



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0024131
(43) 공개일자 2017년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 38/03 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트스트리트 3160

(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 38/03 (2013.01)

(72) 발명자
웨이너, 데이비드, 비.
미국 19066 펜실바니아주 메리온 비컴 레인 717
얀, 지안
미국 19083 펜실바니아주 해버타운 클라마르 애비뉴 213

(21) 출원번호 10-2017-7004941(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년07월30일
심사청구일자 2017년02월22일

(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

(62) 원출원 특허 10-2016-7007633
원출원일자(국제) 2007년07월30일
심사청구일자 2016년03월23일

(85) 번역문제출일자 2017년02월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/074769
(87) 국제공개번호 WO 2008/014521
국제공개일자 2008년01월31일

(30) 우선권주장
60/833,861 2006년07월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 개선된 백신 및 이의 사용 방법

(57) 요약

개선된 항-HIV 면역원 및 이를 암호화하는 핵산 분자가 본원에 기재되어 있다. 본원에 기재된 면역원에는 HIV 아형 A 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열을 갖는 것, HIV 아형 B 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열을 갖는 것, HIV 아형 C 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열을 갖는 것, HIV 아형 D 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열을 갖는

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1

1 MDHTWILFLVAAATRVHSEVFKGIRKRYQHILNRWSTLGGWLMICSAEMLAVIVYGVFWKLAITLPLCASDAKAYDDEVHNVHAIAG EY2E1-B
2 MDHTWILFLVAAATRVHSEVFKGIRKRYQHILNRWSTLGGWLMICSAEMLAVIVYGVFWKLAITLPLCASDAKAYDDEVHNVHAIAG EK2P-B
90 VPTGPHFQEVVLEAVTESEPHKNNVPSMREHDIISLWQSLKPCVXLTPIVTLNCT-----DLGGERMERGEIKKQSPH EY2E1-B
93 VPTGPHFQEVVLEAVTESEPHKNNVPSMREHDIISLWQSLKPCVXLTPIVTLNCTNATYISDSKNTSNGSLEDSGKGDIN--ISFD EK2P-B
VI 부위
167 YTFSLRKYVQKEYALFYKLVWVPEIHHMTSYRLISQNTSVITQACPKMSEFPIPCNYCAPAFKILKCNKHEFNGTGPCTNNSIVQCIHG EY2E1-B
152 YTFSLRKYVQKEYALFYKLVWVPEIHHMTSYRLISQNTSVITQACPKMSEFPIPCNYCAPAFKILKCNKHEFNGTGPCTNNSIVQCIHG EK2P-B
V2 부위
257 IRFVVSITQLLWGLSLAZI-EVVISSEMTFMNARTIIVQLNESVEINLTFPNNTRKSIHIFPQCAFYITGHIIGDIRQAHNIFIRAKMHN EY2E1-B
243 IKFVVSITQLLWGLSLAZI-EVVISSEMTFMNARTIIVQLNESVEINLTFPNNTRKSIHIFPQCAFYITGHIIGDIRQAHNIFIRAKMHN EK2P-B
V3 부위
345 TLKQIVKLLKREQPKWYIVFNQSSSEPRPZVMSFNGSGEFFYQNTTQLENSIWNWNGTWNHNTG--NDEIILPCRIKQIIRWQEVG EY2E1-B
330 TLKQIVKLLKREQPKWYIVFNQSSSEPRPZVMSFNGSGEFFYQNTTQLENSIWNWNGTWNHNTG--NDEIILPCRIKQIIRWQEVG EK2P-B
433 KMYAPPFINGQIERCSNMTGLLLETRDGGANNTEIIRFPGGSDREHWSELYYVYVYKIEPLGVAPIKAKRRVQVQREKRAVGIQAMFL EY2E1-B
419 KMYAPPFINGQIERCSNMTGLLLETRDGGANNTEIIRFPGGSDREHWSELYYVYVYKIEPLGVAPIKAKRRVQVQREKRAVGIQAMFL EK2P-B
절단 부위
523 GFLGAGSTWGAASVTLVQARLLSGIVQDQARLLRAIEACORLLQIIVWGIKGLQARVLAVERYLMDQQLLQIWRCSGKLIQTTIVPR EY2E1-B
504 GFLGAGSTWGAASVTLVQARLLSGIVQDQARLLRAIEACORLLQIIVWGIKGLQARVLAVERYLMDQQLLQIWRCSGKLIQTTIVPR EK2P-B
613 NASWNSKSLDEIWNWNTMWEWEPEIEMVYSLVITLIEESQWQEKNEQELLELQWASLWNVDTITWNLVYIKYIFIMVGGGLGELVFA EY2E1-B
594 NASWNSKSLDEIWNWNTMWEWEPEIEMVYSLVITLIEESQWQEKNEQELLELQWASLWNVDTITWNLVYIKYIFIMVGGGLGELVFA EK2P-B
703 VLSIYFVDETER EY2E1-B
688 VLSIYFVDETER EK2P-B
....

것, HIV 아형 B 컨센서스 Nef-Rev 단백질에 대한 컨센서스 서열을 갖는 것, 및 HIV Gag 단백질 아형 A, B, C 및 D에 대한 컨센서스 서열을 갖는 것이 포함된다. 개선된 항-HPV 면역원 및 이를 암호화하는 핵산 분자; 개선된 항-HCV 면역원 및 이를 암호화하는 핵산 분자; 개선된 hTERT 면역원 및 이를 암호화하는 핵산 분자; 및 개선된 항-인플루엔자 면역원 및 이를 암호화하는 핵산 분자가 본원에 기재되어 있다. 제약 조성물, 재조합 백신 및 생약독화 병원체 뿐만 아니라 HIV, HPV, HCV, hTERT 및 인플루엔자에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법이 기재되어 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 39/21 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 2039/523 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
C12N 2710/24034 (2013.01)
C12N 2740/16034 (2013.01)
C12N 2760/16134 (2013.01)

(30) 우선권주장

60/833,856 2006년07월28일 미국(US)
 60/890,352 2007년02월16일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열 1; 서열 1의 단편; 서열 1과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 1과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 5; 서열 5의 단편; 서열 5와의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 서열 5와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

서열 1 및 서열 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

서열 1 및 서열 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과의 상동성이 95% 이상인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

서열 1 및 서열 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과의 상동성이 98% 이상인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

서열 1 및 서열 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과의 상동성이 99% 이상인 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

서열 16 및 서열 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 7

서열 2를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 2를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 6을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 6을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 및 서열 6

과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편으로 이루어진 균으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

서열 16 및 서열 18로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 분자는 플라스미드인 것인, 핵산 분자.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는, 제약 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는, 주사 가능한 제약 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는, 재조합 백신.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 재조합 백신은 재조합 백시니아 백신인 것인, 재조합 백신.

청구항 14

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는, 생 약독화 병원체.

청구항 15

서열 2; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 2의 단편; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 6; 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 6의 단편; 및 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편으로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 단백질.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

서열 2 및 서열 6으로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 단백질.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

서열 2 및 서열 6으로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 95% 이상인 아미노산 서열을 포함하는, 단백질.

청구항 18

제 15 항에 있어서,

서열 2 및 서열 6으로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 98% 이상인 아미노산 서열을 포함하는, 단백질.

청구항 19

제 15 항에 있어서,

서열 2 및 서열 6으로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는, 단백질.

청구항 20

제 15 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는, 제약 조성물.

청구항 21

제 15 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는, 주사 가능한 제약 조성물.

청구항 22

제 15 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는, 제조합 백신.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

상기 제조합 백신은 제조합 백시니아 백신인 것인, 제조합 백신.

청구항 24

제 15 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는, 생 약독화 병원체.

청구항 25

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 핵산 분자 또는 제 15 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 단백질을 포함

하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유발하기 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 개선된 HIV, HPV, HCV, 인플루엔자 및 암 백신; 면역 반응을 유도시키기 위한 개선된 방법; 및 HIV, HPV, HCV, 인플루엔자 및 암에 대하여 개체를 예방적 및/또는 치료적으로 면역시키기 위한 개선된 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] HIV 계통은 높은 돌연변이율과 기능적 보상으로 인해 고도로 가소성이다. 이러한 높은 돌연변이율은 하기하는 두 가지 이상의 기전에 의해 구동된다: 복제 주기당 한 가지 이상의 돌연변이를 유발시키는 바이러스성 역전사 효소 (RT)의 낮은 충실도, 및 항레트로바이러스성 세포성 인자 APOBEC3G 유전자와 바이러스성 감염력 인자 Vif 보조 유전자의 이중 효과. 가능한 모든 돌연변이와 많은 이중 돌연변이를 수반한 계통이 매 복제 주기 동안 발생하여, 엄청난 항원 다양성을 유발시킨다. 따라서, 개별 단리물로부터 유래된 후보 백신이 다양한 순환성 HIV 바이러스에 대하여 보호시켜 주기에 충분한 교차 반응성을 유도시킬 수 없다고 주장되어 왔다. 최근의 연구는 컨센서스 면역원 [참고: Gao, F., et al. 2005. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. J Virol 79:1154-63.; Scriba, T. J., et al. 2005. Functionally-inactive and immunogenic Tat, Rev and Nef DNA vaccines derived from sub-Saharan subtype C human immunodeficiency virus type 1 consensus sequences. Vaccine 23:1158-69] 또는 선조 면역원 [참고: Doria-Rose, N. A., et al. 2005. Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtype B Ancestral Envelope Protein Is Functional and Elicits Neutralizing Antibodies in Rabbits Similar to Those Elicited by a Circulating Subtype B Envelope. J. Virol. 79:11214-11224; Gao, F., et al. 2004. Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity. Expert Rev. Vaccines 3:S161-S168; Mullins, J.I., et al. 2004, Immunogen sequence: the fourth tier of AIDS vaccine design. Expert Rev. Vaccines 3:S151-S159; Nickle, D. C., et al. 2003. Consensus and ancestral state HIV vaccines. Science 299: 1515-1517]이 이와 관련하여 유용할 수 있다고 제안하였다. 그러나, 이러한 접근 방식에 대한 초기의 연구 결과는 이들 면역원에 의해 비교적 중간 수준의 세포성 면역 증강이 유도되었다고 제시하였다.

[0003] 최근에 다음 문헌의 저자는 8쌍의 아프리카 이성애자간 병전염에서 HIV-1 아형 C 외막 당단백질 서열을 분석한 결과, 보다 짧은 V1, V2 및 V4 길이와 보다 적은 글리칸이 초기 전달자로부터 수득한 서열이 공유하고 있는 공통적인 특징인 것으로 밝혀졌다 [참고: Derdeyn, C, A., et al. 2004. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. Science 303:2019-2022.]. 이러한 데이터는 상기 바이러스를 모방하는 항원이 초기 전염된 바이러스와 관련이 있을 수도 있다는 것을 제안하고 있다. 그러나, 이러한 초기 전달자 구조가 모든 아형에서 관찰되지는 않았다 [참고: Chohan, B., et al. 2005. Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. J. Virol. 79:6528-6531]. 그러나, 보다 짧은 V 루프를 외막 면역원에 혼입하는 것은 다른 이점을 지닐 수도 있는데, 예를 들어 가용성 CD4에 대한 민감도가 증강되므로 [참고: Pickora, C., et al. 2005. Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4. J. Virol. 79:12575-12583], 고려되어야 한다.

[0004] 연구 결과, 급성 및 무증후성 감염과 AIDS 발병 동안 바이러스성 부하를 제어하는 데에 있어서 HIV-1 특이적 CTL 반응이 중요한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 현재 외막에 의거한 DNA 백신이 필요한 만큼 강력한지 어떤지는 명확치 않다. HIV-1 면역원의 발현 수준을 증가시키기 위한 몇 가지 방법이 사용되어 왔는데, 예를 들어 코돈 최적화 [참고: Andre, S., et al. 1998, Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. J Virol 72:1497-503; Deml, L., et al. A. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. J. Virol. 75: 10991-13001], RNA 최적화 [참고: Muthumani, K., et al. 2003. Novel engineered HIV-1 East African Clade-A gp160 plasmid

construct induces strong humoral and cell-mediated immune responses in vivo. Virology 314:134-46; Schneider, R., M. et al. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. J. Virol 71:4892-4903] 및 RNA 이차 구조가 약한 면역글로빈 리더 서열의 부가 [참고: Yang, J. S., et al., 2001. Induction of potent Th1-Type immune responses from a novel DNA vaccine for West Nile Virus New York Isolate (WNV-NY1999). J. Infect Diseases 184:809-816] 방법이 있다.

[0005] 인간 유두종 바이러스 (HPV)는 환상 dsDNA 게놈 (7,000 내지 8,000 염기쌍)을 갖고 있다. 200개 이하의 상이한 유전형이 있다. 계통발생학적으로, HPV는 고도로 보존된다. 점막 HPV는 "고 위험" 또는 "저 위험"으로 분류된다. 저 위험 군에는 유형 6, 11, 42 등이 포함된다. 관련 질병에는 생식기 사마귀; 저 악성도 자궁경부, 항문, 외음부, 질 형성이상; 및 재발성 호흡 유두종증이 포함된다. 고 위험 군에는 유형 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 등이 포함된다. 관련 질환에는 자궁경부암, 전암성 형성이상의 주요 원인; 항문, 외음부, 질, 편도선암의 주 원인; 및 기타 기도소화관의 암에 대한 조인자가 포함된다. 매일, 800명의 여성이 자궁경부암으로 인해 사망하고 있다.

[0006] HPV E6 및 E7 단백질은 종양형성과 종양 상태 유지를 위해 필요한 종양 특이적 항원이다. 자궁경부암 환자에게서는 E7-특이적 면역 반응이 결실된다. E6 단백질과 E7 단백질 둘 다는 세포성 인간 종양 억제인자 유전자 생성물과 특이적으로 상호 작용하는데, E6은 p53과 상호 작용하고 E7은 Rb (망막모세포종 종양 억제인자 유전자)와 상호 작용한다. E6과 E7은 이상적인 면역치료적 표적이다.

[0007] hTERT는 염색체 단축으로 인한 세포 사멸을 방지하기 위해 텔로미어 (telomere)의 말단 상에 TTAGGG 태그를 합성하는 인간 텔로머라제 역전사효소이다. 배아 세포와 몇몇 생식세포계 세포는 정상적으로 hTERT를 발현하여 세포 집단의 생체 항상성을 조절한다. 그러나 암 세포는 세포 집단의 생체 항상성을 붕괴시키기 위해 이러한 조절 기전을 이용하고 있다. 예를 들어, hTERT 과발현이 인간 암 세포의 85% 이상에서 일어난다. 따라서, hTERT는 이상적인 면역치료적 표적이다.

[0008] hTERT는 HCV 또는 HPV 감염으로 인해 hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대한 면역치료를 증강시킬 수도 있다. 고 위험 HPV 유형으로부터의 E6 종양단백질은 인간 각질세포에서 인간 텔로머라제 역전사효소 (hTERT) 전사를 활성화시킨다. 간 내에서의 초기 종양성 병변과 형성이상 병변은 hTERT를 비정상적으로 높은 수준으로 발현하기도 한다. 따라서, HPV 및 HCV에 대한 면역요법은 hTERT를 비정상적 수준으로 발현하는 세포를 표적으로 함으로써 증강시킬 수 있다. hTERT와 HPV 또는 HCV 단백질 또는 이러한 단백질을 암호화하는 핵산 둘 다를 사용하는 복합 면역요법이 관심을 끄는 면역요법이다.

[0009] 인플루엔자 적혈구응집소 (HA)는 인플루엔자 바이러스성 입자의 표면 상에서 발현되고 이러한 바이러스와 그의 숙주 세포 간의 초기 접촉에 대해 책임이 있다. HA는 널리 공지된 면역원이다. 조류 인플루엔자 균주인 인플루엔자 A 균주 H1N5는 특히 인간 집단에 위협이 되는데, 이는 그의 HA 단백질이 천연 돌연변이에 의해 약간 유전적으로 재편성되는 경우, 이는 기타 바이러스 균주와 비교해서 인간 세포의 감염성을 상당히 증가시켰기 때문이다. 유아 및 노인 또는 면역저하된 성인 인간을 바이러스성 H1N5 균주로 감염시키면, 이는 열악한 임상적 결과와 종종 상관이 있다. 따라서, HA 및 H1N5 인플루엔자 균주의 기타 인플루엔자 분자는 이상적인 면역치료적 표적이다.

발명의 내용

[0010] **발명의 요약**

[0011] 본 발명은 그에 대하여 항-HIV 면역 반응을 생성시킬 수 있는 개선된 면역원성 표적을 제공하는 핵산 구조물 및 이에 의해 암호화된 단백질에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 HIV 아형 A 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열, HIV 아형 B 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열, HIV 아형 C 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열, HIV 아형 D 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열, HIV 아형 B 컨센서스 Nef-Rev 단백질에 대한 컨센서스 서열, 및 HIV Gag 단백질 아형 A, B, C 및 D에 대한 컨센서스 서열을 제공한다.

[0013] 본 발명은 이러한 단백질 서열을 암호화하는 구조물, 상기 단백질 및/또는 이러한 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 백신, 및 항-HIV 면역 반응의 유도 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 서열 1; 서열 1의 단편; 서열 1과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 1과의 상동성이 90% 이상인

서열의 단편; 서열 3; 서열 3의 단편; 서열 3과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 3과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 5; 서열 5의 단편; 서열 5와의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 5와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 7; 서열 7의 단편; 서열 7과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 7과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 9; 서열 9의 단편; 서열 9와의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 9와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 11; 서열 11의 단편; 서열 11과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 서열 11과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은 서열 16; 서열 17; 서열 18; 서열 19; 서열 20 및 서열 21로 이루어진 군 중에서 선택된 단백질을 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0016] 본 발명은 서열 2를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 2를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 4를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 4와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 4와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 6을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 6을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 8을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 8과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 8을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 8과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 10을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 10과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 10을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 10과의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 서열 12를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 12와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 서열 12를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편; 및 서열 12와의 상동성이 90% 이상인 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.

[0017] 본 발명은 추가로, 이러한 핵산 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 있어서의 상기 제약 조성물의 용도를 제공한다.

[0018] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 제조합 백신, 및 이러한 제조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 있어서의 상기 제조합 백신의 용도를 제공한다.

[0019] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 있어서의 상기 생 약독화 병원체의 용도를 제공한다.

[0020] 생 약독화 병원체

[0021] 본 발명은 추가로, 서열 2; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 2의 단편; 서열 2와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 4; 서열 4와의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 4의 단편; 서열 4와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 6; 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 6의 단편; 서열 6과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 8; 서열 8과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 8의 단편; 서열 8과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 10; 서열 10과의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 10의 단편; 서열 10과의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편; 서열 12; 서열 12와의 상동성이 90% 이상인 서열; 서열 12의 단편; 및 서열 12와의 상동성이 90% 이상인 서열의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 제공한다.

[0022] 본 발명은 추가로, 서열 16; 서열 17; 서열 18; 서열 19; 서열 20 및 서열 21로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 제공한다.

[0023] 본 발명은 추가로, 이러한 단백질을 포함하는 제약 조성물, 및 상기 단백질을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 있어서의 상기 제약 조성물의 용도를 제공한다.

- [0024] 본 발명은 추가로, 상기 단백질을 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 있어서의 상기 재조합 백신의 용도를 제공한다.
- [0025] 본 발명은 추가로, 상기 단백질을 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HIV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 있어서의 상기 생 약독화 병원체의 용도를 제공한다.
- [0026] 킨센서스 HPV 유전자형 16 E6-E7 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 이러한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0027] 본 발명은 서열 22; 그의 단편; 서열 22와의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명은 또한, 서열 23을 암호화하는 핵산 서열; 서열 24를 암호화하는 핵산 서열; 서열 25를 암호화하는 핵산 서열; 서열 26을 암호화하는 핵산 서열; 및 서열 27을 암호화하는 핵산 서열로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명은 또한, 이러한 핵산 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명은 또한, 서열 23; 그의 단편; 서열 23과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명은 또한, 서열 23; 서열 24; 서열 25; 서열 26; 및 서열 27로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명은 또한, 이러한 단백질을 포함하는 제약 조성물, 및 상기 단백질을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명은 또한, 상기 단백질을 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 또한, 상기 단백질을 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 킨센서스 HCV 유전자형 1a 및 1b E1-E2 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 이러한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0038] 본 발명은 서열 30; 그의 단편; 서열 30과의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명은 또한, 서열 31을 암호화하는 핵산 서열로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명은 또한, 이러한 핵산 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HCV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HCV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HCV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명은 또한, 서열 31; 그의 단편; 서열 31과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다.

- [0044] 본 발명은 또한, 이러한 단백질을 포함하는 제약 조성물, 및 상기 단백질을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HCV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명은 또한, 상기 단백질을 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HCV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명은 또한, 상기 단백질을 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HCV에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 컨센서스 hTERT 아미노산 서열을 포함하는 단백질 및 이러한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0048] 본 발명은 추가로, 서열 34; 그의 단편; 서열 34와의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명은 또한, 이러한 핵산 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명은 또한, 서열 35; 그의 단편; 서열 35와의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명은 또한, 이러한 단백질을 포함하는 제약 조성물, 및 상기 단백질을 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명은 또한, 상기 단백질을 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0055] 본 발명은 또한, 상기 단백질을 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, hTERT를 발현하는 과증식성 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0056] 인플루엔자 H5N1 컨센서스 HA 아미노산 서열, 인플루엔자 H1N1 및 H5N1 컨센서스 NA 아미노산 서열, 인플루엔자 H1N1 및 H5N1 컨센서스 M1 아미노산 서열, 및 인플루엔자 H5N1 컨센서스 M2E-NP 아미노산 서열을 포함하는 단백질; 및 이러한 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0057] 본 발명은 추가로, 서열 36; 그의 단편; 서열 36과의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0058] 본 발명은 추가로, 서열 38; 그의 단편; 서열 38과의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명은 추가로, 서열 40; 그의 단편; 서열 40과의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명은 추가로, 서열 42; 그의 단편; 서열 42와의 상동성이 90% 이상인 뉴클레오티드 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명은 또한, 이러한 핵산 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV, HCV 및 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0062] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV, HCV 및 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.

- [0063] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV, HCV 및 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0064] 본 발명은 또한, 상기 핵산 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 핵산 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV, HCV 및 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0065] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV, HCV 및 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명은 추가로, 상기 핵산 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, HPV, HCV 및 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명은 추가로, 서열 37; 그의 단편; 서열 37과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 분자에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명은 추가로, 서열 39; 그의 단편; 서열 39과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 분자에 관한 것이다.
- [0069] 본 발명은 추가로, 서열 41; 그의 단편; 서열 41과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 분자에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명은 추가로, 서열 43; 그의 단편; 서열 43과의 상동성이 90% 이상인 서열; 및 그의 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 분자에 관한 것이다.
- [0071] 본 발명은 또한, 상기 단백질 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 단백질 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0072] 본 발명은 추가로, 상기 단백질 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0073] 본 발명은 추가로, 상기 단백질 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0074] 본 발명은 또한, 상기 단백질 분자를 포함하는 제약 조성물, 및 상기 단백질 분자를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0075] 본 발명은 추가로, 상기 단백질 분자를 포함하는 재조합 백신, 및 이러한 재조합 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.
- [0076] 본 발명은 추가로, 상기 단백질 분자를 포함하는 생 약독화 병원체, 및 이러한 생 약독화 병원체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 EY2E1-B의 아미노산 서열과 EK2P-B의 아미노산 서열을 비교 도시한 것이다. 밑줄친 것은 IgE 리더 서열이다. 상자에 담은 영역은 가변 영역을 나타낸다. *는 CCR5 활용에 관여한 6개 중요한 잔기를 의미한다. 절단 부위는 화살표로 표시한다. 막관통 (transmembrane) 도메인은 점선으로 나타낸다.

도 2는 두 가지 HIV-1 아형 B 외막 서열의 계통발생학적 관계를 도시한 것이다. 42개 HIV-1 아형 B 외막 서열, EY2E1-B, EK2P-B, 2개 아형 D 및 2개 아형 C 서열 (외집단)이 계통발생학적 분석에 포함되었다. 광범위한 다양성 샘플을 나타내는 아형 B 외막 서열은 다음 11개 국가로부터 유래되었다: 아르헨티나 (1); 호주 (6); 중국 (1); 프랑스 (4); 독일 (1); 영국 (2); 이탈리아 (1); 일본 (1); 네덜란드 (4); 스페인 (1); 미국 (20). EY2E1-B 및 EK2P-B 서열은 검은색 상자 모양으로 도시하였다.

도 3은 외막 면역원의 발현을 도시한 것이다. 패널 A는 EY2E1-B 및 EK2P-B 유전자의 웨스턴 블롯팅 (Western

blotting) 분석으로부터의 결과를 나타낸다. RD 세포를 상이한 플라스미드로 형질감염시켰다. 48시간 후에, 세포 용해물을 수집하였다. 샘플을 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하고, HIV-1 gp120 모노클로날 (2G12)로 프로빙 하였다. 부하 대조군에 대해서는, 블롯을 스트리핑하고 모노클로날 항-액틴 항체로 재프로빙하였다. 패널 B는 EY2E1-B 및 EK2P-B 유전자의 면역형광 검정으로부터의 결과를 나타낸다. 외막 단백질을 발현하는 형질감염시킨 RD 세포는 특유의 적색 형광을 나타내었다. HIV-1 외막-특이적 모노클로날 항체 F105는 일차 항체의 공급원으로 제공되었다.

도 4는 면역시킨 마우스의 혈청에서 총 IgG 항체 역가를 도시한 것이다. 패널 A는 아형 B 외막-특이적 항체 반응의 측정치를 나타낸다. 패널 B는 아형 A/E 외막-특이적 항체 반응의 측정치를 나타낸다. 패널 C는 아형 C 외막-특이적 항체 반응의 측정치를 나타낸다. DNA 구조물 pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 면역시킨 후 체액성 면역 반응이 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 탐지되었다. 각 마우스를 DNA 각각 100 μ g씩을 2주 간격으로 3회 근육내 주사함으로써 면역시켰다. 각 군 (n=3)으로부터의 마우스를 세 번째 면역시킨지 1주 후에 방혈시키고, 동등하게 풀링된 혈청을 차단 완충액에서 희석시킨 다음, 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 분석하였다. pVAX를 이용하여 면역시킨 마우스로부터 수집한 풀링된 혈청을 대조군으로서 사용하였다. 흡광도 (OD)를 450 nm 하에 측정하였다. 각 데이터 점은 각 군당 3마리 마우스 혈청으로부터 평균낸 3개의 OD 값을 나타내고, 값은 3가지 별개의 검정에서 수득된 ELISA의 평균을 나타낸다.

도 5는 Ba1B/C 마우스와 HLA-A2 트랜스제닉 (transgenic) 마우스 둘 다에서 pEY2E1-B에 의한 세포-매개형 면역 반응의 유도를 도시한 것이다. pEY2E1-B 및 pEK2P-B를 이용하여 DNA 백신접종한 후 비장 세포 100만개 당 아형 B 컨센서스 외막-특이적 IFN- γ 스팟 형성 세포 (Spot Forming Cell, SFC)의 빈도를 Ba1B/C 마우스 (패널 A)와 트랜스제닉 마우스 (패널 C) 둘 다에서 ELISpot 검정에 의해 결정하였다. pEY2E1-B 및 pEK2P-B를 이용하여 DNA 백신접종한 후 비장 세포 100만개 당 CD8-고갈된, 아형 B 컨센서스 외막-특이적 IFN- γ 스팟 형성 세포의 빈도를 또한, Ba1B/C 마우스 (패널 B)와 트랜스제닉 마우스 (패널 D) 둘 다에서 결정하였다. 비장 세포를 개개의 면역시킨 마우스 (한 무리당 3마리 마우스)로부터 단리하고, 중복 컨센서스 아형 B 외막 펩티드 풀로 시험관내 자극하였다. 주쇄 pVAX 면역시킨 마우스를 음성 대조군으로서 포함시켰다. 그 값은 IFN- γ SFC의 평균 + 평균의 표준 편차이다. (패널 E) 아형 B 컨센서스 외막-특이적 우성 에피토프의 성상 확인. pEY2E1-B 및 pEK2P-B 백신접종한 Ba1B/C 마우스 각각으로부터 수집한 비장 세포를 24시간 동안 29개 HIV-1 아형 B 컨센서스 외막 펩티드 풀과 함께 배양하였다. IFN- γ 분비성 세포를 상기 언급된 바와 같이 ELISpot 검정에 의해 결정하였다.

도 6은 Ba1B/C 마우스와 HLA-A2 트랜스제닉 마우스 둘 다에서 pEY2E1-B에 의해 유도된 교차 반응성을 도시한 것이다. HIV-1 MN 외막 펩티드 (패널 A), HIV-1 군 M (패널 B), 아형 C 컨센서스 외막 펩티드 (패널 C) 및 2개의 아형 C 단리물 외막 펩티드 (패널 D 및 E)의 4개의 개별 펩티드 풀에 대하여 pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 백신접종함으로써 유도된 Ba1B/C 마우스에서의 부가의 T-세포 면역 반응을 IFN- γ ELISpot 검정에 의해 측정하였다. HIV-1 MN 외막 펩티드 (패널 F), HIV-1 군 M (패널 G), 아형 C 컨센서스 외막 펩티드 (패널 H) 및 2개의 아형 C 단리물 외막 펩티드 (패널 I 및 J)의 4개의 개별 펩티드 풀에 대하여 pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 백신접종함으로써 유도된 HLA-A2 트랜스제닉 마우스에서의 부가의 T-세포 면역 반응을 또한 측정하였다. 주쇄 pVAX 면역시킨 마우스를 음성 대조군으로서 포함시켰다.

도 7은 pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 면역시킨 Ba1B/C 마우스 (패널 A)와 HLA-A2 트랜스제닉 마우스 (패널 B) 둘 다에서 아형 B MN 외막-특이적 우성 에피토프의 성상 확인을 도시한 것이다. pEY2E1-B 및 pEK2P-B 백신접종한 Ba1B/C 마우스 및 트랜스제닉 마우스 각각으로부터 수집한 비장 세포를 24시간 동안 29개 HIV-1 아형 B MN 외막 펩티드 풀과 함께 배양하였다. IFN- γ 분비성 세포를 상기 언급된 바와 같이 ELISpot 검정에 의해 결정하였다.

도 8은 E72E1-B의 기능성 도메인 (약 700+ 아미노산)을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 9는 E72E1-B 구조물의 지도를 도시한 것이다.

도 10 패널 A 및 B는 강력한 세포성 면역 반응이 E72E1-B를 유도시킨다는 것을 도시한 것이다.

도 11 패널 A 및 B는 강력하고 광범위한 교차 반응성 세포성 면역 반응이 E72E1-B를 유도시킨다는 것을 도시한 것이다.

도 12 패널 A-D는 강력한 교차-분기군 (clade) 세포성 면역 반응이 E72E1-B를 유도시킨다는 것을 도시한 것이다.

도 13은 실시예 2에서의 연구를 위해 설계된 면역원을 도시한 것이다.

도 14는 계통발생학적 관계를 도시한 것이다: 36개 HIV-1 아형 C 외막 서열, EY3E1-C, EK3P-C, 2개의 아형 B, 1개의 아형 A 및 1개의 아형 D 서열 (외집단)을 계통발생학적 분석에 포함시켰다. 광범위한 다양성 샘플을 나타내는 아형 C 외막 서열은 12개 국가로부터 유래되었다.

도 15 패널 A 및 B는 pEY3E1-C에 의해 유도된 세포성 반응 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 16은 pEY3E1-C에 의해 유도된 세포성 반응 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 17 패널 A-D는 동일한 분기군 내에서 pEY3E1-C에 의해 유도된 교차-반응성 세포성 반응 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 18 패널 A 및 B는 pEY3E1-C에 의해 유도된 교차-반응성 세포성 반응 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다. 패널 A는 아형 C (우루과이) env-특이적 IFN- γ ELISpot으로부터의 데이터를 나타낸다. 패널 B는 아형 C (남아프리카) env-특이적 IFN- γ ELISpot으로부터의 데이터를 나타낸다.

도 19 패널 A-F는 분기군 사이에서 pEY3E1-C에 의해 유도된 교차-반응성 세포성 반응 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 20 패널 A-X는 HIV-1 gag 컨센서스 구조물에 의해 유도된 면역 반응 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 21은 생식관 상피에서 HPV 생활 주기를 예시한 것이다.

도 22는 HPV-16 게놈 구성 지도를 도시한 것이다.

도 23은 면역원 설계를 예시한 것이다: *는 p53 결합 및 분해에 있어 중요한 결실 또는 돌연변이를 지칭하고; Δ 는 Rb 결합 부위 내에서의 돌연변이를 지칭한다.

도 24는 HPV E6 및 E7 단백질에 대한 암호화 서열을 포함하는 유전 구조물 p1667, 및 HPV 삽입물이 결합되고 음성 대조군으로서 사용되는 주쇄 플라스미드인 pVAX의 예시를 포함하고 있다.

도 25 패널 A-D는 DNA 면역원 p1667에 의해 유도된 세포성 면역 반응을 도시한 것이다.

도 26은 면역우성 에피토프 지도화 결과를 도시한 것이다.

도 27은 C57/BL6 마우스에서의 보호를 연구하기 위해 E6/E7 DNA 백신을 사용하는 예방적 실험 결과를 도시한 것이다.

도 28은 C57/BL6 마우스에서의 보호를 연구하기 위해 E6/E7 DNA 백신을 사용하는 종양 퇴행 실험 결과를 도시한 것이다.

도 29는 비장에서 E7 사량체 (Tetramer) 양성 림프구를 탐지하는 실험으로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 30은 종양에서 E7 사량체 양성 림프구를 탐지하는 실험으로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 31은 트랜스제닉 마우스에서 DNA 백신 보호 연구로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 32는 플라스미드 암호화된 IL-12를 근육내 (IM) 공동-주사한 다음 전기천공 (EP)시킨 HIV-1 컨센서스 면역원에 대한 증강된 세포성 면역 반응을 도시한 것이다. (a) 제1 면역, (b) 제2 면역, 및 (c) 제3 면역한지 2주 후에 IFN γ ELISpot을 수행하였다 (기타 세 가지와 비교하여 알 수 있는 바와 같다). env에 대한 반응을 검은색 막대로 도시하고, gag는 흰색 막대로 도시하였는데, 데이터는 적층 군 평균 반응 \pm SEM으로서 제시된다.

도 33은 근육내 전기천공을 이용한 증강된 교차-반응성 세포성 면역 반응을 도시한 것이다. 3회 면역시킨 후, HIV-1 군 M 펩티드의 4가지 펩티드 폴에 대하여 pEY2E1-B 면역시킨 짧은 꼬리 원숭이 (macaque)에서 총 T-세포 면역 반응을 IFN γ ELISpot에 의해 결정하였다. 데이터는 적층 군 평균 \pm SEM으로서 제시된다.

