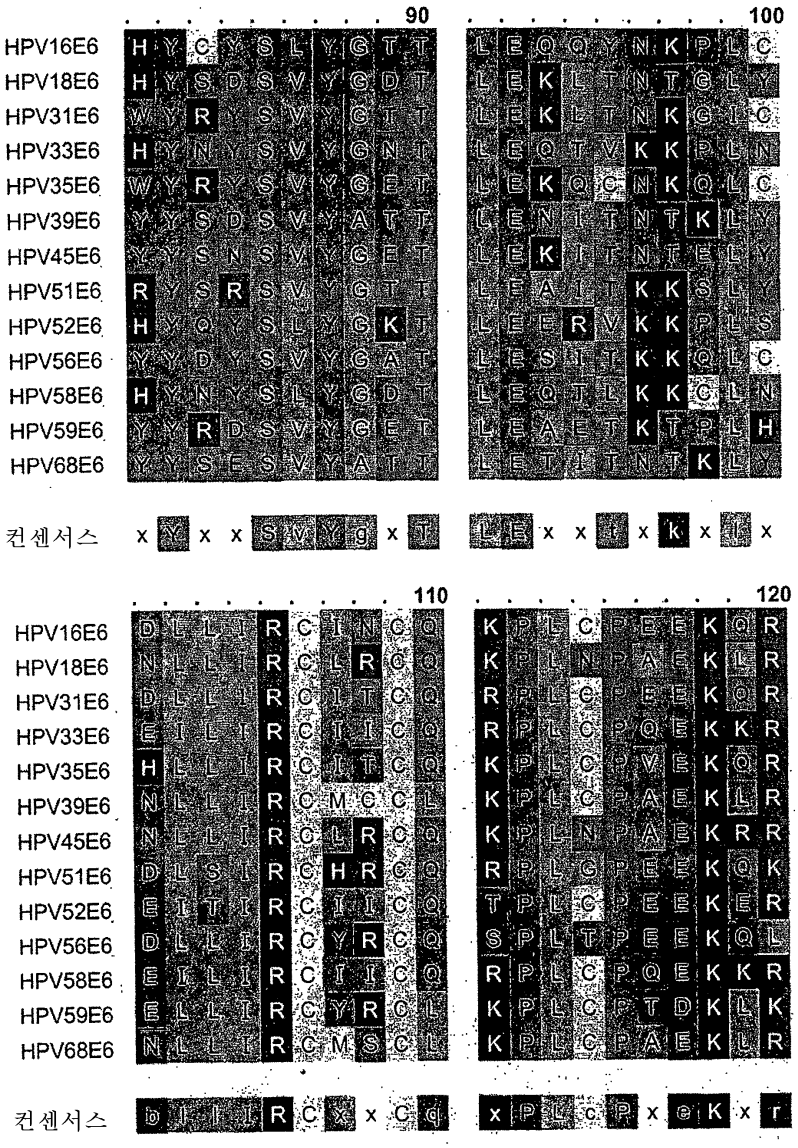
도면2A


1
10
20
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스
30
40

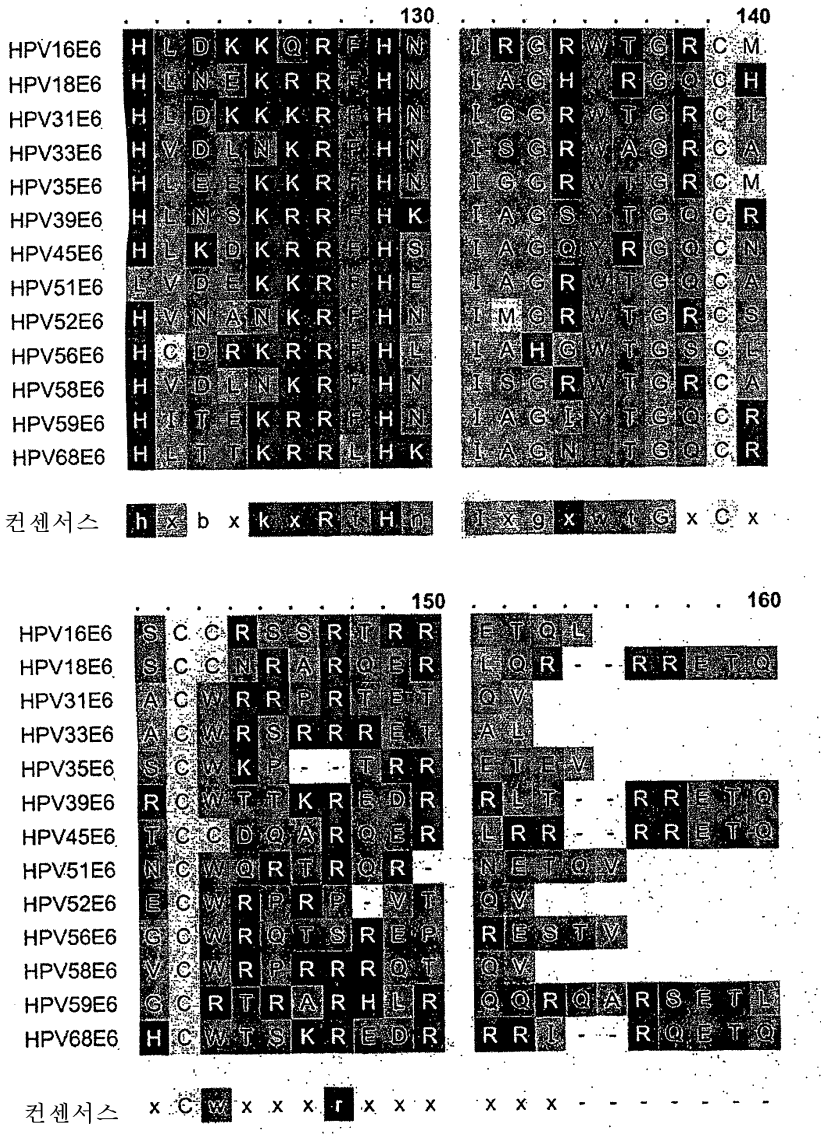
도면2B


50
60
70
80
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스

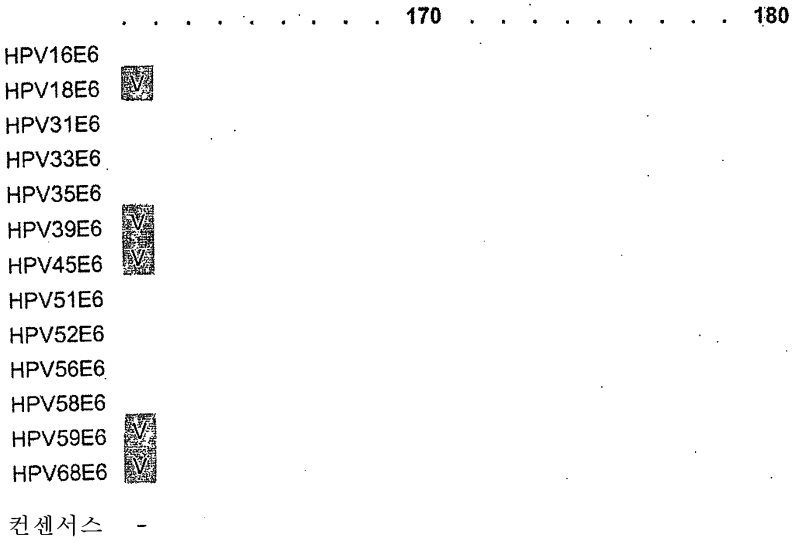
도면2C


90
100
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스
110
120
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스

