

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07K 14/00

(11) 공개번호 특2001-0033618
(43) 공개일자 2001년04월25일

(21) 출원번호 10-2000-7007131
(22) 출원일자 2000년06월24일
 번역문제출일자 2000년06월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1998/08563 (87) 국제공개번호 WO 1999/33868
(86) 국제출원출원일자 1998년12월18일 (87) 국제공개일자 1999년07월08일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나
 감비아 짐바브웨
 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자
 흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑
 스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포
 르투갈 스웨덴 핀란드 사이프러스
 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르
 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비
 쏘
 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바
 이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스
 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀
 란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기
 즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레
 소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니
 아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아
 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간
 다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수
 단 스웨덴 싱가포르 가나 감비아 크로아티아 인도네시아 인도 시에
 라리온 유고슬라비아 짐바브웨 그레나다
(30) 우선권주장 9727262.9 1997년12월24일 영국(GB)
(71) 출원인 스미스클라인 비이참 바이오로지칼즈 에스.에이. 장 스테판느
 벨기에왕국 릭센사르트(비-1330) 루 드 린스티튜트 89
(72) 발명자 달레만스, 빌프리트, 엘., 제이.
 벨기에릭센사르트(비-1330)루드린스티튜트89스미스클라인비이참바이오로지
 칼즈에스.에이.
 제라드, 까뜨린, 마리, 지스레인
 벨기에릭센사르트(비-1330)루드린스티튜트89스미스클라인비이참바이오로지
 칼즈에스.에이.
(74) 대리인 남상선

심사청구 : 없음

(54) 백신

요약

본 발명은 HPV 항원에 대해 T 헬퍼 에피토프를 제공하는 면역학적 융합 파트너와 결합된 인간 유두종바
이러스(HPV) 융합 단백질을 제공한다. HPV 유도 종양의 치료 또는 예방에 유용한 백신 제형이 제공된
다.

명세서

본 발명은 임의로 면역학적 융합 파트너와 결합되고, CpG 함유 올리고뉴클레오타이드와 함께, 인간 유두종
바이러스 유도의 종양 또는 병변의 치료 또는 예방에 유용한 백신으로 제형화된, E6 또는/및 E7, E6, E7
융합 단백질을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 융합 단백질을 함유하는 백신에
관한 것이다. 상기 백신은 인간 유두종 유도 종양의 치료 또는 예방에 유용한 T 헬퍼 에피토프(예컨대,
헤모필루스 인플루엔자 B로부터의 단백질 D) 및 인간 유두종바이러스(예를 들어, 암과 관련된 HPV16 또는
18 균주로부터의 E6 또는 E7 단백질을 포함한다)로부터의 항원을 포함한다. 여기서, 백신은 아췌반

트로서 CpG 함유 올리고뉴클레오타이드와 함께 제형화 된다.

유두종바이러스는 작은 드러난(naked) DNA 종양 바이러스(7.9kb, 이중가닥)이며, 고도로 종 특이적이다. 70개 초과 개개의 인간 유두종바이러스(HPV) 유전형이 기술된다. 유두종바이러스는 종의 기원(사람, 송아지 등) 및 동일한 종으로부터의 다른 다른 유두종바이러스와의 유전적 관련 정도에 따라 분류된다. HPV는 피부 및 점막 표면에 특이적이며, 넓게는 "낮은" 및 "높은" 위험성 바이러스로 분류된다.

낮은 위험성 HPV는 통상 수개월 또는 수년간 지속하는 양성 병변(사마귀, 도는 티눈)을 초래한다. 높은 위험성의 HPV는 전 종양 병변 및 암종과 관련된다. HPV 바이러스와 인간의 암종과의 가장 강력한 양성의 연관 HPV 16 및 18과 경부 암종사이에 존재한다. 10개 초과 다른 HPV 유형이 비록 흔하지는 않으나, HPV31 및 HPV 33을 포함하는 경부 암종에서 또한 발견된다.

성적으로 왕성한 젊은 여성의 생식기에서의 HPV 감염은 흔하며, 대부분의 개체는 감염을 제거하거나, 병변으로 발달되는 경우에는 이를 감퇴시킨다. 감염된 개체중 단지 일부만이 고도의 내피성 종양으로 진행되는 병변을 가지며, 이들 진행성중 단지 일부만이 공격적인 종양으로 발전한다.

HPV 감염을 유도하는 분자적 사건이 완전히 확립되지는 못하였다. 인간의 유두종바이러스를 증식시키기 위한 적절한 시험관내 시스템의 부재는 바이러스 순환에 대한 최상의 정보를 얻는데 대한 진전을 방해했다.

오늘날, 다른 유형의 HPV가 박테리아종의 클로닝 시스템의 도움으로 및 보다 더 최근에는 PCR 증폭에 의해 단리되고 특성화되었다. HPV 게놈의 상기 분자적 조직화는 잘 특성화된 송아지 유두종바이러스 유형 I (BPV I)의 HPV 게놈과 함께 상대적 기초상에서 정의되었다.

비록 소수의 변형이 발생하더라도, 기술된 모든 HPVs 게놈은 7개 이상의 초기 유전자, E1 내지 E7 및 두 개의 후기 유전자 L1 및 L2를 가진다. 또한, 상류 조절영역은 HPV 게놈의 전사의 대부분을 조절하는 것으로 간주되는 조절 서열을 포함한다.

E1 및 E2 유전자는 각각 바이러스의 복제 및 전사의 조절에 포함되고, 바이러스성 통합에 의해 각각 분열되는 경향이 있다. E6 및 E7은 바이러스성 형질전환에 포함된다. E5가 또한 이 과정에 포함된다.

예컨대, HPV 16 및 18과 같이 경부 종양과 관련된 HPVs중에서, 종양원성 (oncogenic) 진행은 바이러스성 DNA의 통합 이후에 개시된다. 상기 통합은 캡시드 단백질 L1 및 L2에 대한 코딩 유전자의 불활성 및 정상적인 세포 분화의 상실 및 종양의 발달을 유도하는 두개의 초기 단백질 E6 및 E7의 연속적인 과발현을 설립하는 E6/E7 오픈 리딩 프레임의 퇴화를 유도하는 E2 억제자 기능의 상실을 코딩하는 유전자의 불활성을 초래한다. E6 및 E7은 각각 주요 종양 억제 단백질, p53 및 pRB, 망막아세포종 유전자 생성물을 불활성화시킴에 의해, 정상적인 세포의 순환을 극복한다.

자궁경부의 종양은 여성에게 있어 흔하며, 전 종양성의 중간 단계를 거쳐 종종 사망을 가져오는 공격적인 종양으로 발전한다. 질환의 중간 단계는 경부 상피내 종양으로 알려졌으며, 심각성의 증가에 따라 I 내지 III 등급으로 분류된다(CIN I-III).

임상적으로, 여성의 항문성기 경도의 HPV 감염은 경부 편평 콘딜로마스에 따라 확산되고, 그의 홀마크는 경부의 판상 상피의 표면세포 및 중간의 세포에 대해 지배적으로 영향을 미치는 코일로사이토시스이다.

바이러스의 세포변성 효과의 결과인 코일로사이트는 핵주위에 클리어 뚜렷한 환을 지닌 다핵성 세포인 것으로 보인다. 상기 상피는 병변의 사마귀같은 외관과 관련된 비정상적인 케라틴화에 의해 두터워진다.

HPV 16 또는 18에 대해 양성인 경우에, 이러한 편평 콘딜로마스는 경부 상피내 종양(CIN) 및 그 자체가 공격적인 경부 암종 병변의 징후로서 간주되는 상피내암(CIS)으로 발전할 수 있는 고도의 위험성이 있다.

종양원성 HPV 감염의 자연적인 경로는 다음의 3단계를 나타낸다, 즉:

- (1) 잠복 감염기,
- (2) 완전한 비리온의 생성과 함께 내핵 바이러스 복제기, 이는 코일로사이트의 발생과 대응한다. 이 단계에서, 상기 HPV는 E2, E5, E6, E7, L1, 및 L2를 포함하는 그의 완전한 범위의 단백질을 생성한다.
- (3) 세포 게놈으로의 바이러스 통합기, 이는 악성 형질전환의 개시를 유발하며, 코일로사이트의 진행성 소멸과 함께 CINII 및 CINIII/CIS에 대응한다. 이 단계에서, E2의 발현은 하향 조절되고, E6 및 E7의 발현은 증가한다. CIN II/III과 CIN III/경부 암종사이에서, 바이러스성 DNA는 기저 세포종의 에피소말 상태에서부터 E6 및 E7 유전자에만(종양 세포) 통합된 형태로 변경된다. 모든 경부 암종의 85%가 HPV16 혈청형과 주로 관련된 판상 세포 암종이다. 10% 및 5%는 각각 아데노암종 및 아데노판상 세포 암종이며, 각각의 유형은 주로 HPV 18 혈청형과 관련된다. 그러나, 다른 종양원성 HPV's도 존재한다.

국제 특허출원 W0 제 96/19496호 은 다양한 인간 유두종바이러스 E6 및 E7 단백질 특허, E6 및 E7 단백질이 모두 결실된 E6/E7 융합 단백질을 개시한다. 이러한 결실된 융합 단백질은 면역유전적이다.

면역조절성 올리고뉴클레오타이드는 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드("CpG")를 함유하며, (W0 제 96/02555호, EP 제 468520호)으로 알려졌다. CpG는 DNA에 존재하는 시토신-구아노신 디뉴클레오타이드 모티프의 약어이다. 역사적으로, BCG의 DNA 분획이 항종양 효과를 나타낼 수 있음이 관찰되었다. 추가적인 연구에서, BCG 유전자 서열로부터 유도된 합성 올리고뉴클레오타이드가 면역자극 효과(생체내 및 시험관내에서)를 유도할 수 있음이 밝혀졌다. 이들 연구의 연구자들은 중심 CG 모티프를 포함하는 어떠한 회귀성(palindromic) 서열이 이러한 활성을 수송한다고 결론지었다. 면역 자극에서 CG 모티프의 중추 역할은 추후에 문헌에서 밝혀졌다(Krieg, Nature 374, p546 1995). 상세한 분석은 CG 모티프가 특정 서열중에 있어야 하며, 그러한 서열이 박테리아의 DNA에는 흔하나, 척추동물의 DNA에는 흔치 않다는 사실

을 밝혔다.

상기 진화적인 차이는 척추동물 면역 시스템이 박테리아 DNA의 존재를 탐지하여(감염중에 발생하는 것으로서), 결과적으로 면역 시스템의 자극을 유도하는 것으로 믿어진다. 상기 Krieg에 의해 정의된 면역자극성 서열은 하기와 같다:

퓨린 퓨린 CG 피리미딘 피리미딘이고, 여기서 CG 모티프는 메틸화되지 않았다. 상기 6개의 뉴클레오타이드의 조합중에, 회귀성 서열이 존재한다. 하나의 모티프의 반복부로서 또는 다른 모티프의 조합으로서, 이러한 모티프중 수개는 동일한 올리고뉴클레오타이드중에 존재할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 하나 이상의 이들 면역자극성 서열의 존재는 다양한 면역 서브세트를 활성화시킬 수 있으며, 이는 천연 킬러 세포(인터페론 γ 를 생성하고, 세포융해 활성을 가진다) 및 마크로파아지(Wooldridge et al Vol 89(no. 8), 1977)를 포함한다. 비록, 이러한 컨센서스 서열을 가지지 않은 다른 비메틸화된 CpG 함유 서열일지라도 면역조절성인 것으로 알려졌다.

