



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0124919
(43) 공개일자 2024년08월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7019939
- (22) 출원일자(국제) 2022년11월14일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년06월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2022/081839
- (87) 국제공개번호 WO 2023/084094
국제공개일자 2023년05월19일
- (30) 우선권주장
21306581.6 2021년11월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
떼라백퍼스
프랑스 에프-75015 파리 세텍스 15 뒤 뒤 닥터 루
28 바티먼트 파스티르 비오톱
- 앵스띠뛰 파스티르
프랑스 파리 75015 뒤 뒤 독퇴르 루 25-28
- (72) 발명자
샤르노, 피에르
프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 25-28
- 안나, 프랑수아
프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 28 바티먼트 파
스티르 비오톱
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 26 항

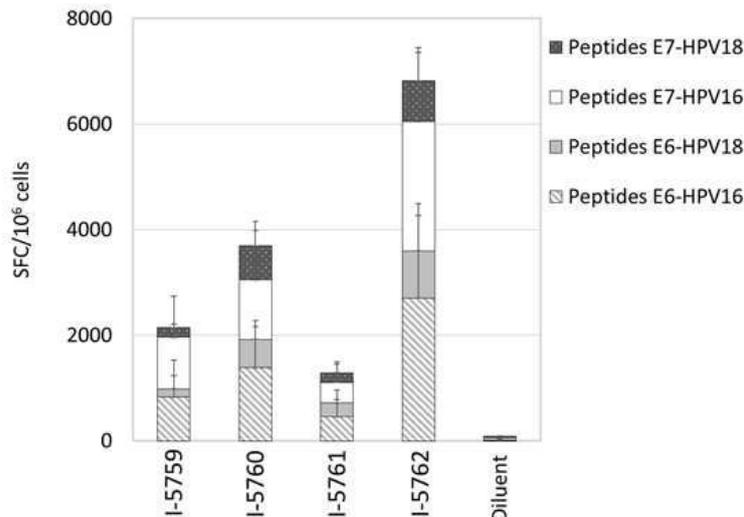
(54) 발명의 명칭 인유두종 바이러스 항원의 발현을 위한 렌티바이러스 벡터 및 이의 HPV 유발 암 치료에 대한 구현

(57) 요약

본 발명은 렌타바이러스 벡터, 특히 HPV 항원을 코딩하는 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열을 포함하는 비통합(non-integrative) 렌티바이러스 벡터, 상기 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자, 이를 포함하는 분리된 세포, 및 상기 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 또한 HPV 유발 암의 치료 또는 예방에서의 이들의 구현에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/585 (2013.01)
C12N 2710/20022 (2013.01)
C12N 2710/20034 (2013.01)
C12N 2740/16043 (2013.01)

(72) 발명자

몽코, 패니

프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 28 바티먼트 파
스퇴르 비오텍

누아라, 아망딘

프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 28 바티먼트 파
스퇴르 비오텍

마즐레시, 라레

프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 25-28

두게, 레티시아

프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 28 바티먼트 파
스퇴르 비오텍

페르, 앙그리드

프랑스 파리 75015 뒤 뒤 닥터 루 28 바티먼트 파
스퇴르 비오텍

(30) 우선권주장

63/279,945 2021년11월16일 미국(US)
22306119.3 2022년07월27일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

렌티바이러스 벡터로서, 특히 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열을 포함하는 비통합(non-integrative) 렌티바이러스 벡터:

- 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
- 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
- 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열, 및
- 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 68%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 14 및 서열번호 15로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 83%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항원을 코딩하는 상기 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열은 함께 융합되어, 단일 프로모터 서열의 제어 하에 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하는 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는, 5'말단에서부터 3'말단까지 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터:

(a) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열;

(b) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열;

(c) 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열;

(d) 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는, 5'말단에서부터 3'말단까지 (a) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 41의 핵산 서열인 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 CNCM에 수탁번호(accession number) I-5759, I-5760, I-5761 및 I-5762로 제출된 비통합 렌티바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것이고, 특히 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 비통합 렌티바이러스 벡터인 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 주조직적합성복합체 1형 (MHC Class I) 프로모터, 특히 β 2-마이크로글로불린 프로모터를 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 cPPT/CTS 서열, 특히 서열번호 37로 표시되는 cPPT/CTS 서열을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 U3 프로모터 서열이 없는 3' 긴 말단 반복(LTR)을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 구성적(constitutive) 인핸서 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 렌티바이러스 벡터.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터는 우드척 B형 간염 바이러스(woodchuck hepatitis B virus, WHV) 전사 후 조절 요소(post-transcriptional regulatory element, WPRE)의 돌연변이 형태를 포함하고, 특히 서열번호 38로 표시되는 서열을 포함하는 것인, 렌티바이러스 벡터.

청구항 16

렌티바이러스 벡터 입자로서, 특히 제1항 내지 제15항 중 어느 하나에 정의된 렌티바이러스 벡터를 적어도 하나 포함하는 비통합 렌티바이러스 벡터 입자.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터 입자는 기능성 렌티바이러스 인테그레이즈(integrase) 단백질을 포함하는, 렌티바이러스 벡터 입자.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서,

상기 렌티바이러스 벡터 입자는 수포성 구내염바이러스 당단백질(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSVG), 특히 VSV-G 인디애나 혈청형 또는 VSV-G 뉴저지 혈청형을 포함하는, 렌티바이러스 벡터 입자.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 렌티바이러스 벡터 입자는 HIV-1 서브타입 D Gag 및 Pol 단백질을 포함하는, 렌티바이러스 벡터 입자.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터 또는 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는, 분리된 세포.

청구항 21

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터, 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 제20항의 세포를 포함하는, 백신 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서,
상기 백신 조성물은 HPV 유발 암의 치료 또는 예방용, 특히 자궁경부암, 질암, 외음부암, 음경암, 항문암, 구인두암 및 이의 전이, 특히 폐 전이로 이루어진 군에서 선택되는 HPV 유발 암의 치료 또는 예방용인 것인, 백신 조성물.

청구항 23

약제 또는 백신으로 사용하기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터, 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 렌티바이러스 벡터 입자, 또는 제20항의 세포.

청구항 24

제23항에 있어서,
상기 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포는 HPV 유발 암의 치료 또는 예방용, 특히 자궁경부암, 질암, 외음부암, 음경암, 항문암, 구인두암 및 이의 전이, 특히 폐 전이로 이루어진 군에서 선택되는 HPV 유발 암의 치료 또는 예방용인 것인, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포.

청구항 25

제22항의 백신 조성물 또는 제23항 또는 제24항의 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포에 있어서, 상기 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포는 적어도 하나의 면역 관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)와 함께 투여되는 것, 특히 항PD-1, 항PD-L1, 항CTLA-4, 항NKG2A, 항TIM-3, 항TIGIT 및 항LAG-3 단일 클론 항체로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 단일 클론 항체, 더 특히 적어도 하나의 항PD-1 단일 클론 항체와 함께 투여되는 것인, 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 동시에 또는 이시에 투여되는 것이고, 특히 상기 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 상기 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포의 투여 후 적어도 2일, 특히 적어도 4일 후에 투여되는 것인, 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 백신 기술 분야에 관한 것으로서, 치료 및 예방 백신으로 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 개선에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인유두종 바이러스(HPV) 항원을 발현하는 렌티바이러스 벡터 및 HPV 유발 암의 예방 및 치료에서의 이의 구현에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인유두종 바이러스(HPV)는 전 세계 암의 5.2%를 유발한다(Tota et al., Prev Med 2011 Oct; 53 Suppl 1:S12-21). 100개 이상의 HPV 유형이 동정되었으며 암과의 연관성에 따라 세 개의 그룹으로 분류된다: 발암 가능성이 높은 고위험군(그 중 HPV 16형 (HPV-16) 및 HPV 18형 (HPV-18)), 양성 병변(benign lesion)과 관련된 저위험군(HPV-6, -11) 및 피부 유형(그 중 HPV-1, -2, -3, -4...) (Chen et al. Virology vol. 516 (2018): 86-101). HPV 관련 암의 비율은 암 유형과 지역에 따라 다르지만 자궁경부암의 90%, 항문암의 91%, 질암의 75%, 구인두암의 70%, 외음부암의 69%, 음경암의 63%가 HPV 감염과 연관되어 있는 것으로 추정된다 (Saraiya et al., J Natl Cancer Inst. 2015 Apr 29;107(6)).

[0003] 암에서 발견되는 가장 흔한 두 가지 유형의 HPV는 HPV16과 HPV18이다. 예를 들어, HPV16과 HPV18은 모든 자궁경부암의 70-75%에 관여하는 것으로 생각된다 (de Sanjose et al., Eur J Cancer. 2013 Nov;49(16):3450-61). HPV16과 18은 또한 항문암(91%), 구인두암(70%), 질암(75%), 음경암(63%), 외음부암(68%)에도 크게 관여한다 (Saraiya et al., J Natl Cancer Inst. 2015 Apr 29;107(6)).

[0004] 따라서 HPV16/18을 표적으로 하는 치료 백신은 암의 위치에 관계없이 관련 암을 치료하고 예방하는데 잠재적으로 사용될 수 있다.

[0005] 인유두종 바이러스(HPV)는 외피가 없는 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 이 바이러스의 유전체는 6개의 비구조 단백질 (초기 단백질 E1, E2, E4, E5, E6 및 E7)과 2개의 구조 단백질 (후기 단백질 L1 및 L2)을 암호화한다 (Chen et al. Virology vol. 516 (2018): 86-101).

[0006] 이 단백질 중 E6과 E7은 발암성에 대한 특징이 잘 알려져 있다. 이 단백질들은 p53 및 pRb 종양 억제 단백질을 비활성화하여 세포 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다. E6/E7 종양 유전자는 HPV 관련 악성 세포 형질전환의 유도과 HPV-양성 암세포의 발암성 표현형 유지에 모두 중요하다 (Yim and Park, Cancer Res Treat. 2005 Dec;37(6):319-24.). E6 및 E7 단백질은 모든 HPV 양성 세포에서 감염 전반에 걸쳐 발현되며, 이러한 관찰로 인해 이들 단백질은 백신의 완벽한 표적이 된다.

[0007] 재조합 바이러스 벡터는 백신 접종 목적으로 널리 개발되었다. 바이러스 유전체의 변형을 통해 유전 물질을 표적 세포에 도입하는 도구로 사용할 수 있는 무독성 및 비감염성 바이러스 입자를 생산할 수 있게 되었다. T 세포 매개 면역을 유도하기 위해 재조합 바이러스 벡터를 사용하는 것은 백신 접종을 위한 매우 유망한 접근 방식이다. 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 백시니아 바이러스 벡터를 포함한 다양한 바이러스 벡터가 백신 접종 목적으로 평가되었다 (Milone and O'Doherty, Leukemia (2018) 32:1529-1541 and Ku et al., Expert Review of Vaccines (2021)). 렌티바이러스는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)도 포함된 레트로바이러스과(Retroviridae)에 속하는 바이러스이다. 렌티바이러스 벡터는 주로 HIV-1에서 유래한다. 렌티바이러스 벡터는 LTR U3 서열을 제거하여 바이러스 프로모터와 인핸서 서열이 전혀 없는 '자가 비활성화' 벡터를 만들어 안정성을 개선하였다. 렌티바이러스 벡터는 다른 바이러스 시스템에 비해 여러 가지 장점을 가지고 있어 유망한 도구로 부상했다. 특히, 렌티바이러스 벡터는 독성이 없으며 다른 레트로바이러스와 달리 비분열 세포, 특히 수지상 세포를 형질도입할 수 있어 (He et al. 2007, Expert Rev vaccines, 6(6):913-24) 내인성 경로를 통해 항원을

지속적으로 제시할 수 있다.

- [0008] 일반적으로 사용되는 다른 바이러스 벡터와 달리 렌티바이러스 벡터는 비분열 세포에 형질도입하는 능력이 있다. 비분열 세포에서의 효율적인 형질도입을 위해서는 중앙 DNA "플랩"이라고 불리는 삼중 가닥 DNA 구조가 형성되어야 하며, 이는 수지상 세포(DC)를 포함한 비분열 세포의 핵으로 유전자 도입의 효율성을 극대화한다 (Arhel et al., EMBO J. 2007 Jun 20; 26(12): 3025-3037) (Zennou et al., Cell. 2000 Apr 14;101(2):173-85).
- [0009] 수지상 세포(DC)는 항원을 제시하고 면역 반응을 개시하는 것이 주요 기능인 항원 제시 세포(APC)의 주요 클래스를 구성하므로 항원 제시에서 가장 중요하다 (Steinman, R., Banchereau, J. Nature 449, 419-426 (2007)). 성숙한 DC는 배수 림프절(drainage lymph node)로 이동하여 주조직적합성복합체(MHC) 분자를 통해 표면에서 항원 유래 짧은 펩타이드를 제시한다. 그러면 림프절에 존재하는 항원 특이적 T 세포는 TCR(T 세포 수용체)을 통해 펩타이드-MHC 복합체와 상호작용할 수 있다. 공동 자극 신호와 함께 특정 TCR에 의한 펩타이드-MHC의 인식은 T 세포 활성화를 개시한다 (Steinman, R., Banchereau, J. Nature 449, 419-426 (2007)).
- [0010] 본 발명의 목적은 HPV 유발 암의 예방 및 치료를 위한 치료 및 예방 백신을 제공하는 것이다.
- [0011] CRT(calreticulin)에 융합된 비종양성 HPV16 E7을 발현하는 인터그라제(integrase) 결함 렌티바이러스 벡터를 사용하여 고위험 인유두종바이러스에 대한 치료 백신이 기술되었다 (Grasso et al., Int J Cancer. 2013 Jan 15;132(2):335-44). 본 실험은 초기 단계의 종양에 대해 수행되었으며, 완벽하지는 않지만 함리적인 수의 백신 접종 마우스에서 상기 종양을 박멸하는 능력을 보여주었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 따라서, 작고 초기 단계의 종양보다 제거하기가 더 어려운 것으로 알려진, HPV에 의해 유도된 보다 공격적이고/거나 잘 이식된 종양의 치료에 대한 당업계의 요구가 여전히 존재한다.
- [0013] 또한, HPV에 의해 유도된 저항성 종양, 즉 조절 T 세포(Treg)가 강하게 침윤된 것을 특징으로 하는 종양에 대한 치료가 필요하다.
- [0014] 또한, HPV 유발 종양에서 CD8⁺ 및 CD4⁺ 세포의 침윤을 치료하는 동시에 상기 종양의 Treg를 감소시키는 치료 백신이 필요하다.
- [0015] 또한, HPV, 특히 PDHPV 항원, 더욱 특히 HPV16 및 HPV18 항원에 대한 강력한 면역 기억을 생성할 필요가 있다.
- [0016] 또한, HPV 유발 암에 대한 안전하고 비종양성이며 예방 및 치료 효과가 있는 새로운 백신의 개발이 필요하다.
- [0017] 또한, 1회 접종 후 원발성 종양을 완전히 제거하고 재발을 강력하게 예방할 수 있는 백신에 대한 필요성도 있다.
- [0018] 본 발명은 상기 요구를 충족시키기 위한 목적을 가진다.

과제의 해결 수단

- [0019] **발명의 요약**
- [0020] **항목 1:** 렌티바이러스 벡터, 특히 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열을 포함하는 비통합(non-integrative) 렌티바이러스 벡터:
 - [0021] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
 - [0022] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
 - [0023] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열, 및
 - [0024] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열.
- [0025] 실시예에 설명된 바와 같이, 본 발명의 렌티바이러스 벡터는 HPV 유발 종양에 대한 강력한 치료 및 예방 활성을 가능하게 한다.