도 34는 IM 전기천공과 플라스미드 IL-12를 이용한 HIV-1 면역원에 대한 증강된 기억 반응을 도시한 것이다. 마지막으로 면역시킨지 5개월 후, ELISpot 검정을 수행하여, IL-12 플라스미드를 이용한 공동-면역을 수반하거나 수반하지 않으면서 IM 및 EP 면역시킨 군에서 gag 및 env에 대한 항원-특이적 기억 반응을 결정하였다. 데이터는 군 평균 반응 \pm SEM으로서 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0078]

- [0079] 본원에 사용되는 바와 같은, "엄격한 혼성화 조건" 또는 "엄격한 조건"은 핵산 분자가 또 다른 핵산 분자와는 혼성화할 것이지만, 기타 서열과는 그렇지 않는 조건을 지칭한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고 상이한 환경에서는 상이할 것이다. 보다 긴 서열은 보다 고온에서 특이적으로 혼성화한다. 일반적으로, 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대한 열 융점 (T_m)보다 약 5°C 더 낮도록 선택한다. T_m 은 표적 서열에 대해 상보적인 프로브의 50%가 평형상태에서 표적 서열과 혼성화되는 온도 (규정된 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하)이다. 표적 서열은 일반적으로 과량으로 존재하기 때문에, T_m 에서 프로브의 50%가 평형상태를 차지한다. 전형적으로, 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7.0 내지 8.3 하에 약 1.0 M 나트륨 이온, 전형적으로 약 0.01 내지 1.0 M 나트륨 이온 (또는 기타 염)이고, 온도가 짧은 프로브, 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드 (예: 10 내지 50개 뉴클레오티드)의 경우에는 약 30°C 이상이고 보다 긴 프로브, 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드의 경우에는 약 60°C 이상이다. 엄격한 조건은 탈안정화제, 예를 들어 포름아미드를 부가하면서 달성할 수도 있다.
- [0080] 뉴클레오티드 및 아미노산에 대한 서열 상동성은 FASTA, BLAST 및 갭이 있는 BLAST [참고: Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389; 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다] 및 PAUP* 4.0b10 소프트웨어 (공급처: D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)를 사용하여 결정할 수 있다. "유사율"은 PAUP* 4.0b10 소프트웨어 (공급처: D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)를 사용하여 계산한다. 컨센서스 서열의 평균 유사율은 계통발생학적 트리 내의 모든 서열과 비교해서 계산한다 (도 2 및 14 참고).
- [0081] 간략하게 설명하면, 기본 국소 정렬 조사 도구 (Basic Local Alignment Search Tool)를 나타내는 BLAST 알고리즘은 서열 유사율을 결정하는 데에 적합하다 [참고: Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다]. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 다음 공급처로부터 공개적으로 입수 가능하다 [the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)]. 이러한 알고리즘은 먼저, 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 워드 (word)와 정렬되는 경우에 몇몇 양성 값을 가진 한계 스코어 T에 부합하거나 이를 충족시키는 조회 서열에서 길이 W의 짧은 워드를 확인함으로써 고 스코어링 서열 쌍 (HSP)을 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃하는 워드 스코어 한계치로서 지칭된다 [Altschul et al., 상기 참고]. 이들 초기의 이웃하는 워드 히트는 그를 함유하는 HSP를 발견하기 위한 조사를 개시하기 위한 시드로서 작용한다. 이러한 워드 히트는 누적 정렬 스코어가 증가할 수 있는 한은 각 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 워드 히트가 각 방향으로 연장되는 것은 1) 누적 정렬 스코어가 그의 최대 도달 값으로부터 약 X 정도 감소하는 경우; 2) 하나 이상의 음성-스코어링 잔기 정렬의 축적으로 인해, 누적 스코어가 제로 또는 그 이하로 되는 경우; 또는 3) 어느 한 서열의 말단에 도달하는 경우에 중지된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬 민감도와 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 디폴트 (default)로서 워드 길이 (W) 11, BLOSUM62 스코어링 매트릭스 [참고: Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919; 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다] 정렬 (B) 50, 기대치 (E) 10, M=S, N=4, 및 양 가닥의 비교를 사용한다. BLAST 알고리즘 [참고: Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787; 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다] 및 갭이 있는 BLAST는 두 서열 간의 유사율을 통계적으로 분석한다. BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사율의 한 가지 측정치는 가장 적은 총액 확률 (P(N))인데, 이는 두 뉴클레오티드 서열 간의 매치가 우연히 일어날 수도 있다는 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 시험 핵산을 다른 핵산과 비교하는 경우에 가장 적은 총액 확률이 약 1 미만, 바람직하게 약 0.1 미만, 보다 바람직하게 약 0.01 미만, 가장 바람직하게 약 0.001 미만인 경우에, 이러한 핵산은 또 다른 핵산과 유사한 것으로 간주된다.
- [0082] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유전 구조물"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 암호화 서열에는 프로모터를 포함한 조절성 요소와 작동적으로 연결된 개시 및 종결 신호, 및 핵산 분자를 투여한 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 폴리아데닐화 신호가 포함된다.
- [0083] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "발현 가능한 형태"는 개체의 세포에 존재하는 경우에 암호화 서열이 발현되도록 단백질을 암호화하는 암호화 서열과 작동적으로 연결된 필수 조절성 요소를 함유하는 유전자 구조물을 지칭한다.
- [0084] **개요**
- [0085] 본 발명은 면역원에 의해 유도된 세포성 면역 반응을 증강시키기 위한 다상 (multi-phase) 전략을 활용함으로써 개선된 백신을 제공한다. 면역원에 대한 변형된 컨센서스 서열이 생성되었다. 코돈 최적화, RNA 최적화, 및 구조물의 면역원성을 증가시키기 위한 고 효율성 면역글로빈 리더 서열의 부가를 포함한 유전적 변형이 또한 기

재된다. 상응하는 코돈 최적화 면역원보다 더 강력하고 광범위한 세포성 면역 반응을 유도시키는 신규한 면역원을 설계하였다.

[0086] 본 발명은 단백질 및 단백질을 암호화하는 유전 구조물에, 그에 대하여 항-HIV, 항-HPV, 항-HCV, 항-인플루엔자 및 항-hTert 면역 반응을 각각 유도시킬 수 있는 면역원으로서 특히 유효하도록 만드는 에피토프를 제공함으로써 개선된 HIV, HPV, HCV, 인플루엔자 및 암 백신을 제공한다. 따라서, 백신을 제공하여 치료적 또는 예방적 면역 반응을 유도시킬 수 있다. 몇몇 양태에서, 이러한 면역원을 전달하기 위한 수단은 DNA 백신, 재조합 백신, 단백질 소단위체 백신, 면역원을 포함하는 조성물, 약독화 백신 또는 사멸 백신이다. 몇몇 양태에서, 백신은 하나 이상의 DNA 백신, 하나 이상의 재조합 백신, 하나 이상의 단백질 소단위체 백신, 면역원을 포함하는 하나 이상의 조성물, 하나 이상의 약독화 백신 및 하나 이상의 사멸 백신으로 이루어진 군 중에서 선택된 복합물을 포함한다.

[0087] 본 발명의 몇몇 양태에 따르면, 본 발명에 따르는 백신을 개체에게 전달하여 이러한 개체의 면역계의 활성을 조정함으로써 HIV, HPV, HCV, 인플루엔자 또는 hTERT에 대한 면역 반응을 증강시킨다. 단백질을 암호화하는 핵산 분자가 개체의 세포에 의해 흡수되는 경우, 이러한 세포에서 뉴클레오티드 서열이 발현되고, 이로써 단백질이 개체에게 전달된다. 본 발명의 국면은 핵산 분자 (예: 플라스미드) 상의 단백질의 암호화 서열을 재조합 백신의 일부로서 및 약독화 백신의 일부로서, 벡터의 단리된 단백질 또는 단백질 일부로서 전달하는 방법을 제공한다.

[0088] 본 발명의 몇몇 국면에 따르면, HIV, HPV, HCV, 인플루엔자 및 암에 대하여 개체를 예방적 및/또는 치료적으로 면역시키는 조성물 및 방법이 제공된다.

[0089] 본 발명은 조절성 요소와 작동적으로 연결된 본 발명의 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 전달하기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 국면은 본 발명의 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 백신; 본 발명의 단백질을 암호화하고/하거나 본 발명의 단백질을 포함하는 생 약독화 병원체; 본 발명의 단백질을 포함하는 사멸 병원체; 또는 본 발명의 단백질을 포함하는 리소솜 또는 소단위체 백신과 같은 조성물을 전달하기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 조성물을 포함하는 주사가 가능한 제약 조성물에 관한 것이다.

[0090] **HIV**

[0091] 본 발명은 HIV 면역원에 의해 유도된 세포성 면역 반응을 증강시키기 위한 다상 전략을 활용함으로써 개선된 항-HIV 백신을 제공한다. 면역원에 대한 변형된 컨센서스 서열이 생성되었다. 코돈 최적화, RNA 최적화, 및 구조물의 면역원성을 증가시키기 위한 고 효율성 면역글로빈 리더 서열의 부가를 포함한 유전적 변형이 또한 기재된다. 상응하는 코돈 최적화 면역원보다 더 강력하고 광범위한 세포성 면역 반응을 유도시키는 신규한 면역원을 설계하였다.

[0092] 서열 1은 아형 A 컨센서스 외막 DNA 서열 구조물이다. 서열 1은 아형 A 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. 서열 2는 아형 A 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열 구조물에 대한 아미노산 서열을 포함한다. IgE 리더 서열은 서열 15이다. 서열 16은 아형 A 컨센서스 외막 단백질 서열이다.

[0093] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 16, 그의 단편, 서열 16을 암호화하는 핵산 분자, 또는 그의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 2 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 1을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 15 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0094] 서열 1의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 1의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는

1890개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 이상의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 2070개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 1의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 1의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 180개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1890개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0095] 서열 2의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 2의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 90개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 510개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 570개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 이상의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 690개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 단편은 90개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 미만의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 690개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0096] 서열 3은 아형 B 컨센서스 외막 DNA 서열 구조물이다. 서열 3은 아형 B 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. 서열 4는 아형 B 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열 구조물에 대한 아미노산 서열을 포함한다. IgE 리더 서열은 서열 15이다. 서열 17은 아형 B 컨센서스 외막 단백질 서열이다.

[0097] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 17, 그의 단편, 서열 17을 암호화하는 핵산 분자, 또는 그의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 4 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 3을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 15 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0098] 서열 3의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 3의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1890개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2160개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2250개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇

양태에서는 2340개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2430개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2520개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2620개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2700개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 3의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 3의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 180개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1890개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1020개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2160개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2250개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2340개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2430개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2520개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2610개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2700개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0099] 서열 4의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 4의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 90개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 510개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 570개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 690개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 단편은 90개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 690개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0100] 서열 5는 아형 C 컨센서스 외막 DNA 서열 구조물이다. 서열 5는 아형 C 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. 서열 6은 아형 C 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열 구조물에 대한 아미노산 서열을 포함한다. IgE 리더 서열은 서열 15이다. 서열 18은 아형 C 컨센서스 외막 단백질 서열이다.

[0101] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 18, 그의 단편, 서열 18을 암호화하는 핵산 분자, 또는 그의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 6 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 5를 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 15 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0102] 서열 5의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 5의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 이상

의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1890개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 5의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 5의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 180개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1890개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1020개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0103] 서열 6의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 6의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 90개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 510개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 570개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 690개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 단편은 90개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 690개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0104] 서열 7은 아형 D 컨센서스 외막 DNA 서열 구조물이다. 서열 7은 아형 D 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. 서열 8은 아형 D 외막 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열 구조물에 대한 아미노산 서열을 포함한다. IgE 리더 서열은 서열 15이다. 서열 19는 아형 D 컨센서스 외막 단백질 서열이다.

[0105] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 19, 그의 단편, 서열 19를 암호화하는 핵산 분자, 또는 그의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 8 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 7을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 15 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0106] 서열 7의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 7의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는

1890개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 이상의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 2140개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 7의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 7의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 180개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1800개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1890개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1980개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1020개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 2070개 미만의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 2140개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0107] 서열 8의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 8의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 90개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 510개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 570개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 이상의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 690개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 단편은 90개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 600개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 660개 미만의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 690개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0108] 서열 9는 아형 B Nef-Rev 컨센서스 외막 DNA 서열 구조물이다. 서열 9는 아형 B Nef-Rev 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. 서열 10은 아형 B Nef-Rev 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열 구조물에 대한 아미노산 서열을 포함한다. IgE 리더 서열은 서열 15이다. 서열 20은 아형 B Nef-Rev 컨센서스 단백질 서열이다.

[0109] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 20, 그의 단편, 서열 20을 암호화하는 핵산 분자, 또는 그의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 10 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 9를 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 15 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0110] 서열 9의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 9의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 이상의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 990개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 9의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 9의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 180개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서

는 810개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 990개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

- [0111] 서열 10의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 10의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 90개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 이상의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 330개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0112] 서열 11은 아형 A, B, C 및 D DNA 서열 구조물의 Gag 컨센서스 DNA 서열이다. 서열 11은 Gag 컨센서스 아형 A, B, C 및 D 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. 서열 12는 Gag 아형 A, B, C 및 D 단백질에 대한 컨센서스 서열과 연결된 IgE 리더 서열을 포함하는 HIV 백신 서열 구조물에 대한 아미노산 서열을 포함한다. IgE 리더 서열은 서열 15이다. 서열 21은 컨센서스 Gag 아형 A, B, C 및 D 단백질 서열이다.
- [0113] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 21, 그의 단편, 서열 21을 암호화하는 핵산 분자, 또는 그의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 12 또는 이를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 11을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 15 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0114] 서열 11의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 11의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 이상의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 이상의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 1800개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 11의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 11의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 180개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 630개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 810개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 990개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1170개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1350개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1530개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1710개 미만의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 1800개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0115] 서열 12의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 12의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 90개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 이상의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 이상의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 510개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 단편은 90개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 330개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 390개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 450개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 510개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0116] HPV

- [0117] 서열 22는 단백질 분해적 절단 서열에 의해 HPV E7에 대한 컨센서스 서열과 연결된, HPV E6에 대한 컨센서스 서열인 IgE 리더 서열을 포함하는 HPV 백신 서열에 대한 암호화 서열을 포함한다. HPV E6에 대한 컨센서스 서열은 서열 24에 제시된 면역우성 에피토프를 포함한다. HPV E7에 대한 컨센서스 서열은 서열 25에 제시된 면역우성 에피토프를 포함한다. HPV E6에 대한 컨센서스 서열은 서열 26이다. HPV E6에 대한 컨센서스 서열은 서열 27이다. IgE 리더 서열은 서열 28이다. 2개의 컨센서스 서열을 연결시키는 데에 유용한 단백질 분해적 절단 서열은 서열 29이다.
- [0118] 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 24 및/또는 서열 25, 또는 둘 중의 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 27 및/또는 서열 28, 또는 둘 중의 하나를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, 단백질 분해적 절단 서열, 예를 들어 서열 29에 의해 서열 28과 연결된 서열 27, 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, IgE 리더 서열인 서열 28, 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 백신은 바람직하게, 서열 23 또는 서열 22 내의 핵산 서열을 포함한다.
- [0119] 몇몇 양태에서, 단백질은 서열 23의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 단백질은 서열 23의 단편으로 이루어진다. 몇몇 양태에서, 핵산은 서열 22의 단편을 포함한다. 몇몇 양태에서, 핵산은 서열 22의 단편으로 이루어진다.
- [0120] 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 30개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 45개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 60개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 75개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 120개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 150개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 210개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 240개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 270개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 300개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 360개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 420개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 480개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 540개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 600개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 300개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 660개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 720개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 780개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 22의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 60개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 75개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 90개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 뉴클레오티드;

아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 270개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 300개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 360개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 420개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 480개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 540개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 31의 단편은 575개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 단편은 30개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 45개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 60개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 75개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 90개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 575개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0128] **hTERT**

[0129] hTERT는 염색체 단축으로 인한 세포 사멸을 방지하기 위해 텔로미어의 말단 상에 TTAGGG 태그를 합성하는 인간 텔로머라제 역전사효소이다. hTERT를 비정상적으로 고 발현시키는 과증식성 세포가 면역요법에 의해 표적화될 수 있다. 최근의 연구는 또한, hTERT가 HCV 및 HPV에 감염된 과증식성 세포 상에서 비정상적으로 발현된다는 것을 뒷받침해준다. 따라서, HPV와 HCV 둘 다에 대한 면역요법은 hTERT를 비정상적 수준으로 발현하는 세포를 표적화함으로써 증강시킬 수 있다.

[0130] 최근의 연구결과, hTERT 유전자로 형질감염시킨 수지상 세포에서의 hTERT 발현은 CD8+ 세포독성 T 세포를 유도시킬 수 있고, CD4+ T 세포를 항원-특이적 방식으로 유도시킬 수 있는 것으로 입증되었다. 따라서, 선택되는 항원을 제시할 수 있는 능력을 유지시키고 노화를 지연시키기 위해 항원 제시 세포 (APC) 내에서의 hTERT 발현을 이용하는 것은 새로운 면역요법 방법을 개발하는 데에 있어서 매력적이다.

[0131] 본 발명의 몇몇 양태에 따라서, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법은 이러한 개체에게 hTERT 단백질 및 그의 기능성 단편 또는 그의 발현 가능한 암호화 서열을, 본 발명의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 재조합 백신 및/또는 본 발명의 단백질을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신과 병용해서 투여하는 것을 포함한다.

[0132] 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 30, 및 다음 군 중에서 선택된 핵산 서열 또는 그의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함한다: 서열 34, 서열 35 및 그의 모든 조합물. 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 34 또는 서열 35를 포함한다. 서열 34는 hTERT를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 서열 35는 hTERT에 대한 아미노산 서열을 포함한다.

[0133] 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 22 및 서열 34 또는 서열 35를 포함한다. hTERT 및/또는 hTERT의 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 HPV 면역원과 병용해서 사용하는 것은 HPV-감염된 세포에 대한 세포-매개형 면역 반응을 증강시켜 준다.

[0134] 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 30개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 45개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 60개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 75개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 120개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 150개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 210개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 240개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 270개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 34의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 300개 이

이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 990개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1020개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1050개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1080개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1110개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1140개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1170개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1200개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1230개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1260개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1290개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1320개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1350개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1380개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1410개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1440개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1470개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 면역우성 에피토프를 암호화하는 서열을 바람직하게 포함한, 1500개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 35의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 단편은 24개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 30개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 36개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 42개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 48개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 54개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 60개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 72개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 90개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 260개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 290개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 320개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 350개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 380개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 410개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 440개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 470개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 500개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 530개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 560개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 590개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 620개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 650개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 680개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 710개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 740개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 770개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 800개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 830개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 860개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 890개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 920개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 950개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 980개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1010개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1040개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1070개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1200개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1230개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1290개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1320개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1350개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1380개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1410개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 1470개 미만의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 1500개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0136] 인플루엔자

[0137] 본 발명의 몇몇 양태에 따라서, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법은 이러한 개체에게 인플루엔자 균주 H5N1 적혈구응집소 (HA) 단백질 및 그의 기능성 단편 또는 그의 발현 가능한 암호화 서열을, 본 발명의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 재조합 백신 및/또는 본

발명의 단백질을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신과 병용해서 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 양태에서, 인플루엔자 백신 조성물 및 방법은 인플루엔자 바이러스 중으로부터의 HA 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 사용을 포함한다. 몇몇 양태에서, 인플루엔자 백신 조성물 및 방법은 인플루엔자 바이러스 균주 H1N5로부터의 HA를 암호화하는 핵산 서열 및 서열 38, 서열 40 및 서열 42로 이루어진 군 중에서 선택된 인플루엔자 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 사용을 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 36 또는 서열 37을 포함한다. 서열 36은 인플루엔자 바이러스의 H1N5 HA를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 서열 37은 인플루엔자 바이러스의 H1N5 HA에 대한 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 38 또는 서열 39를 포함한다. 서열 38은 인플루엔자 H1N1 및 H5N1 NA 컨센서스 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 서열 39는 인플루엔자 H1N1 및 H5N1 NA 컨센서스 서열에 대한 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 40 또는 서열 41을 포함한다. 서열 40은 인플루엔자 H1N1 및 H5N1 M1 컨센서스 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 서열 41은 인플루엔자 H1N1 및 H5N1 M1 컨센서스 서열에 대한 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 42 또는 서열 43을 포함한다. 서열 42는 인플루엔자 H5N1 M2E-NP 컨센서스 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 서열 43은 인플루엔자 H5N1 M2E-NP 컨센서스 서열에 대한 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 본 발명의 백신은 서열 36, 및 다음 군 중에서 선택된 서열을 포함한다: 서열 37, 서열 38, 서열 39, 서열 40, 서열 41, 서열 42, 서열 43, 및 그의 모든 조합물. 인플루엔자 바이러스 균주 H5N1 HA에 대한 컨센서스 서열은 서열 36에 제시된 면역우성 에피토프를 포함한다. 서열 36에 의해 암호화된 인플루엔자 바이러스 H5N1 HA 아미노산 서열은 서열 37이다. 인플루엔자 바이러스 H1N1/H5N1 NA에 대한 컨센서스 서열은 서열 38에 제시된 면역우성 에피토프를 포함한다. 서열 38에 의해 암호화된 인플루엔자 바이러스 균주 H1N1/H5N1 NA 아미노산 서열은 서열 39이다. 인플루엔자 바이러스 균주 H1N1/H5N1 M1에 대한 컨센서스 서열은 서열 40에 제시된 면역우성 에피토프를 포함한다. 서열 40에 의해 암호화된 인플루엔자 바이러스 H1N1/H5N1 M1 아미노산 서열은 서열 41이다. 인플루엔자 바이러스 H5N1 M2E-NP에 대한 컨센서스 서열은 서열 42에 제시된 면역우성 에피토프를 포함한다. 서열 42에 의해 암호화된 인플루엔자 바이러스 H5N1 M2E-NP 아미노산 서열은 서열 43이다. 본 발명의 백신은 상기 규정된 핵산 분자에 의해 암호화된 단백질 생성물 또는 단백질의 모든 단편을 포함할 수 있다.

[0138] 서열 36의 단편은 30개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 45개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 60개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 75개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 90개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 120개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 150개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 180개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 210개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 240개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 270개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 300개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 360개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 420개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 480개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 540개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 600개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 660개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 720개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 780개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 840개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 900개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 960개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1020개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1080개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1140개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1200개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1260개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1320개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1380개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1440개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1500개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1560개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1620개 이상의 뉴클레오티드

를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1680개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 1740개 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 36의 단편은 IgE 리더 서열에 대한 암호화 서열을 포함하지 않는다. 서열 36의 단편은 60개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 75개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 90개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 600개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 660개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 720개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 780개 미만; 몇몇 양태에서는 840개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 900개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 960개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1020개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1080개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1140개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1200개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1260개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1320개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1380개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1440개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1500개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1560개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1620개 미만의 뉴클레오티드; 몇몇 양태에서는 1680개 미만의 뉴클레오티드; 및 몇몇 양태에서는 1740개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0139] 서열 37의 단편은 15개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 30개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 45개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 60개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 75개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 90개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 105개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 120개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 150개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 180개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 210개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 240개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 270개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 300개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 360개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 420개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 480개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 540개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 서열 37의 단편은 565개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 서열 37의 단편은 30개 미만의 아미노산을 포함할 수 있고, 몇몇 양태에서는 45개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 60개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 75개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 90개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 120개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 150개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 180개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 210개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 240개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 270개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 300개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 360개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 420개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 480개 미만의 아미노산; 몇몇 양태에서는 540개 미만의 아미노산; 및 몇몇 양태에서는 565개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0140] 본 발명의 몇몇 양태에 따라서, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법은 이러한 개체에게 인플루엔자 균주 H1N1 및 인플루엔자 균주 H5N1 NA 단백질 및 그의 기능성 단편 또는 그의 발현 가능한 암호화 서열을, 본 발명의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 제조합 백신 및/또는 본 발명의 단백질을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신과 병용해서 투여하는 것을 포함한다.

[0141] 본 발명의 몇몇 양태에 따라서, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법은 이러한 개체에게 인플루엔자 균주 H1N1 및 인플루엔자 균주 H5N1 M1 단백질 및 그의 기능성 단편 또는 그의 발현 가능한 암호화 서열을, 본 발명의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 제조합 백신 및/또는 본 발명의 단백질을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신과 병용해서 투여하는 것을 포함한다.

[0142] 본 발명의 몇몇 양태에 따라서, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법은 이러한 개체에게 인플

루엔자 균주 H5N1 M2E-NP 단백질 및 그의 기능성 단편 또는 그의 발현 가능한 암호화 서열을, 본 발명의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 재조합 백신 및/또는 본 발명의 단백질을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신과 병용해서 투여하는 것을 포함한다.

[0143] **백신**

[0144] 본 발명은 단백질 및 단백질을 암호화하는 유전 구조물에, 그에 대하여 면역 반응을 유도시킬 수 있는 면역원으로서 특히 유효하도록 만드는 에피토프를 제공함으로써 개선된 백신을 제공한다. 따라서, 백신을 제공하여 치료적 또는 예방적 면역 반응을 유도시킬 수 있다. 몇몇 양태에서, 이러한 면역원을 전달하기 위한 수단은 DNA 백신, 재조합 백신, 단백질 소단위체 백신, 면역원을 포함하는 조성물, 약독화 백신 또는 사멸 백신이다. 몇몇 양태에서, 백신은 하나 이상의 DNA 백신, 하나 이상의 재조합 백신, 하나 이상의 단백질 소단위체 백신, 면역원을 포함하는 하나 이상의 조성물, 하나 이상의 약독화 백신 및 하나 이상의 사멸 백신으로 이루어진 군 중에서 선택된 복합물을 포함한다.

[0145] 본 발명의 몇몇 양태에 따르면, 본 발명에 따르는 백신을 개체에게 전달하여 이러한 개체의 면역계의 활성을 조정함으로써 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 단백질을 암호화하는 핵산 분자가 개체의 세포에 의해 흡수되는 경우, 이러한 세포에서 뉴클레오티드 서열이 발현되고, 이로써 단백질이 개체에게 전달된다. 본 발명의 국면은 핵산 분자 (예: 플라스미드) 상의 단백질의 암호화 서열을 재조합 백신의 일부로서 및 약독화 백신의 일부로서, 벡터의 단리된 단백질 또는 단백질 일부로서 전달하는 방법을 제공한다.

[0146] 본 발명의 몇몇 국면에 따르면, 개체를 예방적 및/또는 치료적으로 면역시키는 조성물 및 방법이 제공된다.

[0147] DNA 백신은 미국 특허 제5,593,972호, 제5,739,118호, 제5,817,637호, 제5,830,876호, 제5,962,428호, 제5,981,505호, 제5,580,859호, 제5,703,055호, 제5,676,594호, 및 이에 인용된 우선권 출원 (이들 각각이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. 이들 출원에 기재된 전달 프로토콜 이외에도, DNA를 전달하기 위한 대체 방법이 미국 특허 제4,945,050호 및 제5,036,006호 (이들 각각이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0148] 본 발명은 항원을 암호화하는 외래 유전자를 전달하기 위해 재조합 벡터를 사용하는 개선된 백신, 개선된 약독화 생 백신 및 개선된 사멸 백신 뿐만 아니라 소단위체 및 당단백질 백신에 관한 것이다. 약독화 생 백신, 외래 항원을 전달하기 위해 재조합 벡터를 사용하는 백신, 소단위체 백신 및 당단백질 백신은 미국 특허 제4,510,245호; 제4,797,368호; 제4,722,848호; 제4,790,987호; 제4,920,209호; 제5,017,487호; 제5,077,044호; 제5,110,587호; 제5,112,749호; 제5,174,993호; 제5,223,424호; 제5,225,336호; 제5,240,703호; 제5,242,829호; 제5,294,441호; 제5,294,548호; 제5,310,668호; 제5,387,744호; 제5,389,368호; 제5,424,065호; 제5,451,499호; 제5,453,364호; 제5,462,734호; 제5,470,734호; 제5,474,935호; 제5,482,713호; 제5,591,439호; 제5,643,579호; 제5,650,309호; 제5,698,202호; 제5,955,088호; 제6,034,298호; 제6,042,836호; 제6,156,319호 및 제6,589,529호 (이들 각각이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

[0149] 세포에 의해 흡수되는 경우, 유전 구조물(들)은 기능성 염색체의 분자로서 세포에 여전히 존재할 수도 있고/있거나 세포의 염색체성 DNA 내로 통합될 수 있다. DNA를 세포 내로 도입할 수 있는데, 여기서 플라스미드(들)의 형태로 별개의 유전 물질로서 존재한다. 또 다른 한편, 염색체 내로 통합될 수 있는 선형 DNA가 세포 내로 도입될 수 있다. DNA를 세포 내로 도입하는 경우, 염색체 내로의 DNA 통합을 증진시키는 시약을 가할 수 있다. 통합을 증진시키는 데에 유용한 DNA 서열을 DNA 분자에 포함시킬 수도 있다. 또 다른 한편, RNA를 세포에 투여할 수 있다. 중심절 (centromere), 텔로미어 및 복제 기점을 포함한 선형 미니염색체로서 유전 구조물을 제공하는 것이 또한 고려된다. 유전자 구조물은 세포에 살아있는 약독화 생 미생물 또는 재조합 미생물 벡터에서 유전 물질의 일부로서 존재할 수 있다. 유전자 구조물은 재조합 바이러스성 백신의 계능의 일부일 수 있는데, 여기서 유전 물질은 세포의 염색체 내로 통합되거나 여전히 염색체외이다. 유전 구조물은 핵산 분자의 유전자 발현에 필요한 조절성 요소를 포함한다. 이러한 요소에는 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호가 포함된다. 또한, 표적 단백질 또는 면역조절성 단백질을 암호화하는 서열의 유전자 발현에 종종 증강인자가 요구된다. 이들 요소가 목적 단백질을 암호화하는 서열과 작동적으로 연결되는 것이 필요하고, 조절성 요소가 이들이 투여된 개체에서 작동적인 것이 필요하다.

[0150] 개시 코돈 및 정지 코돈은 일반적으로, 목적 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부인 것으로 간주된다. 그러나, 이들 요소가 유전자 구조물이 투여되는 개체에서 기능성인 것이 필요하다. 개시 및 종결 코돈은 암호화 서열과 동일 프레임 내에 있어야만 한다.

- [0151] 사용된 프로모터 및 폴리아데닐화 신호는 개체의 세포 내에서 기능성이어야만 한다.
- [0152] 특히 인간에 대한 유전자 백신을 생성시키는 데에 있어서, 본 발명을 실시하는 데에 유용한 프로모터의 예에는 원숭이 바이러스 40 (SV40)로부터의 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스 (MV), 예를 들어 BIV 장 말단 반복 서열 (LTR) 프로모터, 몰로니 (Moloney) 바이러스, ALV, 시토메갈로 바이러스 (CMV), 예를 들어 CMV 즉발형 프로모터, 엡슈타인 바르 (Epstein Barr) 바이러스 (EBV), 라우스 (Rous) 육종 바이러스 (RSV) 뿐만 아니라 인간 유전자, 예를 들어 인간 액틴 (Actin), 인간 미오신 (Myosin), 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 인간 메탈로티오네인으로부터의 프로모터가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0153] 특히 인간에 대한 유전자 백신을 생성시키는 데에 있어서, 본 발명을 실시하는 데에 유용한 폴리아데닐화 신호의 예에는 SV40 폴리아데닐화 신호 및 LTR 폴리아데닐화 신호가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 특히, SV40 폴리아데닐화 신호로서 지칭된, pCEP4 플라스미드 (공급처: Invitrogen, San Diego CA) 내에 있는 SV40 폴리아데닐화 신호를 사용한다.
- [0154] DNA 발현에 요구되는 조절성 요소 이외에도, 기타 요소가 DNA 분자에 포함될 수도 있다. 이러한 부가의 요소에는 증강인자가 포함된다. 증강인자는 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 및 바이러스성 증강인자, 예를 들어 CMV, RSV 및 EBV로부터의 증강인자 중에서 선택될 수 있다.
- [0155] 구조물을 염색체외적으로 유지시키고 구조물의 다수 카피를 세포에서 생성시키기 위해 유전 구조물에 포유류 복제 기점을 제공할 수 있다. 플라스미드 pVAX1, pCEP4 및 pREP4 [공급처: Invitrogen (San Diego, CA)]는 통합 없이 고 카피 에피솜성 복제를 생성시키는 엡슈타인 바르 바이러스 복제 기점 및 핵 항원 EBNA-1 암호화 영역을 함유한다.
- [0156] 면역 적용 분야에 관련된 몇몇 바람직한 양태에서는, 본 발명의 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 부가적으로 이러한 표적 단백질에 대한 면역 반응을 추가로 증강시키는 단백질에 대한 유전자를 포함하는 핵산 분자(들)를 전달한다. 이러한 유전자의 예는 기타 사이토킨 및 림포카인, 예를 들어 알파-인터페론, 감마-인터페론, 혈소판 유래된 성장 인자 (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, 표피 성장 인자 (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 및 IL-15 (신호 서열이 결실된 IL-15를 포함하고, 임의로 IgE로부터의 신호 펩티드를 포함한다)를 암호화하는 것이다. 유용할 수 있는 기타 유전자에는 다음을 암호화하는 것이 포함된다: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-셀렉틴 (selectin), P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스파제 (Caspase) ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRCS, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 그의 기능성 단편.
- [0157] 어떠한 이유로 인해 유전 구조물이 투여된 세포를 제거하는 것이 요망되는 경우에는 세포 붕괴를 위한 표적으로서 제공되는 부가의 요소를 가할 수 있다. 발현 가능한 형태의 헤르페스 티미딘 키나제 (tk) 유전자를 유전 구조물에 포함시킬 수 있다. 약물 강시클로비르 (gancyclovir)를 개체에게 투여할 수 있고, 이러한 약물은 모든 세포 생성성 tk를 선택적으로 사멸시키므로, 유전 구조물을 이용하여 세포를 선택적으로 붕괴시키기 위한 수단을 제공할 것이다.
- [0158] 단백질 생성을 최대화하기 위해, 구조물을 투여한 세포 내에서의 유전자 발현에 매우 적합한 조절성 서열을 선별할 수 있다. 더우기, 세포에서 가장 효율적으로 전사되는 코돈을 선별할 수 있다. 당업자는 세포에서 기능성인 DNA 구조물을 생성시킬 수 있다.
- [0159] 몇몇 양태에서는, 본원에 기재된 단백질에 대한 암호화 서열을 IgE 신호 펩티드와 연결시킨 유전자 구조물을 제공할 수 있다. 몇몇 양태에서는, 본원에 기재된 단백질을 IgE 신호 펩티드와 연결시킨다.
- [0160] 예를 들어, 단백질을 사용하는 몇몇 양태에서는, 당업자가 널리 공지된 기술을 사용하여 본 발명의 단백질을 생성 및 단리시킬 수 있다. 예를 들어, 단백질을 사용하는 몇몇 양태에서는, 당업자가 널리 공지된 기술을 사용하여 본 발명의 단백질을 암호화하는 DNA 분자를, 널리 공지된 발현 시스템에서 사용하기 위한 시판용 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다. 예를 들어, 시판용 플라스미드 pSE420 (공급처: Invitrogen, San Diego, Calif.)는

이. 콜라이 (*E. coli*)에서 단백질을 생성시키기 위해 사용할 수 있다. 시판용 플라스미드 pYES2 (공급처: Invitrogen, San Diego, Calif.)는, 예를 들어 효모의 에스. 세레비지에 (*S. cerevisiae*) 균주에서의 생성을 위해 사용할 수 있다. 시판용 플라스미드 MAXBAC™ 완전 바큘로바이러스 (baculovirus) 발현 시스템 (공급처: Invitrogen, San Diego, Calif.)은, 예를 들어 곤충 세포에서의 생성을 위해 사용할 수 있다. 시판용 플라스미드 pcDNA1 또는 pcDNA3 (공급처: Invitrogen, San Diego, Calif.)은, 예를 들어 포유류 세포, 예를 들면 중국 산 햄스터 난소 세포에서의 생성을 위해 사용할 수 있다. 당업자는 이들 시판용 발현 벡터 및 시스템 등을 사용하여, 통상적인 기술 및 용이하게 입수 가능한 출발 물질에 의해 단백질을 생성시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989); 본원에 참고로 도입된다]. 따라서, 목적하는 단백질은 원핵 시스템과 진핵 시스템 둘 다에서 제조하여, 특정 스펙트럼의 프로세싱된 형태의 단백질을 생성시킬 수 있다.