본 발명은 임의로 T 세포 에피토프를 가지는, 면역학적 융합 파트너와 결합되고 면역조절성 CpG 함유 올리고뉴클레오타이드로 아쥬반트된 E6 또는/및 E7 또는 E6/E7 융합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

본 발명의 바람직한 형태에서, 면역학적 융합 파트너는 헤모필루스 인플루엔자 B의 단백질 D로부터 유도된다. 바람직하게는, 단백질 D 유도체는 단백질의 처음의 약 1/3, 특히 바람직하게는 처음 N-말단의 약 100-110 아미노산을 포함한다. 단백질 D는 지질화될 수 있다(지질 단백질 D). 다른 면역학적 융합 파트너는 인플루엔자 바이러스, NS1(헤마글루티닌)으로부터의 비구조 단백질을 포함한다. 일반적으로, N 말단의 81 아미노산이 이용되나, 다른 단편도 이들이 T-헬퍼 에피토프를 포함하면 사용될 수 있다.

다른 구체예에서, 상기 면역학적 융합 파트너는 LYTA로서 알려진 단백질이다. 바람직하게는, 상기 분자중 C 말단 부분이 사용된다. Lyta는 N-아세틸-알라닌-아미다제, 아미다제 LYTA, (Lyta 유전자{Gene, 43(1986) p265-272}에 의해 코딩된) 펩티도글리칸 골격중 특정 결합을 특이적으로 퇴화시키는 자가용해소를 합성하는 스트렙토코커스 뉴모니애로부터 유도된다. 상기 LYTA의 C-말단 도메인은 콜린 또는 DEAE와 같은 콜린 유사체에 대한 친화성에 관여한다. 이러한 특성은 융합 단백질의 발현에 용용한 플라스미드를 발현하는 E.Coli C-LYTA의 개발을 위해 조사되었다. 그의 아미노 말단에 C-LYTA를 함유하는 하이브리드 단백질의 정제가 참고문헌에 기술된다[Biotechnology: 10,(1992) p795-798]. 본원에서 사용된 것과 같이, 바람직한 구체예는 잔기 178에서 C 말단 개시중에 발견된 Lyta 분자의 반복부를 이용한다. 특히 바람직한 형태는 잔기 188-305를 통합한다.

따라서, 바람직한 구체예중의 본 발명은 면역 조절성 CpG 올리고뉴클레오타이드 및 융합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 융합 단백질은 HPV16 단백질로부터의 단백질 D-E6, HPV16으로부터의 단백질 D-E7, HPV 18로부터의 D-E7, HPV 18로부터의 D-E6, HPV 16 및 18로부터의 단백질 D E6 E7을 포함한다. 상기 단백질 D 부분은 바람직하게는 단백질 D의 처음의 1/3을 포함한다. 다른 E6 및 E7 단백질이 다른 HPV 서브유형으로부터 이용될 수 있는 것으로 해석된다.

본 발명에서 사용되는 상기 단백질은 바람직하게는 E. Coli중에 발현된다. 바람직한 구체예에서, 단백질은 5 내지 9 사이 및 바람직하게는 6개의 히스티딘 잔기를 포함하는 히스티딘 테일과 함께 발현된다. 이들은 정제를 돕는다.

바람직한 구체예에서, 상기 단백질 E7은 rb(망막아세포종 유전자 생성물)에 대한 결합부위중에 하나 또는 수개의 돌연변이를 수송하고, 따라서 어떠한 잠재적인 형질전환 능력을 제거한다. HPV 16 E7에 대한 바람직한 돌연변이는 Cys₂₄의 글리신으로의 치환, 또는 글루탐산₂₆의 글루타민으로의 치환을 포함한다.

바람직한 구체예에서, E7 단백질은 이들 돌연변이 양자를 모두를 포함한다.

HPV 18 E7의 바람직한 돌연변이는 Cys₂₇의 글리신으로의 치환 및/또는 글루탐산₂₉의 글루타민으로의 치환을 포함한다. 또한 바람직하게는, 돌연변이 양자가 모두 존재한다.

단일 또는 이중의 돌연변이가 또한 어떠한 잠재적인 형질전환 능력을 제거하기 위해 E₆의 p53영역에 도입될 수 있다.

본 발명의 추가의 구체예에서, 면역학적 융합 파트너 및 CpG 면역조절성 올리고뉴클레오타이드와 결합된 HPV로부터의 E6E7 융합 단백질이 제공된다.

본 발명의 백신은 바람직하게 Th1 면역 반응을 유도한다.

헬퍼 T 세포의 두가지 주된 유형이 Th1 및 Th2로 특성화되었으며, 이들은 분비하는 시토킨의 형태가 다르다. 이들 시토킨은 2가지의 다른 유형의 면역 반응의 발달 이면의 구동력으로서 고려될 수 있다: 면역 반응의 Th1 유형은 세포 매개 작동체 메카니즘 예컨대, T-림프구에 의한 INF- γ 및 IL-2 시토킨의 생산과 관련된다. 차례로 다른 세포를 활성화시켜 다른 중요한 시토킨 및 매개체를 분비하게 할 수 있다(INF- γ -활성화된 NK 세포는 IL12를 생성시키고, IL2-활성화된 NK 세포는 림프킨 활성화된 킬러 세포(LAK)로 형질전환되며, INF- γ -활성화된 마크로파아지는 TNFa, IL1, IL6류의 감염성 매개체를 분비시키고, 산화 질소를 방출시키며, IL2는 항원 특이적, 단상형 제한 세포독성 T 림프구(CTL)의 분화를 돕는다. 마우스중의 항체 수준에서, 면역 반응의 Th-1유형은 또한 IgG2 아이소타이프(Balb/c 마우스중의 IgG2a 및 C57BL/6 마우스중의 IgG2b)의 항체 생산과 관련된다.

면역 반응의 Th2 유형은 마우스중의 IgG1, IgA, 및 IgM을 포함하는 면역글로불린 아이소타이프의 광범위한 생산에 의해, IL4, IL5, IL6, IL10류 시토킨의 생산과 함께, 항원에 대한 체액의 면역반응과 관련된다.

인간에서, Th1 및 Th2 유형 면역반응의 구별은 절대적인 것은 아니다. 하나의 개체는 Th1이 지배적이거나 Th2가 지배적인 면역반응을 지니한다. 그러나, 시토킨 계열을 모스만 및 코프만에 의해 쥐의 CD4+ve

T 세포 클로닝중에 기술된 것에 따라 고려하는 것이 종종 편리하다(Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.(1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173).

인간에서, TH1 유형 반응은 또한 IgG1형 항체와 대응하는 마우스중의 CT1 및 IgG2 아이소타이프의 존재와 함께, 시토킨(IFN γ and IL2)의 존재와 관련된다.

상기 유형 1 표현형은 암종의 처치는 물론 바이러스 및 세포내 박테리아 감염에 대한 보호에 있어 특히 중요하다.

재조합 기법으로 본 발명에서 사용된 단백질을 제조하기 위해, T 세포 헬퍼 에피토프를 제공하는 면역학적 융합 파트너인 헤모필루스 인플루엔자 B로부터의 단백질 D의 1/3-N-말단 부분에 대한 E7, E6 또는 E6/E7 융합의 융합을 포함하는 발현 기법이 사용될 수 있다. 친화성 폴리히스티딘 테일은 융합 단백질의 카복시 말단에서 조작되며, 이는 단순화된 정제를 허용한다. 이러한 재조합된 항원은 E. Coli에서 불용성 단백질로서 과발현된다.

본 발명의 단백질은 트랜스중에서 티오레독신(TIT)과 공발현될 수 있다. 시스에서 트랜스 바이러스중 티오레독신과의 공발현은 단백질 분해효소의 필요 없이 항원을 티오레독신 없이 유지시키는데 바람직하다. 티오레독신 공발현은 본 발명의 단백질이 쉽게 용해되도록 한다. 티오레독신 공발현은 단백질 정제 분야, 정제된 단백질 용해성 및 품질에 상당한 영향을 가진다.

복제성 발현 벡터가 본 발명에 따라 본래의 리플리콘을 갖는 직쇄상 DNA 단편을 제공하도록 숙주 세포 적합성인 벡터를 절단하고, 상기 직쇄상 단편을 하나 이상의 DNA 분자와 결합시킴에 의해 제조될 수 있다. 상기 하나 이상의 DNA 분자는 직쇄상의 단편과 함께 부착되는 조건에서 목적하는 생성물 예컨데, 본 발명의 단백질을 엔코딩하는 DNA 중합체, 또는 그의 유도체를 엔코딩한다.

따라서, 목적하는 바와 같이 DNA 중합체가 벡터의 구성중에 예비 형성되거나 형성될 수 있다.

벡터의 선택은 부분적으로는 숙주 세포에 의해 결정될 수 있으며, 숙주세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있으나, 바람직하게는 E. Coli이다. 적합한 벡터로는 플라스미드, 박테리오파아지, 코스미드 및 재조합된 바이러스가 포함된다.

복제성 발현 벡터의 제조는 일반적으로 DNA의 제한, 중합화, 및 부착을 위한 효소를 사용하여, 예를 들어 상기한 참고문헌(Maniatis et al)에 기술된 방법을 따라 수행될 수 있다.

재조합된 숙주 세포가 본 발명에 따라, 형질전환 조건에서 숙주세포를 본 발명의 복제성 발현 벡터를 사용하여 형질전환시킴에 의해 제조될 수 있다. 적절한 형질전환 조건은 공지이며, 참고문헌에 기술된다(예를 들어 상기한 Maniatis et al, 또는 "DNA 클로닝" Vol. II, D.M. Glover ed., IRL Ltd, 1985).

형질전환 조건의 선택은 숙주에 따라 결정된다. 이와 같이, 박테리아성 숙주 예컨데, E. coli는 CaCl₂(Cohen et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110)의 용액 또는 RbCl, MnCl₂, 아세트산 칼륨 및 글리세롤의 혼합물을 포함하는 용액으로 처리되고, 다음 3-{N-모르폴리노}-프로판-술폰산, RbCl 및 글리세롤을 사용하여 처리될 수 있다. 배양중인 포유동물세포는 세포상으로의 벡터 DNA의 칼슘 공침에 의해 형질전환될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 복제성 발현 벡터를 사용한 숙주 세포의 형질전환으로 확장된다.

형질전환된 숙주 세포를 DNA 중합체의 발현을 허용하는 조건에서 배양시키는 것은 상기와 같이 일반적인 방법으로 수행된다(예를 들어, Maniatis et al, 또는 "DNA 클로닝"). 이와 같이 바람직하게는, 상기 세포는 50°C미만의 온도에서 양분과 함께 배양된다.

상기 생성물은 숙주 세포에 따라 공지의 방법을 사용하여 회수된다. 이와 같이, 숙주 세포가 박테리아인 예컨데, E.coli인 경우에, 숙주 세포는 물리적, 화학적, 또는 효소적으로 분해되고 단백질 생성물은 분해물로부터 분리된다. 숙주세포가 포유동물의 세포인 경우에, 상기 생성물은 일반적으로 영양 배지 및 세포 부재 추출물로부터 분리될 수 있다. 공지의 단백질 분리 방법은 선택적 침전, 흡착 크로마토그래피, 및 모노클로날 항체 친화성 컬럼을 포함하는 친화성 크로마토그래피를 포함한다.

본 발명의 단백질이 히스티딘 테일(His Tag)과 함께 발현되는 경우. 상기 단백질은 금속 이온 친화성 크로마토그래피 컬럼 (IMAC) 컬럼을 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 용이하게 정제될 수 있다.

제 2의 크로마토그래피 단계 예컨데, Q-세파로스가 고도로 정제된 단백질을 산출시키기 위해 IMAC 컬럼의 사용 이전 또는 이후에 사용될 수 있다. 면역학적 융합 파트너가 C-LYTA인 경우, 이러한 생성물을 정제하기 위해 콜린 및/또는 DEAE에 대한 CLYTA의 친화성을 이용할 수 있다. C-LYTA 및 그의 태그를 함유하는 생성물은 분화 친화성 크로마토그래피를 사용하는 2 단계의 공정에 의해 용이하고 효과적으로 정제될 수 있다. 제 1의 단계는 IMAC에 대한 His tag의 친화성을 포함하며, 제 2의 단계는 콜린 또는 DEAE에 대한 LYTA의 C-말단 도메인의 친화성을 포함한다.