- [0026] **항목 2:** 항목 1의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0027] **항목 3:** 항목 1 또는 2의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 16로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 68%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 14 및 서열번호 15로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0028] **항목 4:** 항목 1 내지 3 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0029] **항목 5:** 항목 1 내지 4 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 33로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 83%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0030] **항목 6:** 항목 1 내지 5 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 항원을 코딩하는 상기 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열은 함께 융합되어, 단일 프로모터 서열의 제어 하에 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하는 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0031] **항목 7:** 항목 1 내지 6 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는, 5'말단에서부터 3'말단까지 다음으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 렌티바이러스 벡터:
- [0032] (a) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열;
- [0033] (b) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열;
- [0034] (c) 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열;
- [0035] (d) 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열.
- [0036] **항목 8:** 항목 1 내지 7 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는, 5'말단에서부터 3'말단까지 (a) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열인, 렌티바이러스 벡터.
- [0037] **항목 9:** 항목 1 내지 8 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 41의 핵산 서열인 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0038] **항목 10:** 항목 1 내지 9 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 CNCM에 수탁번호(accession number) I-5759, I-5760, I-5761 및 I-5762로 제출된 비통합 렌티바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것이고, 특히 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 비통합 렌티바이러스 벡터인 것인, 렌티바이러스 벡터.

- [0039] **항목 11:** 항목 1 내지 10 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 구조적 복합체 1형 (MHC Class I) 프로모터, 특히 $\beta 2$ -마이크로글로불린 프로모터를 포함하는, 렌티바이러스 벡터.
- [0040] **항목 12:** 항목 1 내지 11 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 cPPT/CTS 서열, 특히 서열번호 37로 표시되는 cPPT/CTS 서열을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.
- [0041] **항목 13:** 항목 1 내지 12 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 U3 프로모터 서열이 없는 3' 긴 말단 반복(LTR)을 포함하는, 렌티바이러스 벡터.
- [0042] **항목 14:** 항목 1 내지 13 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 구성적 (constitutive) 인핸서 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 렌티바이러스 벡터.
- [0043] **항목 15:** 항목 1 내지 14 중 어느 한 항목의 비통합 렌티바이러스 벡터에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 우드척 B형 간염 바이러스(woodchuck hepatitis B virus, WHV) 전사 후 조절 요소(post-transcriptional regulatory element, WPRE)의 돌연변이 형태를 포함하고, 특히 서열번호 38로 표시되는 서열을 포함하는 것인, 렌티바이러스 벡터.
- [0044] **항목 16:** 렌티바이러스 벡터 입자, 특히 항목 1 내지 15 중 어느 하나에 정의된 렌티바이러스 벡터를 적어도 하나 포함하는 비통합 렌티바이러스 벡터 입자.
- [0045] **항목 17:** 항목 16의 렌티바이러스 벡터 입자에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터 입자는 기능성 렌티바이러스 인테그레이즈(integrase) 단백질을 포함하는, 렌티바이러스 벡터 입자.
- [0046] **항목 18:** 항목 16 또는 17의 렌티바이러스 벡터 입자에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터 입자는 수포성 구내염 바이러스 당단백질(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSVG), 특히 VSV-G 인디애나 혈청형 또는 VSV-G 뉴저지 혈청형을 포함하는, 렌티바이러스 벡터 입자.
- [0047] **항목 19:** 항목 16 내지 18 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터 입자에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터 입자는 HIV-1 서브타입 D Gag 및 Pol 단백질을 포함하는, 렌티바이러스 벡터 입자.
- [0048] **항목 20:** 항목 1 내지 14 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터 또는 항목 16 내지 19 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는, 분리된 세포.
- [0049] **항목 21:** 항목 1 내지 14 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터, 항목 16 내지 19 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 항목 20의 세포를 포함하는, 백신 조성물.
- [0050] **항목 22:** 항목 21의 백신 조성물에 있어서, HPV 유발 암의 치료 또는 예방용, 특히 자궁경부암, 질암, 외음부암, 음경암, 항문암, 구인두암 및 이의 전이, 특히 폐 전이로 이루어진 군에서 선택되는 HPV 유발 암의 치료 또는 예방용 백신 조성물.
- [0051] **항목 23:** 약제 또는 백신으로 사용하기 위한, 항목 1 내지 15 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터, 항목 16 내지 19 중 어느 한 항목의 렌티바이러스 벡터 입자, 또는 항목 20의 세포.
- [0052] **항목 24:** 항목 23의 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포는 HPV 유발 암, 특히 자궁경부암, 질암, 외음부암, 음경암, 항문암, 구인두암 및 이의 전이, 특히 폐 전이로 이루어진 군에서 선택되는 HPV 유발 암의 치료 또는 예방용인 것인, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포.
- [0053] **항목 25:** 항목 22의 백신 조성물 또는 항목 23 또는 24의 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포에 있어서, 상기 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포는 적어도 하나의 면역 관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)와 함께 투여되는 것, 특히 항PD-1, 항PD-L1, 항CTLA-4, 항NKG2A, 항TIM-3, 항TIGIT 및 항LAG-3 단일 클론 항체로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 단일 클론 항체, 더 특히 적어도 하나의 항PD-1 단일 클론 항체와 함께 투여되는 것인, 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포.
- [0054] **항목 26:** 항목 25의 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포에 있어서, 상기 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 동시에 또는 이시에 투여되는 것이고, 특히 상기 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 상기 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포의 투여 후 적어도 2일, 특히 적어도 4일 후에 투여되는 것인, 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포.

- [0055] 본 발명의 특정 하나 이상의 기술된 양태와 관련하여 제공되는 세부사항, 실시예 및 선호사항은 본 명세서에서 추가로 설명될 것이며, 본 발명의 모든 양태에 동일하게 적용된다. 본 명세서에 기술된 구체예, 실시예 및 선호사항의 모든 가능한 변형의 임의의 조합은 본 명세서에서 다르게 표시되거나 문맥상 명확하게 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다.
- [0056] **서열의 요약**
- [0057] 서열번호 1은 HPV 16의 E6 단백질을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0058] 서열번호 2는 HPV 16의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0059] 서열번호 3은 HPV 16의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0060] 서열번호 4는 HPV 16의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0061] 서열번호 5는 HPV 16의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0062] 서열번호 6은 HPV 16의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0063] 서열번호 7은 HPV 16의 E6 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0064] 서열번호 8은 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0065] 서열번호 9는 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0066] 서열번호 10은 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0067] 서열번호 11은 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0068] 서열번호 12는 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0069] 서열번호 13은 HPV 16의 E7 단백질을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0070] 서열번호 14는 HPV 16의 E7 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0071] 서열번호 15는 HPV 16의 E7 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0072] 서열번호 16은 HPV 16의 E7 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0073] 서열번호 17은 HPV 16에서 유래한 E7 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0074] 서열번호 18은 HPV 16에서 유래한 E7 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0075] 서열번호 19는 HPV 18의 E6 단백질을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0076] 서열번호 20은 HPV 18의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0077] 서열번호 21은 HPV 18의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0078] 서열번호 22는 HPV 18의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0079] 서열번호 23은 HPV 18의 E6 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0080] 서열번호 24는 HPV 18의 E6 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0081] 서열번호 25는 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0082] 서열번호 26은 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0083] 서열번호 27은 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0084] 서열번호 28은 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0085] 서열번호 29는 HPV 18의 E7 단백질을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0086] 서열번호 30은 HPV 18의 E7 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0087] 서열번호 31은 HPV 18의 E7 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.

- [0088] 서열번호 32는 HPV 18의 E7 단백질의 비중양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0089] 서열번호 33은 HPV 18의 E7 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0090] 서열번호 34는 HPV 18에서 유래한 E7 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0091] 서열번호 35는 HPV 18에서 유래한 E7 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0092] 서열번호 36은 HPV 18에서 유래한 E7 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0093] 서열번호 37은 cPPT/CTS 서열을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0094] 서열번호 38은 우드척 B형 간염 바이러스(woodchuck hepatitis B virus, WHV) 전사 후 조절 요소(post-transcriptional regulatory element, WPRE)의 돌연변이 형태를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0095] 서열번호 39는 RAHYNIVTF H-2D^b 제한 T 세포 에피토프를 포함하는 합성 E7_{HPV16} 유래 펩타이드이다.
- [0096] 서열번호 40은 RAHYNIVTF H-2D^b 제한 T 세포 에피토프를 포함하는 합성 E7_{HPV16} 유래 펩타이드이다.

발명의 효과

- [0097] 본 발명자들은 적어도 4개의 서로 다른 인유두종 바이러스(HPV) 항원, 특히 적어도 2개의 서로 다른 HPV 아형, 특히 HPV16 및 HPV18 아형의 단백질 E6 및 E7 중에서 선택된 적어도 4개의 HPV 항원을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 필요한 개체에게 투여하면 HPV 유발 암에 대한 높은 예방 및 치료 활성이 나타난다는 것을 발견하였다.
- [0098] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 HPV 감염에 의해 유발된 종양에 대해 강력하고 지속적이며 광범위한 세포 매개 반응을 유도할 수 있다.
- [0099] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 및 이를 포함하는 렌티바이러스 입자, 상기 렌티바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 분리된 세포 및 이를 포함하는 백신 조성물이 본 명세서 전체에 걸쳐 설명된다.

도면의 간단한 설명

- [0100] **도 1**은 본 발명의 HPV 백신이 생체 내에서 면역원성을 보여준다. CNCM에 수탁번호 I-5979로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5760으로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터 또는 CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 1x10⁷ TU의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 50 μL의 희석제를 마우스에 근육 주사하였다. 14일 후, 비장세포를 준비하고 4개의 서로 다른 펩타이드 풀을 사용하여 IFNγ ELISPOT에 대해 발새 재자극하였다.

가로 좌표: 왼쪽에서 오른쪽으로: CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5760으로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터 또는 50 μL의 희석제(대조군)로 얻은 결과.

세로 좌표: 점 형성 세포(Spot Forming Cells, SFC)/10⁶ 세포.

도 2는 본 발명의 백신이 생체 내(in vivo)에서 잘 이식된 종양을 완전히 제거함을 보여준다. TC-1 세포를 피하 주사하고 종양의 부피를 격일로 측정하였다(캘리퍼스 측정). 평균 종양 부피가 70 mm³일 때, 마우스를 무작위로 분류하고 1x10⁸ TU의 LV-GFP 인디애나(대조군), I-5759를 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자, I-5760을 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자, I-5761을 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자 또는 I-5762를 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자를 근육주사로 백신 접종하였다.

가로 좌표: 일(days).

세로 좌표: 종양 부피(mm³).

도 3은 디자인 I-5759, I-5760, I-5761, I-5762 또는 대조군으로서 희석제를 발현하는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터가 재발을 방지하기 위해 오래 지속되는 면역을 생성하는 능력을 보여준다. 원발성 종양을 제거한 마우스를 60일째에 다른 쪽 옆구리에 다시 투여하였다. 대조군 마우스(아무 처리하지 않은 마우스)에도 미경험

(naive) 마우스의 종양 세포 성장을 확인하기 위해 피하주사 하였다.

가로 좌표: 일(days).

세로 좌표: 종양 부피(mm³).

도 4는 마우스의 용량/반응을 나타낸다. 1×10^6 TC-1 세포를 동물의 옆구리에 주사하고 종양 부피를 일주일에 2회 측정하였다(캘리퍼스 측정). 평균 종양 부피가 80mm³일 때, 마우스를 무작위로 분류하고 희석제(대조군), 1×10^7 TU의 I-5759 백신 또는 1×10^8 TU의 I-5759 백신을 (근육주사) 접종하였다.

가로 좌표: 일(days).

세로 좌표: 종양 부피(mm³).

도 5는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터로 백신 접종 후 림프구 종양 침윤을 나타낸다. 1×10^6 TC1 종양 세포를 동물의 옆구리에 주사(피하주사)하고, 종양 부피를 일주일에 2회 측정하였다(캘리퍼스 측정). 평균 종양 부피가 80mm³일 때, 마우스를 무작위로 분류하고 희석제(대조군), 1×10^7 TU의 I-5759 백신 또는 1×10^8 TU의 I-5759 백신을 (근육주사) 접종하였다.

백신 접종 10일 후, 종양을 수집하고 분해하여 유세포 분석(flow cytometry)으로 분석하였다. 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 FACS 염색을 수행하고 MacsQuant facs에서 데이터를 수집하였다.

가로 좌표: 왼쪽에서 오른쪽으로: 희석제(대조군); 1×10^8 TU의 I-5759 백신.

세로 좌표: 왼쪽 상단 도면: % CD8+ T 세포(살아있는 세포 내); 오른쪽 상단 도면: % CD4+ T 세포(살아있는 세포 내); 하단 도면: % Treg 세포(살아있는 세포 내).

도 6은 본 발명에 따른 벡터가 잘 형성된 대형 종양을 제거하는 능력을 나타낸다. 1×10^6 TC1 세포를 동물의 옆구리에 주사(피하주사)하였다. 평균 종양 부피가 약 300mm³일 때, 마우스를 무작위로 분류하여 희석제(대조군) 또는 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신을 1×10^8 TU로 (근육주사) 백신 접종하였다.

가로 좌표: 일(days).

세로 좌표: 종양 부피(mm³).

도 7은 CFSE로 표지되고 본 발명에 따른 백신(I-5759)의 부재(자극되지 않은 상태) 또는 존재 하에 배양된 인간 PBMC에서의 T 세포 반응을 도시한다. 배양 2주 후 세포 증식 및 활성화를 측정하였다(n=3). CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포 증식(CFSE 희석으로 측정됨)(A) 및 CD25 활성화 마커의 발현(B)은 배양액에 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 첨가함으로써 증가되었다.

가로 좌표: 왼쪽에서 오른쪽으로: 자극되지 않음 (Unstim - 대조군); I-5759 백신.

세로 좌표: (A) 왼쪽 도면: CD8+ 집단에서 CFSElow의 %; 오른쪽 도면: CD4+ 집단에서 CFSElow의 %. (B) 왼쪽 도면: CD4+ 집단에서 CD25+의 %; 오른쪽 도면: CD8+ 집단에서 CD25+의 %.

도 8A 내지 8D는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체(antigen construct) 4가지 예를 도시한다. 이들 항원 구성체 각각은 다양한 순서로 다음 4개의 서열로 구성된다: 비종양성 인유두종 바이러스 (HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열, 비종양성 인유두종 바이러스 (HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열, 비종양성 인유두종 바이러스 (HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 및 비종양성 인유두종 바이러스 (HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열. 도 8A는 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 나타낸다. 도 8B는 CNCM에 수탁번호 I-5760으로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 나타낸다. 도 8C는 CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 나타낸다. 도 8D는 CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 나타낸다.

도 9A 및 9B는 세포 내 사이토카인 염색(Intracellular Cytokine Staining, ICS)으로 분석된 비장세포의 T 세포

포 사이토카인 반응을 ETTDPDRAHYNIVTF (서열번호 39) 및 PDRAHYNIVTFCKC (서열번호 40) 합성 펩타이드 혼합물의 자극 유무에 따라 나타난 것이며, 둘 모두 RAHYNIVTF H-2D^b 제한 T세포 에피토프(볼드체는 H-2D^d 앵커 잔기를 나타냄)를 포함하고 있으며, 비장세포는 Ctrl Lenti(LV-GFP 인디애나) 또는 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신을 근육주사 하여 면역화된 C57BL/6 마우스 (n = 5/group)에서 백신 접종 14일 후 얻은 비장세포이다. 도 9A는 특히 사이토카인-생산 CD8⁺ T 세포에서 수행된 세포 계측 게이팅 전략과 표면 CD107a 염색으로 평가된 IFN- γ -생산 CD8⁺ T 세포의 탈과립 활성을 나타낸다. 도 9B는 CD8⁺ T 서브세트 내에서의 각 (다)기능성 세포 서브세트의 빈도와 IFN- γ ⁺ CD107a⁺ 세포의 빈도를 나타낸다.