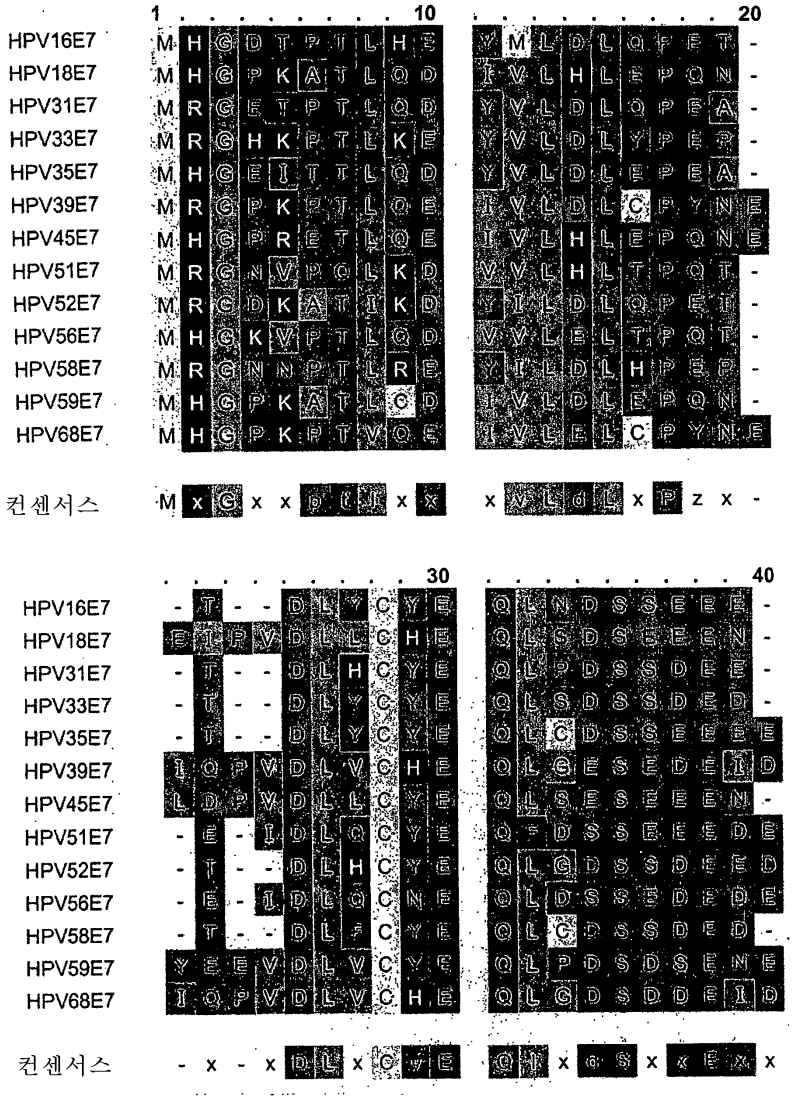
도면2D


130
140
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스
150
160
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스

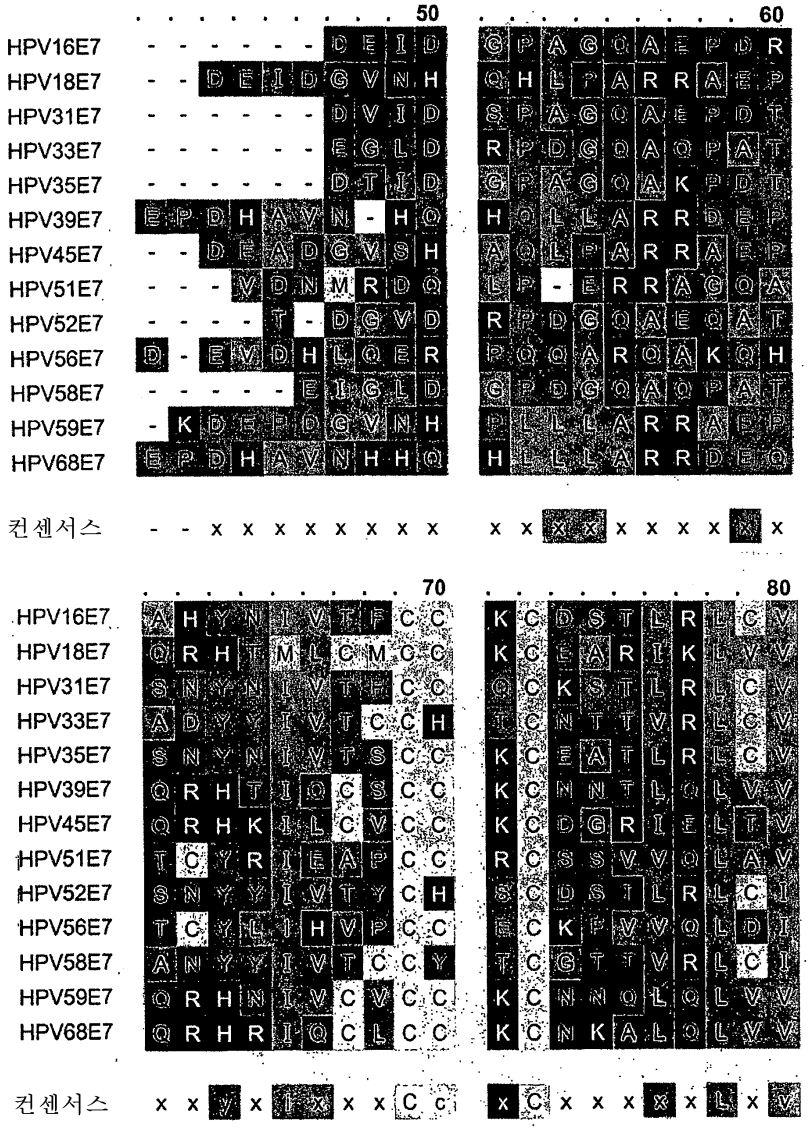
도면2E


170
180
HPV16E6
HPV18E6
HPV31E6
HPV33E6
HPV35E6
HPV39E6
HPV45E6
HPV51E6
HPV52E6
HPV56E6
HPV58E6
HPV59E6
HPV68E6
컨센서스

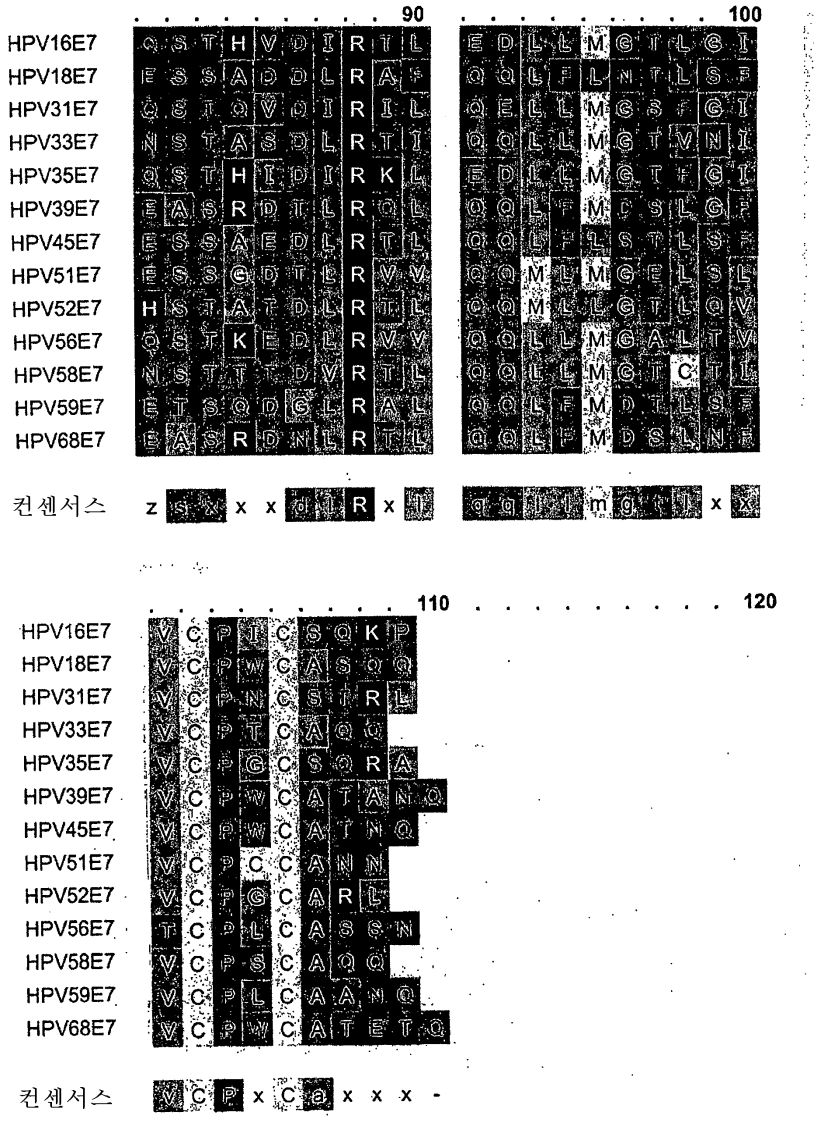
도면3A


1
10
20
HPV16E7
HPV18E7
HPV31E7
HPV33E7
HPV35E7
HPV39E7
HPV45E7
HPV51E7
HPV52E7
HPV56E7
HPV58E7
HPV59E7
HPV68E7
컨센서스
30
40
HPV16E7
HPV18E7
HPV31E7
HPV33E7
HPV35E7
HPV39E7
HPV45E7
HPV51E7
HPV52E7
HPV56E7
HPV58E7
HPV59E7
HPV68E7
컨센서스