바람직한 백신 조성물은 HPV 16으로부터의 단백질 D-E6 또는 그의 유도체와 함께 HPV 16으로부터의 단백질 D-E7 중 하나 이상을 포함한다. 대안적으로, E6 및 E7이 단일 분자에 존재할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 D E6/E7 융합이다. 이러한 백신은 임의로 HPV 18로부터의 E6 단백질 및 E7 단백질중 어느 하나 또는 양자 모두를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 D-E6 또는 단백질 D-E7 융합 단백질 형태 또는 단백질 D E6/E7 융합 단백질 형태이다. 본 발명의 백신은 HPV 16 또는 18로부터의 다른 HPV 항원을 포함할 수 있다. 특히, 상기 백신은 L1 또는 L2 항원 모노머를 포함할 수 있다. 대안적으로, 이러한 L1 또는 L2 항원은 바이러스류 입자로서 함께 존재하거나, 바이러스류 입자 또는 캡소머(capsomer) 구조로서 L1 단독의 단백질로 존재할 수 있다. 이러한 항원, 바이러스류 입자 및 캡소머는 그 자체로서 공지이다. 예를 들어, W094/00152, W094/20137, W094/05792, 및 W093/02184를 참조할 수 있다. 부가의 초기 단백질 예를 들어, E2 또는 바람직하게는 E5가 포함될 수 있다. 본 발명의 백신은 추가적인

로 다른 HPV 균주로부터의 항원, 바람직하게는 균주 HPV 6, 11, 31, 또는 33으로부터의 항원을 포함할 수 있다.

백신의 제법은 일반적으로 참고문헌에 기술된다(Vaccine Design-The subunit and adjuvant approach (Ed Powell and Newman) Pharmaceutical Biotechnology Vol. 6 Plenum Press 1995). 리포솜중에 캡슐화되는 것은 Fullerton, 미국특허 제 4,235,877호에 기술된다.

바람직한 올리고뉴클레오타이드는 6개 이상의 뉴클레오타이드에 의해 구분된, 바람직하게는 2개 이상의 CpG 모티프를 함유한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 통상 대옥시뉴클레오타이드이다. 바람직한 구체에서, 올리고뉴클레오타이드중 인터뉴클레오타이드는, 비록 포스포다이에스테르 및 다른 인터뉴클레오타이드 결합이 혼합된 인터뉴클레오타이드 결합을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명의 범위내에 있다고 하더라도, 포스포로디티오에이트, 또는 보다 더 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이다.

바람직한 올리고뉴클레오타이드는 하기의 서열을 가진다: 하기 서열은 바람직하게는 모두 포스포로티오에이트 변형된 인터뉴클레오타이드 결합을 함유한다.

올리고 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

올리고 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT

올리고 3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

본 발명에서 사용된 상기 CpG 올리고뉴클레오타이드는 종래기술에 알려진 방법에 따라 합성될 수 있다(예를 들어, EP 468520). 편리하게도, 이러한 올리고뉴클레오타이드는 자동화된 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 또는 포스포로디티오에이트의 생성 방법이 미국특허 제 5,666,153호, 미국특허 제 5,278,302호, 및 W095/26204에 기술된다.

본 발명을 하기 실시예에 기초하여 보다 더 구체적으로 기술한다.

실시예 1: E.coli 균주 발현 융합 단백질-D1/3-E7-His(HPV16)의 구성

1) 발현 플라스미드의 구성

a) 플라스미드 pMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)는 pMG81(W097/01640)으로 공개된 UK 특허출원 제 951 3261.9호에 기술)이며, 여기서 인플루엔자로부터의 코딩 영역 NS1의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr127에 대응하는 코돈, 순형(biotype) 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)으로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음으로 다중 코딩 부위(11잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6His)의 코딩 영역이 이어지게 했다. 상기 플라스미드를 융합 단백질 D1/3-E7-His의 발현에 사용하였다.

b) -HPV 게놈성 E6 및 E7 서열 유형 HPV 16(참고문헌, Dorf et al., Virology 1985, 145, p.181-185)를 pBR332(Deutschs Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum fur human pathogen Papillimavirus - D 69120-Heidelberg로부터 입수)중에 클로닝시킨 총 길이의 HPV 16으로부터 증폭시키고, TCA301(=pRIT14462)를 생성시키기 위해 pUC19로 서브클로닝시켰다.

플라스미드 TCA308(=pRIT14501)의 구성: 융합 단백질-D1/3-E7-His를 발현시키는 플라스미드

E7 단백질의 아미노산 1 → 98에 대응하는 뉴클레오타이드 서열을 pRIT14462로부터 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응중에, NcoI 및 SpeI 제한 부위를 E7 서열의 5' 및 3' 말단에서 생성시키고 플라스미드 TCA308(=pRIT14501)을 생성하도록 플라스미드 pMG MCS Prot D1/3의 같은 자리에 삽입시켰다. 상기의 삽입체를 중합효소 연쇄반응중에 어떠한 변형도 없었음을 확인하기 위해 서열화시켰다. 융합 단백질-D1/3-E7-His(HPV)에 대한 상기 서열을 서열번호 1로 나타내고, 상기 코딩 서열을 서열번호 2로 나타냈다.

2)-AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14501을 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결합성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3)-박테리아성 균주의 증식 및 유도-Prot-D1/3-E7-His의 발현

플라스미드 pRIT14501과 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30°C에서, 카나마이신 50μg/ml를 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39°C로 이동시키고 단백질 D1/3-E7-His의 합성을 개시시켰다. 39°C에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20°C에서 저장했다.

실시예 II: 융합 단백질-D1/3-E6-his/HPV16를 발현하는 E.coli의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

a) 플라스미드 pMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)는 pMG81(W097/0640)에 기술됨), 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음으로 다중 코딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역이 이어지게 했다. 상기 플라스미드를 융합 단백질 D1/3-E6-his의 발현에 사용하였다.

b) HPV 게놈성 E6 및 E7 서열 유형 HPV 16(참고문헌, Dorf et al., Virology 1985, 145, p.181-185)를 pBR332(Deutschs Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum fur human pathogen Papillimavirus - D 69120-Heidelberg로부터 입수)중에 클로닝시킨 총 길이의 HPV 16으로부터 증폭시켰다.

c) TCA301(=pRIT14462)를 생성시키기 위해 pUC19로 서브클로닝시켰다.

플라스미드 TCA307(=pRT14497)의 구성: 융합 단백질-D1/3-E6-His/HPV16을 발현하는 플라스미드

E6 단백질의 아미노산 1 → 151에 대응하는 뉴클레오티드 서열을 pRIT14462로부터 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응중에, Nco I 및 Spe I 제한 부위를 E6 서열의 5' 및 3' 말단에서 생성시키고, 플라스미드 TCA307(=pRIT14497)을 생성하도록 플라스미드 pMGMCs Prot D1/3의 같은 자리에 삽입시켰다. 상기의 삽입체를 중합효소 연쇄반응중에 어떠한 변형도 없었음을 확인하기 위해 서열화시켰다. 융합 단백질-D1/3-E6-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 3 및 서열번호 4로 나타냈다.

2. AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14497을 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ 용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3. 박테리아성 균주의 증식 및 유도 - Prot-D1/3-E6-His의 발현

플라스미드 pRIT14497과 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30℃에서, 카나마이신 50μg/ml을 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고 단백질 D1/3-E6-his의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장시켰다.

4. 융합 단백질 D1/3-E6-his(HPV)의 특성화

추출물의 제조

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20,000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16,000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

Coomassie-염색된 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯상에서의 분석

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠릿 분획중에 편중된 약 32kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질-D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다.

5. 티오레독신의 공발현

HPV 18(실시에 IX)로부터의 단백질 D1/3 E7 His의 발현과 유사한 유형으로, E.coli 균주 AR58을 티오레독신 및 단백질 D1/3 E7 His(HPV 16)을 엔코딩하는 플라스미드로 형질전환시켰다.

실시에 III: 융합 단백질-D1/3-E6E7-his / HPV16을 발현하는 E.coli의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

a) 플라스미드 pMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)는 pMG81(상기 기술됨)의 유도체이며, 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr 127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음에 다중 코딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역이 이어지게했다. 상기 플라스미드를 융합 단백질 D1/3-E6E7-his의 발현에 사용하였다.

b) HPV 게놈성 E6 및 E7 서열 유형 HPV 16(참고문헌, Dorf et al., Virology 1985, 145, p.181-185)를 pBR332(Deutschs Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum fur human pathogen Papillimavirus - D 69120-Heidelberg로부터 입수)중에 클로닝시킨 총 길이의 HPV 16으로부터 증폭시키고 TCA301(=pRIT14462)를 생성시키기 위해 pUC19로 서브클로닝시켰다.

c) TCA301(=pRIT14462)중에 E6 및 E7에 대한 코딩서열을 E6의 종료 코돈을 제거시키고, TCA309(=pRIT14556)중에 융합된 E6 및 E7 코딩 서열을 생성시키기 위해 E6 및 E7 유전자 사이의 5 뉴클레오티드의 결실을 도입하는, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터(Af1 III 및 Nsi I 부위 사이에 삽입)를 사용하여 변형시켰다.

플라스미드 TCA311(=pRT14512)의 구성: 융합 단백질-D1/3-E6E7-His/HPV16을 발현시키는 플라스미드

융합된 E6E7 단백질의 아미노산 1 → 249에 대응하는 뉴클레오티드 서열을 pRIT14556로부터 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응중에, Nco I 및 Spe I 제한 부위를 E6 서열의 5' 및 3' 말단에서 생성시키고, 플라스미드 TCA311(=pRIT14512)을 생성하도록 플라스미드 pMGMCs Prot D1/3의 동일한 부위에 삽입시켰다. 상기의 삽입체를 중합효소 연쇄반응중에 어떠한 변형도 없었음을 확인시키기 위해 서열화시켰다. 융합 단백질-D E6/E7 1/3-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 5 및 서열번호 6으로 기술했다.

2. AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14512를 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ 용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3. 박테리아성 균주의 증식 및 유도 - Prot-D1/3-E6E7-His의 발현

플라스미드 pRIT14512와 함께 형질전환된 AR58 세포를 30℃에서, 카나마이신 50μg/ml을 첨가한 LB 배지

100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고 단백질 D1/3-E6E7-his의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장시켰다.

4. 융합 단백질 D1/3-E6E7-his(HPV)의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20,000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서 16,000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크리아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠릿 분획중에 편중된 약 48kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질-D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다.

실시예: IV

유사한 유형으로 HPV 16으로부터의 지질 D 1/3 및 E6-E7의 융합 단백질을 티오레독신의 존재하에 E.coli에서 발현시켰다. 상기 전구 단백질(388aa)의 N-말단은 MDP 잔기를 함유시켰으며, 후속하여 성숙된 단백질(370aa)을 생산하기 위해 생체내에서 절단될 지질 단백질 D(헤모필루스 인플루엔자로부터)의 시그널 펩티드의 16개 아미노산이 이어지도록 했다. 지질단백질 부분(aa 1내지 127)에 후속하여 융합된 형태의 단백질 E6 및 E7이 이어지도록 했다. 단백질의 상기 C 말단을 TSG HHHHHH에 의해 연장시켰다.