도 10은 종양이 이식되고 본 발명에 따른 HPV 백신(I-5759)으로 백신 접종된 마우스, 또는 종양이 이식되고 백신 접종되지 않은 마우스(대조군 - Ctrl Lenti)의 종양 침윤 선천 면역 세포(NK)의 세포계측(cytometric) 분석을 도시한 것이다. CD11b 및 NKp46이 검출되었다.

도 11은 본 발명에 따른 벡터가 잘 형성된 대형 종양을 제거하는 능력을 나타낸다. 원발성 종양을 제거한 완치 마우스(오른쪽 패널)의 재투여는 처음 생착(engraftment)시킨 후 119일 후에 1.10⁶ TC-1 종양 세포를 사용하여 다른 쪽 옆구리에서 이루어졌으며, 어떠한 치료 없이 유지하였다. 종양 세포의 성장을 확인하기 위해 대조군 마우스(아무 처리하지 않은 - 노화 마우스 대조군 - 왼쪽 패널)에도 종양 세포를 피하주사 하였다.

가로 좌표: 종양 재투여 후 일(days).

세로 좌표: 종양 부피(mm³).

도 12A 및 12B는 본 발명에 따른 백신(I-5759)의 최적 용량 이하 백신 접종과 항PD-1 치료(단일 클론 항체 항PD-1) 간의 시너지 효과를 보여준다.

도 12A는 마우스에서 종양 생착(D0) 후 며칠 동안(가로 좌표)의 종양 부피(mm³ - 세로 좌표) 변화를 나타낸다. 실험은 종양이 생착된 3개의 동일한 마우스 그룹을 대상으로 수행되었다. 첫 번째 그룹(10마리 마우스 - 대조군 그룹 - 도 12A의 왼쪽 패널)에서는 마우스에 LV가 없는 인디애나(D13)(대조군)를 투여하고(D13)(화살표로 표시된 날짜), 4일 후 항PD-1 (Programmed cell Death protein-1) 단일 클론 항체(D17, 이후 D20, D22, D24, D28 및 D31)를 투여했다. 두 번째 그룹(12마리 마우스 - 대조군 그룹 - 도 12A의 가운데 패널)에서는 마우스에 본 발명(I-5759)에 따른 백신을 투여하고(D13)(화살표로 표시된 날짜), 4일 후 대조 항체(isotype ctrl)(D17, 이후 D20, D22, D24, D28 및 D31)를 투여했다. 세 번째 그룹(14마리 마우스 - 도 12A의 오른쪽 패널)에서는 마우스에 본 발명에 따른 백신(I-5759)을 투여하고(D13)(화살표로 표시된 날짜), 4일 후 항PD-1 단일 클론 항체(D17, 이후 D20, D22, D24, D28 및 D31)를 투여했다.

도 12B는 시간 경과(days - 가로 좌표)에 따른 각 그룹(대조군 그룹 1 : Ctrl Lenti; 대조군 그룹 2 : I-5759 + ctrl Ig; 그룹 3 : I-5759 + anti-PD-1)의 마우스 생존율(% of mice - 세로 좌표)을 나타낸다.

도 13A 및 13B는 Lenti-HPV-07 백신을 1회 접종한 후 TC1-nLuc 세포를 정맥주사 하여 폐 전이 병소를 유도한 마우스의 완치도를 나타낸다.

도 13A는 상기 세포를 상기 마우스에 정맥 주사한 후, 시간 경과(가로 좌표 - days)에 따라 여러 마우스 그룹에 주입된 TC1-nLuc 세포에 의해 안정적으로 발현되는 나노루시퍼레이즈에 의해 초당 광자 수(photons per second, p/s)(세로 좌표 - Total Flux)로 표현되는 발광 값의 변화를 나타낸다. 3개의 마우스 그룹을 테스트하였다: TC1-nLuc 세포를 주입하지 않은 마우스가 있는 음성 대조군  (n=11)(Neg Ctrl), TC1-nLuc 세포를 주입하고 5일째에 1.10⁹ TU의 Control Lenti(LV가 없는 인디애나)를 주입한 마우스가 있는 대조군  (n=11)(TC1 + Ctrl Lenti) 및 TC1-nLuc 세포를 주입하고 5일째에 1.10⁹ TU의 본 발명에 따른 백신(Lenti-HPV-07 (I-5759))를 주입한 마우스가 있는 그룹  (n=11)(TC1 + Lenti-HPV-07).

도 13B는 종양 주입 후 22일째에 상기 설명한 세 실험 그룹의 개별 마우스에 대한 개별 p/s 값을 나타낸다. 세로 좌표: 초당 광자 수(p/s)에 의해 표현되는 발광 값(Total Flux). 가로 좌표: 왼쪽에서 오른쪽으로: Neg Ctrl 그룹, Ctrl Lenti 그룹, Lenti-HPV-07 그룹.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0101] **정의**
- [0102] 본 출원에 사용된 모든 과학 및 기술 용어는 달리 명시되지 않는 한 당업계에서 일반적으로 사용되는 의미를 갖는다.
- [0103] 본 명세서에서 사용되는 "전이유전자(transgene)"는 재조합 기술을 통해 적절한 조건 하에서 비-천연(non-native) 환경 또는 이종 세포(heterologous cell)에서 발현될 수 있는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [0104] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합(recombinant)"은 본 발명의 세포와 관련하여 사용될 때, 내인성 및/또는 이종의 핵산 또는 단백질의 세포 도입 또는 천연(native) 세포의 변형에 의해 세포가 변형되었거나 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래되었음을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연(비-재조합) 형태에는 없는 유전자 또는 핵산을 발현하거나 천연(예: 내인성) 유전자를 천연 수준과 다른 수준으로 발현하거나 천연(예: 내인성) 유전자의 추가 또는 보충 사본을 천연 수준과 다른 수준으로 발현한다. 본 발명에 다른 분리된 세포는 본 발명에 따른 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터 및/또는 본 발명에 따른 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터 입자를 포함한다는 점에서 재조합이다.
- [0105] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합(recombinant)"은 벡터와 관련하여 사용될 때, 당업자에게 잘 알려진 유전공학 기술에 의해 형성/획득된 서열을 의미한다.
- [0106] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리펩타이드(polypeptide)"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기를 포함하고 5개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 의미한다. 아미노산은 한 글자 또는 세 글자 명칭으로 식별된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "단백질(protein)"은 "폴리펩타이드"라는 용어와 동의어이며, 2개 이상의 폴리펩타이드를 의미할 수도 있다. 따라서 "단백질", "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"라는 용어는 상호교환 하여 사용될 수 있다. 폴리펩타이드는 기능성을 추가하기 위해 선택적으로 변형(예를 들어, 글리코실화, 인산화, 아실화, 파네실화, 프레닐화, 술폰화 등)될 수 있다. 활성을 나타내는 폴리펩타이드는 효소라고 지칭될 수 있다. 유전자 코드의 축퇴의 결과로, 주어진 폴리펩타이드를 코딩하는 다수의 뉴클레오티드 서열이 생성될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.
- [0107] 본 명세서에서 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 물리적으로 연결되어 있고 서로 기능적 관계에 있는 2개 이상의 핵산 서열 요소를 의미한다. 예를 들면, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에서, 프로모터는 항원 구성체의 전사 또는 발현을 개시하거나 조절할 수 있기 때문에 본 명세서에서 "항원 구성체(antigen construct)"라고도 하는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되며, 이 경우 항원 구성체는 프로모터의 "제어 하에" 있는 것으로 이해되어야 한다. 일반적으로 두 개의 핵산 서열이 작동 가능하게 연결되면 동일한 방향에 있으며 일반적으로 동일한 해독틀(reading frame)에 있게 된다. 필수적인 것은 아니지만, 일반적으로 본질적으로 연속되어 있다.
- [0108] 용어 "암호화(encoding)" 또는 "코딩(coding for)"은 폴리뉴클레오티드가 전사 및 번역 메커니즘을 통해 아미노산 서열을 생성하는 과정을 의미한다.
- [0109] 각각 또는 관심 아미노산 서열에 대해 참조 서열이 본 명세서에 설명되어 있다. 본 설명은 또한 참조 아미노산 서열과 특정 비율의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0110] 명백한 이유로, 본 발명의 모든 설명에서, 각각 고려되는 뉴클레오티드 또는 아미노산 동일성을 준수하는 특정 핵산 서열 또는 특정 아미노산 서열은 추가로 원하는 생물학적 활성을 나타내는 단백질(또는 항원)을 얻는 것으로 이어져야 한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 2개의 핵산 서열 간 또는 2개의 아미노산 서열 간의 "동일성 비율(percentage of identity)"은 비교 창을 통해 최적으로 정렬된 두 서열을 비교하여 결정된다.
- [0111] 따라서 비교 창에서 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 부분은 두 서열 간 최적의 정렬을 얻기 위해 참조 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않는)과 비교하여 추가 또는 삭제(예를 들어 "갭(gap)")를 포함할 수 있다.
- [0112] 용어 "서열 상동성(sequence homology)" 또는 "서열 동일성(sequence identity)" 또는 "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적을 위해, 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 서열 상동성 또는 서열 동일성의 비율을 결정하기 위해, 최적의 비교 목적을 위해 서열을 정렬하는 것으로 정의된다. 두 서열 사이의 정렬을 최적화하기 위해 비교되는 두 서열 중 임의의 서열에 갭이 도입될 수 있다. 이러한 정렬은 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 수행될 수 있다. 또는, 정렬은 더 짧은

길이, 예를 들어 약 20개, 약 50개, 약 100개 이상의 핵산/염기 또는 아미노산에 걸쳐 수행될 수 있다. 서열 동일성은 보고된 정렬 영역에서 두 서열이 동일하게 일치하는 비율이다.

- [0113] 서열 비교 및 두 서열 간의 서열 동일성 비율 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있다. 당업자는 2개의 서열을 정렬하고 2개의 서열 사이의 동일성을 결정하기 위해 여러 가지 다른 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다는 사실을 인지할 것이다 (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley).
- [0114] 2개의 아미노산 서열 간 또는 2개의 뉴클레오티드 서열 간의 서열 동일성 비율은 2개의 서열 정렬을 위한 Needleman 및 Wunsch 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다 (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). 아미노산 서열과 뉴클레오티드 서열 모두 이 알고리즘으로 정렬할 수 있다. Needleman-Wunsch 알고리즘은 컴퓨터 프로그램 NEEDLE에서 구현되었다.
- [0115] 본 발명의 목적을 위해, EMBOSS 패키지의 NEEDLE 프로그램(버전 2.8.0 이상, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden J. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276 - 277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>)이 사용되었다. 단백질 서열의 경우 EBLOSUM62가 치환 매트릭스로 사용된다. 뉴클레오티드 서열의 경우 EDNAFULL이 사용된다. 사용되는 선택적 매개변수는 갭 오픈링 페널티 10과 갭 확장 페널티 0.5이다. 엔드 갭 페널티는 추가되지 않는다. 출력 섹션에서는 "간단한 동일성 및 유사성(Brief identity and similarity)" 및 "SRS pairwise"라는 질문에 대한 응답으로 예(Yes)를 출력 정렬 형식으로 표시하였다.
- [0116] 상기 기재된 바와 같이 프로그램 NEEDLE에 의해 정렬된 후 쿼리 서열(query sequence)과 본 발명의 서열 사이의 서열 동일성 비율은 다음과 같이 계산된다: 두 서열에서 동일한 아미노산 또는 동일한 뉴클레오티드를 나타내는 정렬에서 해당 위치의 수에서 정렬의 총 갭 수를 뺀 후 정렬의 총 길이로 나눈 값이다. 여기에 정의된 동일성은 NOBRIEF 옵션을 사용하여 NEEDLE에서 얻을 수 있으며 프로그램 출력에 "longest-identity"로 표시된다.
- [0117] 뉴클레오티드와 아미노산 서열의 유사성, 즉 서열 동일성 비율은 당업계에 알려진 여러 다른 알고리즘을 사용하여 서열 정렬을 통해 결정할 수 있으며, 바람직하게는 Karlin 및 Altschul의 수학적 알고리즘 (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), hmalign (HMMER package, <http://hmmerr.wustl.edu/>) 또는 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> 또는 GAP 프로그램에서 제공되는 CLUSTAL 알고리즘 (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80)이나 Myers 및 Miller의 수학적 알고리즘 (1989 - Cabios 4: 11-17) 또는 Clone Manager 9을 사용하여 결정할 수 있다. 사용되는 기본 매개변수는 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>에 설정된 기본 매개변수이다.
- [0118] 서열 동일성(서열 매칭)의 등급은 예를 들어 BLAST, BLAT 또는 Blastz (또는 BlastX)를 사용하여 계산할 수 있다. 유사한 알고리즘이 BLASTN 및 BLASTP 프로그램에 통합되어 있다 (Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410). BLAST 폴리뉴클레오티드 검색은 관련 단백질을 코딩하는 핵산과 상동성인 폴리뉴클레오티드 서열을 얻기 위해 BLASTN 프로그램(점수 = 100, 단어 길이 = 12)으로 수행된다.
- [0119] BLAST 단백질 검색은 SHC 폴리펩타이드와 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해 BLASTP 프로그램(점수 = 50, 단어 길이 = 3)으로 수행된다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 얻기 위해, Altschul 등((1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402)에 설명된 대로 Gapped BLAST를 활용한다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용하는 경우 해당 프로그램의 기본 매개변수가 사용된다. 서열 매칭 분석은 Shuffle-LAGAN(Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-162) 또는 Markov 랜덤 필드와 같은 확립된 상동성 매핑 기법으로 보완할 수 있다. 본 출원에서 서열 동일성의 비율이 언급되는 경우, 달리 구체적으로 명시되지 않는 한, 이러한 비율은 더 긴 서열의 전체 길이와 관련하여 계산된다.
- [0120] 특정 구현예에서, 두 서열 간의 % 동일성은 CLUSTAL O(버전 1.2.4)를 사용하여 결정된다.
- [0121] 본 명세서에서 사용되는 비종양성(non-oncogenic)은 전통적인 의미, 즉 종양 형성을 유발할 수 없는 요소, 본 명세서의 경우 항원과 관련된 의미로 사용된다. 다른 곳에서 상세히 설명된 바와 같이, 본 발명에서 구현된 항원은 비종양성이 되도록 유전적으로 수정되었다. 이러한 용어의 통상적인 의미에 따르면, 본 발명에 구현된 항원을 코딩하는 핵산 서열은 자연에서 발견되지 않으며, 핵산 서열의 삽입 또는 결실 또는 변형에 의해 변형되어 자연계에는 자연적으로 존재하지 않는 아미노산 서열을 암호화하게 된다.