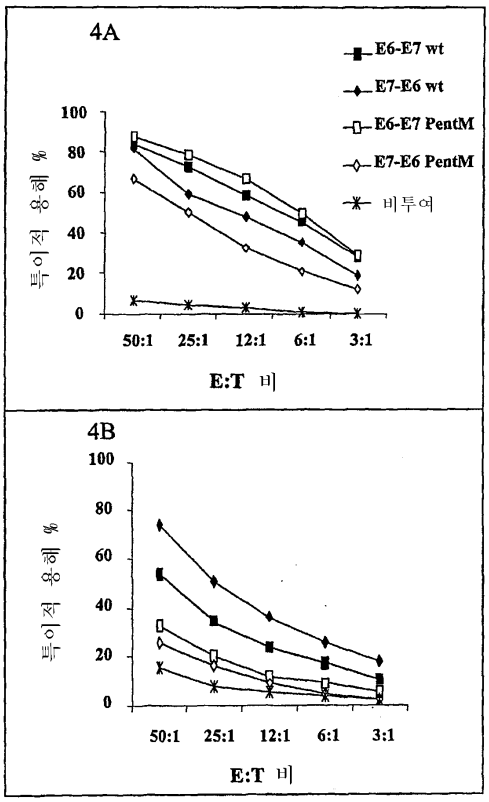
도면3B


50
60
HPV16E7
HPV18E7
HPV31E7
HPV33E7
HPV35E7
HPV39E7
HPV45E7
HPV51E7
HPV52E7
HPV56E7
HPV58E7
HPV59E7
HPV68E7
컨센서스
70
80
HPV16E7
HPV18E7
HPV31E7
HPV33E7
HPV35E7
HPV39E7
HPV45E7
HPV51E7
HPV52E7
HPV56E7
HPV58E7
HPV59E7
HPV68E7
컨센서스

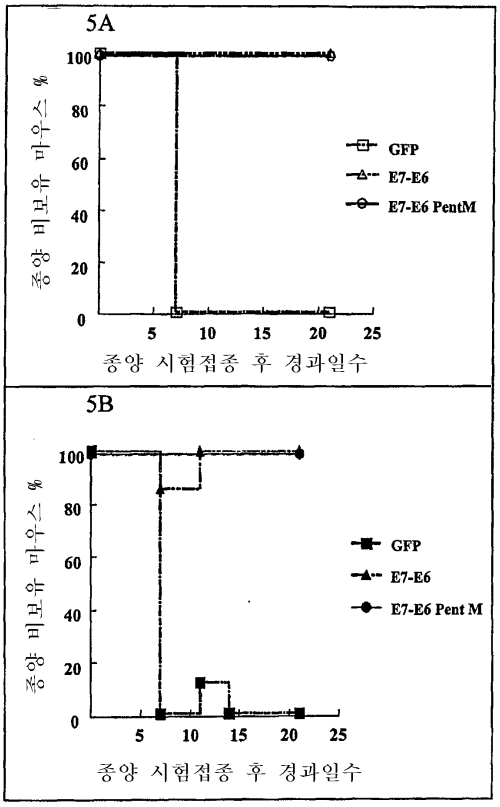
도면3C


90
100
HPV16E7
HPV18E7
HPV31E7
HPV33E7
HPV35E7
HPV39E7
HPV45E7
HPV51E7
HPV52E7
HPV56E7
HPV58E7
HPV59E7
HPV68E7
컨센서스
110
120
HPV16E7
HPV18E7
HPV31E7
HPV33E7
HPV35E7
HPV39E7
HPV45E7
HPV51E7
HPV52E7
HPV56E7
HPV58E7
HPV59E7
HPV68E7
컨센서스

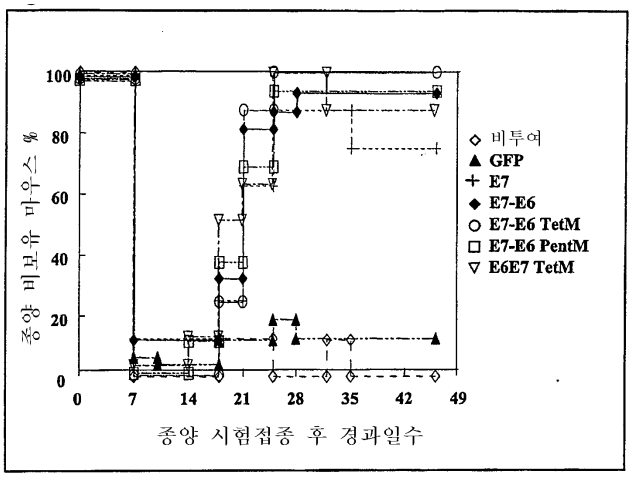
도면4


4A
E6-E7 wt
E7-E6 wt
E6-E7 PentM
E7-E6 PentM
비투여
특이적 용해 %
100
80
60
40
20
0
50:1
25:1
12:1
6:1
3:1
E:T 비
4B
특이적 용해 %
E:T 비

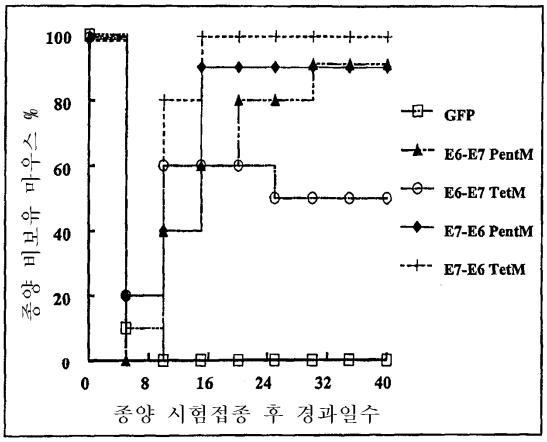
도면5


5A
종양 비보유 마우스 %
GFP
E7-E6
E7-E6 PentM
5
10
15
20
25
종양 시험접종 후 경과일수
5B
종양 비보유 마우스 %
GFP
E7-E6
E7-E6 Pent M
종양 시험접종 후 경과일수

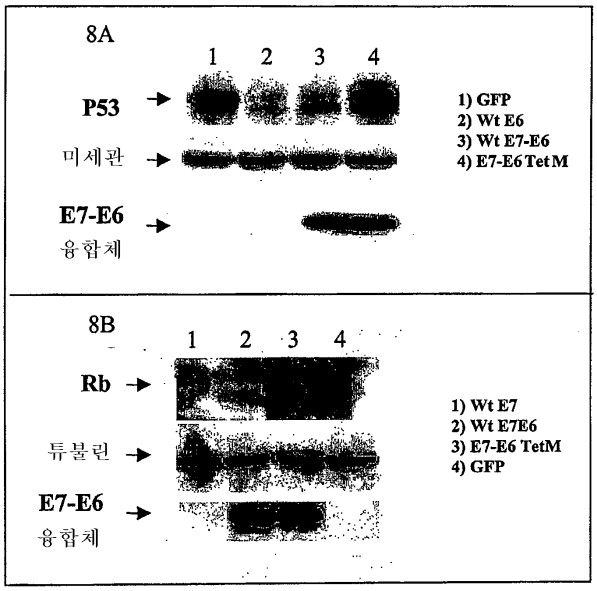
도면6


종양 비보유 마우스 %
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
42
49
종양 시험접종 후 경과일수
비투여
GFP
E7
E7-E6
E7-E6 TetM
E7-E6 PentM
E6E7 TetM

도면7


종양 비보유 마우스 %
100
80
60
40
20
0
0
8
16
24
32
40
종양 시험접종 후 경과일수
GFP
E6-E7 PentM
E6-E7 TetM
E7-E6 PentM
E7-E6 TetM

도면8



서 열 목 록

<110> WYETH HOLDINGS CORPORATION
<120> Human papillomavirus polypeptides and immunogenic compositions

<130> 00630/200M137-WO0

<150> US 60/415,929
<151> 2002-10-03

<160> 65

<170> KopatentIn 1.7

<210> 1
<211> 248
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 1

Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

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

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
145 150 155 160

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu
165 170 175

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
180 185 190

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
195 200 205

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
210 215 220

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
225 230 235 240

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

<210> 2
<211> 747
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 2
atgtttcagg acccacagga gcgacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa 60

acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt 120

gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat 180

gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt 240

tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgtta 300

attaggtgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac 360

aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggtggaccg gtcgatgtat gtcttgttgc 420

agatcatcaa gaacacgtag agaaacccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa 480

tatatgttag atttgcaacc agagacaact gatctctact gttatgagca attaaatgac 540

agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc 600

cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa 660

agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg 720

tgccccatct gttctcagaa accataa 747

<210> 3
<211> 248
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 3

Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

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

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

```
Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
145                 150                 155                 160

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
                165                 170                 175

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
            180                 185                 190

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
        195                 200                 205

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
    210                 215                 220

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
225                 230                 235                 240

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
                245
```