실시예 V: 융합 ProtD1/3-E7을 발현하는 E.coli 균주 B1002의 구성

돌연변이된 (cys24→gly, glu26→gln) 유형 HPV16

1)-발현 플라스미드의 구성

출발물질:

a)-융합 ProtD1/3-E7-His를 코딩하는 플라스미드 pRIT 14501(=TCA 308)

b)-플라스미드 LITMUS 28(New England Biolabs cat n° 306-28), pUC 유도된 클로닝 벡터,

c)-플라스미드 pMG MCS ProtD1/3(pRIT 14589), pMG81(상기 기술됨)의 유도체, 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)으로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음에 다중 코딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역이 이어지게 했다.

플라스미드 pRIT 14733(=TCA347)의 구성: His tail과 함께 돌연변이된 (cys24→gly, glu26→gln) 융합 단백질 D1/3-E7을 발현시키는 플라스미드

HPV 16으로부터의 E7 유전자 코딩 서열을 함유하고, His 테일과 함께 연장된 pRIT 14501(=TCA 308)로부터의 Nco I-Xba I 단편을 pRIT 14909(=TCA 337)을 생성시키기 위한 돌연변이에 유용한 매개 벡터 리트무스 28중에 서브클로닝시켰다. 이중 돌연변이 cys24→gly(Edmonds and Vousden, J.Virology 63: 2650(1989)) 및 glu26→gln(Phelps et al., J.Virology 66:2418-27(1992))를 망막아세포종 유전자 (pRB)의 항종양원성 생성물과의 결합을 손상시키기 위해 선택했다. 플라스미드 pRIT 14681(=TCA 343)을 생성시키기 위해 "Quick Change Site directed Mutagenesis" 키트(Stratagene cat n 200518)를 사용하여 E7 유전자중에 돌연변이를 도입시켰다. 서열화에 의해 돌연변이의 존재 및 완성된 E7 유전자의 통합을 확인한 후, 플라스미드 pRIT 14733(=TCA 347) 단백질 및 코딩 서열을 생성시키기 위해 상기 돌연변이시킨 E7 유전자를 벡터 pRIT 14589(=pMG MCS ProtD1/3)중에 도입시켰다.

상기 융합 단백질D1/3-E7 돌연변이된 (cys24→gly, glu26→gln)-His를 서열번호 7 및 8에 나타냈다.

2)-ProtD1/3-E7 돌연변이된(cys24→gly, glu26→gln)-His/HPV16을 발현시키는 균주 B1002의 구성

플라스미드 pRIT 14733을 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결합성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3)-박테리아성 균주 B1002의 증식 및 유도 - ProtD1/3-E7 돌연변이된 (cys24→gly, glu26→gln)-His/HPV16의 발현

플라스미드 pRIT 14733(B1002균주)과 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30℃에서, 카나마이신 50μgr/ml을 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고 ProtD1/3-E7 돌연변이된-His/HPV16의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장시켰다.

4)-융합 ProtD1/3-E7 돌연변이(cys24→gly, glu26→gln)-His형 HPV16의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20,000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16,000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크리아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠릿 분획중에 편중된 약 33kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 22 J 70 항단백질 D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다.

B1002세포를 배양조로부터 원심분리하여 분리시켰다. 농축시킨 B1002세포를 -65°C에서 저장시켰다.

실시에 VI: 융합 clyta-E6-his(HPV16)를 발현하는 E.coli 균주의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

a) 융합 ProtD1/3-E6-His/HPV16을 코딩하는 플라스미드 pRIT14497(=TCA307).

b) 플라스미드 pRIT14661(=DVA2), 스트렙토코커스 뉴모니아의 Lyta의 117 C-말단 코돈에 대한 코딩서열을 함유하는 벡터. Lyta는 N-아세틸-L-알라닌 아미다제를 합성하는 스트렙토코커스 뉴모니아로부터 유도된다. (펩티도글리칸 골격중의 특정 결합을 특이적으로 퇴화시키는 자가용해소, lyta 유전자{Gene, 43(1986) pag 265-272}에 의해 코딩된}. 상기 LYTA의 C-말단 도메인은 콜린 또는 DEAE와 같은 콜린 유사체에 대한 친화성에 관련된다.

1.b 플라스미드 pRIT 14634(=TCA332)의 구성: 융합 clyta-E6-his(HPV16)를 발현하는 플라스미드

a) 제 1단계에서, 커다란 Nco I -Af1II 제한 단편을 플라스미드 pRIT14497로부터 정제하고, 작은 Af1II -Af1III 제한 단편을 플라스미드 pRIT14661로부터 정제시켰다.

b) 제 2단계에서, clyta 서열을 플라스미드 pRIT 14634(=TCA332)를 생성시키는 E7-His 서열(Nco I 및 Af1III은 제한 부위에 적합하다)과 결합시켰으며, pL 프로모터의 조절하에 융합 단백질 clyta-E6-His를 코딩시켰다.

융합 단백질 clyta-E6-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 9 및 10으로 나타냈다.

AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14634를 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

박테리아성 균주의 증식 및 유도 - clyta-E6-His의 발현

플라스미드 pRIT14634와 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30°C에서, 카나마이신 50μg/ml을 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39°C로 이동시키고 단백질 clyta-E6-his의 합성을 개시시켰다. 39°C에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20°C에서 저장시켰다.

4. 융합 clyta-E6-his의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20.000psi(3파시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4°C하에서, 16.000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠릿 분획중에 편중된 약 33kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질-D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다. 발현 수준은 전체 단백질의 약 3%를 나타냈다.

실시에 VII: 융합 clyta-E7-his(HPV16)를 발현하는 E.coli 균주의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

1.a 출발물질

a) 융합 ProtD1/3-E7-His/HPV16을 코딩하는 플라스미드 pRIT14501(=TCA308).

b) 스트렙토코커스 뉴모니아의 Lyta의 117 C-말단 코돈에 대한 코딩 서열을 함유하는 매개 벡터, 플라스미드 pRIT14661(=DVA2).

1.b 플라스미드 pRIT14626(=TCA330)의 구성: 융합 clyta-E7-His/HPV16을 발현하는 플라스미드

a) 제 1단계에서, 커다란 Nco I -Af1II 제한 단편을 플라스미드 pRIT14501로부터 정제하고, 작은 Af1II -Af1III 제한 단편을 플라스미드 pRIT14661로부터 정제시켰다.

b) 제 2단계에서, clyta 서열을 플라스미드 pRIT 14626(=TCA330)을 생성시키는 E7-His 서열(Nco I 및 Af1III은 제한 부위에 적합하다)과 결합시켰으며, pL 프로모터의 조절하에 융합 단백질 clyta-E7-His를 코딩시켰다.

융합 단백질 clyta-E7-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 11 및 12로 나타냈다.

2. AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14626을 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ 용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3. 박테리아성 균주의 배양 및 유도 - clyta-E7-His의 발현

플라스미드 pRIT14626와 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30℃에서, 카나마이신 50μgr/ml을 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고 단백질 clyta-E7-his의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장시켰다.

4. 융합 clyta-E7-his의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20.000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16.000g으로 30분동안 원심분리시켰다. 상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠릿 분획중에 편중된 약 35kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질-D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다. 발현 수준은 전체 단백질의 약 5%를 나타냈다.

실시에 VIII: 융합 clyta-E6E7-his(HPV16)를 발현하는 E.coli 균주의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

1.a 출발 물질

a) 융합 ProtD1/3-E6E7-His/HPV16을 코딩하는 플라스미드 pRIT14512 (=TCA311).

b) 스트렙토코커스 뉴모니애의 LytA의 117 C-말단 코돈에 대한 코딩 서열을 함유하는 매개 벡터, 플라스미드 pRIT14661(=OVA2).

1.b 플라스미드 pRIT14629(=TCA331)의 구성: 융합 clyta-E6E7-His/HPV16을 발현하는 플라스미드

a) 제 1단계에서, 커다란 Nco I -Af1II 제한 단편을 플라스미드 pRIT14512로부터 정제하고, 작은 Af1II - Af1III 제한 단편을 플라스미드 pRIT14661로부터 정제시켰다.

b) 제 2단계에서, clyta 서열을 플라스미드 pRIT 14629(=TCA331)을 생성시키는 E7-His 서열(Nco I 및 Af1III은 적합성 제한 부위이다)과 결합시켰으며, pL 프로모터의 조절하에 융합 단백질 clyta-E6E7-His를 코딩시켰다.

융합 단백질 clyta-E6E7-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 13 및 14로 나타냈다.

2. AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14629를 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결합성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3. 박테리아성 균주의 증식 및 유도 - clyta-E7-His의 발현

플라스미드 pRIT14629와 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30℃에서, 카나마이신 50μgr/ml을 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고 단백질 clyta-E6E7-his의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장시켰다.

4. 융합 clyta-E6E7-his의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20.000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16.000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠릿 분획중에 편중된 약 48kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질-D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다. 발현 수준은 전체 단백질의 약 5%를 나타냈다.

실시에 IX: ProtD1/3 E7 his(HPV18)(E.coli B1011)

트랜스중(E.coli B1012)의 티오레독신과 공발현시킨 단백질D1/3 E7 his/HPV18

1) 발현 플라스미드의 구성

1).a. 단백질-D1/3-E7 His/HPV18을 발현시키는 플라스미드, 플라스미드 TCA316(=pRIT 14532)의 구성

출발물질

a)-플라스미드 pMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)는 pMG81(W097/0640)에 공개된 영국 특허출원 제 951 3261.9호에 기술)의 유도체이며, 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr 127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음에 다중 코

딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역이 이어지게 했다. 상기 플라스미드를 융합 단백질 D1/3-E7-his의 발현에 사용하였다.

b) 원형(prototype) HPV 18의 HPV 게놈성 E6 및 E7 서열(참고문헌, Cole et al., J.Mol.Biol.(1987)193,599-608)을 pBR332(Deutsches Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum für human pathogen Papillomavirus - D 69120-Heidelberg로부터 입수)중에 클로닝시킨 총 길이의 HPV 16으로부터 증폭시키고, TCA302 (=pRIT14467)를 생성시키기 위해 pUC19로 서브클로닝시켰다.

플라스미드 TCA316(=pRIT14532)의 구성

E7 단백질의 아미노산 1 → 105에 대응하는 뉴클레오티드 서열을 pRIT14467로부터 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응중에, Nco I 및 Spe I 제한 부위를 E7 서열의 5' 및 3' 말단에서 생성시키고 플라스미드 TCA316(=pRIT14532)을 생성하도록 플라스미드 pMGCS Prot D1/3의 같은 자리에 삽입시켰다. 상기의 삽입체를 서열화시키고, E7/HPV18 원형 서열대 변형을 글루탐산에 의한 글리산의 치환을 생성시키는 E7 유전자(뉴클레오티드 128 G→A)중에서 확인하였다(E7중의 43aa, 융합 단백질중의 156 위치). 융합 단백질-D-1/3-E7-His/HPV18에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 15 및 16으로 나타냈다.

1).b. 플라스미드 TCA313(pRIT14523)의 구성: 티오레독신 발현 플라스미드

출발물질

a)-Co1E1 또는 P15a 복제 오리진을 함유하는 플라스미드와 적합성인 플라스미드 pBBR1MCS4(Anotine R. and C. Loch, Mol.Microbiol, 1992,6,1785-1799; M.E.Kovach et al, Biotechniques 16, (5), 800-802).

b)-람다 파아지의 프로모터 pL의 서열을 함유하는 플라스미드 pMG42 (W093/04175에 기술됨).

c)-AspA 전사 종결자가 후속하는 티오레독신 코딩 서열을 함유하는 플라스미드 pTRX(Invitrogen, kit Thiofusion K350-01).

플라스미드 TCA313(=pRIT 14523)의 구성

pL 프로모터 및 pTRX로부터의 Nde I - Hind III 단편을 함유하고, AspA 종결자가 후속하는 티오레독신에 대한 코딩서열을 함유하는, pMG42로부터의 Ecor I -Nde I 단편을 플라스미드 TCA313(=pRIT14523)을 생성시키기 위해 정제하고, 플라스미드 벡터 pBBR1MCS4의 Ecor I 및 Hind III 위치로 결합시켰다.