- [0122] 당업자는 핵산 서열에서 결실, 치환 또는 삽입을 수행하기 위한 다양한 수단을 오랫동안 알고 있다.
- [0123] 당업자가 이해하는 바와 같이, 코딩 서열을 변형하여 특정 숙주에서의 발현을 향상시키는 것이 더욱 유리할 수 있다. 유전 암호는 64개의 가능한 코돈으로 구성되어 있지만, 대부분의 생물체는 이들 중 일부 코돈만을 주로 사용한다. 한 종에서 가장 자주 사용되는 코돈을 최적 코돈(optimal codon)이라고 하며, 자주 사용되지 않는 코돈은 희귀 코돈(rare codon) 또는 저사용 코돈(low-usage codon)으로 분류된다. 코돈은 "코돈 최적화(codon optimization)" 또는 "종 코돈 편향성 제어(controlling for species codon bias)"라고 하는 과정을 통해 숙주가 선호하는 코돈 사용을 반영하도록 코돈을 대체할 수 있다. 다른 숙주 세포에 대한 코돈 최적화는 코돈 사용표를 사용하여 쉽게 결정하거나 Integrated DNA Technologies의 CodonOp (www.idtdna.com/CodonOptfrom)와 같은 상용 소프트웨어를 사용하여 수행할 수 있다. 최적화된 코딩 서열은 특정 원핵생물 또는 진핵생물 숙주가 선호하는 코돈을 포함하며(Murray et al, 1989, Nucl Acids Res. 17: 477-508), 이는 예를 들어 번역 속도를 높이거나 최적화되지 않은 서열에서 생성된 전사체에 비해 반감기가 긴 전사체와 같은 바람직한 특성을 가진 재조합 RNA 전사체를 생성하기 위해 준비될 수 있다. 번역 종결 코돈은 숙주 선호도를 반영하도록 수정될 수도 있다. 예를 들어, 외떡잎식물의 일반적인 종결 코돈은 UGA인 반면, 곤충과 E.coli는 일반적으로 UAA를 종결 코돈으로 사용한다 (Dalphin et al, 1996, Nucl Acids Res. 24: 216-8).
- [0124] "비통합(non-integrative)" 렌티바이러스 벡터는 이 렌티바이러스 벡터가 세포 내에 있을 때 숙주 세포 유전체에 통합되지 않는다는 것을 의미한다. 비통합 렌티바이러스 벡터 입자는 비통합 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 입자에 관한 것이다. 이는 통합 결함(integration-defective) 렌티바이러스 벡터 또는 비통합된(non-integrating) 렌티바이러스 벡터라고도 할 수 있다.
- [0125] HPV 유발 암은 HPV(인유두종 바이러스)와 관련된 암으로도 알려져 있다. 실제로 HPV 감염이 감염된 숙주의 면역 체계에 의해 성공적으로 통제되지 않을 때 발생한다. 고위험 HPV 감염이 수년 동안 지속되면 세포 변화로 이어질 수 있으며, 치료하지 않으면 시간이 지남에 따라 악화되어 암이 될 수 있다.
- [0126] **본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터**
- [0127] 본 발명자들은 HPV 유발 암에 대한 새로운 치료 및 예방용 렌티바이러스 벡터 기반 백신을 고안하였다.
- [0128] 특히, 본 발명은 특정 비종양성 HPV 항원 그룹으로부터 선택된 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터에 관한 것이다.
- [0129] 서로 다른 핵산 서열이란, 렌티바이러스 벡터에 포함된 적어도 4개의 핵산 서열이 모두 다르다는 것, 즉 이들 각각이 특정 비종양성 HPV 항원 그룹의 다른 구성원이라는 것을 의미한다.
- [0130] 비종양성 HPV 항원 그룹은 다음과 같다:
- [0131] - 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열;
- [0132] - 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열;
- [0133] - 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열; 및
- [0134] - 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열.
- [0135] HPV 통합 후 소실되는 대부분의 HPV 단백질과 달리, E6 및 E7 단백질은 HPV 유발 종양에서 지속적으로 발현된다 (Ghittoni, Raffaella et al. Virus genes vol. 40,1 (2010): 1-13; Morrow, Matthew P et al. Expert review of vaccines vol. 12,3 (2013): 271-83). 이 단백질들은 세포 기능을 방해하고 HPV 관련 암 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Tomai ζ, Vjekoslav. Cancers vol. 8,10 95. 19 Oct. 2016; Ghittoni, Raffaella et al. Virus genes vol. 40,1 (2010): 1-13). E6 및 E7은 여러 경로를 방해하는 것으로 생각되지만 가장 중요한 것은 세포에서의 E6 단백질 발현이 세포 내 E3 유비퀴틴 리가아제인 E6AP와 직접 상호 작용하여 종양 억제인자 p53의 유비퀴틴 매개 분해를 유도한다는 것과(Huibregtse, J M et al. The EMBO journal vol. 10,13 (1991): 4129-35; Martinez-Zapien, Denise et al. Nature vol. 529,7587 (2016): 541-5), E7은 Rb 단백질에 결합하여 Rb와 E2F 간의 상호작용을 방해하고 E2F 인자를 방출한다는 것이다(Casseti, M Cristina et al. Vaccine vol. 22,3-4 (2004): 520-7).
- [0136] E6 및 E7 단백질은 모든 HPV 유발 암에서 발현되므로, 본 발명의 렌티 바이러스 벡터에 두 가지 주요 아형(HPV16 및 HPV18)에 대한 이들 단백질의 항원을 포함하기로 결정하였다. E6 및 E7 항원으로부터 백신을 개발하

기 위해서는 이러한 단백질과 관련된 발암 위험을 제거하는 것이 매우 중요하다.

- [0137] 따라서 본 발명에서는 비종양성 E6 및 E7 단백질이 구현된다. "비종양성 E6 및 E7 HPV 단백질"이란, 이들의 인코딩 서열이 PDZ 결합 모티프뿐만 아니라 p53, Mi2b 및 Rb 결합 부위를 제거하도록 변형되었음을 의미한다. 특정 구현예에서, E6 및 E7 HPV 단백질의 결합 부위의 부분적인 돌연변이가 Rb 결합을 완전히 제거할 수 없었기 때문에, 상기 부위는 특히 본 발명에서 구현된 서열로부터 완전히 제거되었다.
- [0138] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 RNA 또는 DNA 분자일 수 있다.
- [0139] 본 발명의 맥락에서, "렌티바이러스 벡터"는 시스-작용 렌티바이러스 RNA 또는 DNA 서열을 포함하고, 트랜스로 제공되는 필수 렌티바이러스 단백질(예를 들어, Gag, Pol 및/또는 Env) 및 보조 단백질(예를 들어, Tat, Rev)을 필요로 하는 전이유전자를 갖는 숙주세포의 형질도입을 위한 비복제성 벡터를 의미한다. 렌티바이러스 벡터는 모든 기능성 HIV 단백질의 발현이 결여되어 있다. 렌티바이러스 벡터 유전체는 상기 레트로바이러스 벡터의 생산 또는 개발 단계에 따라, RNA 또는 DNA 분자의 형태로 존재할 수 있다.
- [0140] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 렌티바이러스 벡터는 비통합 렌티바이러스 벡터이다.
- [0141] 비통합 렌티바이러스 벡터는 특히 백신 접종 목적으로, 삽입 돌연변이 유발과 관련된 잠재적인 종양 발생 위험을 완화하기 위해 설계되었다. 비통합 렌티바이러스 벡터의 예는 Coutant 등(PLOS ONE 7(11):e48644 (2012)), Karwacz 등(J. Virol. 83(7):3094-3103 (2009)), Negri 등(Molecular Therapy 15(9):1716-1723 (2007)) 및 Hu 등(Vaccine 28:6675-6683 (2010))에 제공된다. 결과적으로 비통합 렌티바이러스 벡터 시스템은 통합 시스템에 비해 삽입 돌연변이 유발의 잠재적 위험을 완화할 수 있는 것으로 보고되었다(Hu et al., Vaccine 28:6675-6683 (2010)). 일부 기능 분석에서 수지상 세포(DC)-지시 통합 결합 렌티바이러스 벡터(IDLV)에 의해 유발된 면역 반응의 규모와 질이 통합 시스템과 비슷하다는 것이 추가로 보고되었다. 따라서 통합 결합 렌티바이러스 벡터(IDLV)는 인체 투여를 위한 통합 벡터보다 더 안전한 벡터로 간주되어 왔으며 효과도 비슷하다.
- [0142] 또한, 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터의 바이러스 프로모터 및 인핸서 서열의 3' LTR의 U3 영역에서의 결실은 내인성 프로모터 활성화 가능성을 제한한다. 안전성에 대한 이러한 우려는 1998-1999년에 희귀한 형태의 X-연관(SCID-X1 유전자) 중증 면역 결핍 질환을 앓고 있는 어린이를 대상으로 Moloney 바이러스 기반 레트로바이러스 벡터로 수행된 SCID-X1 유전자 치료 실험에서 얻은 경험을 직접적으로 다룬다(Cavazzana-Calvo et al., 2000, Science., 288(5466):669-72). 이 실험에서 9명의 어린이 중 4명이 인간 LM02 원종양유전자(proto-oncogene)에 인접하게 이루어진 Moloney 유래 레트로바이러스 벡터의 통합으로 인해 백혈병에 걸렸다(Hacein-Bey-Abina et al., 2008, J.Clin.Invest., 118(9):3132-3142). 악성 종양은 바이러스 U3 프로모터/인핸서가 LM02 원종양유전자에 근접한 결과라는 것이 입증되었다. 결과적으로 안전성은 렌티벡터를 인간에게 투여할 때 주요 관심사이다.
- [0143] 따라서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 당업계에 공지된 바와 같이 시스의 긴 말단 반복(LTR) 서열을 포함할 수 있으며, 특히 U3 프로모터 서열이 없는 3' 긴 말단 반복(LTR)을 포함할 수 있다(Miyoshi H et al., 1998, J Virol. 72(10):8150-7; Zufferey et al., 1998, J Viro/ 72(12):9873-80).
- [0144] 인핸서는 원거리에서 전사 활성화자로 작용할 수 있는 시스-작용 서열이다. 이는 다양한 세포 유형, 특히 수지상 세포(DC)에서 전이유전자의 강력한 발현을 얻는 데 가장 효율적이기 때문에 바이러스 유래 벡터에 널리 사용되어 왔다(Chinnasamy et al., 2000, Hum Gene Ther 11(13):1901-9; Rouas et al., 2008, Cancer Gene Ther 9(9):715-24; Kimura et al., 2007, Mol Ther 15(7):1390-9; Gruh et al., 2008, J Gene Med 10(1) 21-32). 그러나 삽입 돌연변이 유발의 안전성 문제를 고려할 때, 이러한 전사 인핸서 서열을 렌티바이러스 벡터 구성에서 삭제하여 인핸서 근접 효과에 의한 삽입 돌연변이 유발 위험을 제거해야 한다. 이 인핸서 근접 효과는 삽입 돌연변이 유발의 가장 빈번한 메커니즘이며, 유전자 전달 후 종양이 발생한 인간 또는 동물 사례에서 설명되는 유일한 효과이다.
- [0145] 따라서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 구성적(constitutive) 인핸서 서열을 포함하지 않을 수 있다.
- [0146] 이전 연구에서는 바이러스 프로모터를 구조적복합체 클래스 II 유전자(MHC class II) (Kimura et al., 2007, Mol Ther 15(7):1390-9) 및 dectin-2 유전자(Lopes et al., 2008, J Virol 82(1):86-95)에서 유래한 수지상 세포(DC)-특이적 프로모터로 대체하는 것에 대해 보고했다.
- [0147] Lopes 등에서 사용된 dectin-2 유전자 프로모터는 추정 인핸서 및 아데노바이러스 보존 서열(아데노바이러스 프로모터의 역말단 반복(ITR))을 포함한다(Bonkabara et al., 2001, J. Immunology, 167:6893-6900). Kimura 등

이 사용한 MHC 클래스 II 유전자 프로모터에는 알려진 인헨서가 포함되어 있지 않다.

- [0148] 그러나 인헨서가 없으면 MHC 클래스 II 프로모터는 정맥 투여 시 수지상 세포(DC)에서 충분히 전이유전자가 발현되게 하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 특히, MHC 클래스 II 프로모터를 포함하는 렌티바이러스 벡터는 면역능력이 있는 C57BL/6 마우스에서 면역 반응을 유발하지 않았으며, 이는 CMV 프로모터/인헨서에서 관찰된 면역 반응과 대조적이었다. 마우스에 주입한 후 통합 및 지속적인 전이유전자 발현이 관찰되었지만, MHC 클래스 II 프로모터를 통해 전사된 렌티바이러스 벡터는 백신 보강 후에도 항원 특이적인 CD8+ 세포독성 T 림프구 반응을 자극하지 못했다. 따라서 이 연구의 저자들은 MHC 클래스 II 프로모터의 사용은 유전자 대체 요법처럼 발현의 지속성이 요구되는 응용 분야에만 흥미로울 뿐이며, 면역요법의 맥락에서는 그렇지 않다고 결론지었다. 참고로 MHC 클래스 II 프로모터는 대부분의 세포 유형에서 저조하게 발현된다.
- [0149] 따라서 MHC 클래스 II 프로모터는 정맥주사를 통해 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 렌티바이러스 벡터에 적절한 프로모터가 아니다. 또한, dectin-2 프로모터는 대부분의 세포 유형에서 저조하게 발현되며 인헨서를 포함하는 것으로 보인다. 따라서 dectin-2 프로모터는 안전상의 이유로 렌티바이러스 벡터에 적합한 프로모터가 아니다.
- [0150] 따라서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 MHC 클래스 I 프로모터를 포함할 수 있으며, 즉 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터의 항원을 코딩하는 핵산 서열은 MHC 클래스 I 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0151] 적절한 MHC 클래스 I 프로모터는 β 2- 마이크로글로불린 프로모터, HLA-A2 프로모터, HLA-B7 프로모터, HLA-Cw5 프로모터, HLA-E 프로모터 또는 HLA-F 프로모터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 구체적으로는 β 2- 마이크로글로불린 프로모터이다.
- [0152] MHC 클래스 I 프로모터는 신장, 평활근, 간 및 심장 세포에서의 발현보다 BDCA+ 수지상 세포에서의 프로모터 발현이 더 높다는 점에서 수지상 세포 특이적(APC)이다. 또한 다른 형질도입된 세포 유형에서도 상대적으로 높은 발현을 보이는데, 예를 들어 BDCA+ 수지상 세포에서의 프로모터 발현은 골격근 세포에서의 프로모터 발현의 12-100배에 불과한 반면, MHCII HLA-DR α 프로모터의 경우 900배에 달한다.
- [0153] 이 프로모터는 특히 본 발명의 렌티바이러스 벡터에서 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열의 전사를 유도한다.
- [0154] 상기 프로모터는 자연적으로 발생하거나 잘 알려진 분자생물학적 기술을 사용하여 얻은 합성 MHC 클래스 I 프로모터일 수 있다.
- [0155] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 EP2169073에 설명된 것과 같은 cPPT/CTS 서열을 포함할 수 있다. 이 cPPT/CTS 서열은 특히 서열번호 37로 표시되는 서열일 수 있다.
- [0156] 실제로, 비분열 세포에서 효율적인 통합 및 복제를 위해서는 일반적으로 렌티바이러스 유전체의 중심에 두 개의 시스-작용 서열, 즉 중앙 폴리퓨린 관(central polypurine tract, cPPT)과 중앙 종결 서열(central termination sequence, CTS)이 존재해야 한다. 이는 중앙 DNA "플랩(flap)"이라고 하는 삼중 가닥 DNA 구조의 형성으로 이어지며, 이는 핵 기공에서 사전-통합(pre-integration) 복합체의 코팅을 벗겨내고 수지상 세포와 같은 비분열 세포의 핵으로 발현 카세트를 효율적으로 가져오는 신호로 작용한다.
- [0157] 본 발명의 렌티바이러스 벡터는 생체 내에서 보다 안정적으로 전이유전자의 발현을 가능하게 하는 우드척 B형 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 요소(WPRE)를 포함할 수 있으며, 특히 우드척 B형 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 요소(WPRE)의 돌연변이 형태를 포함할 수 있다.
- [0158] 돌연변이 우드척 전사 후 조절 요소 (mWPRE)는 WPRE 영역에 포함된 X 단백질의 발현을 피하기 위해 점 돌연변이가 도입되는 것을 특징으로 하며, 이는 상기 X 단백질이 발암 특성을 가질 수 있기 때문이다(Kingsman et al., Gene Ther. 2005 Jan;12(1):3-4).
- [0159] 본 발명의 렌티바이러스 벡터에 포함된 우드척 B형 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 요소(WPRE)의 돌연변이 형태는 특히 서열번호 38로 표시되는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0160] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 특히 본 발명의 비통합 렌티바이러스 벡터는
- [0161] (i) 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열, 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열, 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열 및 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하고;

- [0162] (ii) U3 프로모터 서열이 없는 3' 긴 말단 반복(LTR)을 포함하고;
- [0163] (iii) 구성적 인핸서 서열을 포함하지 않고;
- [0164] (iv) MHC 클래스 I 프로모터, 특히 β 2-마이크로글로불린 프로모터를 포함하고;
- [0165] (v) 특히 서열번호 37로 표시되는 서열을 갖는 cPPT/CTS 서열을 포함하며; 그리고
- [0166] (vi) 특히 서열번호 38로 표시되는 핵산 서열을 갖는 우드척 B형 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 요소(WPRE)의 돌연변이 형태를 포함한다.
- [0167] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 다음을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [0168] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
- [0169] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
- [0170] - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열, 및
- [0171] - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열.
- [0172] 본 발명의 렌티바이러스 벡터의 HPV 항원을 코딩하는 적어도 4개, 특히 4개의 서로 다른 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 프로모터 서열의 제어 하에 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성할 수 있고, 구체적으로 (i) 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열 각각 사이에 연결 서열(본 명세서에서는 스페이서라고도 함)이 없는 경우 또는 (ii) 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열 중 적어도 2개 사이에 연결 서열(또는 스페이서)이 있는 경우일 수 있고, 보다 구체적으로 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열 각각 사이에 연결 서열이 있는 경우일 수 있다.
- [0173] 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0174] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 참조 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0175] 특히, 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0176] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 참조 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0177] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0178] 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0179] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0180] 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 68%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0181] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 아미노산 서열과 적어도 68%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 참조 아미노산 서열과 적어도 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일

성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0182] 특히, 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0183] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 참조 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0184] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0185] 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0186] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 16(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0187] 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 24로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0188] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 아미노산 서열과 적어도 60%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 참조 아미노산 서열과 적어도 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0189] 특히, 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0190] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 참조 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0191] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0192] 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0193] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0194] 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 83%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0195] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 아미노산 서열과 적어도 83%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 참조 아미노산 서열과 적어도 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0196] 특히, 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 30, 서열

번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.