[0161] 당업자는 기타 시판용 발현 벡터 및 시스템을 사용할 수 있거나 또는 널리 공지된 방법 및 용이하게 입수 가능한 출발 물질을 사용하여 벡터를 생성시킬 수 있다. 필수 제어 서열, 예를 들어 프로모터 및 폴리아데닐화 신호, 및 바람직하게는 증강인자를 함유하는 발현 시스템은 각종 숙주에 대해 용이하게 입수 가능하고 당해 분야에 공지되어 있다 [참고: 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)]. 유전 구조물은 이러한 구조물로 형질감염시킨 세포주에서 기능성인 프로모터와 작동적으로 연결된 단백질 암호화 서열을 포함한다. 구성성 프로모터의 예에는 시토크롬 b 바이러스 또는 SV40으로부터의 프로모터가 포함된다. 유도성 프로모터의 예에는 마우스 유방 백혈병 바이러스 또는 메탈로티오네인 프로모터가 포함된다. 당업자는 용이하게 입수 가능한 출발 물질로부터 본 발명의 단백질을 암호화하는 DNA를 수반한 세포로 형질감염시키는 데에 유용한 유전 구조물을 용이하게 생성시킬 수 있다. 상기 단백질을 암호화하는 DNA를 포함한 발현 벡터를 사용하여 화합성 숙주를 형질전환시킨 다음, 이를 외래 DNA의 발현이 일어나는 조건 하에 배양 및 유지시킨다.

[0162] 이로써 생성된 단백질은 세포를 용해시킴으로써 배양물로부터 회수하거나 또는 당해 분야에 공지되고 적당한 배대로 배양 배지로부터 회수한다. 당업자는 널리 공지된 기술을 사용하여 상기 발현 시스템을 사용하여 생성되는 단백질을 단리시킬 수 있다. 상기 언급된 바와 같은 특이적 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 천연 공급원으로부터 단백질을 정제하는 방법은 제조할 DNA 방법론에 의해 생성된 단백질을 정제하는 데에도 동등하게 적용할 수 있다.

[0163] 제조할 기술에 의해 단백질을 생성시키는 것 이외에도, 자동화 펩티드 합성기를 또한 이용하여 단리되고 본질적으로 순수한 단백질을 생성시킬 수 있다. 이러한 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 치환이 있는 유도체가 DNA-암호화된 단백질 생성에서 제공되지 않는 경우에 유용하다.

[0164] 핵산 분자를 널리 공지된 몇 가지 기술, 예를 들어 DNA 주사 (DNA 백신접종으로서 지칭되기도 함), 제조할 벡터, 예를 들어 제조할 아데노바이러스, 제조할 아데노바이러스 관련 바이러스 및 제조할 백시니아를 사용하여 전달할 수 있다.

[0165] 투여 경로에는 근육내, 비내, 복강내, 피내, 피하, 정맥내, 동맥내, 안내 및 경구 뿐만 아니라 국부, 경피, 흡입 또는 좌제 또는 점막 조직, 예를 들어 질, 직장, 요도, 볼 및 설하 조직에 대한 세정에 의한 경로가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 바람직한 투여 경로에는 근육내, 복강내, 피내 및 피하 주사가 포함된다. 유전 구조물은 전통적인 주사기, 바늘이 없는 주사 장치, 또는 "미소발사체 충격 유전자 총"을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 수단에 의해 투여할 수 있다.

[0167] 몇몇 양태에서, 핵산 분자는 폴리뉴클레오티드 기능 증강인자 또는 유전자 백신 촉진제의 투여와 연계해서 세포에 전달한다. 폴리뉴클레오티드 기능 증강인자는 미국 특허 제5,593,972호, 제5,962,428호 및 국제특허출원 PCT/US94/00899 (1994년 1월 26일자로 출원됨) (이들 각각이 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. 유전자 백신 촉진제는 미국 특허원 제021,579호 (1994년 4월 1일자로 출원됨) (본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다. 핵산 분자와 연계해서 투여되는 공동-작용제는 핵산 분자와의 혼합물로서 투여할 수 있거나, 또는 핵산 분자를 투여하는 것과 동시에, 투여하기 전 또는 후에 별개로 투여할 수 있다. 또한, 형질감염제 및/또는 복제성 작용제 및/또는 염증제로서 기능할 수 있고 GVF와 공동 투여될 수 있는 기타 작용제에는 성장 인자, 사이토킨 및 림포카인, 예를 들어 α-인터페론, 감마-인터페론, GM-CSF, 혈소판 유래된 성장 인자 (PDGF), TNF, 표피 성장 인자 (EGF), IL-1 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 및 IL-15 뿐만 아니라 섬유아세포 성장 인자, 표면 활성제, 예를 들어 면역-자극성 복합체 (ISCOMS), 프로인트 (Freunds) 완전 아주반트, LPS 유사체 [모노포스포릴

지질 A (WL) 포함], 무라밀 펩티드, 퀴논 유사체 및 소포체, 예를 들어 스쿠알렌이 포함되고, 히알루론산을 유전 구조물과 연계해서 투여할 수도 있다. 몇몇 양태에서, 면역조절성 단백질을 GVFR로서 사용할 수 있다. 몇몇 양태에서는, 핵산 분자를 PLG와 연합해서 제공하여 전달/흡수를 증강시킨다.

[0168] 본 발명에 따르는 제약 조성물은 약 1 나노그램 내지 약 2000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에서, 본 발명에 따르는 제약 조성물은 약 5 나노그램 내지 약 1000 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 10 나노그램 내지 약 800 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 0.1 내지 약 500 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 1 내지 약 350 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 25 내지 약 250 마이크로그램의 DNA를 포함한다. 몇몇 바람직한 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 100 내지 약 200 마이크로그램의 DNA를 포함한다.

[0169] 본 발명에 따르는 제약 조성물은 사용될 투여 방식에 따라서 제형화한다. 제약 조성물이 주사가 가능한 제약 조성물인 경우, 이는 멸균성이고, 발열원을 함유하지 않고 미립자를 함유하지 않는다. 등장성 제형을 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로, 등장성을 위한 첨가제에는 염화나트륨, 텍스트로스, 만니톨, 솔비톨 및 락토스가 포함될 수 있다. 몇몇 경우에, 등장성 용액, 예를 들어 인산염 완충 식염수가 바람직하다. 안정화제에는 젤라틴 및 알부민이 포함된다. 몇몇 양태에서는, 혈관 수축제를 제형에 가한다.

[0170] 본 발명의 몇몇 양태에 따르면, 면역 반응의 유도 방법이 제공된다. 백신은 단백질에 의거한 생 약독화 백신, 세포 백신, 재조합 백신 또는 핵산 또는 DNA 백신일 수 있다. 몇몇 양태에서, 면역원에 대해 개체에서 면역 반응을 유도시키는 방법 (이에는 점막 면역 반응을 유도시키는 방법이 포함된다)은 개체에게 CTACK 단백질, TECK 단백질, MEC 단백질 및 그의 기능성 단편 또는 그의 발현 가능한 암호화 서열 중의 하나 이상을, 본 발명의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 재조합 백신 및/또는 본 발명의 단백질을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신과 병용해서 투여하는 것을 포함한다. CTACK 단백질, TECK 단백질, MEC 단백질 및 그의 기능성 단편 중의 하나 이상은 면역원을 암호화하는 단리된 핵산 분자 및/또는 면역원을 암호화하는 재조합 백신 및/또는 면역원을 포함하는 소단위체 백신 및/또는 생 약독화 백신 및/또는 사멸 백신을 투여하기 전에, 동시에 또는 후에 투여할 수 있다. 몇몇 양태에서, CTACK, TECK, MEC 및 그의 기능성 단편으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 단리된 핵산 분자를 개체에게 투여한다.

[0171] [실시예]

[0172] 실시예 1

[0173] 재료 및 방법

[0174] HIV-1 아형 B 외막 서열. HIV-1 아형 B 컨센서스 외막 서열을 생성시키기 위해, 11개 국가로부터 수집한 42개 아형 B 외막 유전자 서열을 유전자은행으로부터 선별하여 샘플링 바이어스 (sampling bias)를 피하였다. 각 서열은 상이한 환자를 나타낸다. 사용된 모든 서열은 비-재조합이다.

[0175] 다중 정렬. 계통발생학적 연구에 적용된 정렬 과정은 클러스탈 (Clustal) X (버전 1.81) [참고: Thompson, J. D., et al. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882]의 적용을 포함하였다. 갭 개구 페널티로서 10을 사용하고 갭 연장 페널티로서 0.1을 사용하여, 쌍을 이룬 정렬 파라미터를 동적 "저속-정밀" 프로그래밍에 설정하였다. 다중 정렬 파라미터는 0.2의 갭 연장 페널티를 포함하였다.

[0176] HIV-1 아형 B 외막 컨센서스 서열의 구축. HIV-1 아형 B 외막 컨센서스 뉴클레오티드 서열은 다중 정렬과 소수의 (minor) 최종 수동 조정을 수행한 후에 수득하였다. 추론된 아미노산 서열을 사용하여 정렬 갭의 도입을 안내하여 이들이 코돈 사이에 삽입되도록 하였다. 컨센서스 뉴클레오티드 서열을 해독함으로써, 컨센서스 아미노산 서열을 수득하였다.

[0177] 계통발생학적 트리. 아미노산 계통발생학적 트리 구축을 위해, 프로그램 PAUP* 4.0b10 [Swofford, D. L. 1999. PAUP* 4.0: 단순성을 이용한 계통발생학적 분석 (* 및 기타 방법), 버전 4.0b2a. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.]을 사용하여 이웃 결합법 (NJ)을 이용하였다. 아형 D로부터의 2개의 부가 서열 (K03454 및 AAA44873) 및 아형 C로부터의 2개 서열 (AAD12103 및 AAD12112)은 발근 (rooting)을 위한 외집단으로서 사용하였다 [참고: Kuiken, C., B. T. Korber, and R. W. Shafer. 2003. HIV sequence databases. *AIDS*

Rev. 5:52-61].

- [0178] HIV-1 아형 B 외막 컨센서스 서열의 변형. HIV-1 아형 B 컨센서스 외막 서열을 수득한 후에 몇 가지 변형을 수행하였다: 고도로 가변적인 V1 및 V2 영역을 단축시키고, CCR5 활용을 위해 V3 루프를 설계하며, 세포질성 미부 영역을 C-말단으로부터 제거하고, 리더 서열 및 상류 코작 (Kozak) 서열을 N-말단에 가하며, 유전자최적화기 [GeneOptimizer™ (GENEART, Germany)]를 사용함으로써 코돈 최적화 및 RNA 최적화를 수행하였다.
- [0179] 외막 면역원. 변형된 HIV-1 아형 B 초기 전달자 컨센서스 외막 당단백질을 암호화하는 유전자 (EY2E1-B)를 합성하고 GENEART에 의해 서열 검증하였다. 이와 같이 합성된 EY2E1-B를 BamHI 및 NotI로 분해시키고, 시토메갈로바이러스 즉발형 프로모터의 제어 하에 발현 벡터 pVAX (공급처: Invitrogen) 내로 클로닝하고, 이 구조물을 pEY2E1-B로서 명명하였다.
- [0180] 인간 코돈 바이어스된 일차 아형 B 단리물 6101 gp140 외막 유전자 [증정자: M. Sidhm (Wyeth)]로부터 일차 아형 B 면역원 (EK2P-B)을 생성시켰다. 기본적으로, 최적화시킨 6101 외막 유전자는 천연 리더 서열과 세포질성 미부를 제거함으로써 돌연변이시켰다. 이어서, 다음 정배향 및 역배향 특이적-프라이머를 설계함으로써 IgE-리
Env-F: 5'-
GTCGCTCCGCTAGCTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACC-3' (서열 13)
Env-R: 5'-GGTCGGATCCTTACTCCACCCTCTCCTTTTTGCC-3' (서열 14). 정제된 PCR 생성물을 pVAX 플라스미드 벡터 내로 클로닝하고, 이를 또한 EcoRI 및 XbaI로 선형화하였다. 이 구조물은 pEK2P-B로서 명명되었다.
- [0181] EY2E1-B의 생체내 발현 및 EY2E1-B와 모노클로날 항체와의 반응성. 인간 황문근육종 (RD) 세포 (2 X 10⁶개)는 FuGENE 6 형질감염 시약 (공급처: Roche, Germany)를 사용하여 각각 3 □g의 pEY2E1-B 및 pEK2P-B 플라스미드로 60 mm 디쉬에서 형질감염시켰다. 형질감염시킨지 48시간 후, 세포를 1 x PBS로 3회 세척하고, 150 μl의 용해 완충액 (공급처: Cell Signaling Technology)에서 용해시켰다. 총 단백질 용해물 (50 μg)을 SDS-PAGE 겔 상에서 분획하고, PVDF 막 (공급처: Amersham)으로 옮겼다. 외막-특이적 모노클로날 항체 2G12 (공급처: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA) 및 모노클로날 항-액틴 항체 (공급처: Sigma-Aldrich)를 이용하여 면역블롯 분석을 수행하고, ECLTM 웨스턴 블롯 분석 시스템 (공급처: Amersham)을 사용하여 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG (공급처: Sigma-Aldrich)로 가시화하였다. 액틴을 웨스턴 블롯에 대한 부하 대조군으로서 사용하였다.
- [0182] EY2E1-B와 모노클로날 항체와의 반응성을 탐지하기 위하여, 형질감염으로부터의 총 단백질 용해물 (100 μg)을, 2G12, 4G10 및 ID6 (공급처: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)을 포함한 5 μg 외막-특이적 모노클로날 항체로 면역침전시켰다. 빈 (empty) 벡터 pVAX로 형질감염시킨 세포로부터의 동일한 양의 총 단백질 용해물을 음성 대조군으로서 사용하였다. 면역침전시킨 단백질을 SDS-PAGE 겔 상에서 분획화하고 상기 언급된 바와 같이 웨스턴 블롯팅함으로써 탐지하였다.
- [0183] 간접 면역형광성 검증. EY2E1-B 및 EK2P-B 유전자의 발현을 확인하기 위한 간접 면역형광성 검정을 수행하였다. 인간 황문근육종 (RD) 세포를, 그 다음날 10% FBS (GIBCO)을 수반한 완전 DMEM 배지에서 60 내지 70% 융합도를 수득하기 위한 밀도로 조직 배양 챔버 슬라이드 (공급처: BD Biosciences)에 도말하고, 밤새 부착시켜 두었다. 그 다음날, 제조업자의 지시에 따라서 FuGENE 6 형질감염 시약 (공급처: Roche)을 사용하여 pEY2E1-B, pEK2P-B 및 대조군 플라스미드 pVAX (1 μg/웰)로 형질감염시켰다. 형질감염시킨지 48시간 후, 세포를 찬 1 X PBS로 2회 세척하고, 15분 동안 메탄올을 이용하여 슬라이드 상에 고정시켰다. 이 슬라이드로부터 잔류 용매를 제거할 때, 세포를 항-마우스 HIV-1 env 모노클로날 F105 (공급처: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)와 함께 90분 동안 항온 배양하였다. 이어서, 슬라이드를 TRITC-접합된 이차 항체 (공급처: Sigma-Aldrich)와 함께 45분 동안 항온 배양하였다. 4',6-디아미도-2-페닐인돌 히드로클로라이드 (공급처: Sigma-Aldrich)를 이차 항체 용액에 가하여 핵을 대비염색시켜 소정의 분야에서 입수 가능한 세포 총 수의 핵을 나타내었다. 슬라이드를 페이딩방지 (antifading) 시약 (공급처: Molecular Probes)을 함유하는 봉입제로 고정시켰다. 형광 현미경에 대한 상 3 프로 프로그램 (공급처: Media Cybernetics)를 사용하여 영상을 분석하였다.
- [0184] 외막-특이적 항체 결정. 외막에 대해 특이적인 IgG 항체 측정을 면역시킨 마우스와 대조군 마우스 둘 다에서 ELISA (효소 결합 면역흡착 검증)에 의해 수행하였다. 눈크-임뮤노 (Nunc-Immuno™) 판 (공급처: Nalge Nunc International, Rochester, NY)을 1 μg/ml의 분기군 B 재조합 HIV-1 IIIB 당단백질 가용성 gp160 (공급처:

Immuno Diagnostics, MA), 분기군 A/E 일차 외막 단백질 HIV-1 93TH975 gp120 및 분기군 C 일차 외막 단백질 HIV-1 96ZM651 gp120 (공급처: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA)으로 각각 피복시키고, 실온 하에 밤새 항온 배양하였다. 세척 후, 판을 37°C 하에 1시간 동안 PBST (1 x PBS + 0.05% Tween-20) 중의 3% BSA로 차단시켰다. 이어서, 판을 다시 세척하고, 특이적 마우스 혈청과 함께 항온 배양하며, 4°C 하에 밤새 PBST 중의 3% BSA로 희석시킨 다음, 37°C 하에 1시간 동안 1/10,000 희석물의 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG (공급처: Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 함께 항온 배양하였다. 반응물을 기질 TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) (공급처: Sigma-Aldrich)로 전개시켰다. 웰당 100 μ l의 2.5 M 황산을 이용하여 반응을 중지시키고, 판을 450 nm의 OD 하에 EL808 판 판독기 (공급처: Biotech Instrument Inc.) 상에서 판독하였다.

[0185] 마우스의 면역. 4 내지 6주생 암컷 BALB/c 마우스는 다음 공급처 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)로부터 구입하였다. 트랜스제닉 B6.Cg-Tg (HLA-A/H2-D)2Enge/J 마우스의 번식 쌍은 다음 공급처 (the Jackson Laboratory)로부터 구입하고 본 실험실의 닥터 미셸 쿠츨러 (Dr. Michelle Kutzler)가 번식시켰다. 이들 트랜스제닉 마우스는 인간 HLA-A2.1 프로모터의 지시 하에, 인간 HLA-A2.1 유전자의 알파-1 및 알파-2 도메인과 마우스 H-2Dd 유전자의 알파-3 막관통 및 세포질성 도메인을 함유하는 중간 하이브리드 부류 I MHC 유전자인 AAD를 발현한다. 마우스 알파-3 도메인 발현은 이러한 시스템에서의 면역 반응을 증강시켜 준다. 변형되지 않은 HLA-A2.1과 비교해서, 키메라 HLA-A2.1/H2-Dd MHC 부류 I 분자는 마우스 T 세포의 효율적인 양성 선별을 매개하여, HLA-A2.1 부류 I 분자에 의해 제시된 펩티드를 인식할 수 있는 보다 완전한 T 세포 레퍼토리를 제공하였다. HLA-A2.1 부류 I 분자의 맥락에서 마우스 T 세포에 의해 제시되고 인식된 펩티드 에피토프는 HLA-A2.1+ 인간에 제시된 것과 동일하다. 4 내지 6주생 암컷 트랜스제닉 마우스를 다음에 기재된 추가의 연구를 위해 사용하였다. 이들에 관한 보살핌은 다음 기관의 지침에 따랐다 [the National Institutes of Health and the University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee (IACUC)]. 각 마우스는 100 μ g의 DNA를 각각 2주 간격으로 3회 근육내 투여함으로써 면역시켰다. 각 군 별로 3마리 마우스가 있으며, 대조군 마우스는 pVAX DNA로 백신 접종하였다. 세 번째 면역시킨지 1주 후에 마우스를 희생시키고, 비장을 무균적으로 꺼냈다. 비장 세포를 수집하고 RBC 용해 완충액에 재현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 용해 후, 동일한 군으로부터의 비장 세포를 풀링하고, 10% FBS를 수반한 RPMI 1640에 재현탁시켰다. 세포를 계수하고, 분석용으로 제조하였다.

[0186] IFN- γ ELISpot 검정. 고-단백질 결합성 IP 96 웰 멀티스크린™ 판 (공급처: Millipore, Bedford, MA, USA)을 사용하였다. 판을 4°C 하에 밤새 1X PBS에서 희석시킨 마우스 IFN- γ 에 대한 mAb (공급처: R&D Systems, Minneapolis, MN)로 피복시켰다. 판을 PBS로 3회 세척한 다음, 1% BSA 및 5% 슈크로스 보충시킨 1X PBS로 실온 하에 2시간 동안 차단시켰다. 마우스 비장 세포를 완전 배양 배지 (10% FBS 및 항생제를 보충시킨 RPMI 1640)에서 재현탁시킨 웰당 2×10^5 개 세포의 유입 세포수로 세 번 되풀이하여 가하였다. HIV-1 아형 B, 아형 C, 군 M의 전체 단백질 컨센서스 서열 및 HIV-1 MN (아형 B 단리물), HIV-1 C.UY.01.TRA3011 및 C.ZA.01.J54Ma (2개의 아형 C 단리물) 외막의 전체 단백질 서열을 나타내는 11개 아미노산이 중복된 15개 아미노산 잔기를 각각 함유하는 6개 펩티드 세트를 다음 공급처로부터 수득하였다 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). env 펩티드 각 세트를 IFN- γ 방출의 특이적 자극을 위한 항원으로서 4개의 풀 내로 2 μ g/ml 펩티드의 농도로 풀링하였다. 콘카발린 (Concavalin) A (공급처: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 5 g/ml, 및 완전 배양 배지를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 5% CO₂ 기압 항온 배양기에서 37°C 하에 24시간 동안 항온 배양한 후 판을 4회 세척하였다. 이어서, 바이오티닐화 항-마우스 IFN- γ 탐지 항체를 가하고, 판을 4°C 하에 밤새 항온 배양하였다. 판을 세척하고, 제조업자 ((ELISPOT Blue Color Module, R&D Systems, Minneapolis, MN)의 지시에 따라서 색 전개를 수행하였다. 판을 공기 건조시키고 임뮤노스팟 (ImmunoSpot®) 소프트웨어를 수반한 자동화 ELISPOT 판독기 시스템 (공급처: CTL Analyzers, Cleveland, OH)을 사용하여 스팟을 계수하였다. 데이터 디스플레이를 위해 스팟 형성 세포 (SFC)의 평균 수를 1×10^6 개 비장 세포가 되도록 조정하였다. ELISpot 검정을 3가지 별개의 실험에서 3회 반복하였다.

[0187] CD8+ T-세포 고갈 연구. 제조업자의 지시에 따라서 CD8에 대한 항체로 피복시킨 면역-자기 비드 (공급처: Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY)를 사용함으로써, CD8 림프구를 비장 세포로부터 고갈시켰다. CD8+ T-세포를 고갈시킨 후, IFN- γ ELISpot 검정을 상기 언급된 바와 같이 수행하였다.

[0188] 에피토프 지도화 연구. 반응성 에피토프를 지도화하기 위해, HIV-1 컨센서스 아형 B 및 HIV-1 MN의 전체 외막 단백질을 나타내는 11개 아미노산이 중복된 15개 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드 2개 세트를 각각 풀당 14 내지 15개 펩티드의 29개 풀 내로 풀링하고, IFN- γ ELISpot 검정을 상기 언급된 바와 같이 수행하였다. 이들 상

이한 29개 폴딩된 자극인자 세트를 매트릭스 검정에 사용하였는데, 이는 에피토프 지도화를 촉진시켜 준다.

[0189] 통계학적 분석. pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 면역시킨 마우스 간의 세포성 면역 반응을 비교하기 위하여 스튜던트 대응표본 t-시험을 사용하였다. 이러한 연구에서는, $p < 0.05$ 가 통계적 유의성인 것으로 간주되었다.

[0190] **결과**

[0191] 신규한 아형 B 초기 전달자 컨센서스에 의거한 외막 유전자의 구축 및 설계. 유전자은행으로부터 검색한 42개 아형 B 서열로부터 HIV-1 아형 B의 컨센서스 서열을 생성시켰다. 도 1에 요약된 바와 같이, 컨센서스 서열을 생성시킨 후에 몇 가지 변형을 수행하였다. 간략하게 설명하면, 점막으로 전염된 바이러스를 모방한 HIV-1 외막의 CCR5-지향성 변형을 생성시키기 위해, 초기 전달자 단리물의 서열에 따라서 V3 루프 중의 6개 중요한 아미노산을 설계하였다. 추가로, V1 루프 중의 10개 아미노산 및 V2 루프 중의 1개 아미노산을 컨센서스 서열로부터 또한 결실시켰다. 고도로 효율적인 리더 서열을 출발 코돈의 동일 프레임내 상류에서 융합시켜 발현을 촉진시켰다. 막관통 도메인을 본래의 상태로 유지시켜 표면 발현을 촉진시키고, 절단 부위를 본래의 상태로 유지시켜 외막 단백질의 숙주 프로테이나제 절단과 적당한 폴딩을 획득하였다. 세포질성 미부를 제거하여 외막 재순환을 방지시키고 보다 안정하고 보다 높은 표면 발현을 증진시켰다 [참고: Berlioz-Torrent, C., et al. 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J. Virol.* 73:1350-1359; Bultmann, A., et al., 2001. Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J. Virol.* 75:5263-5276]. 더욱이, 보다 고 수준의 발현을 위해, 이러한 유전자의 코돈 사용을 호모 사피엔스 (Homo Sapiens) 유전자의 코돈 바이어스에 맞도록 적응시켰다 [참고: Andre, S., et al. B. 1998. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* 72:1497-503; Deml, L., et al. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J. Virol.* 75:10991-11001]. 또한, RNA 최적화 [참고: Schneider, R., et al., 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation, *J. Virol.* 71:4892-4903]을 또한 수행하였다: 극히 높은 (>80%) 또는 극히 낮은 (<30%) GC 함량 영역 및 시스-작용성 서열 모티프, 예를 들어 내부 TATA 박스, 카이 (chi)-부위 및 리보솜성 빈 부위는 피하였다. 공학적으로 처리시킨 합성 EY2E1-B 유전자를 구축하였는데, 이는 길이가 2734 bp였다. EY2E1-B 유전자를 추가의 연구를 위해 BamHI 및 NotI 부위에서 pVAX 내로 서브클로닝하였다.

[0192] 계통발생학적 분석. 무작위로 샘플링된 외막 아형 B 서열로부터 EY2E1-B 서열까지의 거리 분포를 평가하기 위해, 계통발생학적 분석을 수행하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, EY2E1-B 서열과 샘플링된 모든 서열과의 상대적 친밀성이 관찰되었다. EY2E1-B 서열을 일차 단리물 EK2P-B 서열과 비교하는 경우, 이는 거의 동등한 수준의 유사율 스코어 분포를 나타내었다 (표 1). EY2E1-B에 대한 평균 유사율 스코어는 85.7%인 반면, EK2P-B에 대한 평균 유사율 스코어는 79.4%였다.

표 1

[0193] 잠재적 외막 백신 후보와 아형 B 외막 서열 정렬 간의 유사율 스코어 평균 및 범위 (%)

	평균 유사율 스코어 (%)	유사율 스코어 범위 (%)
EY2E1-B	85.7	92.1-79.6
EK2P-B	79.4	86.3-73.9

[0194] EY2E1-B의 생체내 발현 및 항원성 결정. pEY2E1-B 및 pEK2P-B의 생체내 발현을 시험하기 위해, RD 세포를 재료 및 방법 섹션에 기재된 바와 같이 이들 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염시킨 후 세포 용해물로부터 총 단백질을 추출하고 재료 및 방법 섹션에서 언급된 외막-특이적 모노클로날 항체 2G12로 면역블롯팅하여 pEY2E1-B의 발현을 탐지하였다. 웨스턴 블롯 결과는 이들 두 구조물이 외막 단백질을 발현하였다고 표시하였다 (도 3A). 탐지된 외막 단백질은 약 120 KD였다. 표 2는 pEY2E1-B와 pEK2P-B의 비교를 나타낸 것이다.

표 2

	컨센서스/ 일차	초기 전달자	코돈 최적화	RNA 최적화	IgELS	세포질성 미부
EY2E1-B	컨센서스	예	예	예	예	아니오
EK2P-B	일차	아니오	예	예	예	아니오

[0195]

항원성 에피토프를 결정하기 위해, RD 세포 용해물로부터 발현된 외막 단백질을 3가지 상이한 gp120-특이적 항체 2G12, 4G10 및 ID6으로 면역침전시켰다. 면역침전을 수행한 후, 웨스턴 블롯팅을 수행하여 면역침전된 단백질을 탐지하였다. 본 발명자들의 결과는 합성 면역원이 항체 2G12 및 ID6과는 결합할 수 있었지만, 4G10과는 그렇지 않았다는 것을 나타내었다. 항체 2G12는 광범위한 각종 일차 단리물을 중화시키고 입체 형태적 및 탄수화물-의존성 gp120 에피토프와 반응하며, 항체 ID6은 gp120 및 gp160과 결합하고 gp120의 처음 204개 aa에 대하여 유도되기 때문에, 본 발명자들의 결과는 공학적으로 처리시킨 합성 면역원 EY2E1-B가 비교적 천연 입체 형태로 폴딩될 수 있고 몇몇 천연 항원성 에피토프를 보존할 수도 있다는 것을 제안하였다. 더우기, 항체 4G10은 T-세포주 적응시킨 균주인 LAI gp160을 인식하는 HIV-1 LAI/BRU V3 모노클로날 항체이기 때문에, 본 발명자들의 데이터는 또한, 이러한 합성 외막이 공-수용체 CXCR4를 활용하지 않을 것이란 사실을 제안하였다.

[0197]

발현을 추가로 확인하고 항원성 에피토프를 결정하기 위해, 형질감염시킨 RD 세포를 사용하여 간접 면역형광성 검정을 수행하였다. 형광 현미경을 사용한 결과 pEY2E1-B 및 pEK2P-B 형질감염시킨 세포에서 고 특이적 발현이 관찰되었다. 불연속적 또는 입체 형태적 gp120 에피토프와 반응하는 HIV-1 env 모노클로날 F105를 본 검정에 사용하였다. 도 3B에 표시된 바와 같이, Env 단백질을 발현하는 형질감염시킨 세포는 전형적인 로다민 형광을 나타내었는데, 이는 합성 단백질이 발현되었고 비교적 천연 입체 형태를 지니고 있다는 것을 다시 한번 제안하고 있다. 대조군으로서, pVAX 형질감염시킨 RD 세포에서는 발현이 탐지되지 않았다.

[0198]

체액성 반응의 유도. 합성 면역원이 보다 고-역가 외막-특이적 항체 반응을 유도시킬 수 있었는지를 결정하기 위하여, pVAX, pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 면역시킨 Ba1B/C 마우스로부터 혈청을 수집하고 ELISA를 수행하였다. 도 4A에 도시된 바와 같이, 본 발명자들은 pEK2P-B 면역시킨 마우스에서와 비교해서 비교적 보다 고 수준의 분기군 B 외막-특이적 항체가 pEY2E1-B 면역시킨 마우스로부터 수집한 혈청과 반응한다는 것을 관찰하였다. 이와는 달리, 백터 단독 마우스는 특이적 항체 반응을 발생시키지 못하였다. 그러나, pEY2E1-B 주사된 마우스와 pEK2P-B 주사된 마우스 둘 다에서는 분기군 A/E 및 분기군 C 단백질에 대한 탐지 가능한 어떠한 항체 반응도 없었는데 (도 4B 및 4C), 이는 합성 컨센서스에 의거한 면역원이 비교적 천연 입체 형태를 지니고 있고 천연 항원성 에피토프를 보존하고 있긴 하지만, 광범위한 교차-분기군 항체 면역 반응을 유도시키지 않을 수 있다는 것을 표시한다.

[0199]

ELISpot에 의해 측정된 강력하고 광범위한 세포성 면역 반응. Ba1B/C 마우스를 pEY2E1-B 및 pEK2P-B로 면역시키고 ELISpot 분석을 수행하여 HIV-1 컨센서스 아형 B 단백질로부터의 펩티드 4개 풀에 반응하는 항원-특이적 IFN- γ 분비성 세포 수를 결정하였다 (도 5A). 세포 100만개 당 스팟 형성 단위 (SFU) 수로써 측정된 바와 같은 반응 크기는 pEY2E1-B 백신접종한 마우스에서 27.5 내지 520의 범위였다. 비교하자면, pEK2P-B 백신접종한 마우스로부터의 비장 세포는 단지 2 내지 237.5의 스팟 범위 만을 나타내었다 ($p < 0.05$). pEY2E1-B 면역시킨 마우스에서 모든 4개 풀에 대한 비장 세포 100만개 당 SFU의 부가 빈도는 $1976.25 + 260$ 인 반면, pEK2P-B 면역시킨 마우스에서는 세포 100만개 당 SFU의 수가 $519 + 45$ 였다. pVAX 백터로 면역시킨 마우스로부터의 세포를 음성 대조군으로서 사용하였는데, 이는 컨센서스 외막 B 펩티드 풀에 대해 비장 세포 100만개 당 단지 $60 + 5$ SFU 만을 나타내었다 ($p < 0.05$). 본 발명자들은 3가지 별개의 연구에서 유사한 결과를 관찰하였다. 따라서, pEY2E1-B 구조물은 세포-매개형 면역 반응을 구동하는 데에 있어서 4배 정도 더 강력하다. 본 발명자들은 또한, CD8+ 림프구가 pEY2E1-B로 면역시킨 Ba1B/C 마우스에서 탐지된 IFN- γ 분비에 대해 책임이 있었는지에 관하여 결정하였다. 도 5B에 도시된 바와 같이, 세포 100만개 당 SFU의 수는 CD8+ 고갈 후에 $127.5 + 11$ 로 감소되었는데, 이는 CD8+ T-세포 고갈된 ELISpot에 의해 관찰된 IFN- γ 생성성 세포의 빈도가 약 90% 정도 감소되었다는 지표이다. pEY2E1-B에 의해 유도된 IFN- γ 생성은 주로 CD8+ T-세포에 의해 매개된다.