티오레독신에 대한 코딩 서열을 서열번호 17로 나타냈다.

2)-AR58 균주의 형질전환

2).a. ProtD1/3-E7-His/HPV18을 발현시키는 균주 B1011의 수득

플라스미드 pRIT14532를 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중에, 카나마이신에 대해 내성인 형질전환체를 선택함에 의해 도입시켰다.

2).b. ProtD1/3-E7-His/HPV18 및 티오레독신을 발현하는 균주 B1012의 구성

플라스미드 pRIT14532를 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ 용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중에, 카나마이신 및 암피실린 이중 내성인 형질전환체를 선택함에 의해 도입시켰다.

3)-박테리아성 균주 B1011 및 B1012의 증식 및 유도 - 트랜스중의 티오레독신과 함께 또는 없이 Prot-D1/3-E7-His/HPV18의 발현

플라스미드 pRIT14532(B1011 균주)와 함께 형질전환시킨 AR58 세포와 플라스미드 pRIT14532 및 pRIT14523(B1012 균주)과 함께 형질전환시킨 AR58 세포를, 30℃하에서, B1011 균주에 대해서는 카나마이신 50μgr/ml를 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양하고, B1012 균주에 대해서는 카나마이신 50μgr/ml와 암피실린 100μgr/ml를 첨가한 배지중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고, 단백질 D1/3-E7-his/HPV18 및 티오레독신의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다.

융합 단백질 D1/3-E7-his/HPV의 특성화

추출물의 제조

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 재현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco내에서 20.000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16.000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

Coomassie 염색된 SDS-폴리아크릴아미드 겔 및 웨스턴 블롯상의 분석

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠렛의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

융합 단백질 ProtD1/3-E7-His(약 31kDa)를 균주 B1011에 대한 펠렛 분획중의 Coomassie 염색된 겔에 의해 가시화시키고, 균주 B1012에 대한 상등 분획중에 부분적으로 편중시켰으며(30%), 토끼의 폴리클로날 항단백질-D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체에 의한 웨스턴 블롯에서 동정하였다. 발현 수준은 Coomassie 염색된 SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 볼 수 있는 바와 같이, 전체 단백질의 약 1-3%를 나타냈다.

균주 B1012의 추출물에 대해서는, 상기 티오레독신(약 12kDa)을 상등액중의 Coomassie 염색된 겔에 의해

가시화시키고, 웨스턴 블롯에서 모노클로날 항티오레독신(Invitrogen R920-25)에 의해 단리시켰다.

실시에 X: 융합 ProtD1/3-E7을 발현하는 E.coli 균주 B1002의 구성

돌연변이된 (cys27→gly, glu29→gln) 유형 HPV18

1)-발현 플라스미드의 구성

출발물질:

a)-융합 ProtD1/3-E7-His을 코딩하는 플라스미드 pRIT 14532(=TCA 316)

b)-pUC 유도된 클로닝 벡터, 플라스미드 LITMUS 28(New England Biolabs cat n° 306-28),

c)-플라스미드 pMG MCS ProtD1/3(pRIT 14589), pMG81(상기 기술됨)의 유도체, 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)으로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음에 다중 코딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역에 이어지도록 하였다.

플라스미드 pRIT 14831(=TCA355)의 구성: His tail과 함께 돌연변이된 (cys27→gly, glu29→gln) 융합 단백질 D1/3-E7을 발현시키는 플라스미드

HPV 18으로부터의 E7 유전자 코딩 서열을 함유하고 His 테일과 함께 연장된 pRIT 14532(=TCA 316)로부터의 Nco I-Xba I 단편을 pRIT 14910(=TCA 348)을 생성시키기 위한 돌연변이에 유용한 매개 벡터 리트무스 28중에 서브클로닝시켰다. E7/HPV16과의 상사성에 의해, 이중 돌연변이 cys27→gly 및 glu29→gln를 망막아세포종 유전자(pRB)의 항종양원성 생성물과의 결합을 손상시키기 위해 선택했다.

"Quick Change Site directed Mutagenesis" 키트(Stratagene cat n 200518)를 사용하여 E7 유전자중에 돌연변이를 도입시켰다. pRIT 14532의 서열화가 HPV18의 원형 서열중에서 E7의 43 위치에 글리신이 아닌 글루탐산이 존재하는 것을 밝힘에 따라, 돌연변이의 제 2의 순환을 제 43 위치에 글리신의 도입시키기 위해 수행시켰다. 본 발명자들은 플라스미드 pRIT14829(=TCA353)을 수득했다. 서열화를 통해 돌연변이의 존재 및 완성된 E7 유전자의 통합을 확인한 후, 플라스미드 pRIT 14831(=TCA 353)을 생성시키기 위해 상기 돌연변이시킨 E7 유전자를 벡터 pRIT 14829(=pMG MCS ProtD1/3)중에 도입시켰다.

상기 융합 단백질-D1/3-E7 돌연변이된(cys27→gly, glu29→gln)-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 18 및 19로 나타냈다.

2)-ProtD1/3-E7 돌연변이된(cys27→gly, glu29→gln)-His/HPV18을 발현시키는 균주 B1098의 구성

플라스미드 pRIT 14831을 균주 B1098을 생성시키기 위해, 카나마이신 내성 형질전환체를 선택하므로써 λpL 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결합성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중으로 도입시켰다.

3)-박테리아성 균주 B1098의 증식 및 유도 - ProtD1/3-E7 돌연변이된 (cys27→gly, glu29→gln)-His/HPV18의 발현

플라스미드 pRIT 14831(B1098균주)과 함께 형질전환시킨 AR58 세포를 30°C에서, 카나마이신 50μgr/ml을 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39°C로 이동시키고 ProtD1/3-E7 돌연변이된-His/HPV18의 합성을 개시시켰다. 39°C에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20°C에서 저장했다.

4)-융합 ProtD1/3-E7 돌연변이된(cys24→gly, glu26→gln)-His형 HPV16의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20.000psi(3패시지)하에서 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4°C하에서, 16.000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

Coomassie-염색된 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯상에서의 분석

상기 추출물을 원심분리시킨 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다. 펠릿 분획중에 편중된 약 31kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 22 J 70 항단백질 D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 모노클로날 Penta-His(Qiagen cat n° 34660)의한 웨스턴 블롯으로 동정하였다. 전체 단백질중의 발현 수준은 약 3 내지 5%였다.

실시에 XI: 융합 단백질-D1/3 E6-his/ HPV18을 발현하는 E.coli 균주의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

a) 플라스미드 pMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)는 pMG81(상기한 바와 같다)의 유도체이며, 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음에 다중 코딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역에 이어지게 했다. 상기 플라스미드를 융합 단백질 D1/3-E6-his의 발현에 사용하였다.

유형 HPV 18의 HPV 게놈성 E6 및 E7 서열(참고문헌, Cole et al., J.Mol.Biol. (1987)193,599-608)을 pBR332(Deutschs Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum fur human pathogen Papillimavirus - D 69120-Heidelberg로부터 입수)중에 클로닝시킨 총 길이의 HPV 16으로부터 증폭시키고,

TCA302(=pRIT14467)를 생성시키기 위해 pUC19로 서브클로닝시켰다.

플라스미드 TCA314(=pRIT14526)의 구성: 융합 단백질-D1/3-E6-His/HPV18을 발현하는 플라스미드

E6 단백질의 아미노산 1 → 158에 대응하는 뉴클레오티드 서열을 pRIT14467로부터 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응중에, Nco I 및 Spe I 제한 부위를 E6 서열의 5' 및 3' 말단에서 생성시키고, 플라스미드 TCA314(=pRIT14526)를 생성하도록 플라스미드 pMGMCs Prot D1/3의 같은 자리에 삽입시켰다. 상기의 삽입체를 서열화시키고, 중합효소 연쇄반응중에 변형이 없었음을 확인하였다. 융합 단백질-D-1/3-E6-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 20 및 21로 나타냈다.

AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14526을 λ_{pl} 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중에 도입시켰다.

3. 박테리아성 균주의 증식 및 유도 - Prot-D1/3-E6-His의 발현

플라스미드 pRIT14526과 함께 형질전환시킨 AR58 세포를, 30℃에서 카나마이신 50μg/ml를 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고, 단백질 D1/3-E6-his의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장시켰다.

4. 융합 단백질 D1/3-E6-his의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20,000psi(3패시지)하에 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16,000g으로 30분동안 원심분리시켰다. 상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠릿의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다. 펠릿 분획중에 편중된 약 32kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질 D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉착체를 통한 웨스턴 블롯으로 동정했다. 전체 단백질 중의 발현 수준은 약 3 내지 5%였다.

실시에 X II: 융합 단백질-D1/3 E6E7-his / HPV18을 발현하는 E.coli 균주의 구성

1. 발현 플라스미드의 구성

a) 플라스미드 pMG MCS prot D1/3(=pRIT14589)는 pMG81(상기한 바와 같다)의 유도체이며, 여기서 인플루엔자로부터 NS1 코딩 영역의 코돈 4-81을 헤모필루스 인플루엔자 균주 772의 성숙한 단백질 D의 잔기 Ser20 → Thr127에 대응하는 코돈, 순형 2(H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. p.119-125)로 치환시켰다. Prot-D1/3의 서열 다음에 다중 코딩 부위(11 잔기) 및 C-말단 히스티딘 테일(6 His)의 코딩 영역이 이어지게 했다. 상기 플라스미드를 융합 단백질 D1/3-E6E7-his의 발현에 사용하였다.

b) 유형 HPV 18의 HPV 게놈성 E6 및 E7 서열(참고문헌, Cole et al., J.Mol.Biol.(1987)193,599-608)을 pBR332(Deutsches Krebsforschungszentrum(DKFZ), Referenzzentrum fur human pathogen Papillimavirus - D 69120-Heidelberg로부터 입수)중에 클로닝시킨 총 길이의 HPV 16으로부터 증폭시키고, TCA302(=pRIT14467)를 생성시키기 위해 pUC19로 서브클로닝시켰다.

c) TCA302(=pRIT 14467)중 E6 및 E7에 대한 코딩서열을, E6 및 E7 유전자 사이의 11 뉴클레오티드의 결실을 유도하는 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터(Af1 III alc Nsi I 부위가 삽입된)를 사용하여 변형시켜, 플라스미드 TCA320(=pRIT 14618)중의 E6의 종료 코돈을 제거시키고 융합된 E6 및 E7 코딩 서열을 생성시켰다.

플라스미드 TCA328(=pRIT14567)의 구성: 융합 단백질-D1/3-E6E7-His/HPV18을 발현하는 플라스미드

E6E7 단백질의 아미노산 1 → 263에 대응하는 뉴클레오티드 서열을 pRIT14618로부터 증폭시켰다. 중합효소 연쇄반응중에, Nco I 및 Spe I 제한 부위를 E6E7 서열의 5' 및 3' 말단에서 생성시키고, 플라스미드 TCA314(=pRIT14567)를 생성하도록 플라스미드 pMGMCs Prot D1/3의 같은 자리에 삽입시켰다. 상기의 삽입체를 서열화시키고, 중합효소 연쇄반응중에 변형이 없었음을 확인하였다. 융합 단백질-D-1/3-E6E7-His에 대한 단백질 및 코딩 서열을 서열번호 22 및 23으로 나타냈다.

2. AR58 균주의 형질전환

플라스미드 pRIT14567을 λ_{pl} 프로모터의 열감수성 억제자를 함유하는 결함성 λ용원 E.coli AR58(Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:88)중에 도입시켰다.