- [0197] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 참조 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0198] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0199] 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 34, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0200] 특정 구현예에서, 비종양성 인유두종 바이러스 18(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 서열번호 34, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가지는 것일 수 있다.
- [0201] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 다음을 포함한다:
- [0202] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원(이하, 본 명세서에서 noE6-HPV16이라고도 함)을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
- [0203] - 비종양성 인유두종바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원(이하, 본 명세서에서 noE7-HPV16이라고도 함)을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열,
- [0204] - 비종양성 인유두종바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원(이하, 본 명세서에서 noE6-HPV18이라고도 함)을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열, 및
- [0205] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원(이하, 본 명세서에서 noE7-HPV18이라고도 함)을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열.
- [0206] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 특히 본 발명의 비통합 렌티바이러스 벡터는
- [0207] (i) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열; 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열; 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 및 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며;
- [0208] 상기 비종양성 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하며; 단일 프로모터 서열의 제어 하에 있으며, 보다 구체적으로 이들 각각 사이에 임의의 연결 서열의 부재 하에 있으며;
- [0209] (ii) U3 프로모터 서열이 없는 3' 긴 말단 반복(LTR)을 포함하고;
- [0210] (iii) 구성적 인핸서 서열을 포함하지 않고;
- [0211] (iv) MHC 클래스 I 프로모터, 특히 β 2-마이크로글로불린 프로모터를 포함하고;
- [0212] (v) 특히 서열번호 37로 표시되는 서열을 갖는 cPPT/CTS 서열을 포함하고; 그리고
- [0213] (vi) 특히 서열번호 38로 표시되는 핵산 서열을 갖는 우드척 B형 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 요소(WPRE)의 돌연변이 형태를 포함한다.
- [0214] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 보다 구체적으로 다음을 포함할 수 있다:
- [0215] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열로서, 상기 핵산 서열은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열이고, 특히 상기 핵산 서열은 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 핵산 서열;
- [0216] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열로서, 상기 핵산 서

열은 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열이고, 특히 상기 핵산 서열은 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 핵산 서열;

- [0217] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E6 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열로서, 상기 핵산 서열은 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열이고, 특히 상기 핵산 서열은 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22 및 서열번호 23으로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 핵산 서열; 및
- [0218] - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열로서, 상기 핵산 서열은 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열이고, 특히 상기 핵산 서열은 서열번호 30, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 것인 핵산 서열;
- [0219] 상기 비종양성 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하며; 단일 프로모터 서열의 제어 하에 있으며, 보다 구체적으로 이들 각각 사이에 임의의 연결 서열의 부재 하에 있음.
- [0220] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 특히 본 발명의 비통합 렌티바이러스 벡터에서 HPV 항원을 코딩하는 적어도 4개, 특히 4개의 서로 다른 핵산 서열은 전통적인 5'부터 3'으로의 관독 방향(5' 말단에서 3' 말단으로)에서 임의의 순서로 존재할 수 있다.
- [0221] 특히, 상기 정의된 바와 같이, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 특히 본 발명에 따른 비통합 렌티바이러스 벡터의 24가지 가능한 조합 중에서, HPV 항원 noE6-HPV16, noE7-HPV16, noE6-HPV18 및 noE7-HPV18을 코딩하는 4개의 서로 다른 핵산 서열은 전통적인 5' 말단에서 3' 말단으로의 관독 방향에서 임의의 순서로 배치될 수 있다.
- [0222] 특정 구현예에서, 5' 말단에서 3' 말단에 이르는 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는 다음으로 이루어진 군에서 선택된다:
- [0223] (a) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열;
- [0224] (b) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열;
- [0225] (c) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열; 및
- [0226] (d) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열,
- [0227] 상기 비종양성 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하며; 단일 프로모터 서열의 제어 하에 있으며, 보다 구체적으로 이들 각각 사이에 임의의 연결 서열이 부재 하에 있다.
- [0228] 이러한 순서는 도 8A 내지 8D에 도시되어 있다.
- [0229] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에서 5' 말단부터 3' 말단까지 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는 보다 구체적으로 다음과 같을 수 있다:
- [0230] (d) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 코딩하는 핵산 서열,

- [0231] 상기 비종양성 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하며; 단일 프로모터 서열의 제어 하에 있으며, 보다 구체적으로 이들 각각 사이에 임의의 연결 서열이 부재 하에 있다.
- [0232] 바람직하게는, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에서 5' 말단에서 3' 말단까지, 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는 다음과 같다:
- [0233] (a) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열,
- [0234] 상기 비종양성 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하며; 단일 프로모터 서열의 제어 하에 있으며, 보다 구체적으로 이들 각각 사이에 임의의 연결 서열이 부재 하에 있다.
- [0235] 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에서 5' 말단에서 3' 말단까지, 적어도 4개의 서로 다른 핵산 서열의 순서는 다음과 같다:
- [0236] (a) 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV16) 단백질을 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 E7 항원을 코딩하는 핵산 서열 - 비종양성 인유두종 바이러스(HPV18) 단백질을 E6 항원을 코딩하는 핵산 서열,
- [0237] 상기 비종양성 HPV 항원을 코딩하는 핵산 서열은 특히 함께 융합되어 단일 항원 융합 단백질을 코딩하는 단일 항원 핵산 서열을 형성하며; 상기 핵산 서열들 각각 사이에 연결 서열이 없는 상태에서 단일 프로모터 서열의 제어 하에 있다.
- [0238] 이들 4개의 서로 다른 항원 구성체 그룹은 본 실시예에서 각각 다음과 같이 구현되었다:
- [0239] - 2021년 10월 21일 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터(상기 순서(a));
- [0240] - 2021년 10월 21일, 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5760로 제출된 렌티바이러스 벡터(상기 순서(b));
- [0241] - 2021년 10월 21일, 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터(상기 순서(c)); 또는
- [0242] - 2021년 10월 21일, 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터(상기 순서(d)).
- [0243] 따라서, CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체는 서열번호 41로 표시되는 다음의 뉴클레오티드 서열을 갖는다:
- [0244] atgcccgagacacccccaccctgcacgaat acatgctggacctgcagcccgaaccaccgacccccgaccgctcactacaacatcgttacatctctgtgtgtaaatgcgactccaccctgagaagatgcgtgcagtcacccacgtggacatcaggacctggaggacctcctcatgggaacctgggtatcgtctgccccatcgcctcccaggcttttcaggacccccaggaaaggccaggaagtgcgccagctctgcaccgaactgcagaccacatcatgacatcatcctcgaatgcgtgtactgcaagcagcagctcctgaggagggaggtgtacgatctgccttcagagacggctgtatcgtctacaggaacccctatgccgtctgcgacaaatgcctgaagttttatccaagatctccgagtacaggcactattgctacagcctgtatgggaccacctggagcagcagtaacaacagccctgtgcgacctcctgatcagggtgcataactgccagaagccctgaggttcacaacatccgcggcaggtggaccggaaggtgcatactgctgcaggtccgcccggccccggacctaaagccacctccaggacatcgtttctccacctggagccccagaacagatccccctggactcagaagaggagaacgacgagatcgacggcgtcaaccaccagcacctgccccgctgcagagccgaacccagagacacacatgctctgcatgtgctgcaaatgcgaagcccgat taagtgggtggaaagcagcggcagcatctgagggccttcagcagctcttctcaacacctgtccttcgtgtgccctgggtggcgagcccgtagaacatccccacaagctgcccgatctgtgcacagagctgaacacctcctgcaggacatcgagatcacctgcgtctactgcaagacctgctggaactgaccgaggtgttcgaattcgccctcaaggacggcttcgtgggtacaggacagcatccccacggcctgccataagctggagaactgaccaacaccggactgtataacctgctgatcaggtgtctgaggtgcagaagcagagaaactgagacatctgaacgagaaaaggaggttcacaatatgcccggcactgataa (서열번호 41)
- [0245] 그리고 서열번호 42로 표시되는 다음의 아미노산 서열을 암호화한다:
- [0246] MPGDTPPLHEYM L D L Q P E T T D P D R A H Y N I V T F C C K C D S T L R R C V Q S T H V D I R T L E D L L M G T L G I V C P I A S Q A F Q D P Q E R P R K L P Q L C T E L Q T T I H D I I L E C V

YCKQQLRREYVDFAFRDGCI VYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRC INQCPLRFHNI RGRWTGRMSSCRSAGPGPK
ATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQLFLNLSFVCPWVGEPRGRTIPYKLPDLC
TELNTSLQDIEITCVYCKTVLEL TEVFEFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRHLNEKRRFHN IAGH (서열번호
42)

[0247] CNCM에 수탁번호 I-5760으로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체는 서열번호 43으로 표시되는 다음의 뉴클레오티드 서열을 갖는다:

[0248] Atgttccaggacccccaggagagggccccggaagtgtccccagctgtgcaccagctgcagaccaccatccacgacatcatcctcgaatgcgtgactgcaag
cagcagctgctgaggagggagggtgtatgactttgccttcagagacggatgcatgtctacaggaaccctacgacctgtgcgacaaatgcctgaagtctac
tccaagatcagcgagtagcagcactactgctactccctgtacggcaccacctcgaacagcagtagcaacaaccctgtgcgacctcctgattagtgatc
aactgccagaagcccctcaggttccacaacatccgcccggcctggaccggccgatgcatgtcttgcctgcaggggccccgacgacctacaagctccccgac
ctgtgcaccgaactcaacacctccctgcaggacatcgagatcacctgcgtgtatgcaagaccgtgctggagctgaccgaggttttcgaatttgcctttaag
gacggcttctgctgtatagggactccatccccacggcctgccatagctggagaagctcacaacaccggactgataatctgctgatcagtgctc
aggtgccagaaggcagaaaagctgaggcatctcaacgagaagcggcttccacaatattgcccggccccggagacccccacactccatgagtagatgctc
gacctgcagcccgaaccaccgacccccagagaccactacaacatcgtgaccttctgctgcaagtgcgactccacctgagaagatgcgtgcagtcacc
cacgtggacatccgacactcgaagacctgctgatgggaacctgggcatcgtgtgccccatcggccccgatgacaagccaccttgcaggacatcgtgctg
cacctggaaccacagaacagatccccgtcgactccgaagaagaaaacgacgaaatcgacggagtagaacaccagcactgcccgcagaaggcccgacct
cagagacacacatgctctgcatgtgctgcaaatgcaagccaggatagctgggtggtagagcagcggcagacctgagggccttccagcagctcttc
ctgaacacactgctctgctgtccccctgggctgataa (서열번호 43)

[0249] 그리고 서열번호 44로 표시되는 다음의 아미노산 서열을 암호화한다:

[0250] MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDII ILECVYCKQQLRREYVDFAFRDGCI VYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRC I
NCQKPLRFHNI RGRWTGRMSSCRGPDOPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLEL TEVFEFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCL
RCQKAEKLRHLNEKRRFHN IAGPGDTPTLHEYMLDLQPETTPDRAHYNI VTFCKCDSTLRRCVQSTHVDIRTLEDLLMGLGIVCP IGPDDKATLQDIVL
HLEPQNEIPVDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQLFLNLSFVCPWA (서열번호 44)

[0251] CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체는 서열번호 45로 표시되는 다음의 뉴클레오티드 서열을 갖는다:

[0252] atgaggcggccctacaagctgcccagctgtgcaccagctgaacacctccctgcaggacatcgagatcacctgcgtgactgcaagaccgtgctggagctg
accgaggtgttcgaattcgattcaaggacggattcgtcgtgtatagggacagcatccacacggcggcctgccacaagctggagaaatgactaacaccgga
ctgtatctgctgatccggtgacctgaggtgtcagaagccgagaagctgaggcatctgaacgagaaaaggagatccacaatattcggcggacctccag
gacccccaggagagggccaggaaactgccccagttgtgcaccagctccagacaacctccacgacatcatcctggagtgcgtgactgt aagcagcagttg
ctgaggagagaggtgtatgacttgccttcagagacggatgcatgtctataggaaccctacgacctgtgcgacaagtgcctgaagtctactccaagatc
agtgagtacaggcatctactgtacagcctgtatggaaccacactggaacagcagtagcaacaagccctgtgcgacctcctgat tagtgatcaactgccag
aagcccctcaggttccacaacatccggggcaggtggaccggaaggtgcatgtcctgctgcaggtccgcccggccccggacctaaagccacctccaggacatc
gtgctgcacctggagccccagaacgagatccccgtcgactcagaggaggagaacgacgaaatgacggcgtcaaccaccagcactgcccgtcgcagagcc
gaacccagagacacacatgctctgcatgtgctgcaaatgcaagccggatagctgggtggtagagctccgcccagcatctgagagccttccagcag
ctcttctgaacacctgctctcgtgtgccccctgggcccgtccgggtgacacacctacctgcagcagtagatgctcgatctgcagcccagaccaccgac
cccgatcgcgcacactacaacatcgtgaccttctgctgcaaatgtgacagcaccctgagacggctgcgtccagtcacccacgttgacatccgacacctcgaa
gacctgctcatgggaacctgggcatcgtgtgccccatcgctgataa (서열번호 45)

[0253] 그리고 서열번호 46으로 표시되는 다음의 아미노산 서열을 암호화한다:

[0254] MRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLEL TEVFEFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRHLNEKRRFHN IAGHFQ
DPQERPRKLPQLCTELQTTIHDII ILECVYCKQQLRREYVDFAFRDGCI VYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRC INQC
KPLRFHNI RGRWTGRMSSCRSAGPGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQ
LFLNLSFVCPWAGPGDTPTLHEYMLDLQPETTPDRAHYNI VTFCKCDSTLRRCVQSTHVDIRTLEDLLMGLGIVCP IAG (서열번호 46)

[0255] CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체는 서열번호 47로 표시되는 다음의 뉴클레오티드 서열을 갖는다:

[0256] atgggcctaaagccacctgcaggacatcgtgctgacctggagccccagaacgagatccccgtggacagcaggaggagaacgacgaaatcgacggcgtg
aaccaccagcactgcccgaagaaggccgaacccagagcacacatgctctgcatgtgctgcaaatgcaagccaggatcaagctgggtggaaagc
agcggcagcagatctgaggcattccagcagctgttctgaacacctctcctcgtgtgccccctggggaacccggcaggacatccccataaactgcccagc

ctctgcaccgagctgaacacctccctgcaggacattgagatcacctgcgtctactgcaaacctgctggaactgaccgaggtgtcgagtgccttcaaa
gacggcttcgtcgtgtacagggacagcatccccacggcctgccat aagctggagaaactgaccaacaccggcctgtacaacctgctgatccgggtgcctg
agatgtcagaagccgagaaactgaggcacctcaacgagaaaaggagattccacaatatgccgggcccggcgacaccccaacctgcacgaatacatgctc
gacctgcagcccgaaccaccgacccccgacagagcccactacaacatcgtgaccttctgctgcaagtgcgactccacctgagaagatgctgagctccacc
cacgtggacatccgcacactcgaagacctgctgatgggaacctgggcatcgtgtgccccatcgcttcccaggccttccaggacccccaggaacggccaaga
aagctgccccagctctgcaccgaactgcagaccaccatccacgacatcatcctggaatgcgtctactgt aagcagcagttgctgaggaggaggtgatgat
ttcgcttcagagacggtgcatcgtctacaggaacctcagccgtgtgacgacaaatgctgaagtctactccaagatctccgaat acagacactat tgc
tacagcctgtacggcaccacctcgaacagcagtaacaacaacctgtgacacctcctgatcaggtgcatcaactgccagaagccctccggttccacaac
atccgaggaagatggaccggccggtgcatgtcctgctgcaggtcctgataa (서열번호 47)

[0257] 그리고 서열번호 48로 표시되는 다음의 아미노산 서열을 암호화한다:

[0258] MGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQLFLNLSFVCPGEPGRTIPYKLPD
LCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTVFVFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRHLNEKRRFHN IAGPDTPTLHEYML
DLQPETTPDRAHYNI VTFCKCDSTLRRVCQSTHVDIRTLEDLLMGLGIVCPIASQAFQDPQERPKLPQLCTELQTTIHD IILECVYCKQQLLRREYVD
FAFRDGCIVYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLQYQNKPLCDLLIRCINQKPLRFHNIRGRWTGRMSSCCRS (서열번호 48)

[0259] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 특히 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 상기 핵산 서열은 특히 서열번호 41의 핵산 서열일 수 있다.