[0200]

또한, HLA-A2 제시된 항원에 대한 인간 T 세포 면역 반응을 모델링하고 이들 항원을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 트랜스제닉 HLA-A2.1/H2-Dd 마우스를 사용하여 상기 언급된 바와 동일한 ELISpot 검정을 수행하였다. 도 5C에 도시된 바와 같이, pEY2E1-B 면역시킨 트랜스제닉 마우스에서 모든 4개 풀에 대한 비장 세포 100만개 당 SFU의 부가 빈도는 $2362 + 257$ 인 반면, pEK2P-B 면역시킨 트랜스제닉 마우스에서는 세포 100만개 당 SFU의

수가 493 + 57이었다. 이들 결과는 pEY2E1-B 구조물이 상기 트랜스제닉 마우스에서 세포-매개형 면역 반응을 구동하는 데에 있어서 4배 정도 더 강력하다는 지표이다. CD8 고갈 후의 ELISpot 데이터는 pEY2E1-B에 의해 유도된 IFN- γ 생성이 주로 CD8+ T-세포에 의해 매개된다는 것을 제안하였다 (도 5D).

[0201] 더우기, 본 발명자들은 ELISpot 검정에서 관찰된 세포성 면역 반응을 추가로 상세히 밝혀내는 데에 관심을 가졌다. 따라서, 컨센서스 아형 B 외막 단백질 전역에 걸쳐 있는 펩티드 라이브러리에 대하여 부가 세트의 ELISpot 검정을 수행하였다. 아형 B 컨센서스 외막 단백질을 포함하는, 11개 아미노산이 중복된 15량체 펩티드의 완전 세트를 사용하여 상기 지도화 연구를 수행하였다. 이러한 연구는 합성 외막에 의해 유도된 명확한 우성 에피토프가 없다는 것을 예시하였다. 그러나, pEY2E1-B-백신접종한 BalB/C 마우스로부터 유래된 비장 세포를 IFN- γ ELISpot 분석한 결과, 29개 풀 중의 18개 풀에서 50개 이상의 스팟이 나타난 반면, pEK2P-B 백신접종한 BalB/C 마우스에서는 6개 풀에서만 나타났다 (도 5E). 이들 결과는 EY2E1-B 면역원에 의해 유도된 세포성 면역 반응의 폭과 크기가 상당히 증가하였다는 것을 예시하였다.

[0202] pEY2E1-B에 의해 유도된 강력한 교차-반응성 세포성 면역 반응. EY2E1-B 면역원이 광범위한 교차-반응성 세포성 면역 반응을 유도시킬 수 있었는지를 결정하기 위해, HIV-1 군 M, 컨센서스 아형 C, HIV-1 MN (아형 B 단리물), HIV-1 C.UY.01.TRA3011 및 C.ZA.01.J54Ma (2개의 아형 C 단리물) 외막 단백질을 사용하여, BalB/C 및 HLA-A2 트랜스제닉 마우스 둘 다에서 IFN- γ ELISpot을 수행하였다. 이들 검정은 도 5A, C 및 E 단독에서 관찰된 결과가 펩티드 표적과 관계가 있는지 아니면 실제적으로 면역 폭 상의 증가에 기인하는지를 추가로 결정해줄 것이다. 도 6A에 도시된 바와 같이, pEY2E1-B 백신접종한 BalB/C 마우스에서 HIV-1 MN 외막 펩티드의 4개 풀에 대한 비장 세포 100만개 당 SFU의 부가 수는 1855 + 215.8이었는데, 이는 pEK2P-B 면역시킨 BalB/C 마우스에서의 수 (비장 세포 100만개 당 SFU는 700 + 168.2였다)보다 약 2배 이상이었으며, 이는 pEY2E1-B가 아형 B 내에서 pEK2P-B보다 더 강력한 교차 반응성을 나타냈다는 지표이다. pEY2E1-B 면역시킨 BalB/C 마우스에서 4개의 HIV 군 M (도 6B) 및 아형 C (도 6C) 컨센서스 외막 펩티드 풀을 이용한 자극에 반응한 IFN- γ 스팟 수는 각각 1150 + 191.3 및 715 + 116.1이었다. pEK2P-B 백신접종한 BalB/C 마우스에서 635 + 152.3 및 345 + 82.3인 군 M 및 아형 C 펩티드에 대한 스팟 수와 비교해서, 상기 데이터는 pEY2E1-B에 의해 유도된 교차-분기군 면역 반응이 BalB/C 마우스에서 pEK2P-B에 의해 유도된 것보다 대략 45% 더 강력하다는 것을 예시하고 있다.

[0203] 중요하게, 본 발명자들은 트랜스제닉 마우스에서 pEY2E1-B에 의해 유도된 훨씬 더 강력한 교차 반응성 세포성 면역 반응을 관찰하였다 (도 6F-J). pEY2E1-B 백신접종한 트랜스제닉 마우스에서 HIV-1 MN 외막 펩티드의 4개 풀에 대한 비장 세포 100만개 당 SFU의 부가 수는 1087 + 153이었는데, 이는 pEK2P-B 면역시킨 HLA-A2 마우스에서의 수 (비장 세포 100만개 당 SFU는 316 + 63이었다)보다 약 3배 이상이었으며 (도 6F), 이는 pEY2E1-B가 트랜스제닉 마우스에서 아형 B 내에서 pEK2P-B보다 더 강력한 교차 반응성을 유도시킬 수 있었다는 지표이다. pEY2E1-B 면역시킨 트랜스제닉 마우스에서 4개의 HIV 군 M (도 6G) 및 아형 C (도 6H) 컨센서스 외막 펩티드 풀을 이용한 자극에 반응한 IFN- γ 스팟 수는 각각 2116 + 216 및 893 + 154였다. pEK2P-B 백신접종한 트랜스제닉 마우스에서 473 + 50 및 266 + 55인 군 M 및 아형 C 펩티드에 대한 스팟 수와 비교해서, 상기 데이터는 pEY2E1-B에 의해 유도된 교차-분기군 면역 반응이 트랜스제닉 마우스에서 pEK2P-B에 의해 유도된 것보다 대략 3배 내지 4배 더 강력하다는 것을 표시하였다. 더우기, 기타 펩티드 세트에 의해 달성된 교차 반응성 및 폭을 평가하는 데에 적격한 대조군으로서 제공해야 하는 2개 아형 C 단리물 펩티드 세트를 사용하여 교차-분기군 C 면역 반응을 추가로 결정하였다. BalB/C 마우스에서 pEY2E1-B 및 pEK2P-B에 의해 유도된 이들 2개 아형 C 단리물 세트에 대한 교차 반응성의 차이가 너무 많지는 않았지만 (도 6D 및 E), pEY2E1-B에 의해 유도된 이들 2개 아형 C 단리물 세트에 대한 교차-분기군 반응성은 pEK2P-B에 의해 유도된 것보다 약 3배 정도 더 강력하였다 (도 6I 및 J). C.ZA.01.J54Ma 및 C.UY.01.TRA3011 펩티드에 대한 스팟 수는 pEY2E1-B 백신접종한 트랜스제닉 마우스에서 1080 + 206 및 890 + 150인 반면, pEK2P-B 백신접종한 트랜스제닉 마우스에서는 단지 305 + 38 및 310 + 62였다.

[0204] 최종적으로, 본 발명자들은 BalB/C 및 HLA-A2 트랜스제닉 마우스 둘 다에서 상기 관찰된 HIV-1 MN에 대한 세포성 면역 반응을 상세히 기술함으로써 EY2E1-B 면역원에 의해 유도된 아형 특이적 표적에 대한 교차-반응성 세포성 면역 반응의 폭이 또한 증가하였는지를 결정하였다. 아형 B MN 외막 단백질 전역에 걸친 펩티드 라이브러리에 대한 에피토프 지도화 검정을 수행하였다. 그 결과는 양 마우스 균주에서 합성 외막에 의해 유도된 명확한 우성 에피토프가 없다는 것을 제안하였다. 그러나, pEY2E1-B-백신접종한 BalB/C 마우스로부터 유래된 비장 세포를 IFN- γ ELISpot 분석한 결과, 29개 풀 중의 14개 풀에서 50개 이상의 스팟이 나타난 반면, pEK2P-B 백신접종한 BalB/C 마우스에서는 9개 풀에서만 나타났다 (도 7A). 유사하게 트랜스제닉 마우스에서, pEY2E1-B 면역시킨 트랜스제닉 마우스에서는 29개 풀 중의 18개 풀에서 50개 이상의 스팟이 나타난 반면, pEK2P-B 백신접종한

트랜스제닉 마우스에서는 6개 풀에서만 나타났다 (도 7B). 이들 데이터는 BalB/C 및 HLA-A2 트랜스제닉 마우스들 다에서 EY2E1-B 면역원에 의해 유도된 교차 반응성 세포성 면역 반응의 폭과 크기가 상당히 증가하였다는 것을 표시하였다.

[0205] 논의

[0206] 진 세계적인 HIV-1 DNA 백신에 관한 노력은 HIV-특이적 T-세포 반응이 감염으로부터의 보호 또는 감염 후 복제 제어에 일부 기여할 수 있다는 원칙에 의해 좌우되었다. DNA 백신이 바이러스성 복제에 강한 영향력을 미칠 수 있긴 하지만, 이러한 백신은 일반적으로, 약독화 생 바이러스성 벡터 만큼 면역 유도에 있어 강력하지 못하다 [참고: Almond, N., et al.. 1995. Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. *Lancet* 345:1342-1344; Berman, P. W., et al. 1996, Protection of MN- rgp120-immunized chimpanzees from heterologous infection with a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 173:52-9; Boyer, J., et al. 1997. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 3:526-532; Daniel, M. C., et al. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258: 1938-1941]. 따라서, 세포성 면역 반응의 폭과 크기를 개선시키는 데에 목표를 둔 전략이 중요하다. 본 발명은 당해 분야의 문헌에 별개의 접근 방식으로서 보고되긴 하였지만, 하나의 백신 양식에서 기존에 함께 조립되지 않았던 면역원의 몇 가지 특징을 이용하여 신규한 항원을 제공한다. 개념 실증으로서, 공학적으로 처리시킨 합성 컨센서스에 의거한 외막 면역원을 개발하였고, 이를 세포-매개형 면역 반응을 유도시키기 위한 최적화 일차 서열 면역원과 비교하였다. 발현 데이터는 이와 같이 공학적으로 처리시킨 신규한 외막 유전자가 포유류 세포주에서 효율적으로 발현될 수 있었지만, 이들 두 면역원의 발현 수준은 극히 유사하였다는 것을 보여주었다 (도 3A). 본 발명자들은 면역원성 연구에서 상기 기능성 면역원에 의해 유도된 세포성 면역 반응이 일차 외막 백신과 비교해서 증가된 다양성과 크기를 나타내었다는 사실을 관찰하였다. BalB/C 및 HLA-A2 트랜스제닉 마우스들 다에서 수득한 에피토프 지도화 데이터는 이러한 다양성과 크기 개선이 이들 일배체형 전반에 걸쳐 유지되었다는 사실을 입증해 주었다. 이러한 발견을 추가로 확인하기 위해, 본 발명자들은 또한 컨센서스에 의거한 아형 C 외막 면역원을 개발하였고, 이를 일차 아형 C 면역원과 비교하였는데, 합성 컨센서스에 의거한 아형 C 외막 면역원이 일차 C 면역원과 비교해서 증강된 다양성과 크기의 세포성 면역 반응을 나타내었다 (공개되지 않은 데이터).

[0207] 백신 설계 전략 관점에서 보면, 백신 후보와 감염성 또는 시험감염성 바이러스 간의 서열 상동성이 중요한 것으로 간주될 수 있다. 백신 균주와 동시에 발생하는 순환성 바이러스 간의 서열 부동률 (dissimilarity degree) 을 최소화하는 데에 유효한 접근 방식은 이들 바이러스에 대해 "중추적인" 인공 서열을 창출시키는 것이다. 이러한 서열을 설계하기 위한 한 가지 전략은 정렬 내의 모든 위치에서 가장 흔한 아미노산으로부터 유래된 컨센서스 서열을 사용하는 것이다. 이 연구에서, 본 발명자들은 컨센서스에 의거한 아형 B 외막 백신을 개발하였고 이러한 합성 면역원이 보다 높은 교차 반응성을 지닐 수도 있다고 생각하였다. 본 발명자들의 연구 결과, pEY2E1-B 백신에 의해 다양한 세포성 면역 반응이 유도된 것으로 밝혀졌다. Balb/c 및 트랜스제닉 마우스들 다에서의 펩티드 지도화 결과 역시, EY2E1-B 면역원이 면역 반응을 확대시켰다는 것을 표시하였다. 더우기, 교차 반응성 세포성 면역 반응 연구 결과는 pEY2E1-B가 상당히 더 강력하고 광범위한 교차 반응성 세포성 면역 반응을 유도시킬 수 있었다고 표시하였다. 따라서, 인공 컨센서스 외막 면역원은 모든 개별적 천연 단리물에서 발견된 것보다 더 보존된 에피토프를 함유하고 있고, 보다 광범위한 교차-분기군 CTL 반응을 유도시킨다.

[0208] 컨센서스 서열은 이론상 이점과 단점을 지니고 있다. 컨센서스 서열은 동시에 발생하는 단리물에 의거하여 생성되기 때문에, 소정의 어떠한 천연 바이러스 단리물보다 현재 순환하고 있는 바이러스성 균주와 유전적으로 보다 더 밀접할 수 있다. 그러나, 급성 감염 동안 샘플링된 바이러스 대신 만성 감염 동안 샘플링된 바이러스를 이용하여 포괄적인 서열 분석을 일반적으로 수행하기 때문에, 대부분이 도피된 에피토프 상에서 컨센서스 백신 반응을 발생시키는 것이 불리할 수 있다. 이러한 단점을 최소화하기 위해, 백신 설계를 위한 본 발명자들의 유용한 전략은 초기 전달자 서열을 고려하는 것일 것이다. 인공적으로 구축하기가 가장 어려운 HIV 단백질 중에서 외막 단백질이 있는데, 이는 HIV-1 외막 유전자 중의 초가변 영역이 신속한 삽입 및 결실에 의해 점진적으로 발달하지만, 점 돌연변이에 의해서는 그렇지 않기 때문이다. 초가변 영역의 길이 차이로 인해, 이들 영역의 컨센서스 서열을 생성시키는 것이 어렵다. 최근에는, 문헌 [참고: Gao, F., Eet al. 2005. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol* 79:1154-63]에서는 군 M 컨센서스 외막 서열을 생성시켰지만, CRF08 BC 제조합 균주의 상응하는 영역으로부터의 비-컨센서스 서열을 이들 가변 영역에 사용하였다. 연구 결과, 보다 짧은 V1, V2 및

V4 영역을 지닌 외막 당단백질을 암호화하는 아형 C 바이러스가 우연히 예상될 수 있는 것보다 상당히 더 높은 빈도로 수용자에게 전염되는 것으로 나타났다. 초기 감염으로부터의 아형 A 외막 서열은 또한, 상당히 더 짧은 V1 및 V2 루프를 갖고 있으며, 훨씬 덜 잠재적인 N-연결 글리코실화 부위를 갖고 있다 [참고: Chohan, B., D. et al. 2005. Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79:6528-6531]. 이와는 달리, 최근에 전염된 아형 B 변이체는 보다 짧은 V1 및 V2 루프를 갖고 있지 않았다. 그러나, 아형 B 감염 증례가 주로 동성애자간 전염이나 약물 주사 사용에 따른 결과였다는 것을 인지하는 것이 중요할 수 있다. 더우기, 연구 결과는 조밀한 V1, V2 영역을 갖는 것에 따른 가능한 기능적 결과는 CD4 결합성 도메인의 노출을 증가시킨 다음, 중화에 대한 감수성을 증강시키는 것이란 사실을 제안하였다 [참고: Edwards, T. G., et al. 2001. Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 75:5230-5239; Kolchinsky, P., et al. 2001. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent Human Immunodeficiency Virus variants. *J. Virol.* 75:2041-2050; Pickora, C., et al. 2005. Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4. *J. Virol.* 79:12575-12583; Puffer, B. A., et al. 2002. CD4 independent of Simian Immunodeficiency Virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity. *J. Virol.* 76:2595-2605]. 본 발명자들은 아형 B 컨센서스 서열을 생성시킨 경우에 V1 및 V2 영역을 단축시켰다.

[0209] HIV-1 감염의 초기 상은 서서히 복제하고 그들의 주요 공동-수용체로서 CCR5를 사용하는 비-합포체-유도성 (NSI) 바이러스가 다수를 차지하고 있다. 가속 CD4 세포 강하 및 감염의 점진적 임상 과정에 앞서 감염된 개체의 약 50%에서 나타나는 합포체-유도성 (SI) 바이러스는 주요 공동-수용체로서 CXCR4를 사용한다. HIV 변이체의 차별적 공동-수용체 활용이 모든 아형에 대해 입증되었다. 아형 C 바이러스는 대부분의 기타 아형과 상이한 것으로 여겨지는데, 이는 아형 C에서 HIV 변이체를 이용한 CXCR4의 과소 표시가 자주 보고되었기 때문이다. 따라서, CCR5 활용이 백신 설계에 있어 극히 중요하게 고려되어야 한다. 기존의 보고서는 gp120의 V3 영역이 공동-수용체 활용에 중요한 역할을 하는 것으로 제시하였다. V3 루프 중의 6개 잔기가 CCR5 상호 작용에 결정적인 것으로 확인되었다: 아르기닌307, 리신314, 이소루이신316, 아르기닌322, 페닐알라닌324 및 알라닌337. 그러나, 아형 C 초기 전달자의 서열을 기초로 하여, 위치 322에서의 잔기는 아르기닌 대신 글루탐산이어야 한다. 요약하면, 초기 전달자의 서열과 CCR5 활용에 중요한 잔기를 나타내는 기존의 연구를 근거로 하여, 본 발명자들은 이론상 CCR5 공동-수용체 활용을 표적으로 할 수 있는 면역 반응을 구동시킬 수 있었던 아형 B 컨센서스 외막 면역원을 설계하였다.

[0210] 잠재적 교차 반응성을 최대화하기 위해, HIV-1 군 M 컨센서스 외막 서열을 창출시켰다. 그러나, 아형 특이적 외막 컨센서스 백신이 적어도 세포성 면역 반응 수준에서 순환성 바이러스와 비교해서 백신 항원의 전반적인 서열 유사성에 대한 보상을 나타낼 수 있는 것이 가능하다. 연구 결과, 아형 B 및 C 외막 단백질의 상이한 영역에서 높은 선별율이 확인된 것으로 밝혀졌다. 이는 아형 B 및 C에서 외막 단백질의 상이한 영역 상에서의 상이한 면역 압력에 의해 유발될 수 있다. 따라서, 아형 특이적 외막 백신을 사용하는 것이 유리할 수 있는데, 이는 백신 및 순환성 바이러스에 대한 면역 반응이 항원 도메인을 공유할 수도 있기 때문이다. 이러한 문제를 추가로 명료하게 하기 위해서는, 군 M 및 아형 특이적 외막 백신을 비교하는 더 많은 실험이 필요하다.

[0211] 컨센서스 서열을 사용하는 것과 관련한 또 다른 중요한 우려는 그의 서열이 어떠한 천연 바이러스에서도 발견되지 않은 조합의 다형성과 연관이 있을 수 있으므로, 잠재적으로 부적절한 단백질 입체 형태가 생성될 수 있다는 것이다. 기존의 연구 결과, 군 M 컨센서스 면역원이 천연 입체 형태로 폴딩될 수 있었고, 외막 항원성 에피토프를 보존할 수 있으며 약한 중화 항체 반응을 유도시킬 수 있었다고 나타났다. 합성 단백질이 항체 2G12, ID6 및 F105와 결합할 수 있었다는 사실에 기초하여, 본 발명자들은 pEY2E1-B가 다소 천연 구조적 입체 형태를 지닐 수 있다고 생각하였다. 중요하게도, 본 발명자들의 데이터는 또한, EY2E1-B 면역원이 보다 고-역가 아형 B 외막-특이적 항체를 유도시킬 수 있었다는 것을 입증하였는데, 이는 이러한 합성 면역원이 보다 많은 부류 II 에피토프를 또한 보존할 수 있다는 지표이다. 이러한 분야에 관한 보다 많은 연구가 중요할 것이다.

[0212] 신규 HIV-1 백신 전략이 개발됨에 따라, 임상전 모델을 사용하여 인간에게서 이들 백신의 효능을 예측하고자 하는 수요가 또한 증가하고 있다. 본 발명자들의 연구에서는, HLA-A2 트랜스제닉 마우스를 사용하여 합성 면역원에 의해 유도된 세포성 면역 반응을 연구하였다. 연구 결과, 이러한 트랜스제닉 균주가 인간 CD8+ 세포용해성 T 세포의 최적의 자극과 관련된 감염성 질병에 대한 백신을 설계 및 시험하는 데에 있어서 중요한 임상전 모델

이란 사실이 밝혀졌다. 이러한 모델에서의 결과는 EY2E1-B가 EK2P-B와 비교해서 훨씬 더 광범위하고 강력한 세포성 면역 반응을 유도시킬 수 있었다고 표시하였는데, 이는 상기 신규 백신이 HLA-A2-제한된 세포성 반응을 유도시키는 데에 보다 강력할 수 있었다는 사실을 제안한다. 비인간 영장류에서 이러한 면역원에 관한 추가의 연구가 계획 중에 있다.

[0213] 종합해 보면, 본 발명자들의 연구 결과는 EY2E1-B가 DNA 백신 카세트로서 CTL 반응의 크기와 폭 둘 다를 증가시키는 면역원으로서 제공된다는 사실을 제안하고 있다. 보다 일반적인 측면에서 보면, 상기 구조물은 비-DNA 백신 접근 방식에서 HIV 균주에 대한 보다 강력하고 광범위한 세포성 면역 반응을 유도하기 위한 기타 플랫폼에 유용할 수 있다.

[0214] **실시예 2: 유도된 세포성 면역 반응의 다양성과 폭을 증강시켜 주는, 공학적으로 처리시킨 신규한 HIV-1 분기군 C 외막 DNA 백신의 개발**

[0215] 강력한 HIV-1 특이적 CTL 반응은 급성 및 무증후성 감염 동안 바이러스성 부하를 관리하는 데에 중요한 역할을 한다. 그러나, 컨센서스 면역원에 관한 최근의 연구는 개선된 세포성 면역 반응을 현저히 입증할 수 없었다. 본 실시예에서 본 발명자들은 개선된 세포성 면역 반응을 알아보기 위해 공학적으로 처리시킨 신규한 분기군 C 컨센서스에 의거한 외막 면역원을 시험하였다. 신규 백신 (pEY3E1-C)을 HIV-1 분기군 C 컨센서스 외막 서열로부터 창출시켰다. 몇 가지 변형을 수행하였는데, 이에 초기 전달자 서열에 기준한 고도로 가변적인 V1 및 V2 영역의 단축, CCR5 활용을 위한 V3 루프의 잔류, 외막 재순환을 방지하기 위해 C-말단으로부터의 세포질성 미부영역 제거, 및 적당한 폴딩을 위한 절단 부위 및 TMD의 잔류가 포함된다. 또한, IgE 리더 서열을 N-말단에 가하였다. 이러한 컨센서스 DNA 백신을 또한 RNA 최적화 및 코돈 최적화시켰다. 세포성 면역 반응은 ELISpot 및 에피토프 지도화 검정을 통하여 BalB/C 마우스에서 연구하였다. pEK3P-C (분기군 C env의 일차 단리물로부터 유래됨)과 비교해서 DNA 백신으로서 연구한 경우, 본 발명자들의 구조물 (pEY3E1-C)이 세포성 면역 반응을 구동하는 데에 있어서 보다 더 유효하였다. pEY3E1-C는 컨센서스 분기군 C 펩티드로써 자극하는 경우에 pEK3P-C보다 더 큰 크기의 세포성 면역 반응을 유도시켰다. 부가적으로, 컨센서스 면역원은 분기군 C로부터의 일차 단리물 펩티드의 2가지 기타 세트으로써 자극하는 경우에 세포성 면역 반응의 크기 증가를 유도시켰다. 크기 증대 이외에도, 29개의 강력하게 반응성인 펩티드 풀 (비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 갖는다) 중의 15개 이상을 유도시킬 수 있는 pEY3E1-C의 능력에 의해 CTL 반응의 폭 증강이 뒷받침되는 반면, pEK3P-C은 반응 폭을 평가하기 위한 엄격한 대조군으로서 제공될 수 있는 능력과 독특성 때문에 선택된 2개의 일차 단리물 펩티드 세트에 반응하여 강력한 반응성을 나타내는 29개 풀 중의 3개 풀 및 29개 풀 중의 9개 풀 만을 유도시켰다. 더우기, pEY3E1-C는 분기군 B 펩티드로 자극하는 경우에 보다 강력한 교차-분기군 세포성 면역 반응을 유도시켰다. 컨센서스 면역원 pEY3E1-C는 DNA 백신 카세트로서 CTL 반응의 크기와 폭 둘 다를 증강시켜 준는데, 이는 컨센서스 면역원이 HIV 백신 각테일에서 성분 항원으로서 제공될 수 있다는 잠재력을 추가로 조사할 가치가 있다는 것을 제안하고 있다.

[0216] 기존 균주의 광범위한 유전적 다양성, 신속한 돌연변이 및 재조합으로 인해, 유효한 백신을 개발하기가 상당히 곤란하다. 개개의 단리물로부터 유래된 후보 DNA 백신은 HIV-1의 다양한 순환성 균주에 대한 보호에 필요한 교차-반응성을 유도시킬 수 없을 수도 있다.

[0217] 부가적으로, HIV-1 외막 당단백질을 발현하는 DNA 백신은 극히 면역원성이 아닌 것으로 보고되었다.

[0218] 본 발명자들은 바이러스의 순환성 균주에 대한 보호를 가능한 제공하기 위해 DNA 백신에 의해 유도된 CTL 반응의 효력을 증가시키기 위한 다상 전략을 사용하였다.

[0219] 최근의 연구 결과, 컨센서스 면역원이 신속하게 진화하는 HIV-1 바이러스에 의해 창출된 다양성 장애를 극복할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0220] 데르데인 (Derdeyn) 등은 보다 짧은 V1-V4 영역이 초기 전염성 아형 C 바이러스의 특징이란 사실을 밝혀내었고, 본 발명자들의 구조물은 초기 전염된 바이러스로부터 비롯되는 면역 반응을 생성시키는 데에 유용할 수도 있는 상기 특징을 수반하도록 설계하였다.

[0221] 더우기, 본 발명의 DNA 백신의 발현 수준은 코돈 최적화, RNA 최적화, 및 면역글로불린 리더 서열의 부가에 의해 증강되었다.

[0222] HIV-1 특이적 CTL 반응은 급성 및 무증후성 감염 동안의 바이러스성 부하 및 AIDS 발병을 제어하는 데에 있어서 중요한 것으로 밝혀졌으므로, 다음 데이터는 본 발명의 신규 면역원에 의해 유도된 CTL 반응에 초점을 두고 있

다.

- [0223] 도 13은 유도된 세포성 면역 반응의 다양성과 폭을 증강시키는, 공학적으로 처리시킨 신규한 HIV-1 분기군 C 외막 DNA 백신을 개발하기 위한 면역원 설계를 도시한 것이다.
- [0224] 도 14는 계통발생학적 관계를 도시한 것이다: 36개 HIV-1 아형 C 외막 서열, EY3E1-C, EK3P-C, 2개의 아형 B, 1개의 아형 A 및 1개의 아형 D 서열 (외집단)을 계통발생학적 분석에 포함시켰다. 광범위한 다양성 샘플을 나타내는 아형 C 외막 서열은 12개 국가로부터 유래되었다.
- [0225] 표 3은 잠재적 외막 백신 후보와 아형 C 외막 서열 정렬 간의 유사율 스코어 평균 및 범위 (%)를 나타낸다.

표 3

	평균 유사율 스코어 (%)	유사율 스코어 범위 (%)
pEY3E1-B	85.3	82.7-93.1
pEK3P-C	87.4	83.6-90.2

- [0227] 3마리 Balb/C 마우스 3개 군을 100 μ g의 DNA로 2주 간격으로 3회 면역시켰다. 7번째 주에, 세포성 연구를 위해 비장을 수거하였다.
- [0228] 도 15 패널 A 및 B에 도시된 바와 같이, pEY3E1-C에 의해 강력한 세포성 반응이 유도되었다.
- [0229] 도 16은 pEY3E1-C에 의해 유도된 강력하고 광범위한 세포성 반응을 도시한 것이다. 컨센서스 C env 펩티드의 29개 풀로 자극한 경우: pEY3E1-C 백신접종한 마우스는 23개 풀로부터 비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 유도시켰고; pEK3P-C 백신접종한 마우스는 2개 풀로부터 비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 유도시켰다.
- [0230] 도 17 패널 A-D는 동일한 분기군 내에서 pEY3E1-C에 의해 유도된 교차-반응성 세포성 반응을 도시한 것이다.
- [0231] 도 18 패널 A 및 B는 pEY3E1-C에 의해 유도된 강력하고 광범위한 교차-반응성 세포성 반응을 도시한 것이다. 패널 A는 아형 C (우루과이) env-특이적 IFN- γ ELISpot으로부터의 데이터를 나타낸다. 분기군 C (우루과이) env 펩티드의 29개 풀로 자극한 경우: pEY3E1-C 백신접종한 마우스는 12개 풀로부터 비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 유도시켰고; pEK3P-C 백신접종한 마우스는 3개 풀로부터 비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 유도시켰다. 패널 B는 아형 C (남아프리카) env-특이적 IFN- γ ELISpot으로부터의 데이터를 나타낸다. 분기군 C (남아프리카) env 펩티드의 29개 풀로 자극한 경우: pEY3E1-C 백신접종한 마우스는 13개 풀로부터 비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 유도시켰고; pEK3P-C 백신접종한 마우스는 5개 풀로부터 비장 세포 100만개 당 50개 이상의 스팟을 유도시켰다.
- [0232] 도 19 패널 A-F는 분기군 사이에서 pEY3E1-C에 의해 유도된 강력한 교차-반응성 세포성 반응을 도시한 것이다.
- [0233] EOC 면역원에 의해 유도된 세포성 면역 반응의 폭과 크기가 상당히 증가되었다. 보다 광범위한 교차-분기군 반응성이 이러한 면역원의 부가 이득으로서 여겨진다.

[0234] **실시예 3:**

[0235] **E6/E7 융합 단백질을 암호화하는, 공학적으로 처리시킨 신규한 HPV-16 DNA 백신의 효능**

- [0236] 폴리단백질로서 발현되도록 함으로써 E6 서열과 E7 서열이 단백질 분해적 절단 부위에 의해 분리되도록 면역원을 설계하였다. 폴리단백질은 또한 IgE 리더 서열을 이용하여 발현되었다. 폴리단백질 설계에는 p53 결합 및 분해에 있어 중요한 E6 서열 상의 결실 또는 돌연변이, 및 E7 단백질 상의 Rb 결합 부위에 있어서의 돌연변이가 포함된다. 도 23은 면역원 설계를 예시한 것이다.
- [0237] 폴리단백질을 암호화하는 암호화 서열을 벡터 pVAX 내로 삽입하여 플라스미드 p1667을 생성시켰다. 도 24는 pVAX 및 p1667의 지도를 도시한 것이다.
- [0238] TC1 종양 세포를 HPV-16 E7로 불멸화시키고, c-Ha-ras 종양형성 유전자로 형질전환시켰다. 이들 세포는 저 수준의 E7을 발현하고 극히 종양원성이다.
- [0239] 마우스를 대상으로 한 면역원성 연구에서는, C57BL6 마우스 한 군당 3마리 마우스에게 마우스당 100 μ g의 DNA를 투여하였다. 여러 군에는 1) pVAX-대조군 벡터를 투여한 대조군 및 2) p1667을 투여한 시험군이 포함되었다.

마우스를 0, 14 및 28일째에 백신 접종하였다. 35일째에, 마우스를 희생시키고 ELISPOT를 수행하였다 (CMI에 초점을 맞춤).

[0240] DNA 면역원 p1667에 의해 유도된 세포성 면역 반응에 대한 데이터가 도 25에 도시되었다. HPV16 컨센서스 E6 및 E7 펩티드 (9개 aa가 중복되는 37, 15량체)를 2개 풀에 사용하였다 - 풀 1: 18개 펩티드; 풀 2: 19개 펩티드. 패널 A 및 C는 총 비장 세포로부터의 데이터를 나타낸다. 패널 B 및 D는 CD8 고갈시킨 샘플로부터의 데이터를 나타낸다.

[0241] 도 26은 면역우성 에피토프 지도화 결과를 도시한 것이다. 2개의 서열이 인지되었다.

[0242] 마우스를 대상으로 한 예방적 연구에서는, C57BL6 마우스 한 군당 5마리 마우스에게 마우스당 100 μ g의 DNA를 투여하였다. 여러 군에는 1) 미처치 군 (PBS 주사함), 2) pVAX-대조군 벡터를 투여한 대조군 및 3) p1667을 투여한 시험군이 포함되었다. 마우스를 0, 14 및 28일째에 백신 접종하였다. 35일째에, 마우스를 TC-1 세포로 시험감염시킨 후, 종양 크기를 측정하였다. 그 결과가 도 27에 도시되었다. IL-15 구조물을 공동-투여한 군으로부터의 데이터가 또한 도시되었다.

[0243] 마우스를 대상으로 한 종양 퇴행 연구에서는, C57BL6 마우스 한 군당 5마리 마우스에게 마우스당 100 μ g의 DNA를 투여하였다. 여러 군에는 1) 미처치 군 (PBS 주사함), 2) pVAX-대조군 벡터를 투여한 대조군 및 3) p1667을 투여한 시험군이 포함되었다. 마우스를 0일째에 5×10^4 개 TC-1 세포로 시험감염시켰다. 3, 10 및 17일째에 마우스에게 DNA 백신을 투여하였다. 8일째부터 종양을 측정하기 시작하였다. 그 결과가 도 28에 도시되었다. IL-15 구조물을 공동-투여한 군으로부터의 데이터가 또한 도시되었다.

[0244] 비장에서 E7 사랑체 양성 림프구 수준을 결정하였다. 도 29는 E7 사랑체 양성 림프구 %로서의 데이터를 도시하였다. DNA 백신 p1667은 비장 내에서 CD62L^{lo}인 E7-특이적 CD8+ T 세포의 활성화를 유도시킨다.

[0245] 종양에서 E7 사랑체 양성 림프구 수준을 결정하였다. 도 30은 E7 사랑체 양성 림프구 %로서의 데이터를 도시하였다. DNA 백신 p1667은 종양 내에서 CD62L^{lo}인 E7-특이적 CD8+ T 세포의 활성화를 유도시킨다.

[0246] 트랜스제닉 마우스에서 E6/E7 DNA 백신 보호 연구를 수행하였다. 미처치, pVAX, p1667, p1667 + IL-15 및 E7/HisB를 서로 비교하였다. 데이터가 도 31에 도시되었다. p1667 및 p1667 + IL-15는 완전히 보호하였다.

[0247] 본 실시예에서 제시된 데이터는 다음 결론을 뒷받침해준다: p1667 구조물은 IFN-g 반응 상승을 매개하는 E7-특이적 CD8+ 림프구를 유도할 수 있는 강력한 세포성 면역 반응을 유도시킨다. 본 발명자들은 DNA 구조물을 투여한 후 그에 대하여 항원 특이적 CTL 반응을 생성시키는 신규한 준우성 및 우성 HPV-16 에피토프 둘 다를 확인하였다. p1667 구조물은 C57/BL6 및 트랜스제닉 마우스 둘 다에서 종양 성장을 방지할 수 있고 종양의 퇴행을 유발시킬 수 있다. DNA 백신 p1667은 극히 작은 HPV-관련 암을 표적으로 하는 신규한 치료 전략에 대한 대단한 가능성을 나타낸다.