<210> 4
<211> 747
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 4

```
atgtttcagg acccacagga gcgacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa     60

acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt    120

gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat    180

gctgtaggtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt    240

tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgtta    300
```

attaggtgta ttaacggtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac 360

aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggtggaccg gtcgatgtat gtcttgttgc 420

agatcatcaa gaacacgtag agaaacccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa 480

tatatgttag atttgcaacc agagacaact gatctctacg gttatgggca attaaatgac 540

agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc 600

cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa 660

agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg 720

tgccccatct gttctcagaa accataa 747

<210> 5
<211> 248
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 5

Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

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

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
145 150 155 160

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
165 170 175

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
180 185 190

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
195 200 205

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
210 215 220

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
225 230 235 240

Gly Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
245

<210> 6
<211> 747
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 6
atgtttcagg acccacagga gcgacccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa 60

acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt 120

gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat 180

gctgtaggtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt 240

tatagtgtgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgtta 300

attaggtgta ttaacggtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac 360

aaaaagcaaa gattccataa tataaggggt cggtggaccg gtcgatgtat gtcttgttgc 420

agatcatcaa gaacacgtag agaaacccag ctgcatggag atacacctac attgcatgaa 480

tatatgttag atttgcaacc agagacaact gatctctacg gttatgggca attaaatgac 540

agctcagagg aggaggatga aatagatggt ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc 600

cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa 660

agcacacacg tagacattcg tactttggaa gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg 720

ggccccatct gttctcagaa accataa 747

<210> 7
<211> 248
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 7

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
100 105 110

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
115 120 125

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
130 135 140

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys
145 150 155 160

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
165 170 175

Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
180 185 190

Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys
195 200 205

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

210 215 220

Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
225 230 235 240

Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
245

<210> 8
<211> 747
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 8
atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact 60

gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180

tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240

gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accatttcag 300

gacccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata 360

catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggtatat 420

gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtatgt 480

gataaatgtt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg 540

tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttgtt aattaggtgt 600

attaactgtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa 660

agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgatgta tgtcttgttg cagatcatca 720

agaacacgta gagaaaccca gctgtaa 747

<210> 9
<211> 248
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 9

```
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1               5                  10                  15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser
            20                  25                  30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
        35                  40                  45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
    50                  55                  60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65                  70                  75                  80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
                85                  90                  95

Lys Pro Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
            100                 105                 110

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
        115                 120                 125

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
    130                 135                 140

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

145 150 155 160

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
165 170 175

Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
180 185 190

Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys
195 200 205

Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn
210 215 220

Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
225 230 235 240

Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
245

<210> 10
<211> 747
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 10
atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact 60

gatctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180

tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240

gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accatttcag 300

gacccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata 360

catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggtatat 420

gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtaggt 480

gataaatgtt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg 540

tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttgtt aattaggtgt 600

attaacggtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa 660

agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgatgta tgtcttgttg cagatcatca 720

agaacacgta gagaaaccca gctgtaa 747

<210> 11
<211> 248
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 11

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

```
Lys Pro Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
            100                 105                 110

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
        115                 120                 125

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
    130                 135                 140

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Gly
145                 150                 155                 160

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
                165                 170                 175

Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
            180                 185                 190

Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Gly Gln Lys Pro Leu Cys
        195                 200                 205

Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn
    210                 215                 220

Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
225                 230                 235                 240

Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
                245
```

<210> 12
<211> 747
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 12

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact 60

gatctctacg gttatgggca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag 180

tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240

gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg ggccccatct gttctcagaa accatttcag 300

gacccacagg agcgacccag aaagttacca cagttatgca cagagctgca aacaactata 360

catgatataa tattagaatg tgtgtactgc aagcaacagt tactgcgacg tgaggtatat 420

gactttgctt ttcgggattt atgcatagta tatagagatg ggaatccata tgctgtaggt 480

gataaatgtt taaagtttta ttctaaaatt agtgagtata gacattattg ttatagtgtg 540

tatggaacaa cattagaaca gcaatacaac aaaccgttgt gtgatttgtt aattaggtgt 600

attaacggtc aaaagccact gtgtcctgaa gaaaagcaaa gacatctgga caaaaagcaa 660

agattccata atataagggg tcggtggacc ggtcgatgta tgtcttgttg cagatcatca 720

agaacacgta gagaaaccca gctgtaa 747

<210> 13
<211> 151
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 13

Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

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

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150

<210> 14
<211> 98
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 14

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 15
<211> 158
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 18

<400> 15

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala
50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr
85 90 95

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100 105 110

Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg
130 135 140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 16
<211> 149
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 31

<400> 16

Met Phe Lys Asn Pro Ala Glu Arg Pro Arg Lys Leu His Glu Leu Ser
1 5 10 15

Ser Ala Leu Glu Ile Pro Tyr Asp Glu Leu Arg Leu Asn Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gly Gln Leu Thr Glu Thr Glu Val Leu Asp Phe Ala Phe Thr
35 40 45

Asp Leu Thr Ile Val Tyr Arg Asp Asp Thr Pro His Gly Val Cys Thr
50 55 60

Lys Cys Leu Arg Phe Tyr Ser Lys Val Ser Glu Phe Arg Trp Tyr Arg

65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Lys Gly Ile
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Thr Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Gly Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ile Ala Cys Trp Arg Arg Pro Arg
130 135 140

Thr Glu Thr Gln Val
145

<210> 17
<211> 149
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 33

<400> 17

Met Phe Gln Asp Thr Glu Glu Lys Pro Arg Thr Leu His Asp Leu Cys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Thr Ile His Asn Ile Glu Leu Gln Cys Val Glu
20 25 30

Cys Lys Lys Pro Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Ala
35 40 45

Asp Leu Thr Val Val Tyr Arg Glu Gly Asn Pro Phe Gly Ile Cys Lys
50 55 60

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

65 70 75 80

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

Asn Glu Ile Leu Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Arg His Val Asp Leu Asn Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Ser Gly Arg Trp Ala Gly Arg Cys Ala Ala Cys Trp Arg Ser Arg Arg
130 135 140

Arg Glu Thr Ala Leu
145

<210> 18
<211> 149
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 35

<400> 18

Met Phe Gln Asp Pro Ala Glu Arg Pro Tyr Lys Leu His Asp Leu Cys
1 5 10 15

Asn Glu Val Glu Glu Ser Ile His Glu Ile Cys Leu Asn Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Glu Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe Ala Cys Tyr
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Glu Gly Gln Pro Tyr Gly Val Cys Met
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg Trp Tyr Arg

65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Lys Gln Cys Asn Lys Gln Leu
85 90 95

Cys His Leu Leu Ile Arg Cys Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Val Glu Lys Gln Arg His Leu Glu Glu Lys Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Gly Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Trp Lys Pro Thr Arg
130 135 140

Arg Glu Thr Glu Val
145

<210> 19
<211> 158
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 39

<400> 19

Met Ala Arg Phe His Asn Pro Ala Glu Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Thr Leu Asp Thr Thr Leu Gln Asp Ile Thr Ile Ala Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Arg Arg Pro Leu Gln Gln Thr Glu Val Tyr Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Ser Asp Leu Tyr Val Val Tyr Arg Asp Gly Glu Pro Leu Ala Ala
50 55 60

Cys Gln Ser Cys Ile Lys Phe Tyr Ala Lys Ile Arg Glu Leu Arg Tyr

65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Ala Thr Thr Leu Glu Asn Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Met Cys Cys Leu Lys Pro Leu
100 105 110

Cys Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Ser Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Lys Ile Ala Gly Ser Tyr Thr Gly Gln Cys Arg Arg Cys Trp Thr Thr
130 135 140

Lys Arg Glu Asp Arg Arg Leu Thr Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 20
<211> 158
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 45

<400> 20

Met Ala Arg Phe Asp Asp Pro Lys Gln Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Val Ser Ile Ala Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Ala Thr Leu Glu Arg Thr Glu Val Tyr Gln Phe Ala
35 40 45

Phe Lys Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Cys Ile Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ser Asn Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Lys Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Glu Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100 105 110

Asn Pro Ala Glu Lys Arg Arg His Leu Lys Asp Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Ser Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Gly Gln Cys Asn Thr Cys Cys Asp Gln
130 135 140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Arg Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 21
<211> 151
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 51

<400> 21

Met Phe Glu Asp Lys Arg Glu Arg Pro Arg Thr Leu His Glu Leu Cys
1 5 10 15

Glu Ala Leu Asn Val Ser Met His Asn Ile Gln Val Val Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Lys Glu Leu Cys Arg Ala Asp Val Tyr Asn Val Ala Phe Thr
35 40 45

Glu Ile Lys Ile Val Tyr Arg Asp Asn Asn Pro Tyr Ala Val Cys Lys
50 55 60

Gln Cys Leu Leu Phe Tyr Ser Lys Ile Arg Glu Tyr Arg Arg Tyr Ser

65 70 75 80

Arg Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Ala Ile Thr Lys Lys Ser Leu
85 90 95

Tyr Asp Leu Ser Ile Arg Cys His Arg Cys Gln Arg Pro Leu Gly Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Lys Leu Val Asp Glu Lys Lys Arg Phe His Glu Ile
115 120 125

Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gln Cys Ala Asn Cys Trp Gln Arg Thr Arg
130 135 140

Gln Arg Asn Glu Thr Gln Val
145 150

<210> 22
<211> 148
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 52

<400> 22

Met Phe Glu Asp Pro Ala Thr Arg Pro Arg Thr Leu His Glu Leu Cys
1 5 10 15

Glu Val Leu Glu Glu Ser Val His Glu Ile Arg Leu Gln Cys Val Gln
20 25 30

Cys Lys Lys Glu Leu Gln Arg Arg Glu Val Tyr Lys Phe Leu Phe Thr
35 40 45

Asp Leu Arg Ile Val Tyr Arg Asp Asn Asn Pro Tyr Gly Val Cys Ile
50 55 60

Met Cys Leu Arg Phe Leu Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Gln

65 70 75 80

Tyr Ser Leu Tyr Gly Lys Thr Leu Glu Glu Arg Val Lys Lys Pro Leu
85 90 95

Ser Glu Ile Thr Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Thr Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Glu Arg His Val Asn Ala Asn Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Met Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ser Glu Cys Trp Arg Pro Arg Pro
130 135 140

Val Thr Gln Val
145

<210> 23
<211> 155
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 56

<400> 23

Met Glu Pro Gln Phe Asn Asn Pro Gln Glu Arg Pro Arg Ser Leu His
1 5 10 15

His Leu Ser Glu Val Leu Glu Ile Pro Leu Ile Asp Leu Arg Leu Ser
20 25 30

Cys Val Tyr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Ala Glu Val Tyr Asn Phe
35 40 45

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

Val Cys Arg Val Cys Leu Leu Phe Tyr Ser Lys Val Arg Lys Tyr Arg

65 70 75 80

Tyr Tyr Asp Tyr Ser Val Tyr Gly Ala Thr Leu Glu Ser Ile Thr Lys