[0260] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 참조 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 참조 아미노산 서열과 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0261] 따라서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 보다 구체적으로 CNCM에 수탁번호 I-5759, I-5760, I-5761 및 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 구체적으로는 CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터이다. 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터는 바람직하게는 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터일 수 있으며, 따라서 바람직하게는 서열번호 41의 핵산 서열을 포함한다.

[0262] **본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 입자**

[0263] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터, 특히 상기 정의된 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자에 관한 것이다.

[0264] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터를 포함하는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 입자는 세포, 예를 들어 HEK 293T 인간 배양 세포를 상이한 DNA 플라스미드로 일시적 형질감염 시 당업계에서 알려진 제조법 기술에 의해 제조될 수 있다:

[0265] (i) 적어도 Gag, Pol, Rev, Tat 및 경우에 따라서는 전달체의 패키징에 필요한 구조 및 효소 단백질을 발현하는 패키징 플라스미드;

[0266] (ii) 패키징, 역전사 및 통합에 필요한 발현 카세트(항원) 및 HIV 시스-작용 인자를 포함하는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터; 및

[0267] (iii) 외피를 코딩하는 플라스미드, 대부분의 경우 수포성 구내염 바이러스(VSV.G)의 당단백질로, 단백질은 다양한 세포, 특히 수지상 세포(DC)를 포함한 주요조직항성(MHC) 항원 제시 세포(APC)를 표적으로 할 수 있는 혼합 입자(pseudotype)를 형성할 수 있음.

[0268] 이러한 방법은 본 발명에 따른 제조법 벡터 입자를 생산할 수 있으며, 다음의 단계를 포함한다:

[0269] i) 적절한 숙주 세포를 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터로 형질감염 시키는 단계;

[0270] ii) 레트로바이러스(바람직하게는 렌티바이러스)의 적어도 구조 및 증합효소 활성을 코딩하는 바이러스 DNA 서열을 포함하는 패키징 플라스미드 벡터로 상기 숙주 세포를 형질감염시키는 단계; 이러한 패키징 플라스미드는 예를 들어 관련 기술분야에 기술되어 있다(Dull et al., 1998, J Virol, 72(11):8463-71; Zufferey et al., 1998, J Virol 72(12):9873-80).

[0271] iii) 상기 렌티바이러스 벡터의 발현 및 렌티바이러스 벡터 입자로의 패키징을 위해 상기 형질감염된 숙주 세포

를 배양하는 단계; 및

- [0272] iv) 상기 배양된 숙주 세포에서 상기 iii)단계의 발현 및 패키징의 결과로 생성된 렌티바이러스 벡터 입자를 수확하는 단계.
- [0273] 본 발명의 레트로바이러스 입자를 위형화(pseudotype)하기 위해, 숙주 세포는 바이러스 외피 단백질(들)을 코딩하는 하나 이상의 외피 DNA 플라스미드(들), 바람직하게는 VSV-G 외피 단백질을 추가로 형질감염될 수 있다.
- [0274] 이 절차를 통해 형질감염된 세포로부터 렌티바이러스 입자 벡터를 일시적 생산할 수 있다. 그러나 패키징 유전자, 프로바이러스 코딩 DNA 및 외피 유전자를 세포 유전체에 안정적으로 삽입함으로써 세포에서 렌티바이러스 입자 벡터를 지속적으로 생산할 수도 있다. 이를 통해 일시적 형질감염 없이도 세포에서 렌티바이러스 입자 벡터를 지속적으로 생산할 수 있다. 물론 이러한 절차를 조합하여 사용할 수 있으며, 일부 DNA/플라스미드는 세포 유전체에 통합되고 다른 일부는 일시적 형질감염을 통해 제공될 수 있다.
- [0275] 렌티바이러스 벡터 입자는 비통합 렌티바이러스 벡터 입자일 수 있다. 비통합 벡터 입자는 렌티바이러스 벡터 입자의 통합 능력의 대부분 또는 전부를 제거하는 하나 이상의 돌연변이를 가지고 있다. 예를 들어, 비통합 벡터 입자는 렌티바이러스 pol 유전자에 의해 코딩된 인테그레이즈에 통합 능력을 감소시키는 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0276] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 입자는 특히 본 발명의 비통합 렌티바이러스 벡터를 포함한다.
- [0277] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 입자는 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSVG), 특히 VSV-G 인디애나 혈청형 또는 VSV-G 뉴저지 혈청형을 포함할 수 있다.
- [0278] 백신 접종 전략과 관련하여, 위형의 렌티바이러스 벡터 입자는 면역 체계가 이미 렌티바이러스에 대한 면역을 형성시킨 경우 면역 체계에서 벗어날 가능성이 더 높다. 이는 질병에 대해 환자를 면역시키기 위해 유사한 입자 벡터를 연속적으로 주입해야 할 때 특히 유용하다.
- [0279] 렌티바이러스 벡터 입자는 HIV-1 Gag 및 Pol 단백질, 특히 HIV-1 서브타입 D Gag 및 Pol 단백질을 포함할 수 있다.
- [0280] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 또는 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는(즉, 형질전환된) 분리된 세포에 관한 것이다.
- [0281] 본 발명에 따른 세포는 바람직하게는 포유류 세포, 특히 인간 세포이다. 더 바람직하게는 인간 비분열 세포이다.
- [0282] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 입자 또는 본 발명에 따른 세포를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0283] 본 발명에 따른 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 배양액을 포함한다.
- [0284] "약학적으로 허용되는 배양액"은 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포를 개체에 게 가용화하여 전달하는 데 사용되는 임의의 용액을 의미한다. 바람직한 약학적으로 허용되는 담체는 식염수이다. 바람직한 실시양태에서, 약학적으로 허용되는 배양액은 보조제를 포함한다.
- [0285] 적절한 생리적으로 허용되는 배양액 및 그 제형은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences(Remington's Pharmaceutical Sciences, (20th edition), ed. A. Gennaro, 2003, Lippincott Williams & Wilkins)에 개시되어 있다.
- [0286] **본 발명에 따른 구현예**
- [0287] 본 발명의 목적은 약제 또는 백신으로 사용하기 위한 본 발명의 렌티바이러스 벡터, 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 본 발명의 분리된 세포에 관한 것이다.
- [0288] 특히, 본 발명의 목적은 HPV 유발 암 및 이의 전이, 특히 HPV 유발암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 본 발명의 렌티바이러스 벡터, 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 본 발명의 분리된 세포, 특히 본 발명에 따른 백신 조성물의 형태에 관한 것이다.
- [0289] 앞서 언급한 바와 같이, HPV 유발 암은 HPV 감염에 의해 유발되는 암이다. 암에서 HPV를 검출하는 방법은 당업계에 알려져 있다 (Aldo Venuti and Francesca Paolini; Head Neck Pathol. 2012 Jul; 6(Suppl 1): 63-74).

- [0290] HPV 유발 암은 특히 자궁경부암, 질암, 외음부암, 음경암, 항문암 및 구인두암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0291] 본 발명에 따른 이러한 암의 전이는 특히 폐 전이일 수 있다.
- [0292] 이러한 예방 및/또는 치료는 고려되는 유효성분, 특히 상기 정의된 본 발명의 백신 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 의미한다.
- [0293] 이를 필요로 하는 개체는 동물, 특히 포유동물이며, 보다 구체적으로는 인간일 수 있다.
- [0294] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 당업자가 쉽게 결정할 수 있는 면역학적 반응을 유도하기에 충분한 용량으로 통상적인 방법에 의해 이를 필요로 하는 개체에게 투여된다.
- [0295] 따라서 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 하기 기재된 바와 같이 정맥 내 또는 근육 내로 투여될 수 있다.
- [0296] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 대안적으로 비강 내로 투여될 수 있다. 이러한 투여 경로는 구인두암 및/또는 폐 전이의 치료 또는 예방에 특히 유용하다.
- [0297] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 치료적 유효량으로 투여되며, 특히 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에 대하여 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 또는 적어도 1×10^9 TU(Transduction units)에 대응하는 용량으로 투여될 수 있으며, 구체적으로는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에 대하여 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 TU 또는 적어도 1×10^9 TU에 대응하는 용량으로 투여될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에 대하여 적어도 1×10^7 TU에 대응하는 용량, 보다 구체적으로는 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에 대하여 적어도 1×10^8 TU에 대응하는 용량, 특히 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터에 대하여 적어도 1×10^9 TU에 대응하는 용량으로 투여된다.
- [0298] "치료적 유효량"은 예를 들어 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 또는 백신 조성물의 양이 대상체에서 다음 효과 중 하나 이상을 발생시키는 데 필요한 양을 의미한다: HPV 유발 종양에 대한 면역 반응; HPV 유발 종양의 크기 감소(즉, 투여 당시 종양 크기와 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 감소); 투여 후 5일 내지 45일 동안 HPV 유발 종양에서 CD8+ 및/또는 CD4+ 침윤의 증가; 투여 후 5일 내지 45일 동안 HPV 유발 종양에서 CD25+FoxP3+CD4+ 조절 T 세포(Treg)의 감소.
- [0299] 투여는 예를 들어 정맥주사, 근육주사, 비강주사, 복강주사 또는 피하주사, 특히 정맥주사, 비강주사 또는 근육주사를 포함하는 잘 알려진 경로를 사용하여 수행될 수 있으며, 정맥주사 또는 근육주사일 수 있다.
- [0300] 적절한 용량과 용법은 여러 요인에 따라 종과 개체 간에 분명히 달라질 수 있다. 예를 들어, 인간의 경우 효과적인 면역 반응을 위해서는 일반적으로 마우스에 비해 더 많은 용량이 필요하다.
- [0301] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 예를 들어, 실시예에 예시된 바와 같이 단일 용량으로 투여하거나 2회 이상의 투여로 투여할 수 있다. 전문가는 각 경우에 본 발명에 따른 유효성분의 투여를 위한 적절한 용법 및 용량을 결정할 것이다.
- [0302] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자, 세포 및 백신 조성물은 적어도 하나의 면역 관문 억제제(immune checkpoint inhibitor, ICI)와 함께 투여하는 것이 유리할 수 있다.
- [0303] 본 발명에 따른 면역 관문 억제제(ICI)는 특히 항체, 특히 항PD-1, 항PD-L1(PD-1 Ligand), 항CTLA-4(Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), 항NKG2A, 항TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), 항TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 또는 항LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3) 항체일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 항PD-1, 항PD-L1, 항CTLA-4, 항NKG2A, 항TIM-3, 항TIGIT 및 항LAG-3 단일 클론 항체로 이루어진 군에서 선택된 단일 클론 항체일 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명에 따른 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 항PD-1, 항PD-L1, 항CTLA-4, 항NKG2A, 항TIM-3 및 항TIGIT 단일 클론 항체로 이루어진 군에서 선택된 단일 클론 항체일 수 있다.

다.

- [0304] 본 발명에 따른 면역 관문 억제제(ICI)는 보다 구체적으로 항체, 특히 항PD-1, 항PD-L1(PD-1 Ligand), 항CTLA-4(Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), 항NKG2A, 항TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), 항TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 또는 항LAG-3(Lymphocyte-activation gene 3) 항체일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 항체, 특히 항PD-1, 항PD-L1(PD-1 Ligand), 항CTLA-4(Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), 항NKG2A, 항TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) 또는 항TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) 항체일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 적어도 하나의 면역 관문 억제제는 항PD-1, 항PD-L1, 항CTLA-4, 항NKG2A, 항TIM-3, 항TIGIT 및 항LAG-3으로 이루어진 군에서 선택된 단일 클론 항체일 수 있으며, 특히 항PD-1, 항PD-L1, 항CTLA-4, 항NKG2A, 항TIM-3 및 항TIGIT 단일 클론 항체로 이루어진 군에서 선택된 단일 클론 항체일 수 있다.
- [0305] 항PD-1 단일 클론 항체는 예를 들어 니볼루맵(Nivolumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab) 및 세미플리맵(Cemiplimab)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0306] 항PD-L1 단일 클론 항체는 예를 들어 아테졸리주맵(Atezolizumab), 아벨루맵(Avelumab) 및 더발루맵(Durvalumab)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0307] 항CTLA-4 단일 클론 항체는 예를 들어 이필리무맵(ipilimumab), 트레멜리무맵(tremelimumab) 및 콰본리무맵(quavonlimab)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0308] 항NKG2A 단일 클론 항체는 예를 들어 모날리주맵(monalizumab)일 수 있다.
- [0309] 항TIM-3 단일 클론 항체는 예를 들어 Sym023 및 사바톨리맵(sabatolimab)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0310] 항TIGIT 단일클론 항체는 예를 들어 티라골루맵(tiragolumab)일 수 있다.
- [0311] 항LAG-3 단일 클론 항체는 예를 들어 릴랏리맵(relatlimab)일 수 있다.
- [0312] 특히, ICI는 항PD-L1 또는 항PD-1 단일 클론 항체일 수 있으며, 특히 항PD-1 단일 클론 항체일 수 있다.
- [0313] 본 발명에 따라 사용하기 위한 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포와 면역 관문 억제제는 동시에 또는 이시에 투여될 수 있다.
- [0314] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터와 면역 관문 억제제를 실시예에서 설명된 바와 같이 병용할 때 얻을 수 있는 예상치 못한 상승적 유리한 특성을 고려하면, 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터를 사용한 백신 접종은 면역 관문 억제제 치료, 특히 항PD-1 치료에 적합한 환자의 수를 증가시킬 수 있을 것으로 예상할 수 있다.
- [0315] 동시 투여로는, (i) 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포와 (ii) 면역 관문 억제제는 동일한 순간 또는 동일한 날 또는 며칠까지 투여될 수 있는 것으로 이해된다. 이 경우, 이들은 동일한 조성물 또는 별도의 조성물로 투여될 수 있다.
- [0316] 이시 투여로는, (i) 본 발명에 따른 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포와 (ii) 면역 관문 억제제는 적어도 수일, 예를 들어 적어도 2일의 차이를 두고 투여될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0317] 특히, (i) 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포와 (ii) 면역 관문 억제제가 이시에 투여되는 경우, 본 발명에 따른 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포는 면역 관문 억제제보다 먼저 투여될 수 있다.
- [0318] 유리하게는, 본 발명에 따른 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포는 면역 관문 억제제 투여 전 적어도 2일, 특히 적어도 4일 전에 투여될 수 있다. 따라서, 면역 관문 억제제는 본 발명에 따른 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포 투여 후 적어도 2일, 특히 적어도 4일 후에 투여되는 것이 유리할 수 있다. 보다 구체적으로, 면역 관문 억제제는 본 발명에 따른 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포 투여 후 4일 내지 1개월 후, 구체적으로는 4일 내지 15일 후, 더 구체적으로는 본 발명에 따른 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포 투여 후 4일 내지 10일 후에 투여될 수 있다.
- [0319] 본 발명에 따라 사용하기 위한 백신 조성물, 렌티바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 입자 또는 세포 및 면역 관문 억제제는 동일한 경로 또는 상이한 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0320] 본 발명의 적어도 하나의 면역 체크포인트 억제제는 치료적 유효량, 즉 투여에 따른 효과를 생성하는 용량으로

투여된다. 면역 관문 억제제의 정확한 용량은 치료 목적에 따라 달라지며, 당업자가 공지된 기술을 사용하여 확인할 수 있다.