3. 박테리아성 균주의 증식 및 유도 - Prot-D1/3-E6E7-His의 발현

플라스미드 pRIT14512와 함께 형질전환시킨 AR58 세포를, 30℃에서 카나마이신 50μg/ml를 첨가한 LB 배지 100ml중에 배양했다. 지수 증식기에 있는 박테리아를 억제자를 불활성화시키기 위해 39℃로 이동시키고, 단백질 D1/3-E6E7-his의 합성을 개시시켰다. 39℃에서 4시간 동안 배양시켰다. 박테리아를 펠릿화시키고 -20℃에서 저장했다.

4. 융합 단백질 D1/3-E6-his의 특성화

동결 세포를 녹이고 PBS 완충액 10ml중에 현탁시켰다. 세포를 French pressure cell press SLM Aminco 내에서 20,000psi(3패시지)하에 분쇄시켰다. 상기 추출물을 4℃하에서, 16,000g으로 30분동안 원심분리시켰다.

상기 추출물의 원심분리 후, 상등액 및 펠렛의 할당량을 SDS-폴리아크릴아미드겔 및 웨스턴 블롯으로 분석했다.

펠렛 분획중에 편중된 약 48kDa의 주요 밴드를 Coomassie 염색된 겔로써 가시화시키고, 토끼의 폴리클로날 항단백질 D, 및 접근성의 히스티딘 테일을 탐지하는 송아지 장 알칼리 포스파타아제(Qiagen cat. n° 34510)와 결합시킨 Ni-NTA 촉합체를 통해 웨스턴 블롯으로 동정했다. 전체 단백질중의 발현 수준은 약 1%였다.

실시에 X III

PD1/3 E7 융합 단백질 및 다른 CpG 올리고뉴클레오티드를 함유하는 백신의 치료능력을 TC1(종양 모델을 발현하는 E7)중에서 평가했다.

1. 치료적 실험: 프로토콜

10e6 TCL 세포, 종양 세포 발현 E7를 C57BL/6 면역적격의 마우스의 옆구리에 피하 주사했다(200 μ l). 종양을 도입시킨 후 7일 및 14일째에, 다른 아췌반트의 존재하에 5 μ l ProtD1/3 E7 HPV16 주사된 인트라풋패드(100 μ l:50 μ l/풋패드)를 사용하여 백신화시켰다:

제 2차 면역화 후 2 및 4주째에, 5마우스/그룹을 사망시켜 비장 또는 오금의 림프절을 취하여 면역 반응을 분석했다.

1.2 결과

마우스 군

- 1) PBS
- 2) ProtD1/3 E7 HPV16
- 3) ProtD1/3 E7 HPV16 + 올리고 1:1826(WD 1001): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT
- 4) 올리고 1
- 5) ProtD1/3 E7 HPV16 + 올리고 2/1758(WD 1002): TCT CCC AGC GTG CGC CAT
- 6) 올리고 2

종양증식:

을 1주일에 2회 각 종양을 측정하여 모니터링하였다.

도 1: 후속하는 4주에 걸친 평균 종양 성장(mm²)/그룹n=10을 나타낸다.

- 피하 주입시킨 10e6 TC1 세포의 주입은 동물중 100%에서 종양의 성장을 가져왔다.
- ProtD1/3E7 또는 보조제만으로 백신화시킨경우: 동물의 100%가 종양을 발전시켰다.
- 도 1 및 도 2에서 볼 수 있는 것 같이, CpG 올리고뉴클레오티드와 함께 항원을 수용한 일군의 마우스에서, 평균 종양 성장은 매우 낮고 그룹간에 매우 유사하였다. 이는 종양의 성장이 완화되었거나 수개의 종양이 완전히 거부되었음을 반영한다.

최종의 백신화 후 2 및 4주째의 각 종양의 증식의 분석은 성장은 그룹내에서 완전히 거부되었음을 보여주었다:

	28일 (n=10)	42일 (n=5)
E7+ 올리고2(1826)	40%	40%
	0%	0%
E7+ 올리고2(1758)	70%	40%
올리고2	0%	0%

PD1/3 E7 + CpG 올리고를 사용하여 백신화시킨 마우스의 평균 종양 성장/군은 매우 유사했으며, 각 종양 성장의 분석은 CpG 올리고가 연장된 완전한 종양 거부를 유도함을 보여주었다.

결론

CpG(올리고 2 > 올리고 1) 양자 모두가 완전한 종양 제거를 유도했다.

비장 및 림프절 세포를 단계 II 이후 2 및 4주째에 72시간 동안 PD1/3E7, 단백질 E7(Bollen), 및 PD(총) PD1/3(라텍스 μ 비드상에 피복되거나 피복되지 않은)(10,1,0.1 μ g/ml)중 어느 하나를 사용한 재자극에 의해 생체외에서 림프세포증식성 반응을 분석했다.

- 양성 대조군(ConA)은 양성이었다.
- 놀랍게도, 단계 II 이후 2 및 4주째의 비장 세포를 사용한 경우에 어떠한 E7 특이적 및 PD 특이적 증식을 발견할 수 없었다.
- 이와 반대로, CpG 올리고 1 및 2 중에 ProtD1/3 E7을 수용한 마우스로부터의 림프절 세포는, 매우 우

수한 E7 특이적 증식 반응을 보였다. 그렇지만, PD(총) 특이적 반응은 $100\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 최고의 농도에서조차도 관찰할 수 없었으며, 라텍스 μ 비드상에 코팅된 경우에서조차 PD1/3을 전혀 관찰할 수 없었다.

유사한 데이터를 단계 II 이후 4주에서도 수득하였다.

혈청 테스트

항 E7 항체 반응: IgG 소량 및 아이소타이프(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgGtot)를 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 코팅 항원으로 E7 단백질을 사용하고 ELISA를 이용하여 측정했다. 도 3 및 도 4는 각각 단계 II 이후 2주 및 4주째에, 총 IgGs중의 다른 IgG 아이소타이프의 상대적 퍼센트를 보여준다.

- 상기 올리고는 PD1/3 단독으로 주입된 경우에 관찰된 약한 항체 반응에 단지 약하게(올리고2) 영향을 미치거나 전혀 영향을 미치지 않는다(올리고 1).
- 지배적인 E7 특이적 항체 서브클래스는 시험된 모든 제형(전체 IgGs중 80-90%)에 대해 IgG2b 임이 명백하였다.

동일한 결과를 단계 II 이후 4주째에 수득했다.

E7 반응(단계 II 이후, 풀링된 혈청)의 아이소타이프 프로파일 exp. 97293

그룹	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgGtot
1) PBS	0	0	0	0
2) ProtD1/3 E7 HPV16	1020	0	4130	4740
3) ProtD1/3 E7 HPV16 + 올리고 1	170	400	3680	4910
4) 올리고 1	0	0	530	420
5) ProtD1/3 E7 HPV16 + 올리고 2	0	590	7560	13690
6) 올리고 2	0	0	0	0

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgGtot
1) PBS	0	0	0	0
2) ProtD1/3 E7 HPV1	240	0	1650	1400
3) ProtD1/3 E7 HPV16 + 올리고 1	0	0	1280	1430
4) 올리고 1	0	0	0	0
5) ProtD1/3 E7 HPV16 + 올리고 2	0	560	3600	5880
6) 올리고 2	0	0	0	0

CTL 분석:

CTL 반응은 최종 백신화 이후 2주 째에 측정한 경우, 세포가 TC1 또는 펩티드 E7 펄싱된 EL4가 표적 세포로서 사용된 경우에 조사된(irradiated) TC1과 함께 생체외에서 재자극된 경우, 마우스가 PD1/3 E7+CpG 올리고 2 > 1(25-40% 특이적 용해)와 함께 면역화된 경우에 탐지할 수 있었다.

- 용해를 펩티드 E7 펄싱된 EL4에서 보다는 TC1상에서 볼 수 있었으나, 대부분 PD1/3 E7+CpG 올리고(2 > 1)와 함께 백신화시킨 마우스군에서 관찰하였다. 이러한 실험에서, 다른 제형은 CTL을 유도하지 않았다.
- E7 펄싱된 EL4 세포를 사용하는 경우, 마우스가 단백질 또는 아쥬반트중 어느 하나 만을 수용한 경우에는 어떠한 용해도 관찰할 수 없었다.

1.3 재료 및 방법

성분	상표명	배치 수	농도 (mg/ml)	완충액
ProtD1/3-E7		957/015	0.677	PBS 7.4
올리고 CpG 1826	EuroGentec	WD1001	5	H ₂ O
올리고 CpG	EuroGentec	WD1002	5	H ₂ O

1.3.1 제형화 방법

모든 제형은 주입한 날에 제조하였다.

올리고 함유 제형

다른 아쥬반트 없이 올리고만을 함유하는 제형을 PBS pH7.4중에 희석시킨 PD1/3 E7+CpG에 CpG를 가하여 제조했다.

항원 없이 상기 아쥬반트 대조군을 단백질을 PBS로 대체하여 제조했다.

1.3.2 마우스 및 세포주

마우스 C57B1/6(Jffa Credo) 6-8 주령된 마우스를 본 실험에 사용했다.

세포주: TC1(John Hopkin's University로부터 수득했다), 또는 EL4 세포를 10% FCS 및 첨가제를 함유하는 RPMI 1640(Bio Whittaker)중에 배양시켰다: 2mM L-글루타민, 1% 항생제(10000U/ml 페니실린,

10000 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 스트렙토마이신) 1%, 비본질적인 아미노산 100x, 1% 피루빈산 나트륨(Gibco), 5 10e-5M 2-메르캅토에탄올. 주입전에, TC1 세포를 혈청 부재 배지 중에서 트립신화시키고 세척했다.

1.3.3 종양의 증식

0일째에 모든 동물에 종양 세포를 주입하고, 7일 째에 랜덤하게 두었다. 각 종양 증식이 수 시간(2개의 주요 직경(A,B)을 1주일 2회 캘리퍼스를 사용하여 측정했다. AxB는 "종양 표면"을 나타낸다) 후속하였으며, 5값/군의 평균을 시간에 대한 그래프로 나타냈다: 6주

1.3.4 CMI 판독

생체외 림프세포증식

림프세포증식을 각 비장 및 림프절 풀상에서 수행했다. 200000개의 비장 세포 또는 오금의 림프절 세포를 96 웰 마이크로플레이트 중에, 1% 정상적인 마우스 혈청 및 첨가제를 함유하는 RPMI 배지중에 3배로 플레이트했다. 다른 양의 PD1/3 E7(1,01,0.01 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 또는 E7(10-1-0.1 $\mu\text{l}/\text{ml}$)를 사용한 생체외에서의 자극후 72시간 후에, 배양 상등액의 100 μl 를 제거하고, 1 μCi 3H 티미딘(Amersham 5Ci/mmol)을 함유하는 신선한 배지로 교체시켰다. 16시간 후, 세포를 필터 플레이트상에서 수득했다. 통합시킨 방사활성을 β 카운터로 계수했다. 결과를 CPM(3배 웰의 평균)중에 나타내거나 자극 색인으로 나타냈다(항원과의 배양물중에 평균 CPM/항원 부재 배양물중의 평균 CPM).

1.3.5 CTL 분석

20 10e6 비장 세포를 2 10e6 조사된(18000r) TC1 세포(종양 발현 E7)과 함께 ConA sup.(2%)의 존재 또는 부재하에 배양했다.