85 90 95

Lys Gln Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Tyr Arg Cys Gln Ser Pro
100 105 110

Leu Thr Pro Glu Glu Lys Gln Leu His Cys Asp Arg Lys Arg Arg Phe
115 120 125

His Leu Ile Ala His Gly Trp Thr Gly Ser Cys Leu Gly Cys Trp Arg
130 135 140

Gln Thr Ser Arg Glu Pro Arg Glu Ser Thr Val
145 150 155

<210> 24
<211> 149
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 58

<400> 24

Met Phe Gln Asp Ala Glu Glu Lys Pro Arg Thr Leu His Asp Leu Cys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Ser Val His Glu Ile Glu Leu Lys Cys Val Glu
20 25 30

Cys Lys Lys Thr Leu Gln Arg Ser Glu Val Tyr Asp Phe Val Phe Ala
35 40 45

Asp Leu Arg Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Phe Ala Val Cys Lys
50 55 60

Val Cys Leu Arg Leu Leu Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Asn

65 70 75 80

Tyr Ser Leu Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Gln Thr Leu Lys Lys Cys Leu
85 90 95

Asn Glu Ile Leu Ile Arg Cys Ile Ile Cys Gln Arg Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Gln Glu Lys Lys Arg His Val Asp Leu Asn Lys Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Ser Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Ala Val Cys Trp Arg Pro Arg Arg
130 135 140

Arg Gln Thr Gln Val
145

<210> 25
<211> 160
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 59

<400> 25

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Gln Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Ser Thr Thr Leu Asn Ile Pro Leu His Asp Ile Arg Ile Asn Cys
20 25 30

Val Phe Cys Lys Gly Glu Leu Gln Glu Arg Glu Val Phe Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Asn Asp Leu Phe Ile Val Tyr Arg Asp Cys Thr Pro Tyr Ala Ala
50 55 60

Cys Leu Lys Cys Ile Ser Phe Tyr Ala Arg Val Arg Glu Leu Arg Tyr

65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Tyr Gly Glu Thr Leu Glu Ala Glu Thr Lys Thr
85 90 95

Pro Leu His Glu Leu Leu Ile Arg Cys Tyr Arg Cys Leu Lys Pro Leu
100 105 110

Cys Pro Thr Asp Lys Leu Lys His Ile Thr Glu Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Asn Ile Ala Gly Ile Tyr Thr Gly Gln Cys Arg Gly Cys Arg Thr Arg
130 135 140

Ala Arg His Leu Arg Gln Gln Arg Gln Ala Arg Ser Glu Thr Leu Val
145 150 155 160

<210> 26
<211> 158
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 68

<400> 26

Met Ala Leu Phe His Asn Pro Glu Glu Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Arg Thr Leu Asp Thr Thr Leu His Asp Val Thr Ile Asp Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Arg Arg Gln Leu Gln Arg Thr Glu Val Tyr Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Ser Asp Leu Cys Val Val Tyr Arg Asp Gly Val Pro Phe Ala Ala
50 55 60

Cys Gln Ser Cys Ile Lys Phe Tyr Ala Lys Ile Arg Glu Leu Arg Tyr

65 70 75 80

Tyr Ser Glu Ser Val Tyr Ala Thr Thr Leu Glu Thr Ile Thr Asn Thr
85 90 95

Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Met Ser Cys Leu Lys Pro Leu
100 105 110

Cys Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Thr Thr Lys Arg Arg Leu His
115 120 125

Lys Ile Ala Gly Asn Phe Thr Gly Gln Cys Arg His Cys Trp Thr Ser
130 135 140

Lys Arg Glu Asp Arg Arg Arg Ile Arg Gln Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 27
<211> 105
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 18

<400> 27

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
20 25 30

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe
85 90 95

Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
100 105

<210> 28
<211> 98
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 31

<400> 28

Met Arg Gly Glu Thr Pro Thr Leu Gln Asp Tyr Val Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Ala Thr Asp Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Pro Asp Ser Ser
20 25 30

Asp Glu Glu Asp Val Ile Asp Ser Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Cys Lys Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr Gln Val Asp Ile Arg Ile Leu Gln
65 70 75 80

Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile Val Cys Pro Asn Cys Ser Thr
85 90 95

Arg Leu

<210> 29
<211> 97

<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 33

<400> 29

Met Arg Gly His Lys Pro Thr Leu Lys Glu Tyr Val Leu Asp Leu Tyr
1 5 10 15

Pro Glu Pro Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
20 25 30

Asp Glu Asp Glu Gly Leu Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Gln Pro Ala
35 40 45

Thr Ala Asp Tyr Tyr Ile Val Thr Cys Cys His Thr Cys Asn Thr Thr
50 55 60

Val Arg Leu Cys Val Asn Ser Thr Ala Ser Asp Leu Arg Thr Ile Gln
65 70 75 80

Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val Cys Pro Thr Cys Ala Gln
85 90 95

Gln

<210> 30
<211> 99
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 35

<400> 30

Met His Gly Glu Ile Thr Thr Leu Gln Asp Tyr Val Leu Asp Leu Glu
1 5 10 15

Pro Glu Ala Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp Ser Ser

20 25 30

Glu Glu Glu Glu Asp Thr Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Lys Pro
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Tyr Asn Ile Val Thr Ser Cys Cys Lys Cys Glu Ala
50 55 60

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Ile Asp Ile Arg Lys Leu
65 70 75 80

Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Phe Gly Ile Val Cys Pro Gly Cys Ser
85 90 95

Gln Arg Ala

<210> 31
<211> 109
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 39

<400> 31

Met Arg Gly Pro Lys Pro Thr Leu Gln Glu Ile Val Leu Asp Leu Cys
1 5 10 15

Pro Tyr Asn Glu Ile Gln Pro Val Asp Leu Val Cys His Glu Gln Leu
20 25 30

Gly Glu Ser Glu Asp Glu Ile Asp Glu Pro Asp His Ala Val Asn His
35 40 45

Gln His Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asp Glu Pro Gln Arg His Thr Ile
50 55 60

Gln Cys Ser Cys Cys Lys Cys Asn Asn Thr Leu Gln Leu Val Val Glu

65 70 75 80

Ala Ser Arg Asp Thr Leu Arg Gln Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Ser
85 90 95

Leu Gly Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Ala Asn Gln
100 105

<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 45

<400> 32

Met His Gly Pro Arg Glu Thr Leu Gln Glu Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Leu Asp Pro Val Asp Leu Leu Cys Tyr Glu Gln Leu
20 25 30

Ser Glu Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ala Asp Gly Val Ser His Ala
35 40 45

Gln Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Lys Ile Leu Cys
50 55 60

Val Cys Cys Lys Cys Asp Gly Arg Ile Glu Leu Thr Val Glu Ser Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser
85 90 95

Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Asn Gln
100 105

<210> 33

<211> 101
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 51

<400> 33

Met Arg Gly Asn Val Pro Gln Leu Lys Asp Val Val Leu His Leu Thr
1 5 10 15

Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Tyr Glu Gln Phe Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Val Asp Asn Met Arg Asp Gln Leu Pro Glu Arg
35 40 45

Arg Ala Gly Gln Ala Thr Cys Tyr Arg Ile Glu Ala Pro Cys Cys Arg
50 55 60

Cys Ser Ser Val Val Gln Leu Ala Val Glu Ser Ser Gly Asp Thr Leu
65 70 75 80

Arg Val Val Gln Gln Met Leu Met Gly Glu Leu Ser Leu Val Cys Pro
85 90 95

Cys Cys Ala Asn Asn
100

<210> 34
<211> 99
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 52

<400> 34

Met Arg Gly Asp Lys Ala Thr Ile Lys Asp Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Gly Asp Ser Ser

20 25 30

Asp Glu Glu Asp Thr Asp Gly Val Asp Arg Pro Asp Gly Gln Ala Glu
35 40 45

Gln Ala Thr Ser Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Tyr Cys His Ser Cys Asp
50 55 60

Ser Thr Leu Arg Leu Cys Ile His Ser Thr Ala Thr Asp Leu Arg Thr
65 70 75 80

Leu Gln Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Gln Val Val Cys Pro Gly Cys
85 90 95

Ala Arg Leu

<210> 35
<211> 105
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 56

<400> 35

Met His Gly Lys Val Pro Thr Leu Gln Asp Val Val Leu Glu Leu Thr
1 5 10 15

Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu Gln Cys Asn Glu Gln Leu Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Val Asp His Leu Gln Glu Arg Pro Gln
35 40 45

Gln Ala Arg Gln Ala Lys Gln His Thr Cys Tyr Leu Ile His Val Pro
50 55 60

Cys Cys Glu Cys Lys Phe Val Val Gln Leu Asp Ile Gln Ser Thr Lys

65 70 75 80

Glu Asp Leu Arg Val Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val
85 90 95

Thr Cys Pro Leu Cys Ala Ser Ser Asn
100 105

<210> 36