[0321] 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 개체에서 HPV 유발 암을 치료 및/또는 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명의 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터, 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 본 발명의 분리된 세포, 특히 본 발명에 따른 백신 조성물의 형태로 상기 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0322] 본 발명은 또한 본 발명의 적어도 하나의 렌티바이러스 벡터, 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자 또는 본 발명의 분리된 세포, 특히 본 발명에 따른 백신 조성물의 형태로의 용도에 관한 것으로서, 이를 필요로 하는 개체의 HPV 유발 암의 치료 및/또는 예방을 위한 용도에 관한 것이다.

[0323] 하기 실시예 및 도면은 예시로서 제공되며 본 발명을 암시적으로 제한하지 않는다.

[0324] 실시예

[0325] 재료 및 방법

[0326] 마우스

[0327] C57BL6jRj 마우스는 Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France)에서 구입했다. 모든 동물은 특정 병원체가 없는 조건에서 유지되었으며, 모든 절차는 승인된 동물 프로토콜과 실험 동물의 적절한 사용 및 관리에 대한 권장 사항에 따라 수행되었다. 모든 동물 실험은 실험동물 관리 및 사용에 관한 프랑스 및 유럽 규정에서 정한 지침에 따라 수행되었다.

[0328] 펩타이드, 항체 및 시약

[0329] 본 발명에 따른 백신의 반응성을 테스트하기 위해, 순도 $\geq 80\%$ 의 15mer 중복 펩타이드(overlapping peptide)를 GenScript Biotech (네덜란드)에서 주문했다. 항 CD4-VioBlue (Clone REA604), 항 CD45-VioGreen(Clon REA737), 항 FoxP3-Vio515(clone REA788), 항 CD279 (PD1)-PE(clone REA802), 항 CD8a-PE-Vio770(clone REA601), 항 CD25-APC(clone REA568), 항 CD11c-FITC(clone REA754), 항 CD11b-APC-Vio770(clone REA592)는 Miltenyi Biotec에서 구입했다. 항mouse H-2kb(clone AF6-88.5), 항CD274(PD-L1)-APC(clone MIH5) 및 항 CD16/CD32(clone 2.4G2)는 BD Biosciences에서 구입하였다.

[0330] 항체는 1% FCS(Gibco)를 함유한 PBS와 함께 혼합하였다.

[0331] 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide)는 Sigma에서 구입하여 PBS(깁코)에 재현탁하고 -20°C 에서 보관한 후 사용했다.

[0332] 세포

[0333] HPV-16 E6 및 E7 발현 TC-1 종양 세포는 전술한 바와 같이 생성되었다(Lin et al. Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):21-6): C57BL6 마우스의 원발성 폐 세포를 HPV-16 E6 및 E7 유전자와 pVEJB 발현 활성화된 인간 c-Ha-ras 종양 유전자로 형질도입 하였다. TC-1 세포주를 GlutaMax RPMI 배지(100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 및 10% 소 태아 혈청이 보충된 Gibco)에서 배양했다.

[0334] 렌티바이러스 벡터 구성

[0335] 항원(Ag) 구성체는 pFlap-B2m-Ag-WPREMutee 백본에 클로닝하였다 (백본에 대해서는 예를 들어 W02016012623 참조). 항원 플라스미드는 체세포분열이 일어나지 않는 세포의 형질도입에 필수적인 cPPT/CTS 서열(서열번호 37)을 포함한다.

[0336] U3 프로모터 서열은 벡터 복제를 피하기 위해 3' 긴 말단 반복(LTR)에서 삭제되었다. 베타-2마이크로글로불린($\beta 2\text{m}$) 프로모터는 모든 형질도입 세포에서 백신 항원 발현을 제어하여 항원이 APC(항원 제시 세포)에서 우선적으로 발현되도록 한다. 또한 돌연변이가 생성 및/또는 유전 독성 효과를 유발할 만한 알려진 인핸서 서열이 존재하지 않는다. 항원 플라스미드는 우드척 B형 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 요소(WPRE)의 돌연변이가 형태(서열번호 38)를 포함한다. 야생형 WPRE 영역에는 종양성을 가질 수 있는 잘린 형태의 WHV X 단백질이 포함되어 있다(Kingsman et al., Gene Ther. 2005 Jan;12(1):3-4). 본 발명의 구성체에 사용된 WPRE의 돌연변이가 형태는 X 단백질 개시 코돈 내에 점 돌연변이를 포함시킴으로써 절단된 X 단백질의 발현을 방지한다. 이러한 돌연변이가 WPRE 서열은 종양성을 갖지 않는 것으로 보인다 (Themis et al., Mol Ther. 2005 Oct;12(4):763-71).

[0337] 패키징 플라스미드(pNDK)에는 HIV-1 아형 NDK의 gag-pol 서열이 포함되어 있다(GenBank acc n° : A34828).

nef, vif, vpr, env 단백질은 발현되지 않는다. 또한 HIV-1 인테그레이즈 단백질 서열(pol 유전자)의 64번 위치에서 아스파르트산(D)을 발린(V)으로 치환(D64V)하면 시험관 내 전이유전자 발현을 방해하지 않고 통합을 억제하기에 충분하다. 본 발명에 따른 렌티바이러스 입자는 비통합 입자이다.

[0338] 외피 플라스미드: pCMV-VSV-G INDCo (Indiana) 및 pCMV-VSV-G NJco (New Jersey) 벡터는 수포성 구내염 바이러스(VSV) G 단백질(VSV-G) 인디애나(GenBank acc. n° J02428) 및 뉴저지(GenBank acc. n° P04882) 혈청형 삽입물을 pVAX1 발현 벡터(Invitrogen)에 서브클로닝하여 제작되었다. 다음 베시쿨로바이러스(Vesiculovirus)의 당단백질을 코딩하는 포유류 코돈 최적화 합성 유전자(GeneArt)를 pVAX1 플라스미드(Invitrogen)에 클로닝했다: 수포성 구내염 바이러스 인디애나 혈청형(GenBank FW591952), 뉴저지 혈청형(GenBank FW591956) 및 코칼 바이러스(Cocal virus)(GenBank: AF045556.1).

[0339] 렌티바이러스 벡터 입자 생산

[0340] 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10% FCS를 DMEM에서 HEK 293 T 세포(ATCC)를 증폭 배양한 후, 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 HEK 293 T 세포(ATCC)를 3개의 플라스미드(바이러스 항원 플라스미드, 외피 발현 플라스미드 및 패키징 플라스미드)로 일시적 인산칼슘 공동형질감염 하여 비통합 렌티바이러스 입자를 생산하였다. 배양 배지는 24시간 후 무혈청(serum free) 배지로 교체하였다. 형질감염 48시간 경과 후 상층액을 2500rpm 원심분리로 수집하고 정제하였다. 바이러스 입자를 초원심분리(22000rpm/88250g 4°C에서 1시간)로 농축하고 보존 완충액(20mM 파이프, 75mM NaCl 및 2.5% 자당)으로 재현탁하였다.

[0341] 벡터 적정(vector titration)

[0342] 렌티바이러스 벡터 역가는 세포(HEK 293 T)의 형질도입 후 정량 PCR로 결정되었다. 아피디콜린은 형질도입 24시간 전에 HEK293T 세포에 첨가되며 전체 적정 과정 동안 유지된다. 50 µg/ml RNase A(Sigma)를 포함하는 용해 완충액(200mM Tris, 1% NP40 및 1% Tween20)으로 30분간 세포를 배양한다. 프로테이나제 K(0.2mg/ml)를 현탁액에 첨가하고 56°C에서 4시간 동안 배양한다. RRE(Ag 벡터의 요소) 및 GAPDH(숙주 세포 내)에 특이적인 프라이머 쌍이 정량 PCR에 사용된다. 역가는 벡터의 형질도입 단위(TU)/mL로 표시된다.

[0343] HPV 백신의 설계

[0344] 구현된 비종양성 면역원성 E6 및 E7 단백질 서열은 본 명세서에서 이전에 설명된 바와 같이 선택되고 변형되었다.

[0345] 특히 다음의 렌티바이러스 벡터를 포함하는 4가지 서로 다른 백신이 설계되었다:

[0346] - 2021년 10월 21일 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터;

[0347] - 2021년 10월 21일, 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5760로 제출된 렌티바이러스 벡터;

[0348] - 2021년 10월 21일, 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터; 또는

[0349] - 2021년 10월 21일, 프랑스 국립 미생물 배양 컬렉션(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM)에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터.

[0350] 이러한 기능성 렌티바이러스 벡터를 포함하는 이들 렌티바이러스 벡터 입자는 벡터 적정에 의해 정량화되고 형질도입 단위(TU)로 표현되어 다음 예에서 구현되었다.

[0351] 렌티바이러스 벡터 백신의 생체 내(in vivo) 면역원성(LV 백신)

[0352] 본 발명에 따른 LV 백신(즉, 본 발명의 기능성 렌티바이러스 벡터를 포함하는 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자)을 50 µL의 희석액에 담아 근육주사로 미경험(naive) C57BL6 암컷 마우스에 접종했다. 14일 후, 비장세포를 준비하고 4개의 서로 다른 HPV 펩타이드 풀(각 펩타이드는 최종 2 µg/mL)로 IFNg ELISPOT에 대해 재자극하였다. 각 펩타이드 풀은 다음의 비종양성 항원 변이체 중 하나에 해당한다: HPV16의 E6 단백질의 비종양성 변이체, HPV16의 E7 단백질의 비종양성 변이체, HPV17의 E6 단백질의 비종양성 변이체 및 HPV17의 E7 단백질의 비종양성 변이체. 이들은 선택된 항원 전체에 대응하는 중복 15mer(11개 아미노산 중복)로 구성된다.

[0353] 생체 내 종양 백신 접종 치료

- [0354] 생체 내 종양 실험을 위해 7-9주령의 C57BL/6 마우스에 1.10^6 TC-1 세포를 오른쪽 옆구리에 피하주사 하였다(주사 전 전기 면도기로 마우스를 면도하였다). 평균 종양 부피가 예상 범위에 도달하면, 마우스를 무작위로 분류하여 근육주사를 통해 본 발명의 LV 백신을 주사하였다. 마우스는 일주일에 3번 캘리퍼스로 종양의 직경을 측정하여 종양 성장을 모니터링했다. 윤리적 이유로 종양이 1500mm^3 이상인 마우스는 안락사 되어야 했다.
- [0355] 인간 PBMC에서 본 발명의 LV 백신의 면역원성
- [0356] 냉동된 인간 PBMC(StemCell)를 부드럽게 해동하고 37°C 에서 10분 동안 $0.5\ \mu\text{M}$ 의 CFSE(Thermofischer)로 염색했다. 그 후 세포를 둥근 바닥 96웰 플레이트(웰당 0.2×10^6 세포)에서 완전 RPMI(10% FCS, 10mM Hepes(Gibco), 100mg/ml 페니실린, $100\ \mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신, 0.1mM 비필수 아미노산(Gibco) 및 1mM 피루브산 나트륨(Gibco)에 배양하였다. 7일 후, 세포를 원심분리하고 새로운 완전 RPMI(예열된)를 추가하였다. 다시 7일 후(총 14일), 세포를 형광 항체로 염색하고 유세포 분석기(MACSQuant analyzer)로 데이터를 수집하였다.
- [0357] 종양 면역 침윤의 세포 계측 분석
- [0358] 종양을 Mouse Tumor Dissociation kit (Miltenyi)로 처리하였다. 그 후 세포 현탁액을 $70\ \mu\text{m}$ 기공 필터를 통해 여과하고 적혈구 용해 완충액(Sigma)으로 처리한 다음 세척하고 1200rpm에서 5분간 원심분리했다. 회수된 세포는 다음과 같이 염색했다.
- [0359] NK를 검출하기 위해 Near IR LD(Invitrogen), Fc γ II/III 수용체 차단 항CD16/CD32(clone 2.4G2, BD Biosciences), APC-항CD11b(clone N418, BD Biosciences), BV421-항NKp46(clone 29A1.4, Biolegend)을 사용하였다.
- [0360] 샘플은 Attune NxT cytometer(Invitrogen)에서 수집되었으며 데이터는 FlowJo 소프트웨어(Treestar, OR, USA)로 분석되었다.
- [0361] 세포 내 사이토카인 염색
- [0362] 면역화된 마우스의 비장세포를 조직 균질화 및 $100\ \mu\text{m}$ 나일론 필터(Cell Strainer, BD Biosciences)를 통과시켜 얻은 후 24웰 플레이트에 4×10^6 cell/well로 플레이팅하였다. 비장세포는 $10\ \mu\text{g/mL}$ 의 상동 또는 대조 펩타이드, $1\ \mu\text{g/mL}$ 의 항CD28(clone 37.51) 및 $1\ \mu\text{g/mL}$ 의 항CD49d(clone 9C10-MFR4.B) 단일 클론 항체(BD Biosciences)의 존재 하에 6시간 동안 자극되었다. 배양의 마지막 3시간 동안은 세포를 BD Biosciences의 Golgi Plug와 Golgi Stop의 혼합물로 처리하였다. 이 단계에서 PE-Cy7-항CD107a(clone 1D4B, BioLegend) 단일 클론 항체도 배양액에 추가하였다. 그 후 세포를 수집하고, 3% FBS와 0.1% Na₃(FACS 완충액)를 함유한 PBS로 세척한 후 Near IR Live/Dead(Invitrogen), Fc γ II/III 수용체 차단 항CD16/CD32(clone 2.4G2), PerCP-Cy5.5-항CD3 ϵ (clone 145-2C11), PE-Cy7-항CD4(clone RM4-5) 및 BV711-항CD8(clone 53-6.7) 단일 클론 항체(BD Biosciences 또는 eBioscience)의 혼합물에 4°C 에서 25분간 배양하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 후 Cytotfix/Cytoperm 키트(BD Bioscience)를 사용하여 투과시켰다. 그 후 세포를 Cytotfix/Cytoperm 키트의 PermWash 1X 완충액으로 2회 세척하고, BV421-항IL-2(clone JES6-5H4), FITC-항TNF(MP6-XT22)의 혼합물 또는 적절한 대조군 Ig 동종형의 혼합물과 함께 4°C 에서 30분간 배양하였다. 이어서, 세포를 PermWash로 2회 세척하고 FACS 완충액으로 1회 세척한 다음 4°C 에서 하룻밤 동안 Cytotfix(BD Biosciences)로 고정하였다. 세포는 Attune NxT cytometer system(Invitrogen)으로 획득하였으며 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어(Treestar, OR, USA)를 사용하여 수행되었다.
- [0363] 실시예 1: 본 발명의 HPV 백신은 생체 내에서 면역원성을 갖는다
- [0364] 본 발명의 백신이 면역 반응을 유도하는 능력을 측정하기 위해, 수용 마우스를 4개의 백신(시험 백신 및 대조군 당 5마리씩 1그룹)으로 면역화하였다.
- [0365] CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5760로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터, CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터 또는 $50\ \mu\text{L}$ 의 희석액을 마우스에 근육주사로 주사하였다. 14일 후, 비장세포를 준비하고 4개의 서로 다른 펩타이드 풀(각 펩타이드는 최종 $2\ \mu\text{g/mL}$)로 IFN γ ELISPOT에 대해 하룻밤 동안 재자극하였다. 그 결과는 도 1에 나타나 있다.
- [0366] 실시예 2: 본 발명 백신의 HPV 백신은 생체 내에서 잘 이식된 종양을 완전히 제거한다