세포독성을 검정하기 위해 사용한 표적 세포는 Cr51(DuPontNEN 37MBq/ml) 로딩(37°C에서 1시간)된 TC1 세포 또는 E7 펠상된 EL4 세포(1시간 동안 37°C에서)였으며, E7 유도된 펩티드(49-57)(QCB)의 세포10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Cr 51 로딩중에 EL4 세포와 비교하여 NK 의존성 용해를 K562 표적세포상에 분석했다. 96 웰 플레이트당 웰에 대해 2000개 표적 세포를 가했으며, 최고의 에펙터와 표적의 비율은 100/1 이었다. 자발성 또는 최대 Cr51 방출에 대한 대조군을 6개를 한벌로하여 수행했으며, 배지 또는 트리톤 1.5%중에 표적이었다. 모든 플레이트를 천천히 원심분리하고 37°C에서 7% CO₂중에 4시간 동안 배양했다. 상등액 50 μl 를 96w 루마플레이트(Packard) 레트 드라이 O/N 상에 디포우징시키고, Top Counter 계수기로 계수하였다. 데이터를 공식(실험적 방출-자발적 방출)/(최대 방출-자발적 방출)X100에 의해 c.p.m.으로부터 측정했다.

혈청 테스트

항 E7 항체 정량화를 코팅 항원으로서 E7 단백질을 사용하고 Elisa를 이용하여 측정했다. 항원 및 항체 용액을 웰당 50 μl 에서 사용했다. 항원을 카르보네이트 완충액 pH9.5중에 최종 농도 3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 에서 희석시켰으며, 4°C하에서 96웰 마이크로 플레이트의 웰로 흡수시켰다(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark). 다음 플레이트를 1% 송아지 혈청 알부민 및 0.1% 트윈 20(포화 완충액)를 함유하는 PBS와 함께 37°C에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액중의 혈청(1/100 희석에서 시작)의 2배 희석액을 E7 코팅된 플레이트에 가하고 37°C에서 1시간 30분동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS 0.1% 트윈 20으로 3차례 세척하고, 완충액중에 1/5000 희석시킨 비오틴 촉합된 항마우스 IgG1, IgG2a, 또는 IgG2b 또는 IgGtot(Amersham, UK)를 각 웰에 가하고, 37°C에서 1시간 30분간 배양했다. 세척 단계 후에, 완충액 중에 1/5000 희석시킨 스트렙타비딘-비오틴닐화된 과산화물 착체(Amersham, UK)를 37°C에서 추가로 30분간 가하였다. 상기한 바와 같이 플레이트를 세척하고, TMP(테트라-메틸-벤지딘)와 함께 10분동안 인큐베이션시켰다. 반응을 H₂SO₄ 4N로 종결시키고, 450nm에서 판독했다. 중간 지점 희석을 SoftmaxPro를 사용하여 측정했다(4개 변수 방정식을 이용한다).

실시에 X IV

제 2의 구체예에서, 본 발명의 백신을 골격의 현저성을 억제하기 위해 시험했다.

치료 실시예:프로토콜

- 10e6 TCL 세포, 종양 세포 발현 E7:를 면역적합성 C57BL/6 마우스의 옆구리에 피하 주사했다(200 μl).
- 제 2 백신화, 종양을 도입시킨후 7일 및 14일째에, 5 μg ProtD1/3 E7 HPV16 주사된 인트라풋패드(100 μl :50 μl /풋패드) +/- CpG 올리고; 변형되거나 동일한 올리고(WD1006)이나 포스포다이에스테르 결합을 지닌 포스포로티오에이트로서의 올리고 1(WD1001)를 사용하여 2차 면역화시켰다.
- 5 마리/군

종양 증식을 1주일 2회 각 종양을 측정하여 모니터링했고, 평균 종양 증식/5마리의 1군을 도 5에 도시했으며, 이는 포스포로티오에이트 변형시킨 올리고뉴클레오타이드가 종양의 감퇴에 효과적이었음을 보여주었다.

결과

- 10e6 TC1을 수용한 모든 동물 세포가 증식성 종양을 진행시켰다.
- PD1/3 E7 HPV16 단백질만을 사용하여 7일 간격으로 2회 백신화시킨 동물의 100%가 종양을 발달시켰다.

- PD1/3 E7 단백질 + 올리고 WD 1006을 수용한 동물의 100%가 시험된 농도에서 종양을 발달시켰다.
- 10 내지 200 μ g의 범위의 농도에서 E7 단백질 + CpG 1001를 수용한 동물군 모두가 종양의 부분적 또는 완전한 감퇴를 보였다(20-40%).

종양 제거에 대한 본 치료 효과가 완전히 얻어지지 않은 최초의 농도는 E7+1 μ gCpG 올리고 1001이었다.

실시에 X V

제 3의 실험에서, 본 발명의 백신을 E7 단백질을 발현하는 유전자 전이 마우스중에서 평가했다.

- 유전자 전이 마우스를 참고문헌(M. Parmentier and C.Ledent at the IRIBHN(ULB). (Ref:PNAS(USA) 1990,87:6176-6180)에 의해 제조했다.
- 유전자 전이 마우스는 탄생시부터 E7HPV16 유전자와 함께 성장함에 따라, 이들은 이들 유전자에 대해 "내성"인 것으로 간주되었다: 이러한 상황에서 HPV16으로부터의 E7는 "자기 항원"으로 간주된다.
- 전이 유전자의 발현은 타이로글로불린 프로모터에 의해 구동되었다. 타이로글로불린이 단지 타이로이드중에서만 발현되므로, E7은 타이로이드중에서 발현된다.
- 본 발현 결과, 타이로이드 세포가 증식하고, 마우스는 6월 또는 1년 후에 공격적인 암종으로 발전하는 갑상선종 또는 작은 혹을 발전시켰다.

본 실험의 결과(도 6)는 본원에서 상기한 바와 같이 CpG 올리고뉴클레오타이드 및 항원을 사용한 치료적 백신화가 종양 성장의 감소를 초래하고, 완전한 종양 제거를 가져올 수 있음을 보여주었다.

재료 및 방법

- 10e6 TCL 세포, 종양 세포 발현 E7:를 면역적합성 C57BL/6 마우스의 옆구리에 피하 주사했다(200 μ l).
- 마우스를 종양을 도입시킨후 7일 및 14일째에, CpG 올리고뉴클레오타이드 TCT CCC AGC GTG CGC CAT 및 두개의 대조군 아췌반트의 존재하에서 5 μ g ProtD1/3 E7 HPV16 주사된 인트라-풋패드(100 μ l:50 μ l/풋패드)를 사용하여 백신화시켰다.
- 10마리/군

2차 백신화 후, 2주 및 4주째에 마우스를 사망시키고 비장 또는 림프절

결과

본 발명의 백신은 HPV 유도된 종양에서 종양의 감퇴에 효과적이었다.

(1) GENERAL INFORMATION

- (i) APPLICANT: BRUCK, CLAUDINE
- (ii) TITLE OF THE INVENTION: VACCINE
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 23
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: SmithKline Beecham
 - (B) STREET: 2 New Horizons Court, Great West Road, B
 - (C) CITY: Midx
 - (D) STATE:
 - (E) COUNTRY: UK
 - (F) ZIP: TW8 9EP
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
 - (A) MEDIUM TYPE: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM Compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: DOS
 - (D) SOFTWARE: FastSEQ for Windows Version 2.0
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:
 (B) FILING DATE:
 (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 (A) NAME: Dalton, Marcus J
 (B) REGISTRATION NUMBER:
 (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: B45124

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 (A) TELEPHONE: 0181 9756348
 (B) TELEFAX: 0181 9756177
 (C) TELEX:
 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 220 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

Protein D 1/3 E7 his

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

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

Gln Lys Pro Thr Ser Gly His His His His His His
210 215 220

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 663 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

Protein D 1/3 E7 his

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

ATGGATCCAA GCAGCCATTC ATCAATATG GCGAATACCC AAATGAAATC AGACAAAATC	60
ATTATTGCTC ACCGTGGTGC TAGCGGTTAT TTACCAGAGC ATACGTTAGA ATCTAAAGCA	120
CTTGCGTTTG CACAACAGGC TGATTATTTA GAGCAAGATT TAGCAATGAC TAAGGATGGT	180
CGTTTAGTGG TTATTCACGA TCACTTTTTA GATGGCTTGA CTGATGTTGC GAAAAAATTC	240
CCACATCGTCATCGTAAAGA TGGCCGTTAC TATGTCATCG ACTTTACCTT AAAAGAAATT	300
CAAAGTTTAG AAATGACAGA AAACCTTGAA ACCATGGCCA TGCATGGAGA TACACCTACA	360
TTGCATGAAT ATATGTTAGA TTTGCAACCA GAGACAACCTG ATCTCTACTG TTATGAGCAA	420
TTAAATGACA GCTCAGAGGA GGAGGATGAA ATAGATGGTC CAGCTGGACA AGCAGAACCG	480
GACAGAGCCC ATTACAATAT TGTAACCTTT TGGTGAAGT GTGACTCTAC GCTTCGGTTG	540
TGCGTACAAA GCACACACGT AGACATTCGT ACTTTGGAAG ACCTGTTAAT GGGCACACTA	600
GGAATTGTGT GCCCATCTG TTCTCAGAAA CCAACTAGTG GCCACCATCA CCATCACCAT	660
TAA	663

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 822 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

Protein D 1/3 E6 His/HPV 16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

ATGGATCCAA GCAGCCATTC ATCAATATG GCGAATACCC AAATGAAATC AGACAAAATC	60
ATTATTGCTC ACCGTGGTGC TAGCGGTTAT TTACCAGAGC ATACGTTAGA ATCTAAAGCA	120
CTTGCGTTTG CACAACAGGC TGATTATTTA GAGCAAGATT TAGCAATGAC TAAGGATGGT	180
CGTTTAGTGG TTATTCACGA TCACTTTTTA GATGGCTTGA CTGATGTTGC GAAAAAATTC	240
CCACATCGTC ATCGTAAAGA TGGCCGTTAC TATGTCATCG ACTTTACCTT AAAAGAAATT	300
CAAAGTTTAG AAATGACAGA AAACCTTGAA ACCATGGCCA TGTTTCAGGA CCCACAGGAG	360
CGACCCAGAA AGTTACCACA GTTATGCACA GAGCTGCAAA CAACTATACA TGATATAATA	420
TTAGAATGTG TGTACTGCAA GCAACAGTTA CTGCGACGTG AGGTATATGA CTTTGCTTTT	480
CGGGATTAT GCATAGTATA TAGAGATGGG AATCCATATG CTGTATGTGA TAAATGTTTA	540
AAGTTTTATT CTAATATTAG TGAGTATAGA CATTATTGTT ATAGTTTGTA TGAACAACA	600
TTAGAACAGC AATACAACAA ACCGTTGTGT GATTGTGTTA TTAGGTGTAT TAACTGTCAA	660
AAGCCACTGT GTCCTGAAGA AAAGCAAAGA CATCTGGACA AAAAGCAAAG ATTCCATAAT	720
ATAAGGGGTC GGTGGACCGG TCGATGTATG TCTTGTTGCA GATCATCAAG AACACGTAGA	780
GAAACCCAGC TGAAGTAGTG CCACCATCAC CATCACCATT AA	822

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 274 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

Protein D 1/3 E6 His/HPV 16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
			35				40					45			
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
			50				55				60				
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
65				70					75					80	
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr
				85					90					95	
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Met
				100				105					110		
Ala	Met	Phe	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Pro	Gln	Leu
				115				120					125		
Cys	Thr	Glu	Leu	Gln	Thr	Thr	Ile	His	Asp	Ile	Ile	Leu	Glu	Cys	Val
				130				135				140			
Tyr	Cys	Lys	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Arg	Glu	Val	Tyr	Asp	Phe	Ala	Phe
				145				150				155		160	
Arg	Asp	Leu	Cys	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp	Gly	Asn	Pro	Tyr	Ala	Val	Cys
				165					170				175		
Asp	Lys	Cys	Leu	Lys	Phe	Tyr	Ser	Lys	Ile	Ser	Glu	Tyr	Arg	His	Tyr
				180					185				190		
Cys	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Gly	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Gln	Tyr	Asn	Lys	Pro
				195					200				205		
Leu	Cys	Asp	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Ile	Asn	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Cys
				210				215					220		
Pro	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	His	Leu	Asp	Lys	Lys	Gln	Arg	Phe	His	Asn
225					230					235				240	
Ile	Arg	Gly	Arg	Trp	Thr	Gly	Arg	Cys	Met	Ser	Cys	Cys	Arg	Ser	Ser
				245					250				255		
Arg	Thr	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	His	His	His	His	His
				260					265				270		
His															