<211> 98
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 58

<400> 36

Met Arg Gly Asn Asn Pro Thr Leu Arg Glu Tyr Ile Leu Asp Leu His
1 5 10 15

Pro Glu Pro Thr Asp Leu Phe Cys Tyr Glu Gln Leu Cys Asp Ser Ser
20 25 30

Asp Glu Asp Glu Ile Gly Leu Asp Gly Pro Asp Gly Gln Ala Gln Pro
35 40 45

Ala Thr Ala Asn Tyr Tyr Ile Val Thr Cys Cys Tyr Thr Cys Gly Thr
50 55 60

Thr Val Arg Leu Cys Ile Asn Ser Thr Thr Thr Asp Val Arg Thr Leu
65 70 75 80

Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Cys Thr Ile Val Cys Pro Ser Cys Ala
85 90 95

Gln Gln

<210> 37
<211> 107

<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 59

<400> 37

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Cys Asp Ile Val Leu Asp Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Tyr Glu Glu Val Asp Leu Val Cys Tyr Glu Gln Leu Pro
20 25 30

Asp Ser Asp Ser Glu Asn Glu Lys Asp Glu Pro Asp Gly Val Asn His
35 40 45

Pro Leu Leu Leu Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Asn Ile Val
50 55 60

Cys Val Cys Cys Lys Cys Asn Asn Gln Leu Gln Leu Val Val Glu Thr
65 70 75 80

Ser Gln Asp Gly Leu Arg Ala Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp Thr Leu
85 90 95

Ser Phe Val Cys Pro Leu Cys Ala Ala Asn Gln
100 105

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 68

<400> 38

Met His Gly Pro Lys Pro Thr Val Gln Glu Ile Val Leu Glu Leu Cys
1 5 10 15

Pro Tyr Asn Glu Ile Gln Pro Val Asp Leu Val Cys His Glu Gln Leu

20 25 30

Gly Asp Ser Asp Asp Glu Ile Asp Glu Pro Asp His Ala Val Asn His
35 40 45

His Gln His Leu Leu Leu Ala Arg Arg Asp Glu Gln Gln Arg His Arg
50 55 60

Ile Gln Cys Leu Cys Cys Lys Cys Asn Lys Ala Leu Gln Leu Val Val
65 70 75 80

Glu Ala Ser Arg Asp Asn Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Met Asp
85 90 95

Ser Leu Asn Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Thr Glu Thr Gln
100 105 110

<210> 39
<211> 152
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(152)
<223> where Xaa is any amino acid

<400> 39

Xaa Xaa Xaa Phe Glx Asp Pro Xaa Glu Arg Pro Xaa Lys Leu Xaa Asp
1 5 10 15

Leu Cys Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa His Asx Ile Xaa Xaa Xaa Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Xaa Glx Leu Glx Arg Xaa Glu Val Tyr Xaa Phe Ala
35 40 45

Phe Xaa Asp Leu Xaa Ile Val Tyr Arg Asp Xaa Xaa Pro Xaa Ala Xaa
50 55 60

Cys Xaa Xaa Cys Leu Xaa Phe Tyr Ser Lys Ile Xaa Glu Xaa Arg Xaa
65 70 75 80

Tyr Xaa Xaa Ser Val Tyr Gly Xaa Thr Leu Glu Xaa Xaa Thr Xaa Lys
85 90 95

Xaa Leu Xaa Asx Leu Leu Ile Arg Cys Xaa Xaa Cys Gln Xaa Pro Leu
100 105 110

Cys Pro Xaa Glu Lys Xaa Arg His Xaa Asx Xaa Lys Xaa Arg Phe His
115 120 125

Asn Ile Xaa Gly Xaa Trp Thr Gly Xaa Cys Xaa Xaa Cys Trp Xaa Xaa
130 135 140

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145 150

<210> 40
<211> 104
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(104)
<223> where Xaa is any amino acid

<400> 40

Met Xaa Gly Xaa Xaa Pro Thr Leu Xaa Xaa Xaa Val Leu Asp Leu Xaa
1 5 10 15

Pro Glx Xaa Xaa Xaa Asp Leu Xaa Cys Tyr Glu Gln Leu Xaa Asp Ser
20 25 30

Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Cys
50 55 60

Cys Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Val Glx Ser Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80

Asp Leu Arg Xaa Leu Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Leu Xaa Xaa Val
85 90 95

Cys Pro Xaa Cys Ala Xaa Xaa Xaa
100

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 41

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

<210> 42
<211> 477
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 18

<400> 42
atggcgcgct ttgaggatcc aacacggcga ccctacaagc tacctgatct gtgcacggaa 60

ctgaacactt cactgcaaga catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa 120

cttacagagg tatttgaatt tgcatttaaa gatttatttg tggtgtatag agacagtata 180

ccccatgctg catgccataa atgtatagat ttttattcta gaattagaga attaagacat 240

tattcagact ctgtgtatgg agacacattg gaaaaactaa ctaacactgg gttatacaat 300

ttattaataa ggtgcctgcg gtgccagaaa ccgttgaatc cagcagaaaa acttagacac 360

cttaatgaaa aacgacgatt tcacaacata gctgggcact atagaggcca gtgccattcg 420

tgctgcaacc gagcacgaca ggaacgactc caacgacgca gagaaacaca agtataa 477

<210> 43
<211> 474
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 31

<400> 43
atgttcaaaa atcctgcaga aagacctcgg aaattgcatg aactaagctc ggcattggaa 60

ataccctacg atgaactaag attgaattgt gtctactgca aaggtcagtt aacagaaaca 120

gaggtattag attttgcatt tacagattta acaatagtat atagggacga cacaccacac 180

ggagtgtgta caaaatgttt aagattttat tcaaaagtaa gtgaatttag atggtataga 240

tatagtgtgt atggaacaac attagaaaaa ttgacaaaca aaggtatatg tgatttgtta 300

attaggtgta taacgtgtca aagaccgttg tgtccagaag aaaaacaaag acatttggat 360

aaaaagaaac gattccacaa cataggagga aggtggacag gacgttgcat agcatgttgg 420

agaagacctc gtactgaaac ccaagtgtaa acatgcgtgg agaaacacct acgt 474

<210> 44
<211> 450
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 33

<400> 44

atgtttcaag acactgagga aaaaccacga acattgcatg atttgtgcca agcattggag 60

acaactatac acaacattga actacagtgc gtggaatgca aaaaaccttt gcaacgatct 120

gaggtatatg attttgcatt tgcagattta acagttgtat atagagaggg aaatccattt 180

ggaatatgta aactgtgttt gcggttctta tctaaaatta gtgaatatag acattataat 240

tattctgtat atggaaatac attagaacaa acagttaaaa aacctttaaa tgaaatatta 300

attaggtgta ttatatgtca aagacctttg tgtcctcaag aaaaaaaacg acatgtggat 360

ttaaacaaac gatttcataa tatttcgggt cgttgggcag ggcgctgtgc ggcgtgttgg 420

aggtcccgac gtagagaaac tgcactgtga 450

<210> 45
<211> 450
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 35

<400> 45
atgtttcagg acccagctga acgaccttac aaactgcatg atttgtgcaa cgaggtagaa 60

gaaagcatcc atgaaatttg tttgaattgt gtatactgca aacaagaatt acagcggagt 120

gaggtatatg actttgcatg ctatgatttg tgtatagtat atagagaagg ccagccatat 180

ggagtatgca tgaaatgttt aaaattttat tcaaaaataa gtgaatatag atggtataga 240

tatagtgtgt atggagaaac gttagaaaaa caatgcaaca aacagttatg tcatttatta 300

attaggtgta ttacatgtca aaaaccgctg tgtccagttg aaaagcaaag acatttagaa 360

gaaaaaaaac gattccataa catcggtgga cggtggacag gtcggtgtat gtcctgttgg 420

aaaccaacac gtagagaaac cgaggtgtaa 450

<210> 46

<211> 477
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 39

<400> 46
atggcgcgat ttcacaatcc tgcagaacgg ccatacaaat tgccagacct gtgcacaacg 60

ctggacacca ccttgcagga cattacaata gcctgtgtct attgcagacg accactacag 120

caaaccgagg tatatgaatt tgcatttagt gatttatatg tagtatatag ggacggggaa 180

ccactagctg catgccaatc atgtataaaa ttttatgcta aaatacggga gctacgatat 240

tactcggact cggtgtatgc aactacatta gaaaatataa ctaatacaaa gttatataat 300

ttattaataa ggtgcatgtg ttgtctgaaa ccgctgtgtc cagcagaaaa attaagacac 360

ctaaatagca aacgaagatt tcataaaata gcaggaagct atacaggaca gtgtcgacgg 420

tgctggacca caaaacggga ggaccgcaga ctaacacgaa gagaaaccca agtataa 477

<210> 47
<211> 477
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 45

<400> 47
atggcgcgct ttgacgatcc aaagcaacga ccctacaagc taccagattt gtgcacagaa 60

ttgaatacat cactacaaga cgtatctatt gcctgtgtat attgcaaagc aacattggaa 120

cgcacagagg tatatcaatt tgcttttaaa gatttatgta tagtgtatag agactgtata 180

gcatatgctg catgccataa atgtatagac ttttattcca gaattagaga attaagatat 240

tattcaaact ctgtatatgg agagacactg gaaaaaataa ctaatacaga gttgtataat 300

ttgttaataa ggtgcctgcg gtgccagaaa ccattgaacc cagcagaaaa acgtagacac 360

cttaaggaca aacgaagatt tcacagcata gctggacagt accgagggca gtgtaataca 420

tgttgtgacc aggcacggca agaaagactt cgcagacgta gggaaacaca agtatag 477

<210> 48
<211> 456
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 51

<400> 48
atgttcgaag acaagaggga aagaccacga acgctgcatg aattatgtga agctttgaac 60

gtttctatgc acaatataca ggtagtgtgt gtgtattgta aaaaggaatt atgtagagca 120

gatgtatata atgtagcatt tactgaaatt aagattgtat atagggataa taatccatat 180

gcagtatgca aacaatgttt actgttttat tcaaaaatta gagagtatag acgttatagc 240

aggtctgtgt atggtactac attagaggca attactaaaa aaagcttata tgatttatcg 300

ataaggtgtc atagatgtca aagaccactt gggcctgaag aaaagcaaaa attggtggac 360

gaaaaaaaaa ggttccatga aatagcggga cgttggacgg ggcaatgcgc taattgctgg 420

caacgtacac gacaacgtaa cgaaacccaa gtgtaa 456

<210> 49
<211> 447
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 52

<400> 49
atgtttgagg atccagcaac acgaccccgg accctgcacg aattgtgtga ggtgctggaa 60

gaatcggtgc atgaaataag gctgcagtgt gtgcagtgca aaaaagagct acaacgaaga 120

gaggtataca agtttctatt tacagattta cgaatagtat atagagacaa taatccatat 180

ggcgtgtgta ttatgtgcct acgcttttta tctaagataa gtgaatatag gcattatcaa 240