[0248] **실시예 4**

[0249] HIV Env 컨센서스 서열을 암호화하는 핵산 서열은, 예를 들어 근육내 또는 피내 전달을 위한 전기천공 기술을 사용하여 각종의 기타 HIV 단백질, 예를 들어 Gag, Pol, Gag/Pol, Nef, Vif, 및 Vpr을 암호화하는 핵산 서열과 병용해서 DNA 백신으로서 투여할 수 있다. 다가 HIV 백신 구조물은 증강된 면역 반응을 제공할 수 있으므로 특히 유용하다. 몇몇 양태에서는, IL-12 암호화 서열이 부가적으로 제공된다. 본원에 참고로 도입되는 미국 공개특허공보 제20070106062호에는 HIV Vif DNA 백신이 기재되어 있다. 본원에 참고로 도입되는 미국 공개특허공보 제20040106100호에는 HIV 보조 단백질을 포함하는 HIV 백신 뿐만 아니라 부가의 백신 구조물을 제조하기 위해 사용될 수 있는 상기 단백질의 서열이 기재되어 있다. 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,468,982호, 제5,817,637호, 및 제5,593,972호에는 HIV gag, HIV pol 및 HIV gag/pol 구조물을 포함한 DNA 백신이 기재되어 있다. 전기천공은 본원에 참고로 도입된 미국 특허 제7,245,963호에 기재되어 있다. 본원에 참고로 도입되는 PCT 특허출원 PCT/US97/19502에는 IL-12 구조물이 기재되어 있다. 본원에 참고로 도입되는 미국 공개특허공보 제20070041941호에는 IL-15를 암호화하는 구조물이 기재되어 있다.

[0250] **실시예 5**

[0251] 짧은 꼬리 원숭이 2개 군을 플라스미드 IL-12를 수반하거나 수반하지 않으면서 최적화된 플라스미드 gag 및 env 구조물로 3회 IM 면역시켰다. 2개의 부가 군에 대해서 동일한 면역 전략을 사용하였는데, 단 플라스미드는 생

체내 전기천공을 수반하거나 수반하지 않으면서 전달하였다.

[0252] 각 면역 후 및 기억 반응을 위해 5개월 후에 IFN γ ELISpot함으로써 세포성 반응을 결정하였다. 연구 전반에 걸쳐 재조합 p24 및 gp160 ELISA에 의해 체액성 반응을 평가하였다. 항원 특이적 T 세포의 증식 능력을 CFSE 염색에 의해 결정하였다. 세포내 사이토킨 염색을 수행하여, 상기 유도시킨 T 세포 반응의 기능적 특징을 추가로 정상 확인하였다.

[0253] 플라스미드 IL-12는 본 발명자들의 최적화된 구조물에 대한 세포성 반응을 증강시켰다. 그러나, 플라스미드의 전달을 증강시키기 위해 전기천공을 사용하는 것은 플라스미드 IL-12를 이용한 IM 면역과 비교해서 세포성 반응과 체액성 반응 둘 다를 개선시킬 수 있었다. 플라스미드 IL-12와 전기천공을 병용한 결과, 각종 파라미터에 의해 측정된 바와 같이 일차 및 기억 모두의 가장 우수한 면역 반응이 유발되었다.

[0254] DNA 아주반트로서 플라스미드 IL-12의 존재 또는 부재 하에 붉은털 짧은 꼬리 원숭이에게서 HIV gag 및 env를 암호화하는 최적화된 DNA 구조물을 비교하였다. IL-12는 정량적 ELISpot 포맷에서 T 세포 반응을 실질적으로 5배 증가시켜 실질적으로 보다 우수한 기억 T 세포 반응을 유발시킬 수 있었다. 그러나, EP 전달된 DNA는 T 세포 반응과 기억을 생성시키는데 있어서 보다 효율적이었는데, 이는 IL-12 IM 아주반트된 DNA 백신과 비교해서 2배 더 높았다. EP + IL-12 아주반트의 병용 요법 군 (combination arm)에서 가장 우수한 반응이 관찰되었다. 이러한 군에서의 기억 반응은 IM DNA 단독보다 10배 더 높았고 EP 단독보다 대략 2배 더 높았다. 본 발명자들은 또한, EP 단독과 비교해서 EP + IL-12 군에서 CFSE에 의해 4배 더 우수한 면역 확장을 관찰하였다. 다기능성 T 세포의 존재 또한, DNA + 사이토킨 + EP 군이 가장 유효하다는 사실을 제안하였다.

[0255] **재료 및 방법**

[0256] **동물:**

[0257] 붉은털 짧은 꼬리 원숭이 (*Macaca mulatta*)는 미국 실험실용 동물 보호 인가협회의 표준에 따라서 바이오쿠얼, 인코포레이티드 [BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD)]에서 사육하였다. 실험에 앞서 검역소에서 30일 이상 동안 동물을 새 환경에 순응시켰다.

[0258] **면역:**

[0259] 5마리 붉은털 짧은 꼬리 원숭이를 0, 4, 및 11주째에 1.0 mg의 pGag4Y 및 pEY2E1-B로 면역시켰다. 각 면역 시점에서 DNA를 2개의 주사 부위 (각각 대퇴사두근 내에 있음) 내로 전달하였다. 짧은 꼬리 원숭이 3마리를 IM 주사 후 전기천공시켰다. 또 다른 5마리 붉은털 원숭이 군을 0, 4, 및 8주째에 1.0 mg의 pGag4Y, pEY2E1-B, 및 WLVI04로 면역시켰다. 5마리 동물 중에서, 2마리 동물은 IM 주사함으로써 면역시켰고, 3마리 동물은 IM 주사 후에 전기천공시켰다. 모든 전기천공 과정은 일정 전류 콜렉트라 (Celectra™) 장치 (공급처: VGX Immune Therapeutics Division of VGX Pharmaceuticals, The Woodlands, TX)를 사용하여 수행하였다. 전기천공 조건은 0.5 Amp, 3 펄스, 52 msec 펄스 길이 (펄스 간극 1초)였다. 이러한 소프트웨어-제어식 장치는 플라스미드 전달 및 일정 전류 구형파 (square wave) 펄스의 발생 직전에 조직 내성을 측정하도록 설계하여, 근육 조직 외 부로의 전달과 잠재적 플라스미드 손실 위험을 없앴다.

[0260] **혈액 수집:**

[0261] 동물을 대상으로 하여 연구 기간 동안 2주 마다 방혈시켰다. 10 ml의 혈액을 EDTA 튜브에 수집하였다. PBMC를 표준 피콜-하이파크 (Ficoll-hypaque) 원심분리에 의해 분리시킨 다음, 완전 배양 배지 (10% 열 불활성화 태아 소 혈청, 100 IU/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 및 55 μ M/L β -머캅토에탄올로 보충시킨 2 mM/L L-글루타민을 수반한 RPMI 1640)에 재현탁시켰다. RBC를 ACK 용해 완충액 (공급처: Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ)로 용해시켰다.

[0262] **플라스미드 및 플라스미드 생성물:**

[0263] Gag4Y는 HIV 분기군 A, B, C 및 D의 gag 단백질의 컨센서스 서열을 암호화하는 발현 카세트를 함유하는데, 다음을 포함한 몇 가지 변형을 수반한다: 코작 서열 및 치환된 IgE 리더 서열의 부가, 포유류 세포에서의 발현을 위한 코돈 및 RNA 최적화 (서열 11은 HIV Gag 컨센서스 서열을 기술하고 있다). Gag4Y 유전자를 추가 연구를 위해 발현 벡터 pVax 내로 서브클로닝하였다. pEY-2E1-B는 HIV 분기군 B의 외막의 컨센서스 서열을 암호화하는 발현 카세트를 함유하고 있다 (서열 3은 HIV Env 컨센서스 서열을 기술하고 있다). WLVI04M은 붉은털 원숭이 IL-12 유전자를 암호화하는 플라스미드이다. 플라스미드는 알데브론 [Aldevron (Fargo, ND)]에서 생산하였고, 저 분자량 0.1% 폴리-L-글루타메이트 나트륨 염을 수반하여 주사용 멸균수 중의 VGX 면역 치료제 (공급처: The

Woodlands, TX)로 다시 제형화하였다.

[0264] 냉동-보존된 PBMC의 CFSE

[0266] *

[0267] 냉동-보존된 PBMC를 37°C 수욕에서 급속 해동시키고 완전 배지로 세척하였다. 세포를 37°C 항온 배양기에서 밤새 항온 배양하고 그 다음 날에 세포 계수치를 수득하였다. 세포를 펠릿화하고 PBS 중의 1 ml CFDA SE (공급처: Molecular Probes, Eugene, OR)에 재현탁시켰다 (1:2000 희석률). 세포를 37°C 하에 10분 동안 항온 배양하였다. 세포를 완전 배지로 세척하고 1×10^6 개 세포/100 μ l의 농도가 되도록 재현탁시키며, 100 μ l의 2 μ g/ml 재조합 HIV-1 p24 또는 gp120 (공급처: ImmunoDiagnostics, Woburn, MA) 플러스 펩티드 폴로 96 웰 환저판에 도말하였다. 5 μ g/ml 콘카발린 A (양성) 및 완전 배지 (음성)를 대조군으로서 사용하였다. 배양물을 5일 동안 항온 배양하였다. 세포를 먼저, 생/사멸 세포 마커인 비비드 (Vivid) 염료 바이올렛으로 얼음 상에서 15분 동안 염색시켰다. 세포를 PBS로 1회 세척하였다. 그 다음, 세포를 4°C 하에 1시간 동안 항-인간 CD3-PE (클론 SP34-2) (공급처: BD Pharmingen) 및 항-인간 CD4-PerCP (클론 L200), 항-인간 CD8-APC (SK1)을 사용하여 염색시켰다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정시켰다. LSRII 유동 세포계수기 (공급처: BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 데이터를 수집하였다. 플로우조 (FlowJo) 소프트웨어 (공급처: Tree Star, Ashland, OR)를 사용하여 유동 세포계수 데이터를 분석하였고, CD3+ 림프구 상에서 통문하였다. 샘플당 3만개 내지 5만개 CD3+ 림프구를 수집하였다.

[0268] 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA):

[0269] 96 웰 판을 100 ng/웰의 재조합 HIV-1 IIIB p24 또는 gp120 (공급처: ImmunoDiagnostics)로 밤새 피복시켜 HIV gag 및 env 반응을 각각 결정하였다. 100 ng/웰의 소 혈청 알부민으로 피복시킨 판이 음성 대조군으로서 제공되었다. 판을 37°C 하에 1시간 동안 3% BSA-PBST로 차단시켰다. 그 다음, 판을 37°C 하에 1시간 동안 4배 일련의 혈청 희석물과 함께 항온 배양하였다. 이어서, 염소 항-원숭이 IgG 서양고추냉이 피옥시다제 접합된 항체를 1:10,000 희석물로 (공급처: MP Biomedicals, Aurora, OH) 판에 가하고 37°C 하에 1시간 동안 항온 배양하였다. 테트라메틸벤지딘 (공급처: R&D systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 판을 전개시키고, 2 N H₂SO₄을 사용하여 반응을 중지시켰다. 이어서, 광밀도 (OD)를 측정하였다.

[0270] IgG 종말점 역가는 BSA 웰의 평균 OD 값보다 2배 더 큰 OD 값을 생성시키는 혈청 희석물 역수로서 정의하였다.

[0271] 효소 연결 면역스팟 검정 (ELISpot)

[0272] 펩티드를 함유하는 웰로부터 음성 대조군 웰 중의 스팟 수를 공제함으로써 항원 특이적 반응을 결정하였다. 그 결과는 세 번 되풀이 하여 수행된 웰에 대해 수득된 평균 값 (비장 세포 100만개 당 스팟 수)으로서 제시하였다.

[0273] 1. 세포내 사이토킨 염색

[0274] 항체 시약

[0275] 직접 접합된 항체를 다음으로부터 획득하였다: BD Biosciences (San Jose, CA): IL-2 (PE), CD3 (Pacific Blue), IFN- γ (PE-Cy7), 및 TNF- α (Alexa Fluor 700), CD8 (APC) 및 CD4 (PerCP).

[0276] 세포 자극 및 염색

[0277] PBMC를 완전 RPMI에서 1×10^6 개 세포/100 μ l가 되도록 재현탁시키고, 1:200 희석물의 자극성 펩티드 100 μ l로 96 웰 판에서 도말하였다. 자극되지 않은 양성 대조군 [스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*) 엔테로톡신 B, 1 μ g/ml; 공급처: Sigma-Aldrich]를 각 검정에 포함시켰다. 세포를 37°C 하에 5시간 동안 항온 배양하였다. 항온 배양을 수행한 후, 세포를 세척하고 (PBS) 표면 항체로 염색시켰다. 세포를 세척하고 지시에 따라서 사이토폭스/사이토펜 (Cytofix/Cytoperm) 키트 (공급처: BD Pharmingen, San Diego, CA)를 사용하여 고정시켰다. 고정시킨 후, 세포를 상기 펄 완충액에서 2회 세척하고 세포내 마커에 대한 항체로 염색시켰다. 염색시킨 후, 세포를 세척하고, 고정시키며 (1% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS), 분석할 때까지 4°C 하에 저장하였다.

[0278] 유동 세포계수법

- [0279] 세포를 변형된 LSR II 유동 세포계수기 (공급처: BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) 상에서 분석하였다. 샘플당 5만개 CD3+ 사건을 수집하였다. 플로우조 버전 8.4.1 (공급처: FreeStar, San Carlos, CA)을 사용하여 데이터 분석을 수행하였다. 초기 통문은 정방향 산란 면적 (FSC-A) 대 높이 (FSC-H) 플롯을 사용하여 이중선을 제거하였다. 상기 사건을 대상으로 하여 FSC-A 대 SSC 플롯에 의해 림프구 통문을 수행하였다. 이를 수행한 후, 사건은 CD3⁺, CD8⁺ 및 CD4⁻ 사건 대 IFN- γ 상에서 순차적으로 통문시켜 하향 조절을 기대하였다. CD8⁺ T 세포를 확인한 후, 최적의 분리를 제공한 조합을 이용하여 각각의 기능에 대한 통문을 만들었다. 각 기능에 대한 통문을 창출시킨 후, 본 발명자들은 불 (Boolean) 통문 플랫폼을 사용하여 가능한 조합의 완전한 어레이를 창출시켰는데, 이는 3가지 기능을 시험한 경우에 8개 반응 패턴과 동등시하였다. 배경 교정 후에 데이터를 보고하였다. 양성 반응에 대한 역치는 10개 사건 또는 0.05%였다.
- [0280] **통계학적 분석**
- [0281] 프리즘 그래프패드 (Prism Graphpad) 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고, 이를 평균 \pm SEM로 표현하였다.
- [0282] **결과**
- [0283] ELISpot 분석
- [0284] 각 면역시킨 후 IFN γ ELISpot에 의해 세포성 면역 반응 유도를 평가하였다. 단일 면역 후 (도 1), IM 주사에 의해서만 플라스미드 DNA를 투여한 군은 약한 세포성 반응을 나타내었다 (74 ± 29 SFU/ 10^6 PBMC). 붉은털 원숭이 IL-12 플라스미드로 공동-면역시키면 보다 높은 반응이 나타났다 (136 ± 51.4 SFU/ 10^6 PBMC). 전기천공시킨 (EP) 군은 평균 반응을 나타냈는데, 이는 IM 군보다 6배 더 높았다 (482 ± 181 SFU/ 10^6 PBMC). IL-12 공동-면역을 EP와 병용하면 IFN γ -생성 세포 수가 추가로 배가되었다 (1030 ± 494 SFU/ 10^6 PBMC).
- [0285] 2회 면역시킨 후 (도 1), IM 군과 IM + IL-12 군은 ELISpot 계수치에서 적당한 수준의 증가를 나타내었다 (각각 104 ± 67.9 SFU/ 10^6 PBMC 및 223 ± 76.6 SFU/ 10^6 PBMC). EP 군은 기존의 면역보다 대략 4배 더 높은 반응을 나타내었고 (1924 ± 417 SFU/ 10^6 PBMC), EP+IL-12 군은 EP 군 단독과 비교해서 IFN γ -생성 세포 수를 다시 배가시켰다 (2819 ± 872 SFU/ 10^6 PBMC).
- [0286] 세 번째 면역시킨 후 (도 1), EP 군에서 항원 특이적 세포 수는 IM 군의 항원 특이적 세포 수보다 log 이상 더 많았다 (각각 5300 ± 3781 및 370 ± 110 SFU/ 10^6 PBMC). IM+IL-12 군은 세포성 면역 상의 현저한 증가를 또한 나타냈는데, ELISpot 계수치는 기존의 면역보다 거의 log 더 많았다 (2042 ± 311 SFU/ 10^6 PBMC). 다른 2회 면역과 같이, EP+IL-12 군은 모든 백신접종 군 중에서 가장 강력하였다 (7228 ± 2227 SFU/ 10^6 PBMC).
- [0287] *교차-반응성 외막 반응의 유도*
- [0288] 성공적인 HIV 백신은 EP+IL-12가 다른 펩티드 라이브러리에 대한 교차-반응성 크기를 개선시킬 수 있었는지를 알아보는 데에 관심이 있었다는 점과 관련하여 교차 반응성 면역 반응의 유도를 요구할 것이다. 본 발명자들은 킨센서스 군 M으로부터의 펩티드 라이브러리를 사용하여 env 항원에 의해 유도된 교차 반응성 CTL 반응을 비교하였다. 모든 군에서 교차 반응성이 관찰되었다. 그러나, 결과는 아형 B ELISpot 분석에서 관찰된 동일한 크기차를 표시하였다 (도 2). 3회 면역 후, IM 군은 군 M 외막 펩티드에 대한 가장 낮은 반응을 나타내었다 ($222 \pm$ SEM SFU/ 10^6 PBMC). IL-12를 부가하면 반응이 배가되었다 ($540 \pm$ SEM SFU/ 10^6 PBMC). EP를 사용하면 보다 높은 군 M 외막 반응이 유도되었는데 ($830 \pm$ SEM SFU/ 10^6 PBMC), 이는 IL-12 공동-주사에 의해 추가로 증강되었다 ($1238 \pm$ SEM SFU/ 10^6 PBMC).
- [0289] 1. 기억 T 세포 반응
- [0290] 중요한 논점은 DNA 플랫폼을 이용하여 기억 반응의 발생을 개선시킬 수 있어야 하는 것이다. 본 발명자들은 마지막 DNA 백신접종한지 5개월 후에 ELISpot 분석을 수행하였다 (도 3). IM 군에서는, 플라스미드 IL-12를 부가하면 기억 세포가 거의 10배 증가하였다 (751 ± 11.1 및 78.6 ± 16.9 SFU/ 10^6 PBMC). IL-12가 이러한 중요한

T 세포 표현형에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 것이 명백하다. 항원-특이적 IFN γ -생성 세포의 수는 EP 군에서 또한 상당하였지만, IL-12 아주반트 + EP는 가장 원기왕성한 기억 반응을 유발시켰는데 (각각 1231 \pm 523.5 및 3795 \pm 1336 SFU/10⁶ PBMC), 이는 병용 기술이 극히 강력한 T 세포 기억 반응을 구동시킨다는 사실을 보여주는 반응이다.

[0292] DNA 백신에 대한 체액성 면역 반응

[0293] IM DNA 백신 기술의 약점은 비인간 영장류 및 인간 임상 연구에서 명백한 항체 반응을 유도시킬 수 없다는 것이다. 본 발명자들은 ELISA 포맷에서 제조합 p24 및 gp160 항원에 대한 HIV-1 gag 및 env 특이적 항체 역가 둘 다를 유도시킬 수 있는 각 군의 능력을 평가하였다. 양 항원에 대해, IM 및 IM + IL-12 군은 상당한 항체 역가를 나타내지 않았다 (<1:50 종말점 역가). 전기천공시킨 군은 제조합 p24와 결합할 수 있었던 현저하게 더 높은 gag 항체 역가를 나타내었다. EP 군과 EP + IL-12 군 둘 다가 12주째에 유사한 종말점 역가를 나타내긴 하였지만 (각각 22,400 및 12,800), EP + IL-12 군은 보다 효율적인 항체 반응을 발생시켰다. 이러한 반응은 면역 도식에서보다 초기에 나타났고, 신속하게 최대 수준으로 상승하였다. env 항체 반응 또한, 보다 낮은 종말점 역가를 수반함에도 불구하고 gag 항원을 이용하여 본 발명자들이 관찰한 결과를 반영하였다.

[0294] CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 증식

[0295] 상당한 ELISpot 반응이 관찰되었기 때문에, 본 발명자들은 이어서 세포성 면역의 부가 파라미터를 조사하였다. 본 발명자들은 상이한 면역 군 중에서 펩티드 자극을 수행한 후 시험관 내에서 증식할 수 있는 gag 특이적 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 능력을 조사하였다. 최종 면역시킨지 2주 후에 수집한 냉동 보존된 샘플을 자극시키고 CFSE 검정에 의해 분석하였다. 평균 CD4⁺ 반응은 ELISpot 검정에서 관찰된 바와 유사한 수준으로 증가하였다. 비교하자면, CD8 증식 유도는 크기 면에서 훨씬 더 현저하였다. 본 발명자들은 IL-12가 IM 단독에 비해 CD8⁺ T 세포 증식을 증가시켰고 EP가 실질적으로 더 높다는 사실을 관찰하였다. EP + IL-12 군은 가장 높은 비율의 CD8⁺ 세포를 가졌는데, 이는 시험관내 자극 후에 증식할 수 있었다 (각각 2.51 \pm SEM % 및 4.88 \pm SEM %). 명백한 CD8 T 세포 증식 밴드가 EP + IL-12 군에서 관찰되었는데, 이는 이러한 병용 면역의 강력한 증식 잠재력을 입증해준다.

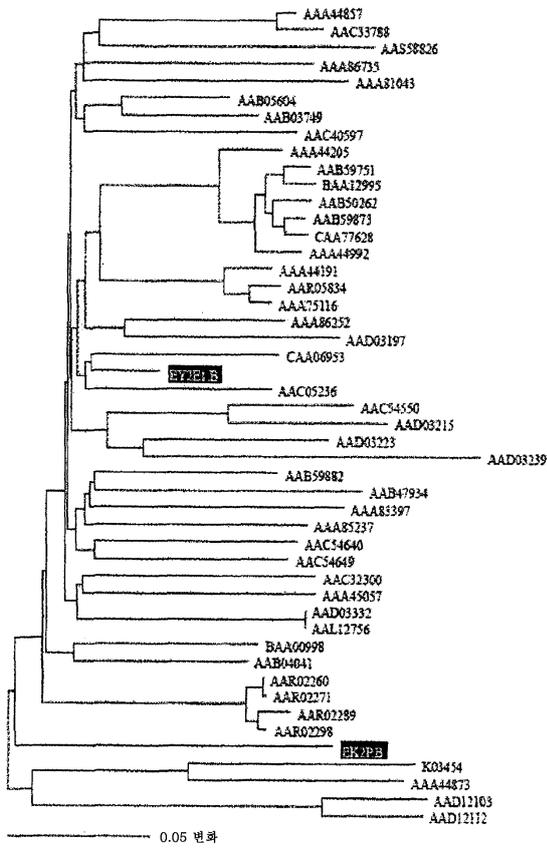
[0297] 다기능성 CD8⁺ T 세포 반응

[0298] 본 발명자들이 EP 및 IL-12 공동-면역 후에 강력한 IFN γ 효과인자 반응 유도를 관찰하긴 하였지만, 본 발명자들은 각종 군에서 항원 특이적 CD8⁺ T 세포 반응의 기능을 추가로 성상 확인하고자 하였다. 최종 면역시킨지 3개월 후에 취한 샘플을 gag 펩티드로 자극하고, IFN γ , TNF α 및 IL-12의 세포내 사이토킨 생성을 알아보기 위해 염색하였다. 모든 군 중에서, IM + IL-12 중의 단지 1마리 동물과 EP 군 중의 1마리 동물 만이 탐지 가능한 IFN γ 반응을 나타내었다. 그러나, EP + IL-12 면역시킨 군 중의 3마리 동물 중에서 2마리가 gag-특이적 IFN γ -생성 CD8⁺ T 세포를 가졌다. IM + IL-12 반응인자는 3개 모든 사이토킨을 알아보기 위해 염색시킨 다기능성 세포 뿐만 아니라 IL-12를 생성시킬 수 있는 능력을 상실한 집단을 적은 비율로 가졌다. EP 반응인자는 4가지 상이한 집단으로 구성된 약간 더 높은 다기능성 반응을 나타내었다. 가장 현저한 반응이 제2 EP + IL-12 동물에서 관찰되었다. 그의 CD8⁺ T 세포의 2% 초과가 3개 모든 사이토킨을 생성시킬 수 있었고, 2%가 IFN γ 와 TNF α 둘 다를 생성시킬 수 있었다. 명백하게, 각 군에서의 동물 수는 적고, 이들 결과를 확인하기 위한 부가의 영장류 연구를 요구하지만, 집합적으로 관찰된 경향은 명백하고 고무적인 것으로 여겨진다.

[0299] 논의

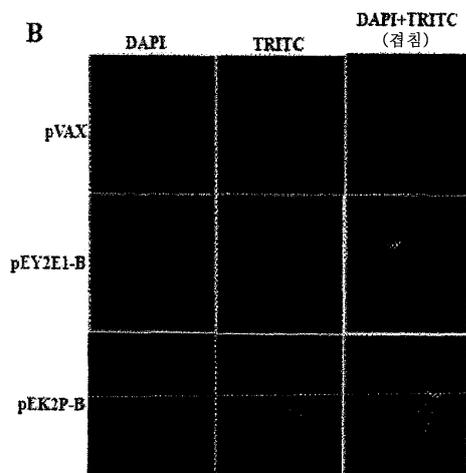
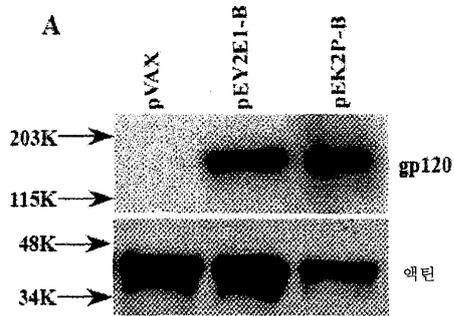
[0300] DNA 백신 아주반트로서의 IL-12는 플라스미드 단독에 비해 ELISpot 반응을 몇배로 개선시켰다. 또한 증식이 명백히 증강되었다. EP 군은 IM 군 단독이나 병용 ELISpot 반응을 나타내는 IM + IL-12 군보다 더 높은 평균 반응을 나타냈는데, 이는 IM + IL-12 군보다 3배 더 높았다. 가장 우수한 ELISpot 반응은 EP + IL-12 군에서 관찰되었는데, 이는 IM+IL-12 군에 비해서는 대략 4배 더 높았고 IM 단독에 비해서는 19배 더 높았다.