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1116 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

Protein D 1/3 E6/E7/ HPV16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

ATGGATCCAA GCAGCCATTC ATCAAATATG GCGAATACCC AAATGAAATC AGACAAAATC	60
ATTATTGCTC ACCGTGGTGC TAGCGGTAT TTACCAGAGC ATACGTTAGA ATCTAAAGCA	120
CTTGCGTTTG CACAACAGGC TGATTATTTA GAGCAAGATT TAGCAATGAC TAAGGATGGT	180
CGTTTAGTGG TTATTCACGA TCACTTTTTA GATGGCTTGA CTGATGTTGC GAAAAAATTC	240
CCACATCGTC ATCGTAAAGA TGGCCGTAC TATGTCATCG ACTTTACCTT AAAAGAAATT	300
CAAAGTTTAG AAATGACAGA AACTTTGAA ACCATGGCCA TGTTTCAGGA CCCACAGGAG	360
CGACCCAGAA AGTTACCACA GTTATGCACA GAGCTGCAAA CAACTATACA TGATATAATA	420
TTAGAATGTG TGTACTGCAA GCAACAGTTA CTGCGACGTG AGGTATATGA CTTTGCTTTT	480
CGGGATTAT GCATAGTATA TAGAGATGGG AATCCATATG CTGTATGTGA TAAATGTTTA	540
AAGTTTTATT CTAAATTAG TGAGTATAGA CATTATTGTT ATAGTTTGTA TGAACAACA	600
TTAGAACAGC AATACAACAA ACCGTTGTGT GATTTGTAA TTAGGTGTAT TAACTGTCAA	660
AAGCCACTGT GTCCTGAAGA AAAGCAAAGA CATCTGGACA AAAAGCAAAG ATTCCATAAT	720
ATAAGGGGTC GGTGGACCGG TCGATGTATG TCTTGTTGCA GATCATCAAG AACACGTAGA	780
GAAACCCAGC TGATGCATGG AGATACACCT ACATTGCATG AATATATGTT AGATTGCAA	840
CCAGAGACAA CTGATCTCTA CTGTTATGAG CAATTAAATG ACAGCTCAGA GGAGGAGGAT	900
GAAATAGATG GTCCAGCTGG ACAAGCAGAA CCGGACAGAG CCCATTACAA TATTGTAACC	960
TTTTGTTGCA AGTGTGACTC TACGCTTCGG TTGTGCGTAC AAAGCACACA CGTAGACATT	1020
CGTACTTTGG AAGACCTGTT AATGGGCACA CTAGGAATTG TGTGCCCCAT CTGTTCTCAG	1080
AAACCAACTA GTGGCCACCA TCACCATCAC CATTAA	1116

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 372 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

Protein D 1/3 E6/E7/ HPV16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys	
1	5 10 15
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro	
	20 25 30
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp	
	35 40 45
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val	
50	55 60
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe	
65	70 75 80

Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met
100 105 110
Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
115 120 125
Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
130 135 140
Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
145 150 155 160
Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys
165 170 175
Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
180 185 190
Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro
195 200 205
Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys
210 215 220
Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn
225 230 235 240
Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
245 250 255
Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu
260 265 270
His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys
275 280 285
Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly
290 295 300
Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr
305 310 315 320
Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr
325 330 335
His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly
340 345 350
Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Thr Ser Gly His His His
355 360 365
His His His
370

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 663 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu
 180 185 190
 Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser
 195 200 205
 Gln Lys Pro Thr Ser Gly His His His His His His
 210 215 220

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 879 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

CLYTA E6 His HPV 16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

ATGAAAGGGG GAATTGTACA TTCAGACGGC TCTTATCCAA AAGACAAGTT TGAGAAAATC	60
AATGGCACTT GGTACTACTT TGACAGTTCA GGCTATATGC TTGCAGACCG CTGGAGGAAG	120
CACACAGACG GCAACTGGTA CTGGTTCGAC AACTCAGGCG AAATGGCTAC AGGCTGGAAG	180
AAAATCGCTG ATAAGTGGTA CTATTTCAAC GAAGAAGGTG CCATGAAGAC AGGCTGGGTC	240
AAGTACAAGG ACACTTGGTA CACTTAGAC GCTAAAGAAG GCGCCATGGT ATCAAATGCC	300
TTTATCCAGT CAGCGGACGG AACAGGCTGG TACTACCTCA AACCAGACGG AACACTGGCA	360
GACAGGCCAG AATTGGCCAG CATGCTGGAC ATGGCCATGT TTCAGGACCC ACAGGAGCGA	420
CCCAGAAAGT TACCACAGTT ATGCACAGAG CTGCAAACAA CTATACATGA TATAATATTA	480
GAATGTGTGT ACTGCAAGCA ACAGTTACTG CGACGTGAGG TATATGACTT TGCTTTTCGG	540
GATTTATGCA TAGTATATAG AGATGGGAAT CCATATGCTG TATGTGATAA ATGTTTAAAG	600
TTTTATTCTA AAATTAGTGA GTATAGACAT TATTGTTATA GTTTGTATGG AACACATTA	660
GAACAGCAAT ACAACAAACC GTTGTGTGAT TTGTTAATTA GGTGTATTAA CTGTCAAAAG	720
CCACTGTGTC CTGAAGAAAA GCAAAGACAT CTGGACAAAA AGCAAAGATT CCATAATATA	780
AGGGGTCTGG GGACCGGTCG ATGTATGTCT TGTTGCAGAT CATCAAGAAC ACGTAGAGAA	840
ACCCAGCTGA CTAGTGGCCA CCATCACCAT CACCATTAA	879

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 293 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

CLYTA E6 His HPV 16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

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

50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr
 100 105 110
 Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Ala Ser Met
 115 120 125
 Leu Asp Met Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu
 130 135 140
 Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu
 145 150 155 160
 Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp
 165 170 175
 Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
 180 185 190
 Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr
 195 200 205
 Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr
 210 215 220
 Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys
 225 230 235 240
 Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg
 245 250 255
 Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys
 260 265 270
 Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu Thr Ser Gly His His
 275 280 285
 His His His His
 290

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 720 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

CLYTA E7 HIS HPV 16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

ATGAAAGGGG GAATTGTACA TTCAGACGGC TCTTATCCAA AAGACAAGTT TGAGAAAATC	60
AATGGCACTT GGTACTACTT TGACAGTTCA GGCTATATGC TTGCAGACCG CTGGAGGAAG	120
CACACAGACG GCAACTGGTA CTGGTTCGAC AACTCAGGCG AAATGGCTAC AGGCTGGAAG	180
AAAATCGCTG ATAAGTGGTA CTATTTCAAC GAAGAAGGTG CCATGAAGAC AGGCTGGGTC	240

AAGTACAAGG ACACTTGGTA CTACTTAGAC GCTAAAGAAG GCGCCATGGT ATCAAATGCC 300
 TTTATCCAGT CAGCGGACGG AACAGGCTGG TACTACCTCA AACCAGACGG AACACTGGCA 360
 GACAGGCCAG AATTGGCCAG CATGCTGGAC ATGGCCATGC ATGGAGATAC ACCTACATTG 420
 CATGAATATA TGTAGATTT GCAACCAGAG ACAACTGATC TCTACTGTTA TGAGCAATTA 480
 AATGACAGCT CAGAGGAGGA GGATGAAATA GATGGTCCAG CTGGACAAGC AGAACCGGAC 540
 AGAGCCCATT ACAATATTGT AACCTTTTGT TGCAAGTGTG ACTCTACGCT TCGGTTGTGC 600
 GTACAAAGCA CACACGTAGA CATTCTACT TTGGAAGACC TGTTAATGGG CACACTAGGA 660
 ATTGTGTGCC CCATCTGTTC TCAGAAACCA ACTAGTGGCC ACCATCACCA TCACCATTAA 720

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 240 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

CLYTA E7 HIS HPV 16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

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

Ile Cys Ser Gln Lys Pro Thr Ser Gly His His His His His His

225 230 235

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1173 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

CLYTA E6E7 His HPV16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

ATGAAAGGGG GAATTGTACA TTCAGACGGC TCTTATCCAA AAGACAAGTT TGAGAAAATC	60
AATGGCACTT GGTACTACTT TGACAGTTCA GGCTATATGC TTGCAGACCG CTGGAGGAAG	120
CACACAGACG GCAACTGGTA CTGGTTCGAC AACTCAGGCG AAATGGCTAC AGGCTGGAAG	180
AAAATCGCTG ATAAGTGGTA CTATTTCAAC GAAGAAGGTG CCATGAAGAC AGGCTGGGTC	240
AAGTACAAGG ACACTTGGTA CTA CTCTAGAC GCTAAAGAAG GCGCCATGGT ATCAAATGCC	300
TTTATCCAGT CAGCGGACGG AACAGGCTGG TACTACCTCA AACCAGACGG AACACTGGCA	360
GACAGGCCAG AATTGGCCAG CATGCTGGAC ATGGCCATGT TTCAGGACCC ACAGGAGCGA	420
CCCAGAAAGT TACCACAGTT ATGCACAGAG CTGCAAACAA CTATACATGA TATAATATTA	480
GAATGTGTGT ACTGCAAGCA ACAGTTACTG CGACGTGAGG TATATGACTT TGCTTTTCGG	540
GATTTATGCA TAGTATATAG AGATGGGAAT CCATATGCTG TATGTGATAA ATGTTTAAAG	600
TTTTATTCTA AAATTAGTGA GTATAGACAT TATTGTTATA GTTTGTATGG AACACATTA	660
GAACAGCAAT ACAACAAACC GTTGTGTGAT TTGTTAATTA GGTGTATTAA CTGTCAAAAG	720
CCACTGTGTC CTGAAGAAAA GCAAAGACAT CTGGACAAAA AGCAAAGATT CCATAATATA	780
AGGGGTCGGT GGACCGGTCG ATGTATGTCT GTTGCAGAT CATCAAGAAC ACGTAGAGAA	840
ACCCAGCTGA TGCATGGAGA TACACCTACA TTGCATGAAT ATATGTTAGA TTTGCAACCA	900
GAGACAACTG ATCTCTACTG TTATGAGCAA TTAATGACA GCTCAGAGGA GGAGGATGAA	960
ATAGATGGTC CAGCTGGACA AGCAGAACCG GACAGAGCCC ATTACAATAT TGTAACCTTT	1020
TGTTGCAAGT GTGACTCTAC GCTTCGGTTG TCGGTACAAA GCACACACGT AGACATTCGT	1080
ACTTTGGAAG ACCTGTTAAT GGGCACACTA GGAATTGTGT GCGCCATCTG TTCTCAGAAA	1140
CCAACTAGTG GCCACCATCA CCATCACCAT TAA	1173

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 391 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

CLYTA E6E7 His HPV16

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

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

Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr
 100 105 110
 Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Ala Ser Met
 115 120 125
 Leu Asp Met Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu
 130 135 140
 Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu
 145 150 155 160
 Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp
 165 170 175
 Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
 180 185 190
 Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr
 195 200 205
 Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr
 210 215 220
 Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys
 225 230 235 240
 Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg
 245 250 255
 Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys
 260 265 270
 Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu Met His Gly Asp Thr
 275 280 285
 Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp
 290 295 300
 Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu
 305 310 315 320
 Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
 325 330 335
 Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val
 340 345 350
 Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly
 355 360 365
 Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Thr Ser Gly
 370 375 380
 His His His His His His
 385 390