tattcactgt atgggaaaac attagaagag agggtaaaaa aaccattaag tgaaataact 300

attagatgta taatttgtca aacgccatta tgtcctgaag aaaaagaaag acatgttaat 360

gcaaacaagc gatttcataa tattatgggt cgttggacag ggcgctgttc agagtgttgg 420

agaccccgac ctgtgaccca agtgtaa 447

<210> 50
<211> 465
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 56

<400> 50
atggagccac aattcaacaa tccacaggaa cgtccacgaa gcctgcacca cttgagtgag 60

gtattagaaa tacctttaat tgatcttaga ttatcatgtg tatattgcaa aaaagaacta 120

acacgtgctg aggtatataa ttttgcatgc actgaattaa aattagtgta tagggatgat 180

tttccttatg cagtgtgcag agtatgttta ttgttttata gtaaagttag aaaatatagg 240

tattatgact attcagtgta tggagctaca ctagaaagta taactaaaaa acagttatgt 300

gatttattaa taaggtgcta cagatgtcaa agtccgttaa ctccggagga aaagcaattg 360

cattgtgaca gaaaaagacg atttcatcta atagcacatg gttggaccgg gtcatgtttg 420

gggtgctgga gacaaacatc tagagaacct agagaatcta cagta 465

<210> 51
<211> 450
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 58

<400> 51
atgttccagg acgcagagga gaaaccacgg acattgcatg atttgtgtca ggcgttggag 60

acatctgtgc atgaaatcga attgaaatgc gttgaatgca aaaagacttt gcagcgatct 120

gaggtatatg actttgtatt tgcagattta agaatagtgt atagagatgg aaatccattt 180

gcagtatgta aagtgtgctt acgattgcta tctaaaataa gtgagtatag acattataat 240

tattcgctat atggagacac attagaacaa acactaaaaa agtgtttaaa tgaaatatta 300

attagatgta ttatttgtca aagaccattg tgtccacaag aaaaaaaaag gcatgtggat 360

ttaaacaaaa ggtttcataa tatttcgggt cgttggacag ggcgctgtgc agtgtgttgg 420

agaccccgac gtagacaaac acaagtgtaa 450

<210> 52
<211> 483
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 59

<400> 52
atggcacgct ttgaggatcc tacacaacga ccatacaaac tgcctgattt gagcacaaca 60

ttgaatattc ctctgcatga tattcgcatc aattgtgtgt tttgcaaagg ggaactgcaa 120

gaaagagagg tatttgaatt tgcttttaat gacttattta tagtgtatag agactgtaca 180

ccgtatgcag cgtgtctgaa atgcatttca ttttatgcaa gagtaagaga attaagatat 240

tatagagatt ccgtgtatgg agaaacatta gaggctgaaa ccaagacacc gttacatgag 300

ctgctgatac gctgttatag atgcctaaaa cctctatgtc caacagataa attaaagcat 360

ataactgaaa aaagaagatt ccataatata gctggaatat atacaggaca gtgtcgtggg 420

tgtcggaccc gagcaagaca cctaagacag caacgacaag cgcgtagtga aacactggtg 480

taa 483

<210> 53
<211> 477
<212> DNA

<213> Human papillomavirus type 68

<400> 53
atggcgctat ttcacaaccc tgaggaacgg ccatacaaat tgccagacct gtgcaggaca 60

ttggacacta cattgcatga cgttacaata gactgtgtct attgcagaag gcaactacaa 120

cggacagagg tatatgaatt tgcctttagt gacctatgtg tagtgtatag agacggggta 180

ccatttgctg catgccaatc atgtattaaa ttttatgcta aaatacggga actacgatat 240

tactcggaat cggtgtatgc aactacatta gaaaccataa ctaatacaaa gttatataat 300

ttattgataa ggtgcatgag ttgcctgaaa ccattgtgtc cagcagaaaa actaaggcac 360

ctaacaacaa aacgaagatt acataaaata gcaggaaact ttacaggaca gtgtcggcac 420

tgctggacca gtaagcgaga ggaccgcaga cgcatacgtc aagaaacaca agtttaa 477

<210> 54
<211> 318
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 18

<400> 54
atgcatggac ctaaggcaac attgcaagac attgtattgc atttagagcc ccaaaatgaa 60

attccggttg accttctatg tcacgagcaa ttaagcgact cagaggaaga aaacgatgaa 120

atagatggag ttaatcatca acatttacca gcccgacgag ccgaaccaca acgtcacaca 180

atgttgtgta tgtgttgtaa gtgtgaagcc agaattaagc tagtagtaga aagctcagca 240

gacgaccttc gagcattcca gcagctgttt ctgaacaccc tgtcctttgt gtgtccgtgg 300

tgtgcatccc agcagtaa 318

<210> 55
<211> 297
<212> DNA

<213> Human papillomavirus type 31

<400> 55
atgcgtggag aaacacctac gttgcaagac tatgtgttag atttgcaacc tgaggcaact 60

gacctccact gttatgagca attacccgac agctcagatg aggaggatgt catagacagt 120

ccagctggac aagcagaacc ggacacatcc aattacaata tcgttacctt ttgttgtcag 180

tgtaagtcta cacttcgttt gtgtgtacag agcacacaag tagatattcg catattgcaa 240

gagctgttaa tgggctcatt tggaatcgtg tgccccaact gttctactag actgtaa 297

<210> 56
<211> 294
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 33

<400> 56
atgagaggac acaagccaac gttaaaggaa tatgttttag atttatatcc tgaaccaact 60

gacctatact gctatgagca attaagtgac agctcagatg aggatgaagg cttggaccgg 120

ccagatggac aagcacaacc agccacagct gattactaca ttgtaacctg ttgtcacact 180

tgtaacacca cagttcgttt atgtgtcaac agtacagcaa gtgacctacg aaccatacag 240

caactactta tgggcacagt gaatattgtg tgccctacct gtgcacaaca ataa 294

<210> 57
<211> 300
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 35

<400> 57
atgcatggag aaataactac attgcaagac tatgttttag atttggaacc cgaggcaact 60

gacctatact gttatgagca attgtgtgac agctcagagg aggaggaaga tactattgac 120

ggtccagctg gacaagcaaa accagacacc tccaattata atattgtaac gtcctgttgt 180

aaatgtgagg cgacactacg tctgtgtgta cagagcacac acattgacat acgtaaattg 240

gaagatttat taatgggcac atttggaata gtgtgccccg gctgttcaca gagagcataa 300

<210> 58
<211> 330
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 39

<400> 58
atgcgtggac caaagcccac cttgcaggaa attgtattag atttatgtcc ttacaatgaa 60

atacagccgg ttgaccttgt atgtcacgag caattaggag agtcagagga tgaaatagat 120

gaacccgacc atgcagttaa tcaccaacat caactactag ccagacggga tgaaccacag 180

cgtcacacaa tacagtgttc gtgttgtaag tgtaacaaca cactgcagct ggtagtagaa 240

gcctcacggg atactctgcg acaactacag cagctgttta tggactcact aggatttgtg 300

tgtccgtggt gtgcaactgc aaaccagtaa 330

<210> 59
<211> 321
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 45

<400> 59
atgcatggac cccgggaaac actgcaagaa attgtattgc atttggaacc tcagaatgaa 60

ttagatcctg ttgacctgtt gtgttacgag caattaagcg agtcagagga ggaaaacgat 120

gaagcagatg gagttagtca tgcacaacta ccagcccgac gagccgaacc acagcgtcac 180

aaaatttttgt gtgtatgttg taagtgtgac ggcagaattg agcttacagt agagagctcg 240

gcagaggacc ttagaacact acagcagctg ttttttgagca ccttgtcctt tgtgtgtccg 300

tggtgtgcaa ctaaccaata a 321

<210> 60
<211> 306
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 51

<400> 60
atgcgtggta atgtaccaca attaaaagat gtagtattgc atttaacacc acagactgaa 60

attgacttgc aatgctacga gcaatttgac agctcagagg aggaggatga agtagataat 120

atgcgtgacc agctaccaga aagacgggct ggacaggcta cgtgttacag aattgaagct 180

ccgtgttgca ggtgttcaag tgtagtacaa ctggcagtgg aaagcagtgg agacaccctt 240

cgcgttgtac agcagatgtt aatgggcgaa ctaagcctgg tttgcccgtg ttgtgcgaac 300

aactag 306

<210> 61
<211> 300
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 52

<400> 61
atgcgtggag acaaagcaac tataaaagat tatatattag atctgcaacc tgaaacaact 60

gacctacact gctatgagca attaggtgac agctcagatg aggaggatac agatggtgtg 120

gaccggccag atggacaagc agaacaagcc acaagcaatt actacattgt gacatattgt 180

cacagttgtg atagcacact acggctatgc attcatagca ctgcgacgga ccttcgtact 240

ctacagcaaa tgctgttggg cacattacaa gttgtgtgcc ccggctgtgc acggctataa 300

<210> 62
<211> 318
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 56

<400> 62
atgcatggta aagtaccaac gctgcaagac gttgtattag aactaacacc tcaaacagaa 60

attgacctac agtgcaatga gcaattggac agctcagagg atgaggatga ggatgaagta 120

gaccatttgc aggagcggcc acagcaagct agacaagcta aacaacatac gtgttaccta 180

atacacgtac cttgttgtga gtgtaagttt gtggtgcagt tggacattca gagtaccaaa 240

gaggacctgc gtgttgtaca acagctgctt atgggtgcgt taacagtaac gtgcccactc 300

tgcgcatcaa gtaactaa 318

<210> 63
<211> 297
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 58

<400> 63
atgagaggaa acaacccaac gctaagagaa tatattttag atttacatcc tgaaccaact 60

gacctattct gctatgagca attatgtgac agctcagacg aggatgaaat aggcttggac 120

gggccagatg gacaagcaca accggccaca gctaattact acattgtaac ttgttgttac 180

acttgtggca ccacggttcg tttgtgtatc aacagtacaa caaccgacgt acgaacccta 240

cagcagctgc ttatgggcac atgtaccatt gtgtgcccta gctgtgcaca gcaataa 297

<210> 64
<211> 324
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 59

<400> 64
atgcatggac caaaagcaac actttgtgac attgttttag atttggaacc acaaaattat 60

gaggaagttg accttgtgtg ctacgagcaa ttacctgact ccgactccga gaatgaaaaa 120

gatgaaccag atggagttaa tcatcctttg ctactagcta gacgagctga accacagcgt 180

cacaacattg tgtgtgtgtg ttgtaagtgt aataatcaac ttcagctagt agtagaaacc 240

tcgcaagacg gattgcgagc cttacagcag ctgtttatgg acacactatc ctttgtgtgt 300

cctttgtgtg cagcaaacca gtaa 324

<210> 65
<211> 333
<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 68

<400> 65
atgcatggac caaagcccac cgtgcaggaa attgtgttag agctatgtcc atacaatgaa 60

atacagccgg ttgaccttgt atgtcacgag caattaggag attcagacga tgaaatagat 120

gaacccgacc atgcagttaa tcaccaccaa catctactac tagccagacg ggacgaacaa 180

cagcgtcaca gaattcagtg tctgtgttgt aagtgtaaca aggcactgca actagtagta 240

gaagcgtcgc gggacaacct gcggacacta caacagctgt ttatggactc actaaatttt 300

gtgtgtccgt ggtgtgcaac tgaaacccag taa 333