도면2



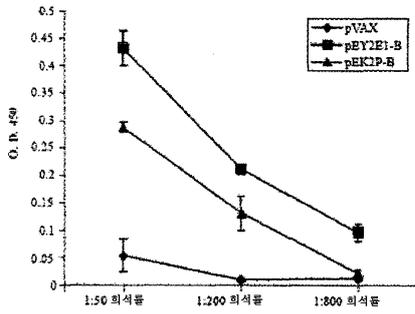
도면3

패널 A 및 B

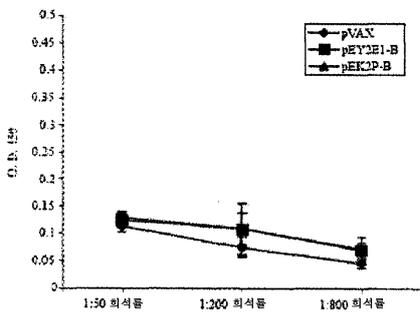


도면4

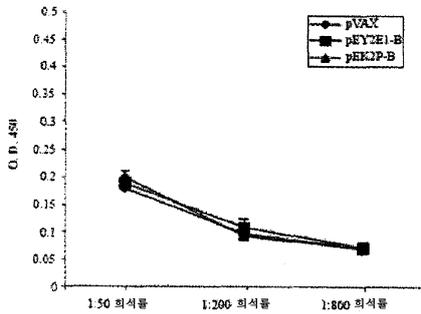
패널 A



패널 B

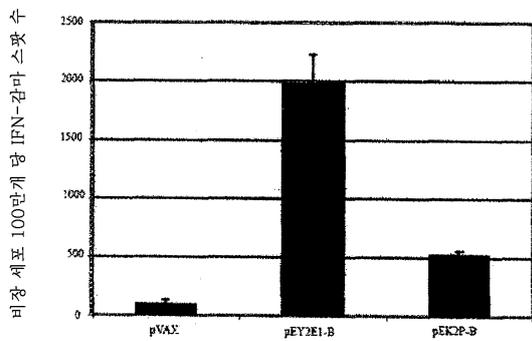


패널 C



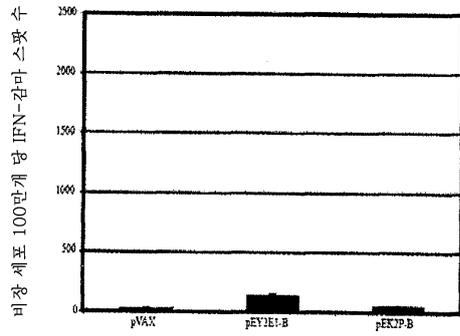
도면5a

패널 A



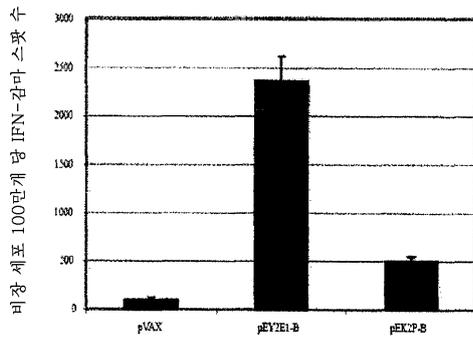
도면5b

패널 B



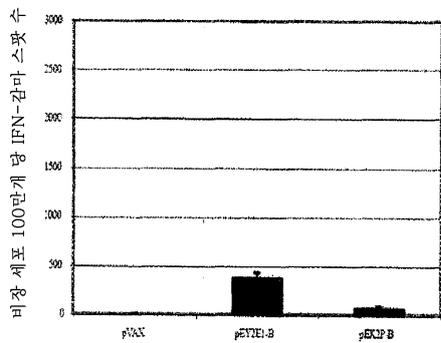
도면5c

패널 C



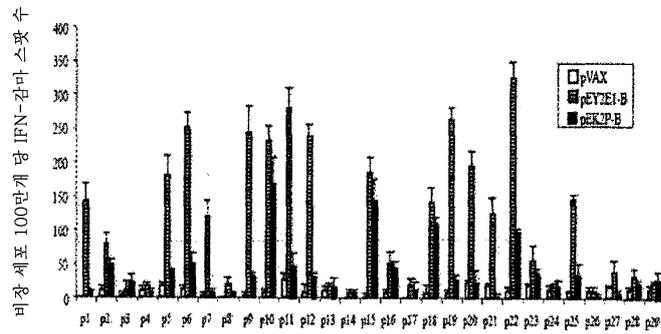
도면5d

패널 D



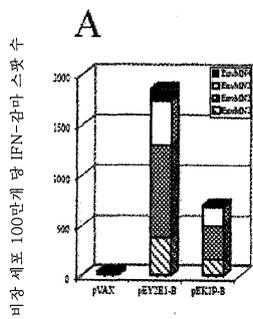
도면5e

패널 E

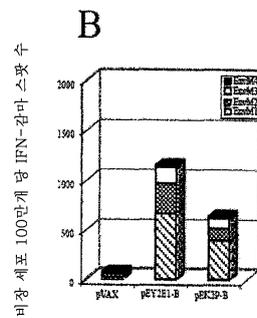


도면6a

패널 A

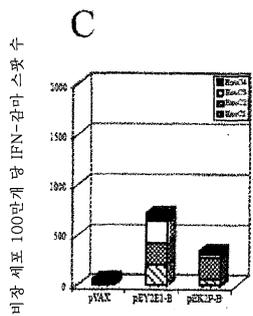


도면6b

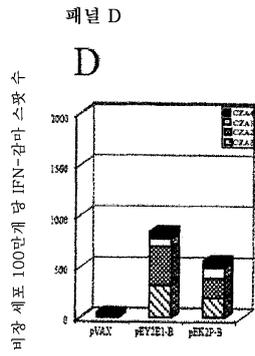


도면6c

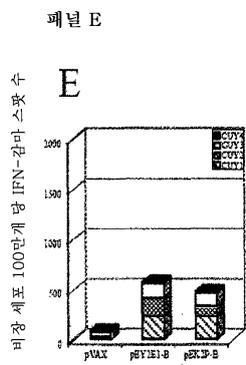
패널 C



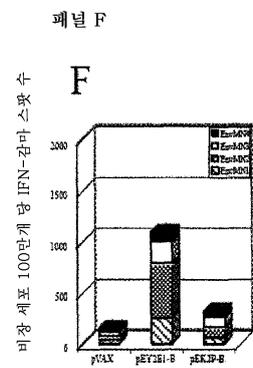
도면6d



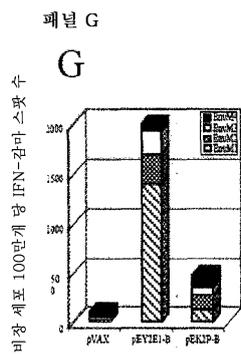
도면6e



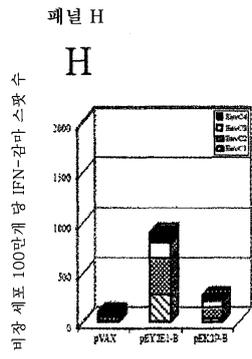
도면6f



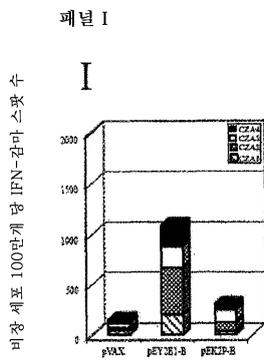
도면6g



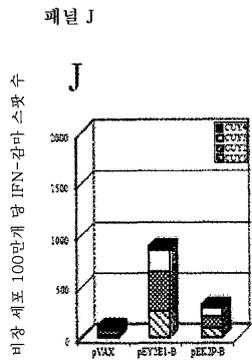
도면6h



도면6i

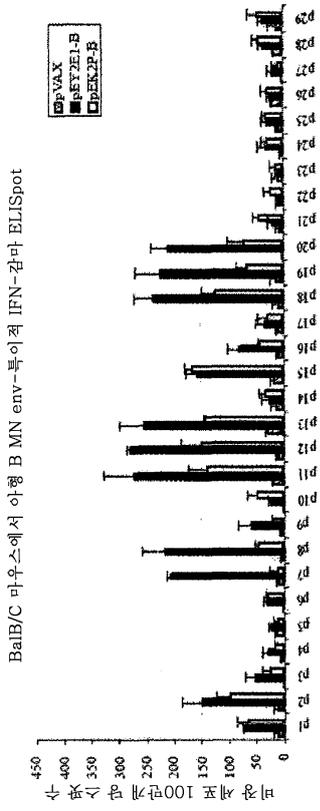


도면6j



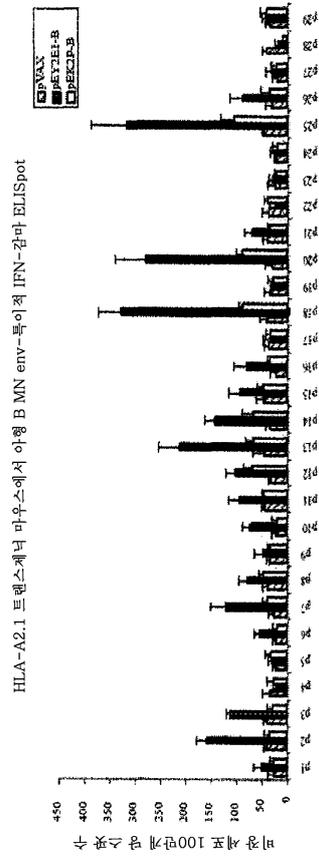
도면7a

패널 A

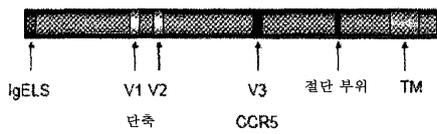


도면7b

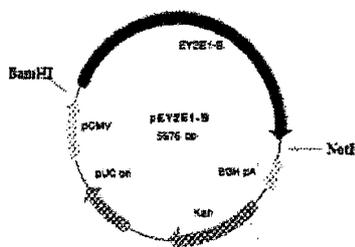
패널 B



도면8



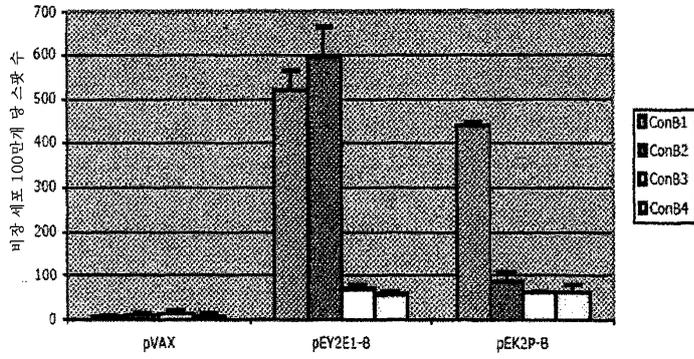
도면9



도면10

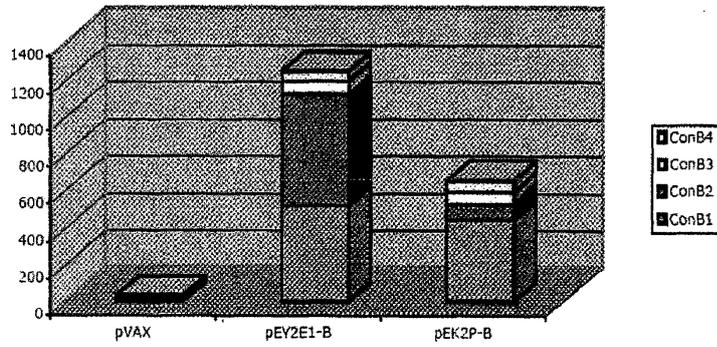
패널 A

아형 B 컨센서스 env-특이적 IFN-감마 ELISpot



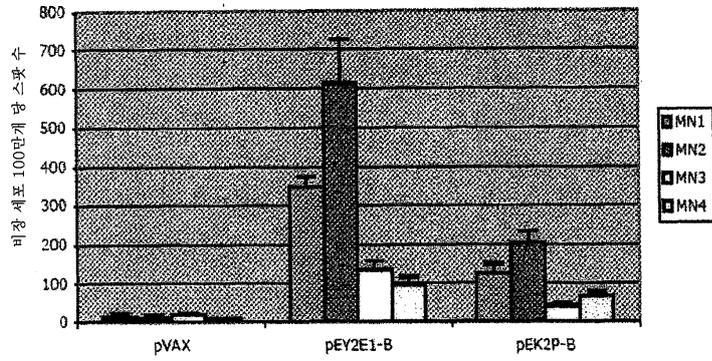
패널 B

아형 B 컨센서스 env-특이적 IFN-감마 ELISpot



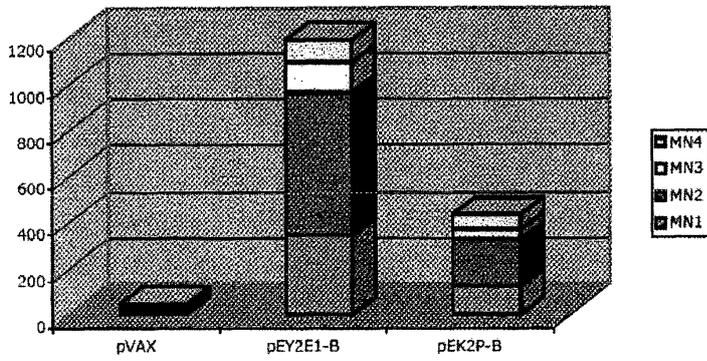
도면11

패널 A 아형 B MN env-특이적 IFN-감마 ELISpot



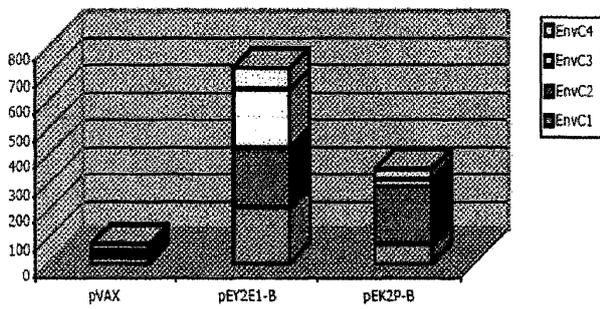
패널 B

아형 B MN env-특이적 IFN-감마 ELISpot



도면12a

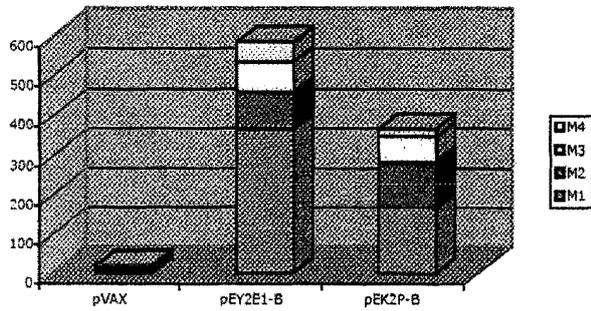
패널 A 아형 C 컨센서스 env-특이적 IFN-감마 ELISpot



도면12b

패널 B

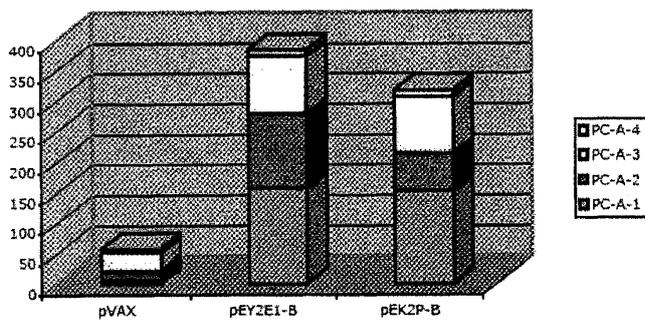
군 M env-특이적 IFN-감마 ELISpot



도면12c

패널 C

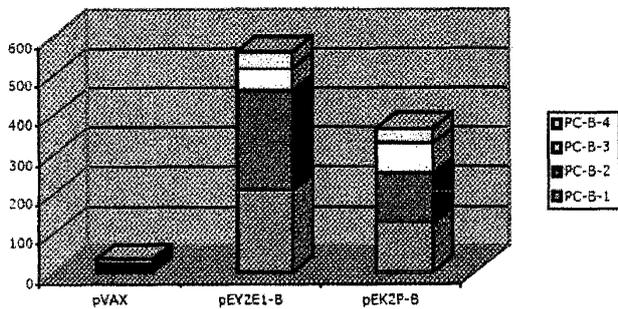
아형 C C1.C.UY.01.TRA3011 env-특이적 IFN-감마 ELISpot



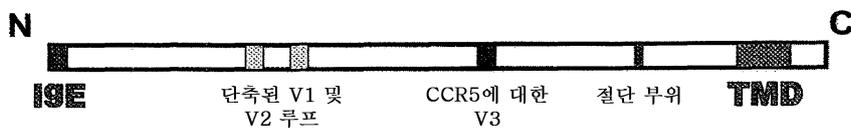
도면12d

패널 D

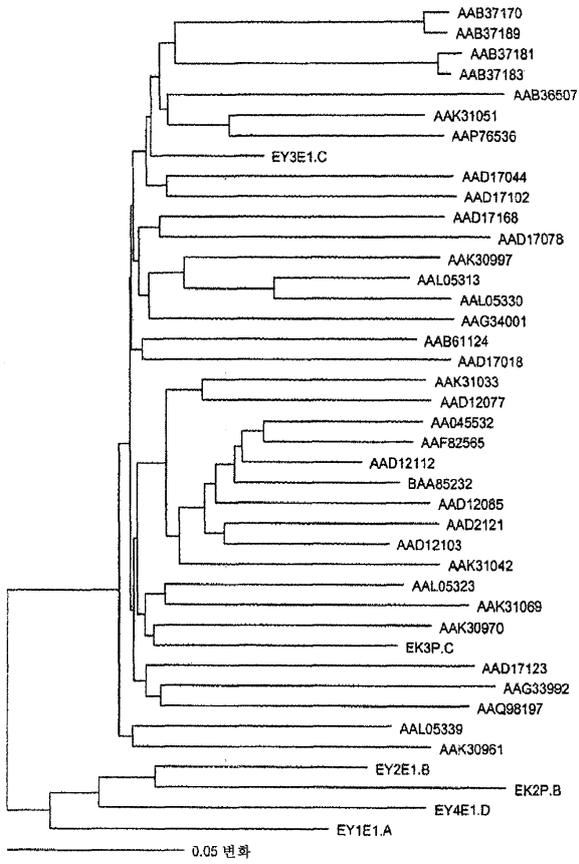
아형 C C.ZA.01.J54Ma env-특이적 IFN-감마 ELISpot



도면13

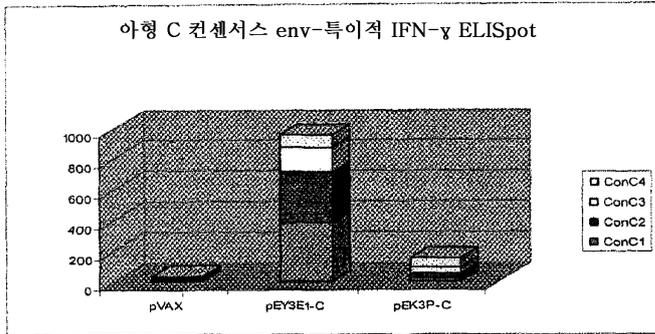


도면14

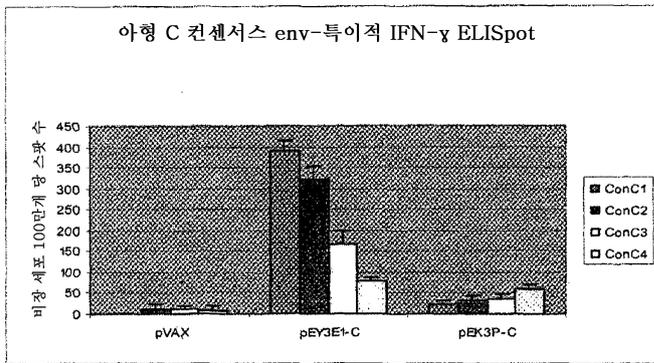


도면15

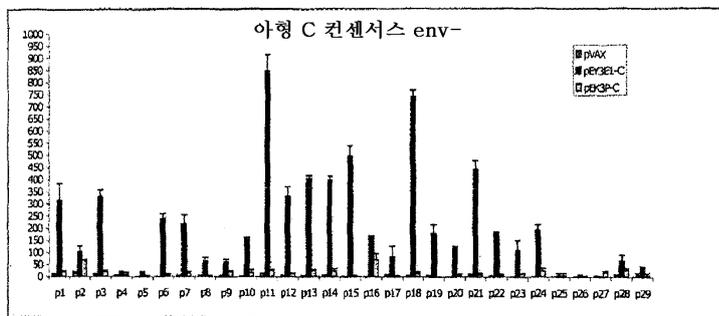
패널 A



패널 B

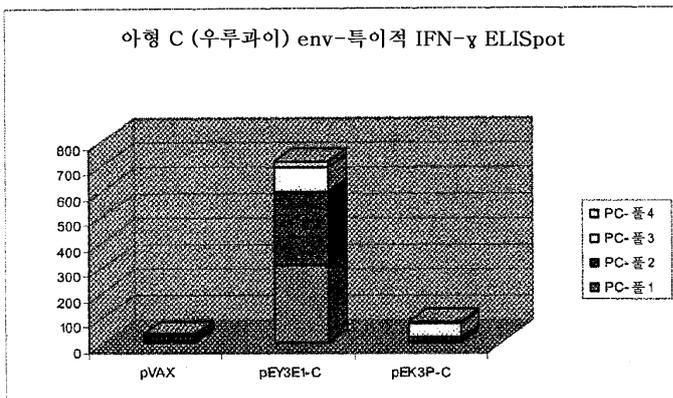


도면16



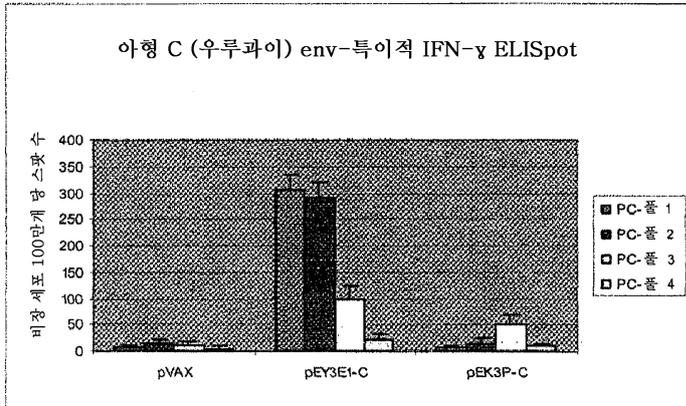
도면17a

패널 A



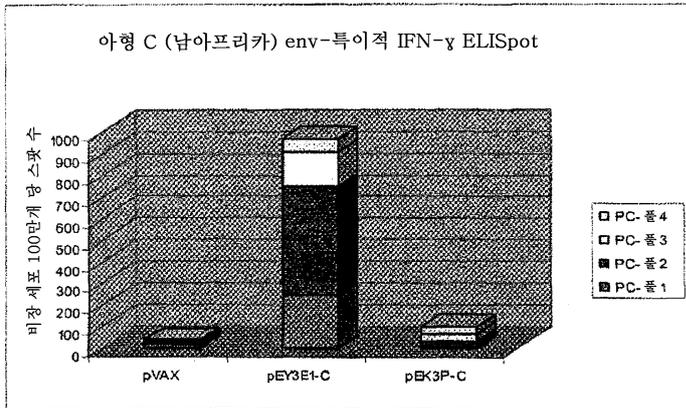
도면17b

패널 B



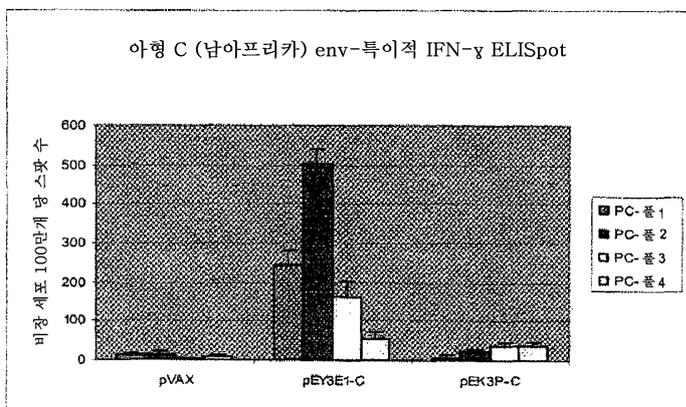
도면17c

패널 C



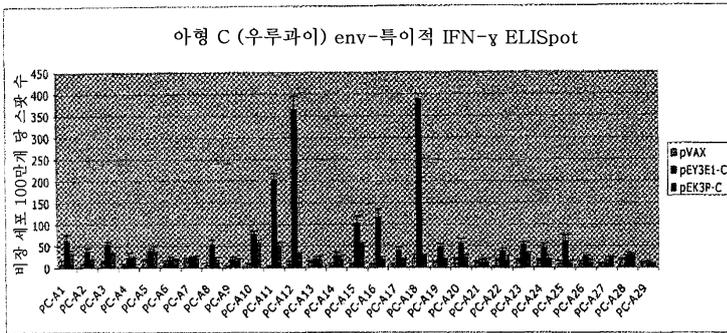
도면17d

패널 D

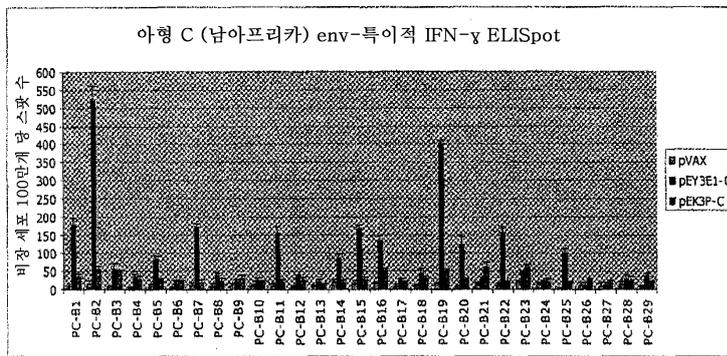


도면18

패널 A

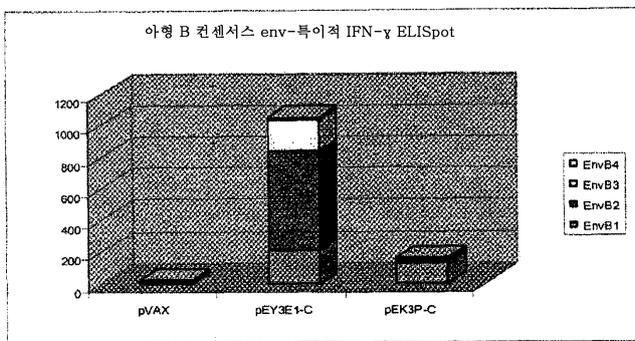


패널 B



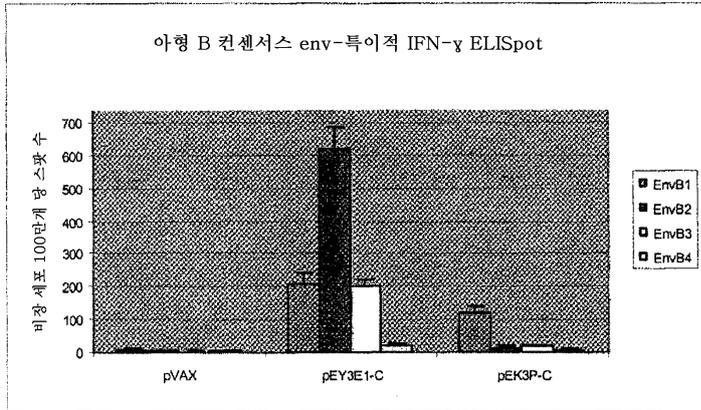
도면19a

패널 A



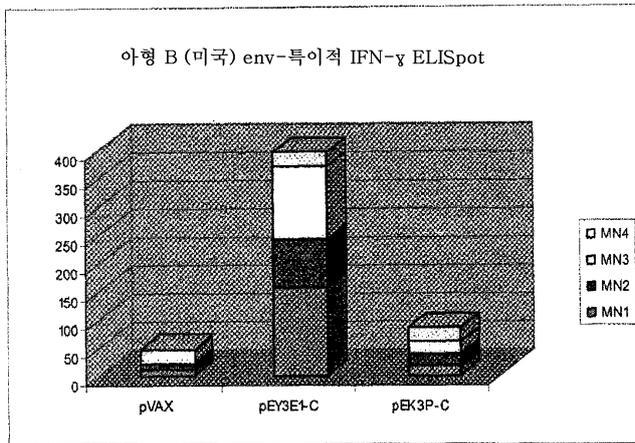
도면19b

패널 B



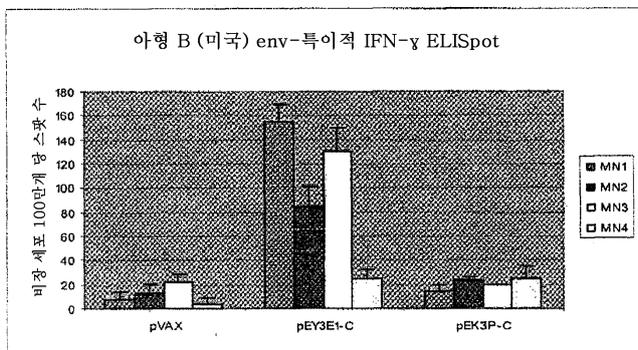
도면19c

패널 C



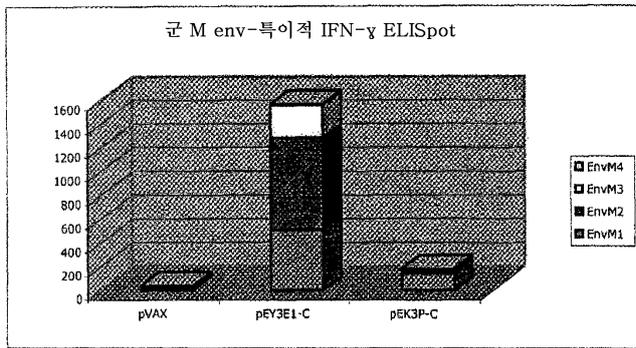
도면19d

패널 D



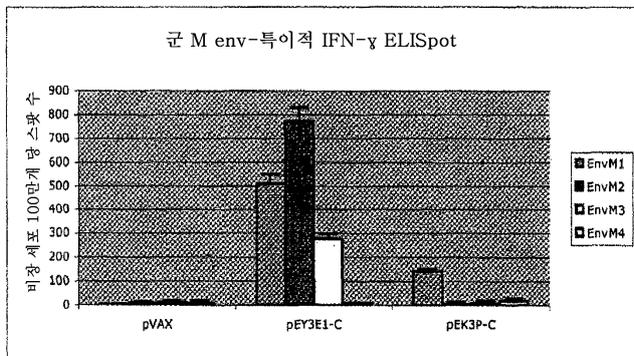
도면19e

패널 E



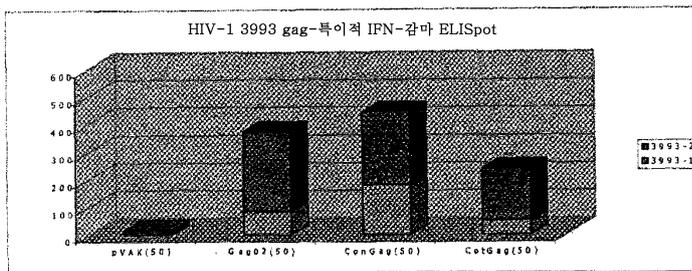
도면19f

패널 F



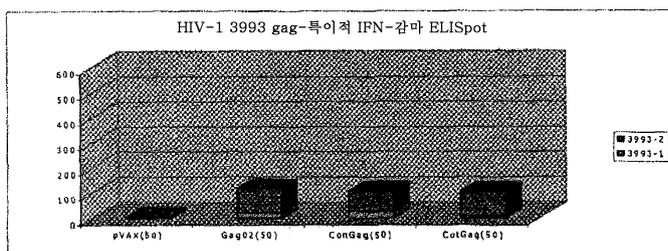
도면20a

패널 A



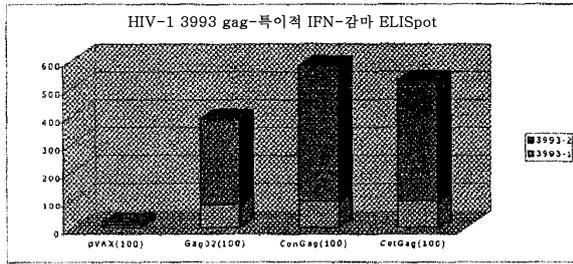
도면20b

패널 B



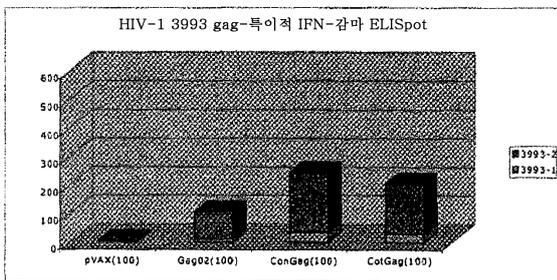
도면20c

패널 C



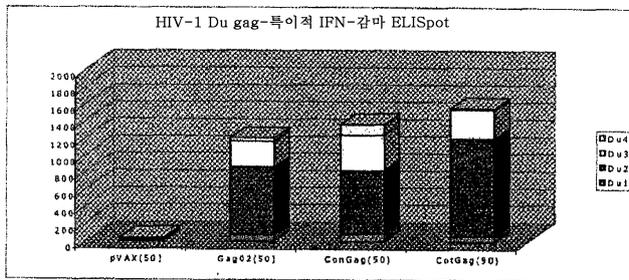
도면20d

패널 D



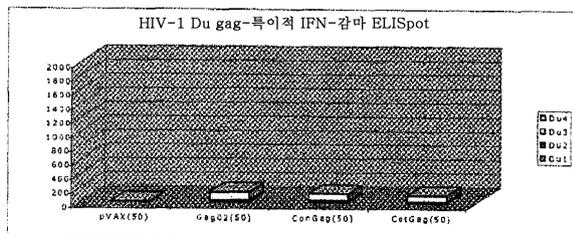
도면20e

패널 E



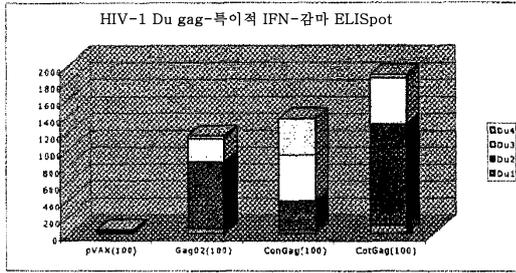
도면20f

패널 F



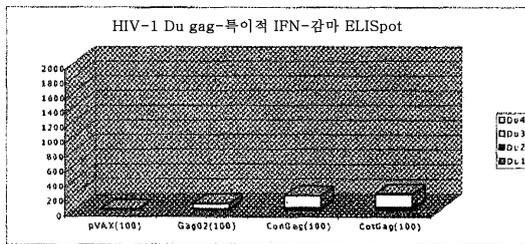
도면20g

패널 G



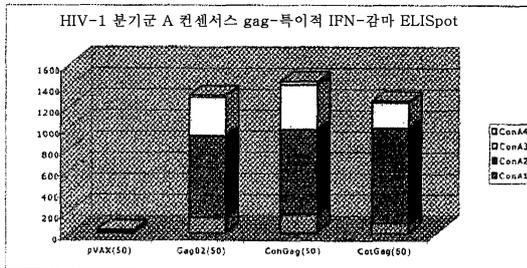
도면20h

패널 H



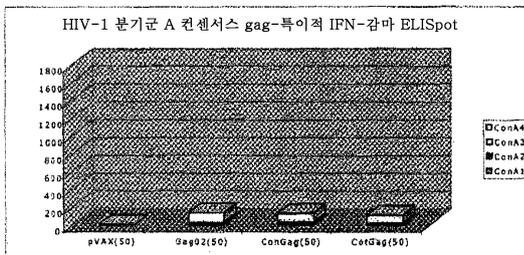
도면20i

패널 I



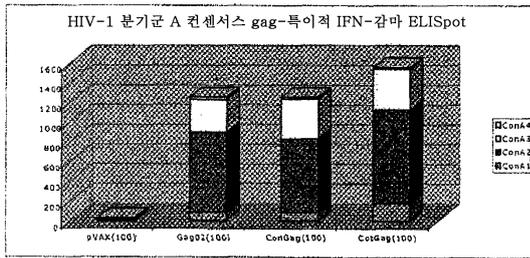
도면20j

패널 J



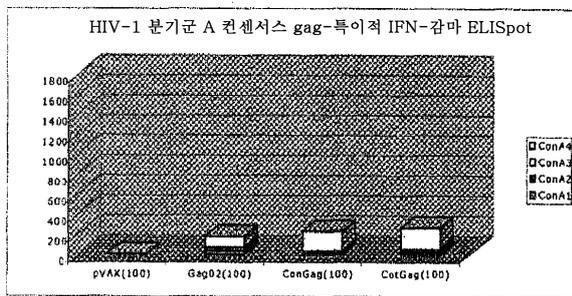
도면20k

패널 K



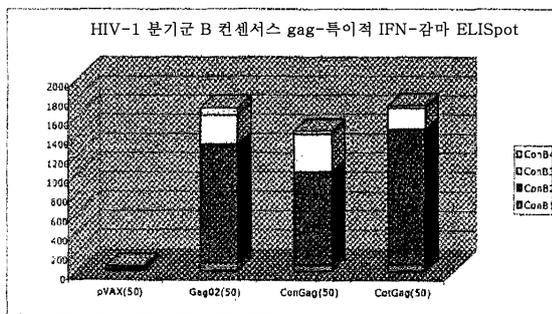
도면20l

패널 L



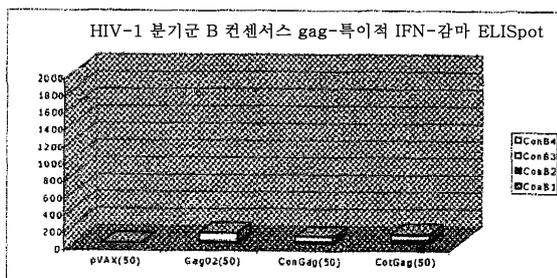
도면20m

패널 M



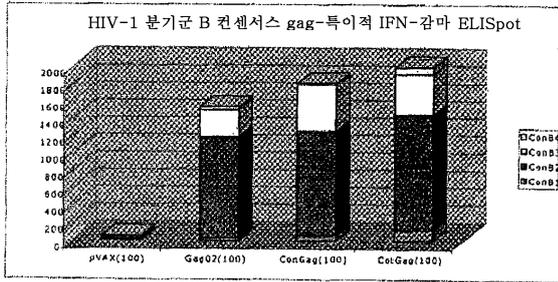
도면20n

패널 N



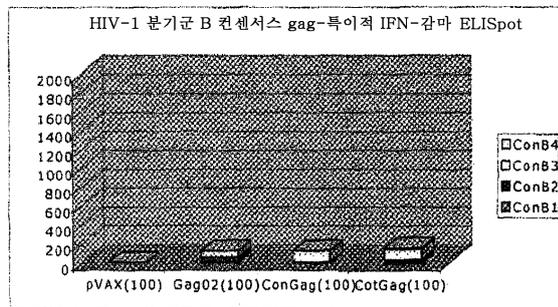
도면20o

패널 O



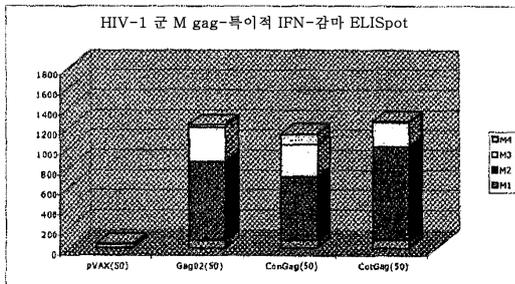
도면20p

패널 P



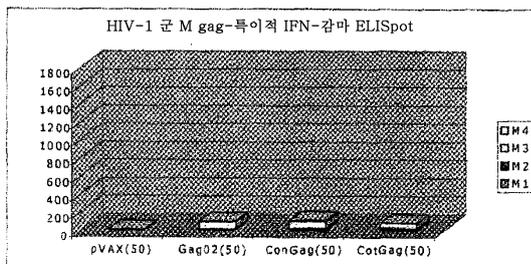
도면20q

패널 Q



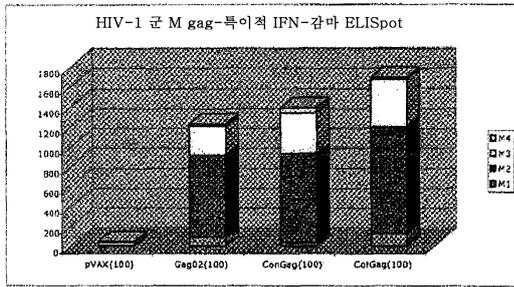
도면20r

패널 R



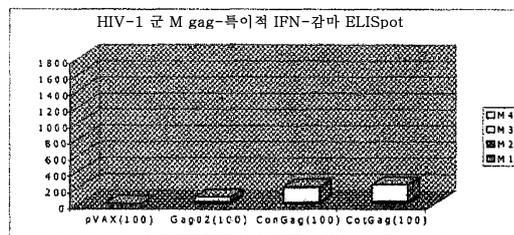
도면20s

패널 S



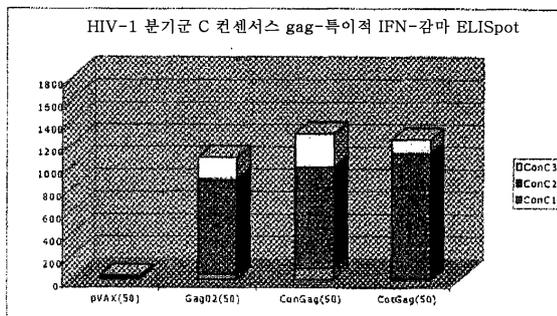
도면20t

패널 T



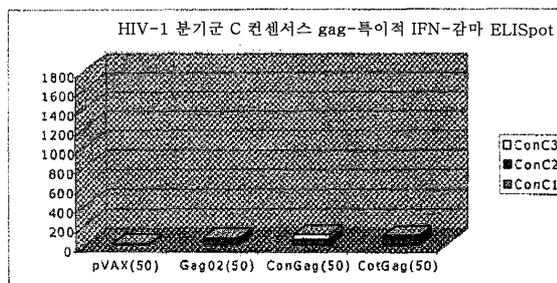
도면20u

패널 U



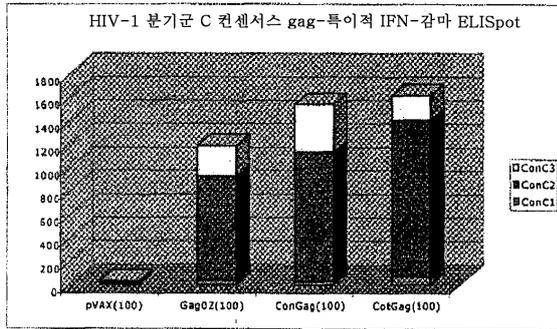
도면20v

패널 V



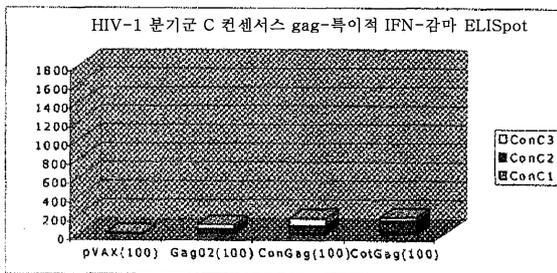
도면20w

패널 W

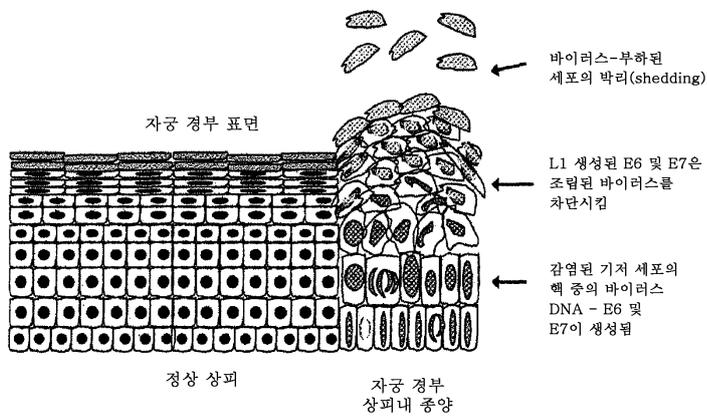


도면20x

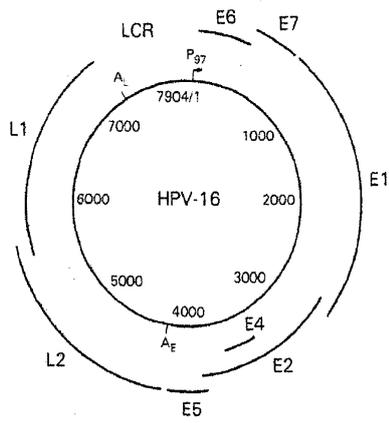
패널 X



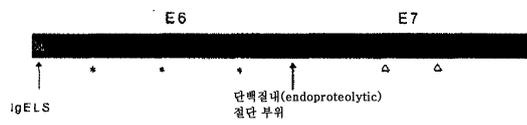
도면21



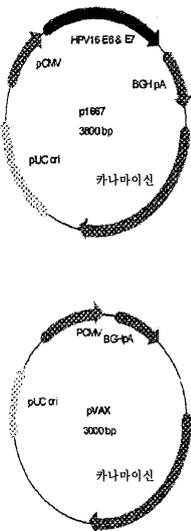
도면22



도면23

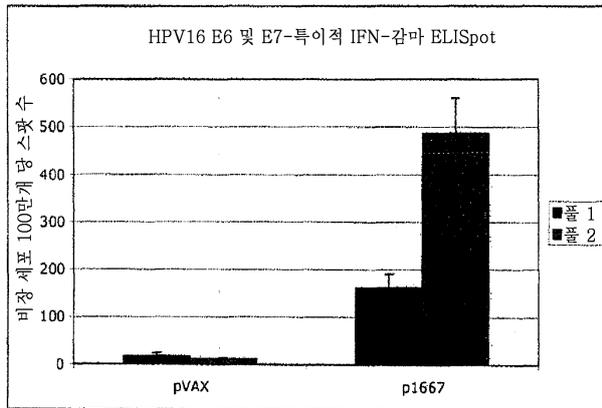


도면24



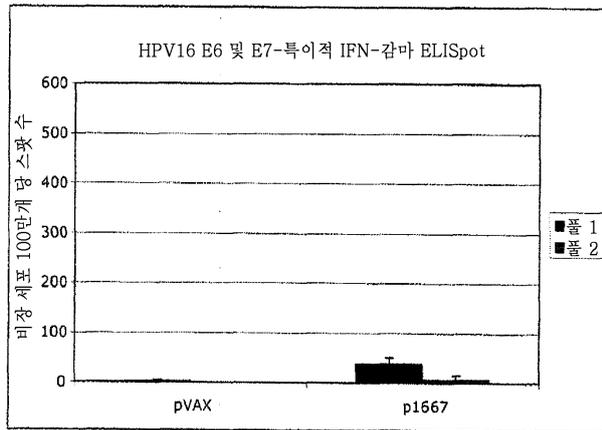
도면25a

패널 A



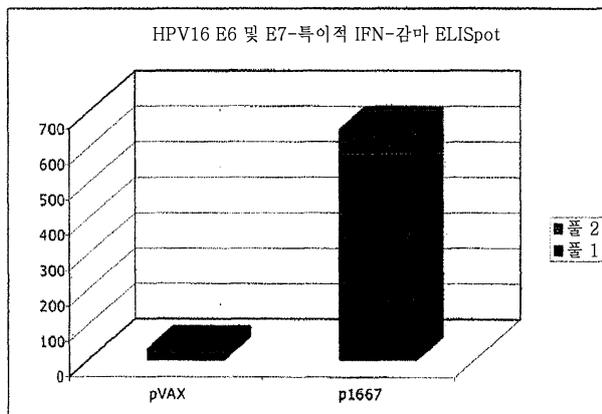
도면25b

패널 B



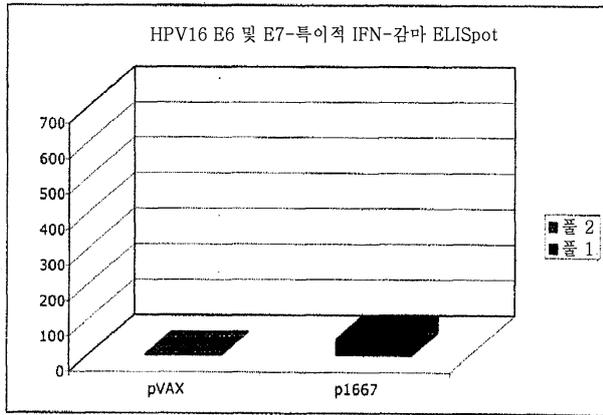
도면25c

패널 C

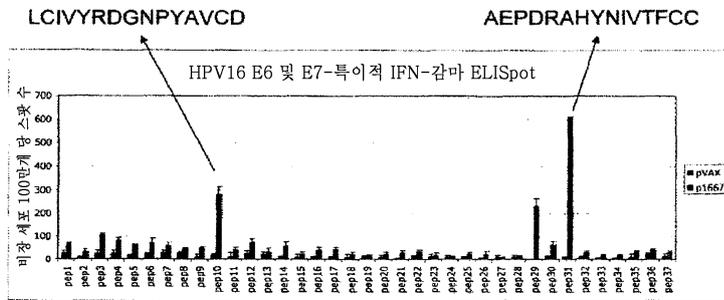


도면25d

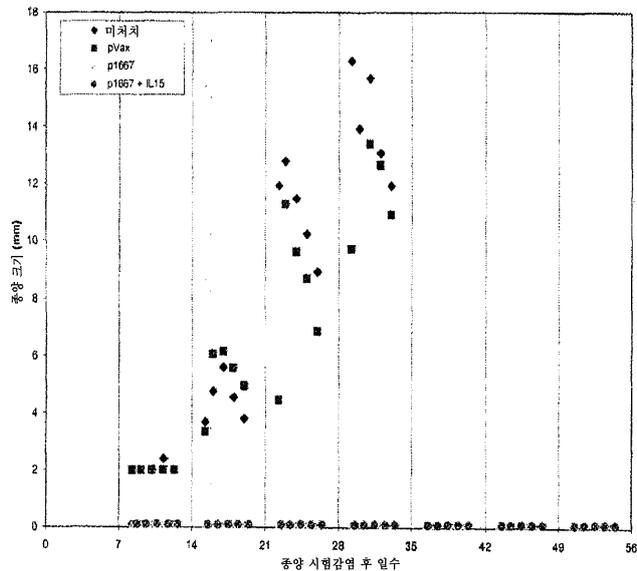
패널 D



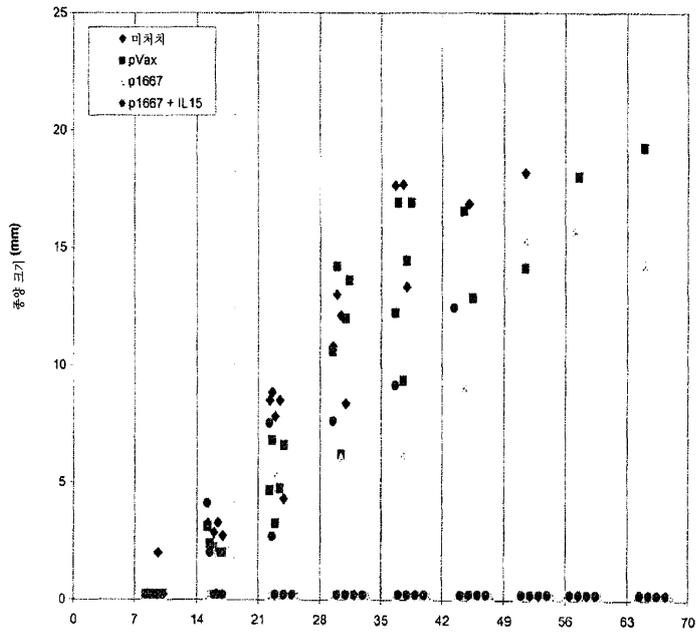
도면26



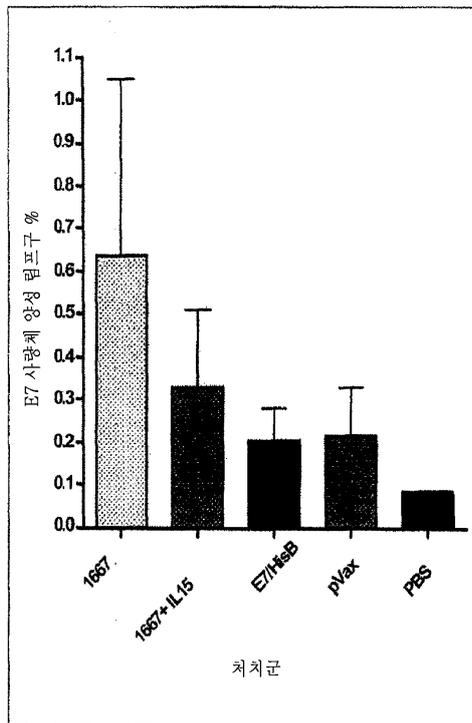
도면27



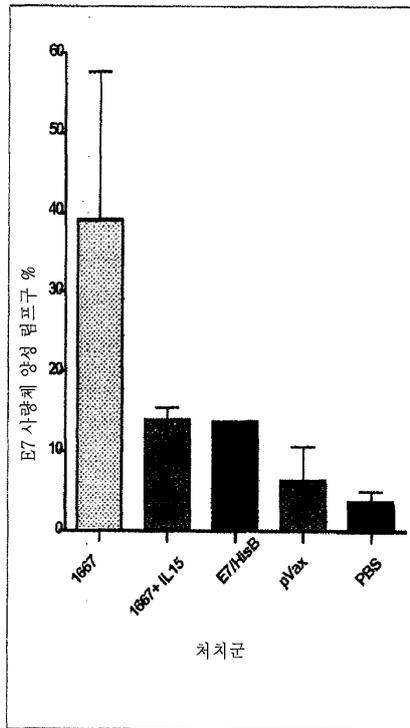
도면28



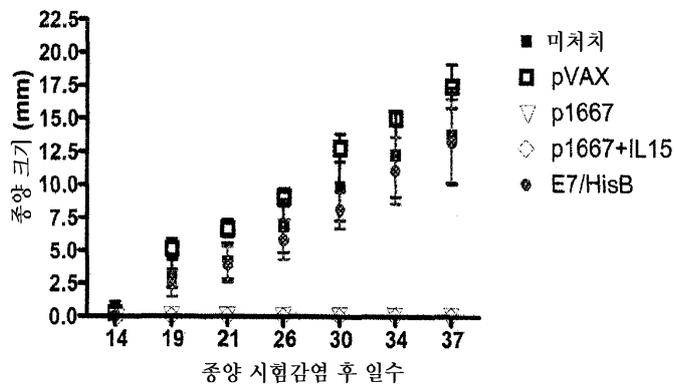
도면29



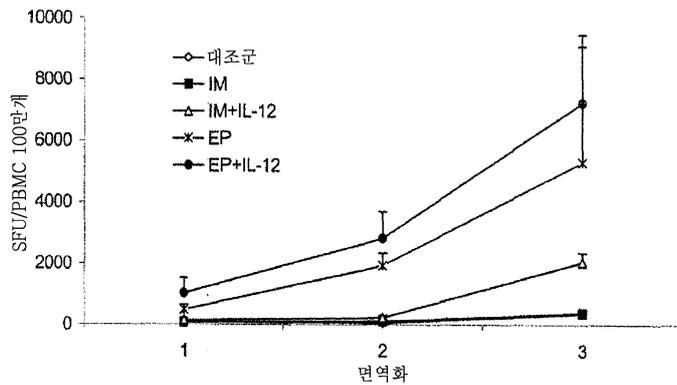
도면30



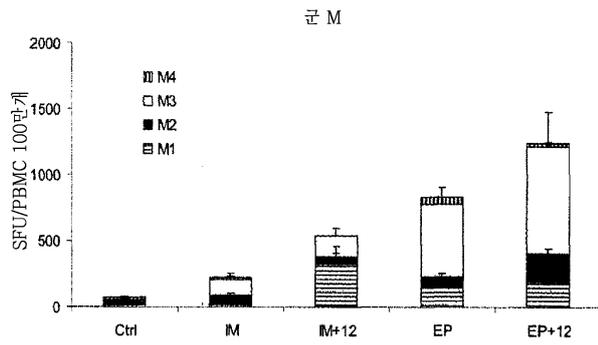
도면31



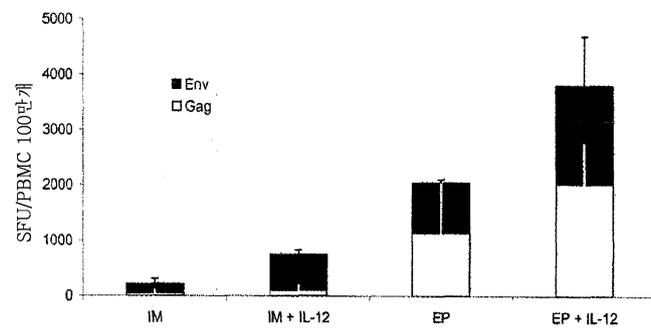
도면32



도면33



도면34



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
 Weiner, David B.
 Yan, Jian

<120> IMPROVED VACCINES AND METHODS FOR USING THE SAME

<130> 133172.01602

<150> US 60/833861

<151> 2006-07-28

<150> US 60/890352

<151> 2007-02-16

<150> US 60/833586

<151> 2006-07-28

<160> 43

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 2142

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype A consensus Envelope DNA sequence construct

<400> 1

```

g gatccatgg actggacctg gattctgttc ctggtggccg ccgccaccag agtgcacagc      60
a gagtgatgg gcatccagcg gaattgccag cacctgtgga gatggggcac catgatcctg     120
g gcatgatca tcatctgctc tgccgccgag aacctgtggg tgaccgtgta ctacggcgtg     180
c ctgtgtgga aggacgccga gaccacctg ttctgcgcca gcgacgcaa ggctacgat      240
a ccgaagtgc acaatgtgtg ggccaccac gcctgcgtgc ctaccgatcc caacccccag     300
g agatcaacc tggagaactg gaccaggag ttcaaatgt ggaagaaca catggtggag      360
c agatgcaca ccgacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccttg cgtgaagctg     420

a cccctctgt gcgtgacct gaactgcagc aacgtgaacg tgaccaccaa catcatgaag     480
g gcgagatca agaactgcag cttcaaatg accaccgagc tgcgggaca gaagcagaaa     540
g tgtacagcc tgttctaca gctggactg gtgcagatca acaagagcaa cagcagcagc     600
c agtaccggc tgatcaactg caacaccagc gccatcacc aggcctgcc caaagtgagc     660
t tcgagccca tccccatca ctactgcgcc cctgccggct tcgccatcct gaagtgcaag     720
g acaaggagt ttaacggcac cggcccctgc aagaatgtga gcaccgtgca gtgcaccac     780
g gcatcaagc ccgtggtgtc caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggaa     840

g tgatgatcc ggagcgagaa catcaccaac aacccaaga acatcatcgt gcagctgacc     900
a agcccgtga agatcaattg caccggccc aacaacaaca cccggaagag catcagaatc     960
g gccctggcc aggccttcta cgccaccggc gacatcatcg gcgatatcag gcaggccac    1020
t gcaatgtga gccggaccga gtggaacgag acctgcaga aagtggcaa gcagctgagg    1080
a agtacttca acaacaagac catcatctt accaacagca gcggcggcag actgagaatc    1140
a ccaccaca gttcaattg tggcggcgag ttcttctact gcaatactc cggcctgttc    1200
a acagcacct ggaacggcaa cggcaccaag aagaagaaca gcaccgagag caacgacacc    1260

a tcaccctgc ctgccggat caagcagatc atcaatatgt ggcagagggt gggccaggcc    1320
a tgtacgcc ctccatcca gggcgtgatc agatgcgaga gcaacatcac cggcctgtg     1380
c tgaccagag atggcggcga caacaacagc aagaacgaga ccttcagacc tggcggcgg     1440
g acatgaggg acaactggcg gagcgagctg tacaagtaca aagtggtaa gatcgagccc    1500
c tggcgctgg cccccacaa ggccaagaga agagtgtgg agcgggagaa gagagctgtg     1560
g gcatcggcg ccgtgttctt gggcttcttg ggagcccgcc gaagcaccat gggagccgcc    1620

```

agcatcacc tgaccgtgca ggccagacag ctgctgagcg gcattgtgca gcagcagagc 1680

aacctgctga gagccatcga ggcccagcag cacctgctga agctgacagt gtggggcatc 1740

aaacagctgc aggcccgcgt gctggccgtg gagagatacc tgaaggacca gcagctgctg 1800

ggcatctggg gctgcagcgg caagctgac tgcaccacca acgtgccctg gaatagcagc 1860

tggagcaaca agagccagag cgagatctgg gacaacatga cctggctgca gtgggacaag 1920

gagatcagca actacaccga tatcatctac aaacctgatc aggagagcca gaaccagcag 1980

gagaagaacg agcaggatct gctggccctg gacaagtggg ccaacctgtg gaactggttc 2040

gacatcagca actggctgtg gtacatcaag atcttcatca tgattgtggg cggcctgatc 2100

ggcctgagaa tcgtgttcgc cgtgctgtct gtgtgactcg ag 2142

<210> 2

<211> 709

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype A consensus Envelope protein sequence construct

<400> 2

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg

20 25 30

Trp Gly Thr Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Ala Ala Glu

35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Asp Ala

50 55 60

Glu Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu

65 70 75 80

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn

85 90 95

Pro Gln Glu Ile Asn Leu Glu Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Met Trp

100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Thr Asp Ile Ile Ser Leu Trp

115 120 125

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

Ser Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile
 625 630 635 640
 Ser Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 645 650 655
 Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala
 660 665 670
 Asn Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys

 675 680 685
 Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe
 690 695 700
 Ala Val Leu Ser Val

705

<210> 3

<211> 2734

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype B consensus Envelope DNA sequence construct

<400> 3

ggatccgcca ccatggactg gacctggatt ctgttcctgg tggccgccgc caccagagtg 60
 cacagcagag tgaagggcat ccggaagaac taccagcacc tgtggagatg gggcaccatg 120

 ctgctgggca tgctgatgat ctgttctgcc gccgagaagc tgtgggtgac cgtgtactac 180
 ggcggtgcctg tgtggaagga ggccaccacc acctgttct gcgccagcga cgccaaggcc 240
 tacgataccg aagtgcacaa tgtgtgggcc acccacgctt gcgtgcctac cgatccaac 300
 cctcaggaag tgggtgctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtgga gaacaacatg 360
 gtggagcaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgctg 420
 aagctgacct ctctgtgctg gacctgaac tgcaccgacc tgagcggcga gaagatggag 480
 aagggcgaga tcaagaactg cagcttcaac atcaccacct ccatccggga caaagtgcag 540

 aaggagtacg ccctgttcta caagetggac gtggtgcca tcgacaacga caacaccagc 600
 taccggctga tcagctgcaa caccagcgtg atcaccagg cctgccccaa agtgagcttc 660
 gagcccatcc ccatcacta ctgcgccct gccggcttcg ccatcctgaa gtgcaacgac 720
 aagaagtcca acggcaccgg cccttgacc aatgtgagca ccgtgcagtg cacccacggc 780
 atcagaccgg tgggtgtccac ccagctgctg ctgaacggca gcctggccga ggaagaagtg 840

gtgatccgga gcgagaattt caccaacaac gccaagacca tcatcgtgca gctgaacgag 900
 agcgtggaga tcaactgcac ccggcccaac aacaatacc ggaagagcat ccacatcggc 960

cctggccagg ctttctacac caccggcgag atcatcggcg atatcaggca ggcccactgc 1020
 aatatcagcc gggccaagtg gaacaacacc ctgaagcaga tcgtgaagaa gctgcgggag 1080
 cagttcgga acaagaccat cgtgttcaac cagagcagcg gcggcagacc tagaatcgtg 1140
 atgcacagct tcaactgtgg cggcgagttc ttctactgca acacaacca gctgttcaac 1200
 agcacctgga acgtgaacgg gacctggaac aacaacaccg agggcaacga caccatcacc 1260
 ctgccctgcc ggatcaagca gatcatcaat atgtggcagg aggtgggcaa ggccatgtac 1320
 gccctccca tcagaggcca gatccggtgc agcagcaata tcaccggcct gctgctgacc 1380

agagatggcg gcaacaataa caccaacgag accgagatct ttagacctgg cggcggagac 1440
 atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tgggaagat cgagcccctg 1500
 ggcgtggccc ccaccaaggc caagagaaga gtggtgcagc gggagaagag agctgtgggc 1560
 atcggcgcca tgtttctggg ctttctggga gccgccggaa gcaccatggg agccgccage 1620
 atgacctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca gcagaacaac 1680
 ctgctgagag ccatcgaggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg gggcatcaag 1740
 cagctgcagg cccgcgtgct ggccgtggag agatacctga aggaccagca gctgctggga 1800

atctgggct gcagcggcaa gctgatctgc accaccaccg tgcctggaa gccagctgg 1860
 agcaacaaga gcctggacga gatctgggac aacatgacct ggatggagtg ggagcgggag 1920
 atcgacaact acaccagcct gatctacacc ctgatcgagg agagccagaa ccagcaggag 1980
 aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa ctggttcgac 2040
 atcaccaact ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtggcgg cctgatcggc 2100
 ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcatc taccctacg acgtgccca ttacgcctga 2160
 gaattcgtaa gtaagtgtca tatgggagag ctcgactaga ctggacagcc aatgacgggt 2220

aagagagtga catttctcac taacctaga caggagggcc gtcaaagcta ctgcctaate 2280
 caatgacggg taatagtac aagaaatgta tcaactcaac ctaagacagg cgcagcctcc 2340
 gagggatgtg tctttgttt tttataatta aaaagggtga catgtccgga gccgtgctgc 2400
 ccgatgatg tcttggcctc tgtttgctac cggtatcgat gttaacgtcg acccgggct 2460
 cgaggtaagt aagtgtcata tgggagagct cgactagact ggacagccaa tgacgggtaa 2520
 gagagtgaca tttctacta acctaaagaca ggaggccgt caaagctact gcctaatecca 2580

atgacgggta atagtgacaa gaaatgtatc actccaacct aagacaggcg cagcctccga 2640

gggatgtgtc tttgttttt tataattaaa aagggtgaca tgtccggagc cgtgctgccc 2700

ggatgatgtc ttggcctctg tttgctgceg ccgc 2734

<210> 4

<211> 715

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype B consensus Envelope protein sequence construct

<400> 4

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg

20 25 30

Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu

35 40 45

Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala

50 55 60

Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu

65 70 75 80

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn

85 90 95

Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp

100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp

115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr

130 135 140

Leu Asn Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile

145 150 155 160

Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln

165 170 175

Lys Glu Tyr Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn
 180 185 190
 Asp Asn Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr
 195 200 205
 Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys
 210 215 220

 Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys Phe Asn
 225 230 235 240
 Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly
 245 250 255
 Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala
 260 265 270
 Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Thr Asn Asn Ala Lys
 275 280 285

 Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg
 290 295 300
 Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Gln Ala
 305 310 315 320
 Phe Tyr Thr Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys
 325 330 335
 Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Val Lys
 340 345 350

 Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser
 355 360 365
 Ser Gly Gly Arg Pro Arg Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly
 370 375 380
 Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn
 385 390 395 400
 Val Asn Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr
 405 410 415

 Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly

Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile
 675 680 685
 Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu
 690 695 700
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 705 710 715

<210> 5

<211> 2140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype C consensus Envelope DNA sequence construct

<400> 5

ggatccgcca ccatggattg gacctggatt ctgttcctgg tggccgccgc cacaagagtg 60

cacagcagag tgcggggcat cctgagaaat tgccagcagt ggtggatctg gggcattctg 120

gggttctgga tgctgatgat ctgcaacgtg atgggcaacc tgtgggtgac cgtgtactac 180

ggcgtgcctg tgtggaagga ggccaagacc acctgttct gtgccagcga tgccaaggcc 240

tacgagaccg aggtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gtgtgccac cgatcccaac 300

cctcaggaga tgggtgctga gaacgtgacc gagaacttca acatgtgaa gaacgacatg 360

gtggaccaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgcgtg 420

aagctgacce ctctgtgcgt gacctgaac tgccggaaca acgtgaacaa caacaacacc 480

atgaaggagg agatcaagaa ctgcagcttc aacatcacca ccgagctgcg ggacaagaag 540

cagaaggtgt acgccctgtt ctaccggctg gacatcgtgc ccctgaacga gaagaacaac 600

agcaacgact accggctgat caactgcaac accagcgcca tcaccaggc ctgtccaag 660

gtgtccttcg accccatccc catccactat tgtgccctg ccggctacgc catcctgaag 720

tgaacaaca agaccttcaa cggcaccggc ccctgcaata atgtgagcac cgtgcagtgt 780

accacggca tcaagcctgt ggtgtccacc cagctgctgc tgaatggcag cctggccgag 840

gaggagatta tcatccggag cgagaacctg accaacaacg ccaagaccat cattgtgcac 900

ctgaatgaga gcgtggagat cgtgtgtacc cggcccaaca acaataccg gaagagcatc 960

agaatcggcc ctggccagac cttttacgcc accggcgaca tcatcggcga tatcaggcag 1020

gcccactgca atatcagcga ggagaagtgg aacaagacc tgcagcgggt gtccgagaag 1080

ctgaaggagc acttcccaaa taagaccatc aagtctgccc ctagcagcgg cggcagactg 1140

gagatcacca cccacagctt caactgcagg ggcgagtct tctactgcaa taccagcaag 1200

ctgttcaaca gcacctacat gcccaacagc accaacaata ccaacaccac catcacctg 1260
 ccctgccgga tcaagcagat catcaatatg tggcaggaag tgggcagagc catgtacgcc 1320

ctcctccatcg agggcaacat cacctgcaag tccaacatca ccggcctgct getgacaaga 1380
 gatggcggca agaacgacac caatgacacc gagaccttca gacctggcgg cggagacatg 1440
 agggacaact ggcgagcga gctgtacaag tacaaggtgg tggagatcaa gcctctgggc 1500
 gtggccccta ccaaggccaa gaggagagtg gtggagaggg agaagagagc cgtgggcatc 1560
 ggcgccgtgt ttctgggctt tctgggagcc gccggatcta caatgggagc cgccagcatc 1620
 aactgaccg tgcaggccag acagctgctg agcggcatcg tgcagcagca gagcaatctg 1680
 ctgagagcca tcgaggccca gcagcacatg ctgcagctga cagtgtgggg catcaagcag 1740

ctgcagacca gagtgtggc catcgagcgc tacctgaagg atcagcagct gctgggcatc 1800
 tgggctgta gggcaagct gatctgtacc accgccgtgc cttggaatag cagctggagc 1860
 aacaagacc agggagacat ctgggacaac atgacctgga tgcagtggga cgggagatc 1920
 agcaactaca ccgacacat ctacaggctg ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag 1980
 aacgagaagg acctgctggc cctggacagc tggaagaacc tgtggaactg gttcgacatc 2040
 accaactggc tigtgtacat caagatcttc atcatgattg tgggcggcct gatcggcctg 2100
 agaatcatct tcgccgtgct gagcatctga tagcggccgc 2140

<210> 6

<211> 705

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype C consensus Envelope protein sequence construct

<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile

20 25 30

Trp Gly Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly

35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala

50 55 60

Lys Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Glu Thr Glu

Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 325 330 335

Ala His Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg
 340 345 350

Val Ser Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe
 355 360 365

Ala Pro Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn
 370 375 380

Cys Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser
 385 390 395 400

Thr Tyr Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu
 405 410 415

Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg
 420 425 430

Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn
 435 440 445

Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn
 450 455 460

Asp Thr Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp
 465 470 475 480

Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly
 485 490 495

Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg
 500 505 510

Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
 515 520 525

Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 530 535 540

Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 545 550 555 560

Glu Ala Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln

565 570 575
 Leu Gln Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 580 585 590
 Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala
 595 600 605
 Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Glu Asp Ile Trp
 610 615 620

Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser Asn Tyr Thr
 625 630 635 640
 Asp Thr Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 645 650 655
 Asn Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn
 660 665 670
 Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met
 675 680 685

Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Ile Phe Ala Val Leu Ser
 690 695 700

Ile

705

<210> 7

<211> 2089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype D consensus Envelope DNA sequence construct

<400> 7

gggcatcaag cggaattacc agcacctgtg gaagtggggc accatgctgc tgggcatgct 60
 gatgacctgc agcgtggccg agaacctgtg ggtgacctg tactacggcg tgctgtgtg 120
 gaaggaagcc accaccacc tgttctgcgc cagcgatgcc aagagctaca agaccgaggc 180

 ccacaatc tgggccacc acgcctgcgt gcctaccgat cccaaccctc aggagatcga 240
 gctggagaac gtgaccgaga acttcaacat gtggaagaac aacatggtgg agcagatgca 300
 cgaggacatc atcagcctgt gggaccagag cctgaagcct tgcgtgaagc tgaccctct 360
 gtgctgacc ctgaactgca cgcacggcat gaggaacgac accaacgata ccaacgtgac 420

catggaggag ggcgagatga agaactgcag cttcaacatc accaccgaag tgcgggacaa 480
 gaagaagcag gtgcacgccc tgttctacaa gctggactgt gtgccatcg acgacaacia 540
 caccaacaac agcaactacc ggctgatcaa ctgcaacacc agcgccatca cccaggcctg 600

 ccccaaagtg accttcgagc ccatcccat ccaactactgc gccctgccg gcttcgcat 660
 cctgaagtgc aaggataaga agttcaacgg caccggcccc tgcaagaatg tgagaccct 720
 gcagtgcacc cacggcatca gaccctgggt gtccaccag ctgctgctga acggcagcct 780
 ggccgaggag gagatcatca tccggagcga gaacctgacc aacaacgcca agatcatcat 840
 tgtgcagctg aacgagagcg tgaccatcaa ttgcaccgg ccctacaaca ataccggaa 900
 gcgcatcccc atcggcctgg gccaggcctt ctacaccacc agaggcatca tcggcgacat 960
 cagacaggcc cactgcaata tcagcggagc cgagtggaat aagaccctgc agcaggtggc 1020

 caagaagctg ggcgacctgc tgaacaagac caccatcadc ttcaagccta gcagcggcgg 1080
 cagacctaga atcaccacc acagcttcaa ttgtggcggc gaggcttctt actgcaatac 1140
 cagccggctg ttcaacagca cctggagcaa gaacagcacc agcaactcca ccaaggagaa 1200
 caacaccate acctgcctt gccggatcaa gcagatcadc aatatgtggc agggagtggg 1260
 caaggccatg taccccctc ccatcgaggg cctgatcaag tgcagcagca acatcaccgg 1320
 cctgctgctg accagagatg gcggagccaa caactccac aacgagacct tcagacctgg 1380
 cggcggagac atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat 1440

 cgagcccctg ggcgtggccc ccaccagagc caagagaaga gtggtggagc gggagaagag 1500
 agccatcgga ctgggcgcca tgttctctggg ctctctggga gccgccgga gcacatggg 1560
 agcccagc ctgacctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca 1620
 gcagaacaac ctgctgagag ccattgagc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg 1680
 gggcattaag cagctgcagg ccaggattct ggccgtggag cgctacctga aggatcagca 1740
 gctgctggga atctggggct gcagcggcaa gcacatctgc accaccaccg tgccttggaa 1800
 tagcagctgg agcaacaaga gcctggacga gatctggaac aacatgacct ggatggagtg 1860

 ggagagggag atcgacaact acaccgcct gatctacagc ctgatcgagg agagccagac 1920
 ccagcaggag aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gccttggaa 1980
 ctggttcagc atcaccagt ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtggcgg 2040
 cctgatcggc ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcctg tgactcgag 2089

<210> 8

<211> 714

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype D consensus Envelope protein sequence construct

<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15
His Ser Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys

 20 25 30
Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu

 35 40 45
Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala

 50 55 60
Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ser Tyr Lys Thr Glu

65 70 75 80
Ala His Asn Ile Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn

 85 90 95
Pro Gln Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp

 100 105 110
Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp

 115 120 125
Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr

 130 135 140
Leu Asn Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val

145 150 155 160
Thr Met Glu Glu Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr

 165 170 175
Glu Val Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu

 180 185 190
Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn Asn Thr Asn Asn Ser Asn Tyr Arg

 195 200 205
Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val

210 215 220

465 470 475 480
 Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys
 500 505 510
 Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Ile Gly Leu Gly Ala Met

 515 520 525
 Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 530 535 540
 Leu Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
 545 550 555 560
 Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
 565 570 575
 Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala

 580 585 590
 Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
 595 600 605
 Ser Gly Lys His Ile Cys Thr Thr Thr Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp
 610 615 620
 Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
 625 630 635 640
 Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Ser Leu Ile

 645 650 655
 Glu Glu Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
 660 665 670
 Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Ser Ile Thr Gln Trp
 675 680 685
 Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly
 690 695 700
 Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
 705 710

<210> 9

<211> 1049

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype B consensus Nef-Rev DNA sequence construct

<400> 9

```

ggatccgcca ccatggactg gacctggatt ctgttcctgg tggccgctgc caccagagtg      60
cacagcagca agagaagcgt ggtgggttgg cctacagtgc gggagaggat gagaagagcc      120
gagcctgccg ccgatggagt gggcgccgtg tctagagatc tggagaagca cggcgccatc      180
accagcagca ataccgccgc caacaatgcc gactgcgctt ggctggaggc ccaggaggag      240
gaggaagtgg gcttcctgtg gagagcccag gtggccctga gagccatgac ctacaaggcc      300

gccgtggatc tgagccactt cctgaaggag aaggcgccgc tggagggcct gatctacagc      360
cagaagcggc aggacatcct ggatctgtgg gtgtaccaca cccagggcta cttccccgac      420
tggcagaatt acacccctgg ccctggcatc agatacctc tgaccttcgg ctggtgcttc      480
aagctggtgc ctgtggagcc tgagaaagtg gaggaggcca acgagggcga gaacaattct      540
gccgcccacc ctatgagcct gcacggcatg gacgatcccg agagggaaagt gctggtgtgg      600
aagttcgaca gcaggttggc cttccaccac atggccagag agctgcaccc cgagtactac      660
aaggactgcc ggggcaggaa gagaagaagc gccggcagaa gcggcgacag cgacgaggag      720

ctgctgaaaa cagtgcggct gatcaagttc ctgtaccaga gcaacctcc tcccagcccc      780
gagggcacca gacaggcccc gagaaaccgg aggaggcggg ggagagagag gcagcggcag      840
atcagaagca tcagcgagtg gattctgagc acctacctgg gcagaccgcg cgagcccgtg      900
ccctgcagc  tccccccct ggagagactg acctggact gcaacgagga ctgcggcacc      960
agcggcacc  agggagtggg cagccccag atcctggtgg agagccctgc cgtgctggag      1020
agcggcacca aggagtgatg agcggccgc      1049
    
```

<210> 10

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype B consensus Nef-Rev protein sequence construct

<400> 10

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

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

gtgtccatcc tggatatcag gcagggcccc aaggagccct tcagagacta cgtggaccgg 960

ttcttcaaga ccttgagagc cgagcaggcc agccaggacg tgaagaactg gatgaccgag 1020

acctgtctgg tgcagaacgc caaccccgac tgtaagacca tcttgagagc cctgggccct 1080

ggcgccacc tggaggagat gatgaccgcc tgccaggagag tgggcggacc cggccacaag 1140

gccagagtgc tggccgaggc catgagccag gccaccaaca gcaacatcat gatgcagcgg 1200

ggcaacttca gaggccccag gaggatcgtg aagtgttca actgtggcaa ggaggccac 1260

atcgccagaa actgtagggc cccaggaag aagggtgct ggaagtgtgg caaagagggg 1320

caccagatga aggactgtac cgagcggcag gccaatttcc tggggaagat ctggcccagc 1380

cacaaggca gacccggcaa tttctgcag agcagacctg agcccaccgc cctcccgc 1440

gagagcttcg gcttcggcga ggagatcacc ccagcccca agcaggagcc caaggacaga 1500

gagctgtacc ctctggccag cctgaagagc ctgttcggca acgatccct gagccagtac 1560

ccctacgacg tgcccgatta cgcctgagaa ttcgtaagta agtgtcatat gggagagctc 1620

gactagactg gacagccaat gacgggtaag agagtgacat ttctactaa cctaagacag 1680

gagggccgctc aaagctactg cctaatacaa tgacgggtaa tagtgacaag aatgtatca 1740

ctccaaccta agacaggcgc agcctccgag ggatgtgtct tttgtttttt ataattaa 1800

agggtgacat gtccggagcc gtgctgcccg gatgatgtct tggcctctgt ttgctcggc 1860

cgc 1863

<210> 12

<211> 524

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gag consensus protein sequence of subtype A, B, C and D construct

<400> 12

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala

20 25 30

Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu

35 40 45

Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn

50 55 60

<400> 13
 gtcgctccgc tagcttggg gtcacagtct attatggggt acc 43

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgE Primer Sequence 2
 <400> 14
 ggtcggatcc ttactccacc actctccttt ttgcc 35

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgE leader sequence
 <400> 15
 Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15
 His

<210> 16
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype A consensus Envelope protein sequence
 <400> 16
 Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg Trp
 1 5 10 15
 Gly Thr Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Ala Ala Glu Asn
 20 25 30
 Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Asp Ala Glu
 35 40 45
 Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val

Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala

305 310 315 320

His Cys Asn Val Ser Arg Thr Glu Trp Asn Glu Thr Leu Gln Lys Val

 325 330 335

Ala Lys Gln Leu Arg Lys Tyr Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Thr

 340 345 350

Asn Ser Ser Gly Gly Arg Leu Arg Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys

 355 360 365

Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser Thr

 370 375 380

Trp Asn Gly Asn Gly Thr Lys Lys Lys Asn Ser Thr Glu Ser Asn Asp

385 390 395 400

Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln

 405 410 415

Arg Val Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gln Gly Val Ile Arg

 420 425 430

Cys Glu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asp

 435 440 445

Asn Asn Ser Lys Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg

 450 455 460

Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu

465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg

 485 490 495

Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly

 500 505 510

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln

 515 520 525

Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu

 530 535 540

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Lys Leu Thr Val Trp Gly

545 550 555 560
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys

 565 570 575
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys

 580 585 590
 Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Ser

 595 600 605
 Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile Ser

 610 615 620
 Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln

625 630 635 640
 Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala Asn

 645 650 655
 Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile

 660 665 670
 Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala

 675 680 685
 Val Leu Ser Val

690

<210> 17

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype B consensus Envelope protein sequence

<400> 17

Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly
 1 5 10 15

Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Lys Leu
 20 25 30

Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr
 35 40 45

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

 Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
 115 120 125
 Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn
 130 135 140
 Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln Lys Glu
 145 150 155 160
 Tyr Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn Asp Asn
 165 170 175

 Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala
 180 185 190
 Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro
 195 200 205
 Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr
 210 215 220
 Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg
 225 230 235 240

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

Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln
 290 295 300
 Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His
 305 310 315 320
 Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg Val Ser
 325 330 335
 Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro
 340 345 350
 Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg
 355 360 365
 Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser Thr Tyr
 370 375 380
 Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu Pro Cys
 385 390 395 400
 Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met
 405 410 415
 Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr
 420 425 430
 Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn Asp Thr
 435 440 445
 Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser
 450 455 460
 Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly Val Ala
 465 470 475 480
 Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg Ala Val
 485 490 495
 Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr
 500 505 510
 Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu
 515 520 525
 Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala

530 535 540
 Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln

545 550 555 560
 Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
 565 570 575

Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro
 580 585 590

Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Glu Asp Ile Trp Asp Asn
 595 600 605

Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Arg Glu Ile Ser Asn Tyr Thr Asp Thr

610 615 620
 Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu

625 630 635 640
 Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn Trp Phe

645 650 655
 Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile Val

660 665 670
 Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Ile Phe Ala Val Leu Ser Ile

675 680 685
 <210> 19

<211> 696

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Subtype D consensus Envelope protein sequence

<400> 19

Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys Trp Gly
 1 5 10 15

Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu Asn Leu
 20 25 30

Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr

35 40 45

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

Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln Gly Val
 290 295 300
 Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Ala Val Leu Glu Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Lys Glu

<210> 21

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gag consensus protein sequence of subtype A, B, C and D

<400> 21

Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp Glu
 1 5 10 15

Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His
 20 25 30

Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly
 35 40 45

Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln Leu Gln
 50 55 60

Pro Ala Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr
 65 70 75 80

Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Lys Ile Glu Val Lys Asp Thr
 85 90 95

Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Gln
 100 105 110

Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln Val Ser
 115 120 125

Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu Glu
 145 150 155 160

405 410 415
 Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu
 420 425 430
 Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln
 435 440 445
 Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly Phe Gly
 450 455 460

Glu Glu Ile Thr Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg Glu Leu
 465 470 475 480
 Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Leu Ser
 485 490 495
 Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 500 505

<210> 22

<211> 818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPV genotype 16 E6-E7 DNA sequence

<400> 22

gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttctctgg tggccgccgc cacacgggtg 60

cacagcttcc aggaccccca ggagagcggc agaaagctgc ctgagctgtg taccgagctg 120

cagaccacca tccacgacat catcctggag tgtgtgtact gtaagcagca gctgctgagg 180

agagagggtg acgaccggga cctgtgtatc gtgtacaggg acggcaatcc ctacgccgtg 240

tgtgacaagt gcctgaagtt ctacagcaag atcagcgagt accggcacta ctgctacagc 300

ctgtacggca ccacctgga gcagcagtac acaagcccc tgtgtgacct gctgatccgg 360

tgtatcaact gccagaagcc cctgcagaga cacctggaca agaagcagcg gttccacaac 420

atcaggggca gatggaccgg cagatgtatg agctgctgcc ggagcagcag aaccagaagg 480

gagaccagc tgagaggccg gaagagaaga agccacggcg ataccccccac cctgcacgag 540

tacatgctgg acctgcagcc tgagaccacc gatctgtacg gctacggcca gctgaatgac 600

agcagcgagg aggaggatga gatcgacggc cctgccggcc aggccgagcc cgacagagcc 660

cactacaaca tcgtgacctt ttgctgtaag tgtgacagca ccctgagact gtgcgtgcag 720

agcaccacg tggacatcag aacctggag gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 780

tgtcccatct gctcccagaa accctgatga gcggccgc

818

<210> 23

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> HPV genotype 16 E6-E7 protein sequence

<400> 23

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

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

 20 25 30

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val

 35 40 45

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp

 100 105 110

Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu

 115 120 125

Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg

 130 135 140

Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu

145 150 155 160

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu

 165 170 175

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly

 180 185 190

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
 195 200 205
 Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
 210 215 220
 Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
 225 230 235 240
 Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val

245 250 255
 Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 260

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPV E6 immunodominant epitope
 <400> 24

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPV E7 immunodominant epitope
 <400> 25

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPV E6 consensus sequence
 <400> 26

Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr

1 5 10 15
 Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys
 20 25 30
 Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu Cys Ile
 35 40 45
 Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
 50 55 60
 Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
 85 90 95
 Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu Asp Lys
 100 105 110
 Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 115 120 125
 Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 130 135 140
 <210> 27
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HPV E7 consensus sequence
 <400> 27
 His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro
 1 5 10 15

 Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu
 20 25 30
 Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg
 35 40 45
 Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu
 50 55 60
 Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp

gtgagagagg gcaacagctc cagatgctgg gtggccctga cccctaccgt ggccgccaga 240

gatggcagcc tgcccaccac caccctgagg agacacgtgg acctgcttgt gggcagcgcc 300

accctgtgta gcgccatgta tgtggcgcat ctgtgtggca gcgtgtttct tgtgggccag 360

ctgttcacct tcagccccag aaggcactgg accgtgcagg actgtaactg ctccatctac 420

cccgccaca tcaccggcca cagaatggcc tgggacatga tgatgaactg gagccctacc 480

accgccctgg tgggtgccca gctgctgaga atccctcagg ccatcgtgga catggtggcc 540

ggagcccact ggggcgtgct ggccggcatc gcctacttca gcatggtggg caactgggcc 600

aaggtgctcg tgggtgctgct gctgttcgcc ggctggacg gcagaggcag gaagagaagg 660

agcgagacc acgtgaccgg cggcaccgcc ggcagaacca cagccggcct tgtgggcctg 720

ttcaccctg gcccaagca gaacatccag ctgatcaaca ccaacggcag ctggcacatc 780

aacagcaccg cctgaactg taacgacagc ctgaacaccg gctggctggc cggcctgttc 840

taccagcaca agttcaacag cagcggctgc cccgagagaa tggccagctg tagaccctg 900

gatgagttcg ccagggctg gggcccatc acctaccca atggcagcgg cctgaccag 960

agacctact gctggcacta cgccccaga cctgtggca tcgtgcccg caagagcgtg 1020

tgtggccccg tgiactgctt caccctagc cccgtggttg tggcaccac cgacagaagc 1080

ggagccccca cctacagctg gggcgagaac gagaccgacg tgctggtgct gaacaacacc 1140

agaccccccc tgggcaattg gttcggctgt acctggatga acagcaccgg cttcaccaaa 1200

gtgtgtggcg cccctcctg tgtgatcggc ggagtgggca acaacaccct gacctgcccc 1260

accgactgct tcagaaagca ccccaggcc acctactcca gatgtggcag cggaccttgg 1320

ctgaccccc gatgtatggt ggactacccc tacaggctgt ggactaccc ctgtaccgtg 1380

aattcacca tcttcaaagt gaggatgtat gtggggggcg tggagcacag actggaggcc 1440

gcctgtaatt ggaccagggg cgagagatgt gacctggagg accgggatag aagcgagctg 1500

tcccctctgc tgctgtccac caccgagtgg caggtgctgc cttgtagctt caccacctg 1560

cccgccctga gcaccggcct gatccacctg caccagaaca tcgtggacgt gcagtacctg 1620

tacggagtgg gctctagcat cgtgtcctgg gccatcaagt gggagtacgt ggtgctgctg 1680

ttcctgctgc tggccgacgc cagagtgtgt agctgcctgt ggatgatgct gctgatcagc 1740

caggccgagg cctgatgagc ggccgc 1766

<210> 31

<211> 580

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCV genotype 1a and 1b consensus E1-E2 protein sequence

<

400> 31

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg Asp Gly Ser Leu

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe

 100 105 110

Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val

 115 120 125

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg

 130 135 140

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val

145 150 155 160

Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala

 165 170 175

Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val

 180 185 190

Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val

 195 200 205

Asp Gly Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Glu Thr His Val Thr Gly Gly

 210 215 220

Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly

225 230 235 240
 Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile
 245 250 255

 Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu
 260 265 270
 Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu
 275 280 285
 Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly
 290 295 300
 Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys
 305 310 315 320

 Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val
 325 330 335
 Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr
 340 345 350
 Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr
 355 360 365
 Asp Val Leu Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe
 370 375 380

 Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala
 385 390 395 400
 Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro
 405 410 415
 Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly
 420 425 430
 Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg
 435 440 445

 Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg
 450 455 460
 Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp
 465 470 475 480

Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu
 485 490 495
 Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser
 500 505 510

 Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln
 515 520 525
 Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Val
 530 535 540
 Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 545 550 555 560
 Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ser
 565 570 575

 Gln Ala Glu Ala
 580
 <210> 32
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HCV E1 consensus sequence
 <400> 32
 Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
 1 5 10 15
 Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
 20 25 30
 Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp
 35 40 45

 Val Ala Leu Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg Asp Gly Ser Leu Pro Thr
 50 55 60
 Thr Thr Leu Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
 85 90 95

Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val Gln Asp
 100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
 115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser
 130 135 140

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala Gly Ala
 145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn
 165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly
 180 185 190

<210> 33

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCV E2 consensus sequence

<400> 33

Glu Thr His Val Thr Gly Gly Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn
 20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
 35 40 45

Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly
 85 90 95

Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly

Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala

355

360

<210> 34

<211> 3512

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

ggtaccgaat tcgccacat ggactggacc tggatcctgt tcctggtggc cgctgccaca    60
agagtgcaca gccccagggc ccccaggtgc agagccgtgc ggagcctgct gcggagccac    120
taccgggagg tgctgccctt ggccaccttc gtgcggaggc tgggccctca ggggtggcgg    180
ctggtgcaga gaggcgacc tgccaccttc agagccctgg tggcccagtg cctggtgtgc    240
gtgccctggg acgccagacc tccccctgcc gcccctagct tccggcaggt gtctgcctg    300

aaagaactgg tggcccgggt gctgcagcgg ctgtgcgaga ggggcgcaa gaacgtgctg    360
gccttcgget tcgccctgct ggacggcgcc agaggcggcc ctcccagagc cttcaccacc    420
tccgtgagaa gctacctgcc caacaccgtg accgacgccc tgagaggcag cggcgcttgg    480
ggcctgctgc tgcgcagagt gggcgacgac gtgctggtgc acctgctggc cagatgcgcc    540
ctgttcgtgc tggtcgcccc cagctgcgcc taccaggtgt gcggcccacc cctgtaccag    600
ctgggagccg ccaccaggc cagaccccct cctcacgct ccggccccag gcggagactg    660
ggctgcgagc gggcctggaa ccacagcgtg cgggagcccg gcgtgccctt gggcctgcca    720

gccccctggc ccagaagaag gggcggcagc gccagcagaa gcctgccctt gcccaagcgg    780
cccagacgcg gagccgcccc tgagcccagc agaacccccg tgggccaggc ctcttgggcc    840
cacctggcc ggaccagagg ccccagcgac cgggcttct gcgtggtgtc ccccgccaga    900
cccgccgagg aagccacctc cctggaaggc gcctgagcg gcaccaggca cagccacccc    960
agcgtgggcc gccagcacca cgccggacc cccagcacct ccaggcccc caggccctgg    1020
gacacccctt gccccctgt gtacccgag accaagcact tctgtacag cagcggcgac    1080
aaagagcagc tgcggcccag cttctgtctg tccagcctga ggcctcctt gaccggcgt    1140

aggcgcctgg tggagacat ctttctgggc agccggcctt ggatgcccgg cacccccagg    1200
cggtgccca ggetgcccc gcggtactgg cagatgaggc ctctgttctt ggaactgctg    1260
ggcaaccacg cccagtgcc ctacggcgtg ctgctgaaa cccactgccc cctgagagcc    1320
ggcgtgacc cagccgccc agtgtgcgcc agagagaagc ctcagggcag cgtggccgct    1380
cccgaggaag aggacaccga ccccagacgc ctggtgcagc tgctcggca gcacagcagc    1440
ccttggcagg tgtacggctt cgtgcgggcc tgctgagaa ggctggtgcc ccttggcctg    1500

```

tggggcagca ggcacaacga gcggcggttt ctgcggaaca ccaagaagt catcagcctg 1560

 gggaagcacg ccaagctgtc cctgcaggaa ctgacctgga agatgagcgt gcggggctgc 1620
 gcctggctga gaagatcccc tggcgtgggc tgcgtgectg ccgccgagca ccggctgcgg 1680
 gaggaatcc tggccaagt cctgactggt ctgatgagcg tgtacgtggt ggagctgctg 1740
 agatccttct tctactgac cgagaccacc ttccagaaga actacctgtt ctctaccgg 1800
 aagagcgtgt ggagcaagct gcagagcatc ggcatccggc agcacctgaa gcgggtgcag 1860
 ctgagagagc tgtccgaggc cgaagtgagg cagcaccggg aggccagacc tgcctgctg 1920
 accagccggc tgcggttcat cccaagccc gacggcctgc ggcccatcgt gaacatggac 1980

 tacgtggtgg gcgccaggac cttccggcgg gagaagcggg ccgagcggct gacctgagg 2040
 gtgaaggccc tgttcagcgt gctgaactac gagcgggcca ggccggcagg cctgctgggc 2100
 gccagcgtgc tgggcttggc cgacatccac cgggcctggc ggaccttcgt gctgagagtg 2160
 cgggcccagg acccccctcc cgagctgtac ttcgtgaagg tggacgtgac aggcgcctac 2220
 gacaccatcc cccaggaccg gctgaccgag gtgatcgcca gcatcatcaa gccccagaac 2280
 acctactgcg tgcggagata cgccgtggtg cagaaggccg cccacggcca cgtgcggaag 2340
 gccttcaaga gccacgtgag caccctgacc gacctgcagc cctacatgcg gcagttcgtg 2400

 gcccacctgc agaaaccag cccctgagg gatgccgtgg tgatcgagca gagcagcagc 2460
 ctgaacgagg ccagcagcgg cctgttcgac gtgttcctga gattcatgtg ccaccacgcc 2520
 gtgcggatcc ggggcaagag ctactgacg tgccagggca tcccacaggg cagcatcctg 2580
 tccacctgc tgtgtccct gtgctacggc gacatggaaa acaagctgtt cgccggcatc 2640
 aggcgggacg gactgctgct gagactggtg gacgacttcc tgctggtgac cccccacctg 2700
 acccagcca agaccttct gcggacctg gtgcggggcg tgcccagta cggctgcgtg 2760
 gtgaacctga gaaagaccgt ggtgaacttc cccgtggagg acgaggccct gggcggcaca 2820

 gccttcgtgc agatgcctgc ccatggactg ttcccttggg gcgggctgct gctggacacc 2880
 cggacctgga aagtgcagag cgactacagc agctacgccc ggaccagcat ccgggcctcc 2940
 ctgaccttca acaggggctt caaggccggc aggaacatgc ggcggaagct gtttggcgtg 3000
 ctgcggctga agtgccacag cctgtttctg tacctgcagg tgaacagcct gcagaccgtg 3060
 tgaccaaca tctacaagat cctgtgctg caggcctacc ggttccacgc ctgctgctg 3120
 cagctgccct ttaccagca ggtgtggaag aaccctacct tcttctgcg ggtgatcagc 3180
 gacaccgcca gcctgtgcta cagcatcctg aaggccaaga acgccggcat gacctgggc 3240

gccaagggag ccgccggacc tctgccagc gaggccgtgc agtggctgtg ccaccaggcc 3300
 tttctgctga agctgaccgc gcaccgggtg acctacgtgc ccctgctggg cagcctgcgg 3360
 accgcccaga cccagctgtc ccggaagctg cctggcacca ccctgacagc cctggaagcc 3420
 gcgccaacc ccgccctgcc ctccgacttc aagaccatcc tggactacce ctacgacgtg 3480
 cccgactacg cctgatgagc ggccgcgagc tc 3512

<210> 35

<211> 1158

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15
 His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg

 20 25 30
 Ser His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu

 35 40 45
 Gly Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe

 50 55 60
 Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg

65 70 75 80
 Pro Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu

 85 90 95
 Leu Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn

 100 105 110
 Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro

 115 120 125
 Pro Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val

 130 135 140
 Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg

 145 150 155 160
 Val Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe

 165 170 175

Val Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu
 180 185 190

Tyr Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser
 195 200 205

Gly Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val
 210 215 220

Arg Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg
 225 230 235 240

Arg Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg
 245 250 255

Arg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser
 260 265 270

Trp Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys
 275 280 285

Val Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly
 290 295 300

Ala Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His
 305 310 315 320

His Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr
 325 330 335

Pro Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser
 340 345 350

Gly Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg
 355 360 365

Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly
 370 375 380

Ser Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro
 385 390 395 400

Gln Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn
 405 410 415

His Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu

Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg
 675 680 685
 Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
 690 695 700
 Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro
 705 710 715 720
 Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr
 725 730 735
 Ile Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
 740 745 750
 Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala
 755 760 765
 His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr
 770 775 780
 Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr
 785 790 795 800
 Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn
 805 810 815
 Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His
 820 825 830
 His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile
 835 840 845
 Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly
 850 855 860
 Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu
 865 870 875 880
 Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His
 885 890 895
 Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly
 900 905 910
 Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp

915 920 925
 Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu
 930 935 940
 Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln
 945 950 955 960
 Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr

 965 970 975
 Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe
 980 985 990
 Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Tyr Leu Gln Val
 995 1000 1005
 Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu
 1010 1015 1020
 Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe

 1025 1030 1035
 His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile
 1040 1045 1050
 Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn
 1055 1060 1065
 Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro
 1070 1075 1080
 Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys

 1085 1090 1095
 Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
 1100 1105 1110
 Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr
 1115 1120 1125
 Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp
 1130 1135 1140
 Phe Lys Thr Ile Leu Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

 1145 1150 1155

<210> 36

<211> 1707

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza H5N1 HA consensus sequence

<400> 36

```

atggaaaaga tcgtgctgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc      60
atcggctacc acgccaacaa cagcaccgag caggtggaca ccatcatgga aaaaaactg      120
accgtgacce acgcccagga catcctggaa aagaccaca acggcaagct gtgcgacctg      180
gacggcgtga agccccgat cctgcgggac tgcagcgtgg cggctggct gctgggcaac      240
cccatgtgcg acgagttcat caacgtgcc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac      300

cccgtgaacg acctgtgcta ccccgcgac ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg      360
ctgtcccga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggtccagc      420
cagaggcca gcctggcgct gagcagcgc tgeccatacc agggcaagtc cagcttcttc      480
cggaactgg tgggctgat caagaagaac agcacctacc ccaccatcaa gcggagctac      540
aacaacacca accaggaaga tctgctggtc ctgtgggca tccaccacc caacgacgcc      600
gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc      660
ctgaaccagc ggctggtgcc ccgcatgcc acccgtcca aggtgaacgg ccagagcggc      720

cggatggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgatg ccatcaactt cgagagcaac      780
ggcaacttca tcgccccga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcaccatc      840
atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc      900
atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc caccctga ccatcggcga gtgccccaaag      960
tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggcc accggcctgc ggaacagccc ccagcgggag      1020
cggcgggccg ccgccccggg cctgttcggc gccatcgccg gcttcatcga gggcgctgg      1080
cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcaggg cagcggctac      1140

gccgccgaca aagagagcac ccagaaggcc atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaacagc      1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggcc gggagttaa caacctggaa      1260
cggcggatcg agaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac      1320
aacgccgagc tgctggtgct gatggaaaac gagcggacc tggacttcca cgacagcaac      1380
gtgaagaacc tgtacgaaa agtgcggctg cagctgcggg acaacgcaa agagctgggc      1440
aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac      1500

```

ggcacctacg actaccccca gtacagcgag gaagcccggc tgaagcggga ggaaatcagc 1560

ggcgtgaaac tggaaagcat cggcatctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620

agcagcctgg ccttgccat catggtggcc ggcctgagcc tgtggatgtg cagcaacggc 1680

agcctgcagt gccggatctg catctag 1707

<210> 37

<211> 568

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza H5N1 HA consensus sequence

<400> 37

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser

1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val

 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile

 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys

 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn

65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val

 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn

 100 105 110

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

 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser

 130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe

 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly

465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala

530 535 540
 Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 38

<211> 1466

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza H1N1&H5N1 NA consensus Sequence

<400> 38

ggtaccgaat tcgccaccat ggactggacc tggatcctgt tcctggtggc cgctgccacc 60
 cgggtgcaca gcatgaacc caaccagaag atcatcacca tcggcagcat ctgcatggtg 120

 atcggcatcg tgagcctgat gctgcagatc ggcaacatga tcagcatctg ggtgtccac 180
 agcatccaga cgggaacca gcaccaggcc gagcccatca gcaacaccaa ctttctgacc 240
 gagaaggccg tggccagcgt gaccctggcc ggcaacagca gcctgtgccc catcagcggc 300
 tgggccctgt acagcaagga caacagcatc cggatcggca gcaagggcga cgtgttcgtg 360

atccgggagc ccttcatcag ctgcagccac ctggaatgcc ggaccttctt cctgaccag 420
 ggggcctgc tgaacgacaa gcacagcaac ggcaccgtga aggacagaag ccctaccgg 480
 accctgatga gctgccccgt gggcgaggcc cccagcccct acaacagccg gttcgagagc 540

gtggcctggt ccgccagcgc ctgccacgac ggcaccagct ggctgacat cggcatcagc 600
 ggccctgaca acggcgccgt ggccgtgctg aagtacaacg gcatcatcac cgacaccatc 660
 aagagctggc ggaacaacat cctgcggacc caggaaagcg agtgcgcctg cgtgaacggc 720
 agctgcttca ccgtgatgac cgacggcccc agcaacggcc aggccagcta caagatcttc 780
 aagatggaaa agggcaaggt ggtgaagagc gtggagctgg acgccccaa ctaccactac 840
 gaggaatgca gctgctacc cgacccggc gagatcacct gcgtgtgccg ggacaactgg 900
 cacggcagca accggccctg ggtgtccttc aaccagaacc tggaaacca gatcggctac 960

atctgcagcg gcgtgttcgg cgacaacccc aggcccaacg atggcaccgg cagctgcggc 1020
 cctgtgagcg ccaacggcgc ctacggcgtg aagggttca gcttcaagta cggcaacggc 1080
 gtgtggatcg gccggaccaa gagcaccaac agcagatccg gcttcgagat gatctgggac 1140
 cccaacggct ggaccgagac cgacagcagc ttcagcgtga agcaggacat cgtggccatc 1200
 accgactggt ccggctacag cggcagcttc gtgcagcacc ccgagctgac cggcctggac 1260
 tgcacccggc cctgcttttg ggtggagctg atcagaggca ggcccaaaga gagcaccatc 1320
 tggaccagcg gcagcagcat cagcttttgc ggcgtgaaca gcgacaccgt gagctggtcc 1380

tggcccagc gcgccgagct gcccttacc atcgacaagt acccctacga cgtgcccagc 1440
 tacgcctgat gagcggccgc gagctc 1466

<210> 39

<211> 476

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza H1N1&H5N1 NA consensus sequence

<400> 39

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Val Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile

35 40 45

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

 Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val
 100 105 110
 Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg
 115 120 125
 Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
 130 135 140
 Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro
 145 150 155 160

 Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala
 165 170 175
 Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly
 180 185 190
 Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly
 195 200 205
 Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr
 210 215 220

 Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met
 225 230 235 240
 Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met
 245 250 255
 Glu Lys Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr
 260 265 270
 His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys
 275 280 285

 Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe

accgacctgg aagccctgat ggaatggctg aaaaccggc ccatcctgag ccccctgacc 240
aagggcatcc tgggcttctg gttcacctg accgtgccca gcgagcgggg cctgcagcgg 300
cggagattcg tgcagaacgc cctgaacggc aacggcgacc ccaacaacat ggaccgggcc 360

gtgaagctgt acaagaagct gaagcgggag atcaccttcc acggcgccaa agaggtggcc 420
ctgagctaca gcacaggcgc cctggccagc tgcattggcc tgatctaaa ccggatgggc 480
accgtgacca ccgaggtggc ctteggcctg gtgtgcgcca cctgcgagca gatcgccgac 540
agccagcaca gatcccaccg gcagatggcc accaccacca acccctgat ccggcagcag 600
aaccggatgg tcttggcctc caccaccgcc aaggccatgg aacagatggc cggcagcagc 660
gagcaggccg ccgaagccat ggaagtggcc agccaggcca ggcatatggt gcaggccatg 720
cggaccatcg gcacccacc cagcagcagc gccggactgc gggacgacct gctggaaaac 780

ctgcaggcct accagaaacg gatggcgctg cagatgcagc ggttcaagta ccctacgac 840
gtgcccgact acgcctgatg agcggccgcg agctc 875

<210> 41

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza H1N1&H5N1 M1 consensus sequence

<400> 41

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile

20 25 30

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

35 40 45

Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu

50 55 60

Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe

65 70 75 80

Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg

85 90 95

Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp

100 105 110
 Arg Ala Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His
 115 120 125
 Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser
 130 135 140
 Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val
 145 150 155 160

Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln
 165 170 175
 His Arg Ser His Arg Gln Met Ala Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg
 180 185 190
 His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu
 195 200 205
 Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala
 210 215 220

Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His
 225 230 235 240
 Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln
 245 250 255
 Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys Tyr Pro
 260 265 270

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 275

<210> 42

<211> 1700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Influenza H5N1 M2E-NP consensus sequence

<400> 42

ggtaccgaat tcgccaccat ggactggacc tggatcctgt tcttggctgc tgccgccacc 60
 aggggtcaca gcagcctgct gaccgagggtg gagaccccca cccggaacga gtggggctgc 120
 cgggtgcagcg acagcagcga ccggggcagg aagcggagaa gcgccagcca gggcaccaag 180

cggagctacg agcagatgga aacagggcggc gagcggcaga acgccaccga gatccgggcc 240
 agcgtgggca gaatggtcgg cggcatcggc cggttctaca tccagatgtg caccgagctg 300
 aagctgtccg actacgaggg ccggctgata cagaacagca tcaccatcga gcggatggtg 360

 ctgtccgctt tcgacgagcg gcggaacaga tacctggaag agcaccaccg gcccgcaag 420
 gacccaaga aaaccggcgg acccatctac cggcggaggg acggcaagtg ggtgcgggag 480
 ctgatcctgt acgacaaaga ggaaatccgg cggatctggc ggacggccaa caacggcgag 540
 gacgccacag ccggcctgac ccacctgatg atctggcaca gcaacctgaa cgacgccacc 600
 taccagcga caagggctct ggtccggacc ggcatggacc cccggatgtg cagcctgatg 660
 cagggcagca cactgccag aagaagcggg gccgctggcg cagccgtgaa gggcgtgggc 720
 accatggtga tggaactgat ccggatgata aagcggggca tcaacgaccg gaatttttg 780

 aggggcgaga acggcagcgg gaccgggata gcctacgagc ggatgtgcaa catcctgaag 840
 ggcaagtcc agacagccgc ccagcgggcc atgatggacc aggtccggga gagccggaac 900
 cccggcaacg ccgagatcga ggacctgatc ttcttgcca gaagcgcct gatcctgcgg 960
 ggacagctgg ccacaagag ctgctgccc gcctgcgtgt acggactggc cgtggccagc 1020
 ggctacgact tcgagcggga gggctacagc ctggtcggca tcgaccctt cggctgctg 1080
 cagaactccc aggtgttcag cctgatccgg cccaacgaga accccgcca caagtccag 1140
 ctggtctgga tggcctgcca cagcggccc ttcgaggata tgagagtgag cagcttcac 1200

 cggggcacca gagtgggtcc caggggccag ctgtccacca ggggcgtgca gatgccagc 1260
 aacgagaaca tggaagccat ggacagcaac acctggaac tgcggagccg gtactgggcc 1320
 atccggacca gaagcggcgg caacaccaac cagcagcggg ccagcggcgg acagatcagc 1380
 gtgcagccca cttctcctg cgacgggaac ctgcccttcg agagggccac catcatggcc 1440
 gccttcaccg gcaacaccga gggccggacc agcgacatgc ggaccgagat catcaggatg 1500
 atggaagcgg ccaggcccga ggacgtgagc ttccaggga ggggcgtgtt cgagctgtcc 1560
 gatgagaagg ccaccaacc catcgtgccc agcttcgaca tgaacaacga gggcagctac 1620

 ttcttcggcg acaacgccga ggaatcagc aactaccct acgacgtgcc cgactacgcc 1680
 tgatgagcgg ccgagctc 1700

 <210> 43
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Influenza H5N1 M2E-NP consensus sequence

<400> 43

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp
 20 25 30

Gly Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 35 40 45

Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Gly Gly
 50 55 60

Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met Val
 65 70 75 80

Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu
 85 90 95

Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg
 100 105 110

Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Arg Tyr Leu Glu Glu
 115 120 125

His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr
 130 135 140

Arg Arg Arg Asp Gly Lys Trp Val Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys
 145 150 155 160

Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp Ala
 165 170 175

Thr Ala Gly Leu Thr His Leu Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn Asp
 180 185 190

Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp Pro
 195 200 205

Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly
 210 215 220

Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu Leu
 225 230 235 240

Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg Gly
 245 250 255
 Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile
 260 265 270
 Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp Gln
 275 280 285

 Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu Ile
 290 295 300
 Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
 305 310 315 320
 Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Ala Ser Gly Tyr
 325 330 335
 Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe Arg
 340 345 350

 Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Phe Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu Asn
 355 360 365
 Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala Ala
 370 375 380
 Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr Arg Val Val
 385 390 395 400
 Pro Arg Gly Gln Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn Glu
 405 410 415

 Asn Met Glu Ala Met Asp Ser Asn Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr
 420 425 430
 Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala
 435 440 445
 Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn
 450 455 460
 Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn Thr
 465 470 475 480

 Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met Glu

485 490 495
Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu
500 505 510
Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp Met
515 520 525
Asn Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp
530 535 540

Asn Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
545 550