- [0367] TC-1 종양 세포는 HPV 유발 종양을 연구하기 위한 전임상 모델로 광범위하게 사용되어 왔다(Kim, J W et al. Gene therapy vol. 11,12 (2004): 1011-8). 이 때 종양 세포는 HPV16의 E6 및 E7을 발현하도록 변형되었다(Lin et al. Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):21-6).
- [0368] TC-1 세포를 마우스에 피하주사 한 후, 주사 부위에서 고형 종양이 빠르게 발견되며 치료되지 않은 동물 종양은 30~40일 내에 윤리적 종료점에 도달할 정도로 성장한다. 본 발명의 렌티바이러스 벡터 입자의 효능을 시험하기 위해, TC-1 세포를 피하주사하고 격일로 종양의 부피를 측정(캘리퍼스 측정)하였다. 평균 종양 부피가 70mm³일 때, 마우스를 무작위로 분류하여 1x10⁸ TU의 LV-GFP 인디애나(대조군), I-5759를 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자, I-5760을 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자, I-5761을 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자 또는 I-5762를 포함하는 인디애나 렌티바이러스 벡터 입자로 백신접종 하였다.
- [0369] 그 결과는 도 2에 나타나 있다.
- [0370] CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터와 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자로 백신접종 한 동물의 100%, CNCM에 수탁번호 I-5760로 제출된 렌티바이러스 벡터로 백신접종 한 동물의 87.5% 및 CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터로 백신접종 한 동물의 75%에서 신속하고 매우 효율적인 종양 제거가 관찰되었다.
- [0371] CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자 및 CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 백신은 동등한 종양 제거율 (I-5760 및 I-5761보다 높음)을 나타내지만 I-5759 백신 접종은 평균 37.5일(+/- 7.4 SD) 내에 종양을 완전히 제거할 수 있는 반면, I-5762 백신 접종은 54.7일이 소요되었다.
- [0372] 놀랍게도 가장 면역원성이 높은 벡터가 가장 보호력이 높지 않았으며 면역원성 순위가 항종양 효능에 적용되지 않는다는 것을 관찰하였다. 실제로, CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자가 가장 효율적인 항종양 백신이었던 반면, CNCM에 수탁번호 I-5760 및 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자는 IFN- γ 생성 측정 시 더 면역원성 있는 벡터였다.
- [0373] **실시예 3: 본 발명의 단일 HPV 백신 투여는 종양 재발에 대해 효과적이다.**
- [0374] 재발은 대부분의 암 유형에서 흔히 관찰되며, 일정 기간 호전된 후 질병이 다시 발생하는 것으로 정의된다. 이는 종종 초기 치료에서 살아남은 일부 종양 세포가 치료 후 몇 주, 몇 달 또는 몇 년 후에 새로운 종양을 형성하기 때문이다.
- [0375] A. 이 모델에서 재발을 모방하기 위해, 마우스에서 원발성 종양을 제거한 후 60일째에 다른 쪽 옆구리에 재투입 하였다. 종양 세포 주입을 확인하기 위해 대조군 마우스(치료하지 않은 마우스)에도 종양 세포를 피하주사로 주입하였다.
- [0376] 그 결과는 도 3에 나타나 있다.
- [0377] 이 도면은 대조군 마우스에 TC-1 세포를 피하주사 하면 30일 이내에 윤리적 한계 크기에 도달하는 고형 종양이 형성된다는 것을 보여준다. 재투입된 마우스(백신 접종 후 오른쪽 옆구리 종양이 제거된 마우스)에서의 종양 성장은 크게 감소했다. 처음 6일 동안 종양 성장이 관찰되었고 그 이후부터 종양 제거가 시작되었다.
- [0378] 종양은 심지어 이식 13~16일 경과 후에는 완전히 제거되었다. 종양 보유 마우스에 1회 접종한 결과, 원발성 종양이 완전히 제거되었고 이차 종양이 빠르게 제거되어 재발을 강력하게 예방할 수 있었다.
- [0379] B. 추가 실험은 1차 생착 후 119일째에 반대쪽 옆구리의 원발성 종양을 제거한 마우스에 1.10⁶ TC-1 종양 세포를 재투입하여 수행되었으며, 아무런 치료를 하지 않은 채 두었다. 종양 세포 주입을 확인하기 위해 대조군 마우스(치료하지 않은 마우스)에도 종양 세포를 피하주사로 주입하였다.
- [0380] 그 결과는 도 11에 나타나 있다.
- [0381] 모든 재투입된 마우스는 첫 종양 투입 145일 경과 후에도 여전히 살아 있었으며, 이는 본 발명에 따른 백신의 1회 주사가 강력한 항종양 기억 보호 면역 반응을 효과적으로 촉진하여 새로운 투입에 대한 T세포 반응을 효율적으로 형성한다는 것을 보여주었다.
- [0382] **실시예 4: 본 발명의 항 HPV 백신의 치료 효과는 용량 의존적이다.**

- [0383] 저용량의 백신 효과를 확인하기 위해 TC1 종양을 가진 마우스를 대상으로 효능 연구를 수행하였다. CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신을 1×10^8 또는 1×10^7 TU/mouse로 마우스에 접종하였다.
- [0384] 특히, 1×10^6 TC-1 세포를 동물의 옆구리에 주입하고 종양 부피를 일주일에 2회 측정하였다(캘리퍼스 측정). 평균 종양 부피가 80mm^3 일 때, 마우스를 무작위로 분류하여 희석액(대조군), 1×10^7 TU 또는 1×10^8 TU의 I-5759 백신을 (근육주사로) 접종했다.
- [0385] 그 결과는 도 4에 나타나 있다.
- [0386] 1×10^8 TU로 백신을 접종하면 종양이 완전하고 신속하게 제거되는 반면(접종 후 20일 이내), 1×10^7 TU의 백신 접종 용량은 종양 성장에 부분적인 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 3/6(50%)의 마우스는 백신 접종 22일 후 종양이 없어졌고, 나머지 마우스는 백신 접종 후 15~18일(5~10일 동안)에 종양이 감소했지만 그 이후에는 종양 성장을 제어할 수 없었다.
- [0387] 본 발명에 따른 백신의 1회 저용량(1×10^7) 접종은 아데노바이러스 벡터 기반 백신의 3회 접종에서 관찰된 것과 유사한 수준의 부분적 억제를 보여주었다(Rice, AE et al. Cancer gene therapy vol. 22,9 (2015): 454-62). 이는 본 발명에 따른 백신의 최적 용량은 아데노바이러스 플랫폼보다 더 효율적일 수 있음을 시사한다. 또한, 저용량 효능은 두 번째 백신 주사에 의해 증가될 가능성이 높다.
- [0388] **실시예 5: 본 발명에 따른 백신 접종은 치료된 종양에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 침윤을 증가시키고 T reg을 감소시킨다.**
- [0389] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터로 백신 접종 후 유도되는 항종양 기전을 더 이해하기 위해 종양 침윤을 조사하였다. 1×10^6 TC1 종양 세포를 동물의 옆구리에 주사(정맥주사)하고 일주일에 2회 종양의 부피를 측정했다(캘리퍼스 측정). 평균 종양 부피가 80mm^3 일 때, 마우스를 무작위로 분류하여 희석제(대조군) 또는 1×10^7 TU의 I-5759 또는 1×10^8 TU의 I-5759를 백신으로 (근육주사로) 접종했다.
- [0390] 백신 접종 10일 후, 종양을 수집하고 분해하여 유세포 분석법으로 분석하였다. 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 FACS 염색을 수행하고 MacsQuant facs에서 데이터를 얻었다.
- [0391] 그 결과는 도 5에 나타나 있다.
- [0392] 백신을 접종한 마우스의 종양에는 대조군 종양에 비해 더 많은 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포가 침윤되어 있었다. 종양 내 CD8⁺ T 세포와 CD4⁺ T 세포의 비율은 각각 약 4배와 3배 증가하였다. 반면, 종양 내 CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺ 조절 T 세포(Treg)의 비율은 치료된 동물에서 크게 감소하였다.
- [0393] 이러한 관찰은 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 포함하는 백신이 종양에 대한 CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포 모집을 개선할 뿐만 아니라 종양 내 Treg의 비율도 감소시킨다는 것을 시사하기 때문에 매우 중요하다.
- [0394] **실시예 6: 본 발명의 HPV 백신은 생체 내에서 대형 종양을 완전히 제거한다**
- [0395] 잘 형성된 종양은 작은 초기 단계의 종양보다 제거하기가 더 어려운 것으로 알려져 있다. TC1 모델에서 테스트된 대부분의 백신은 후기 시점에 투여될 때 효과가 더 약하다(Rice, AE et al. Cancer gene therapy vol. 22,9 (2015): 454-62; Berraondo, Pedro et al. Cancer research vol. 67,18 (2007): 8847-55). 1×10^6 TC1 종양을 동물의 옆구리에 주사(피하주사)하였다. 평균 종양 부피가 약 300mm^3 일 때, 마우스를 무작위로 분류하여 희석제(대조군) 또는 1×10^8 TU의 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신을 근육주사로) 접종하였다. 종양 부피는 캘리퍼스를 사용하여 일주일에 2회 측정하였다.
- [0396] 그 결과는 도 6에 나타나 있다.
- [0397] 본 발명에 따른 백신은 잘 형성된 HPV 유발 종양을 완전히 제거하는 데 매우 효율적임을 알 수 있다.

[0398] 실시예 7: 본 발명의 HPV 백신이 시험관 내에서 인간 PBMC 활성화를 유도한다

[0399] 본 발명에 따른 백신이 인간 세포에서 T 세포 반응을 유도할 수 있는지 확인하기 위해, 인간 PBMC(StemCell)에 CFSE를 표지하고 본 발명에 따른 백신(I-5759)의 부재(무자극 상태) 또는 존재 상태에서 배양하였다. 배양 2주 후 세포 증식 및 활성화를 측정하였다.

[0400] CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포의 증식(CFSE 회색으로 측정) 및 CD25 활성화 마커의 발현은 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 배양액에 첨가함으로써 증가되었다.

[0401] 그 결과는 도 7에 나타나 있다.

[0402] 이로써 PBMC에서의 항원 제시 세포가 본 발명에 따른 HPV 백신에 의해 형질도입될 수 있고 항원을 가공하여 T 세포를 활성화시킬 수 있다는 결론을 내릴 수 있다.

[0403] 실시예 8: 본 발명의 HPV 백신에 의해 유도된 전신 T 세포 면역 및 작동 T 세포(effector T cell)의 표현형

[0404] 유도된 T세포 반응의 질에 대하여 더 많은 통찰력을 얻기 위해, CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신 또는 Ctrl Lenti (LV-empty Indian a)가 투여된 마우스의 비장세포를 아무 처리하지 않은 채 두거나 HPV16유래 E7 펩타이드인 ETTPDRAHYNIIVTF 및 PDRAHYNIIVTFCKK의 혼합물로 시험관 내에서 자극하였으며, 이 펩타이드들은 면역우세 H-2Dd-제한 RAHYNIIVTF 에 피토프를 포함한다(Feltkamp MC et al.. Eur J Immunol 1993;23:2242-9). 그 후 비장세포를 IL-2, TNF- α 및 IFN- γ 에 대한 세포내 염색(IntraCellular Staining, ICS)으로 분석하였다.

[0405] 그 결과는 도 9A에 나타나 있다.

[0406] 본 발명에 따른 렌티바이러스 벡터를 백신접종한 마우스에서 이들 펩타이드로 자극하면 CD8⁺ T세포 반응이 감지되었다. 기능성 CD8⁺ T세포 이펙터는 주로 IFN- γ ⁺ (단일 양성), TNF- α ⁺ IFN- γ ⁺ 또는 IL-2⁺ IFN- γ ⁺ (이중 양성) 및 IL-2⁺ TNF- α ⁺ IFN- γ ⁺ (삼중 양성) 하위 집단에 분포되어 있었다(도 9B).

[0407] 대부분의 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 세포는 또한 표면 CD107a 탈과립 마커를 발현하여 이러한 T 세포의 이펙터 특성을 보여 준다(도 9B).

[0408] 실시예 9: 본 발명의 HPV 백신을 접종한 마우스의 종양 세포 및 종양 침윤 선천성 면역 세포의 특징

[0409] 백신 접종 후 11일째, 즉 종양 퇴행 단계에서 종양 내 침윤물의 세포계측에 의한 특징 분석 결과, CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신을 접종한 마우스의 퇴행성 종양에서 자연살해(NK) 세포의 비율이 크게 증가한 것으로 나타났다.

[0410] 그 결과는 도 10에 나타나 있다.

[0411] 실시예 10: 차선 용량의 Lenti-HPV-07 백신 접종은 항PD1 면역요법과 상승적으로 작용한다

[0412] 본 발명자들은 차선 용량의 Lenti-HPV-07(I-5759) 백신 접종과 항 PD-1 치료 사이의 잠재적 상승 효과를 추가로 조사하였다.

[0413] 항PD-1 치료는, CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 본 발명에 따른 백신을 주사(D13, 즉 TC-1 세포를 마우스에 피하주사로 투여한 후 13일)한 지 4일 경과 후(D17, 즉 TC-1 세포를 마우스에 피하주사로 투여한 후 17일) 시작되었다. 항PD-1 주사를 여러 번 실시하였다(상기 언급된 D17에 이어서 D20, D22, D24, D28 및 D31).

[0414] 특히, 종양을 이식한 세 개의 동일한 마우스 그룹을 대상으로 실험을 수행하였다. 첫 번째 그룹(마우스 10마리 - 대조군 그룹)에서는 마우스에 LV-empty 인디애나(대조군)를 투여하고(D13) 4일 후 항PD-1 단일 클론 항체를 투여했다(D17, 이후 D20, D22, D24, D28 및 D31). 두 번째 그룹(마우스 12마리 - 대조군 그룹)에서는 마우스에 본 발명에 따른 백신(I-5759)을 투여하고(D13), 4일 후 대조군 항체(동형 ctrl)를 투여했다(D17, 이후 D20, D22, D24, D28 및 D31). 세 번째 그룹(14마리 마우스)에서는 마우스에 본 발명에 따른 백신(I-5759)을 투여한(D13) 후 4일 후 항PD-1 단일 클론 항체를 투여했다(D17, 이후 D20, D22, D24, D28 및 D31).

[0415] 그 결과는 도 12A 및 12B에 나타나 있다.

- [0416] 불충분한 항종양 T세포 반응을 유도하는 차선 용량의 백신은 항PD-1과 상승적으로 작용하여 종양의 퇴행을 증가시켰다.
- [0417] 14마리 중 6마리의 마우스에서는 종양이 완전히 퇴행했고, 다른 2마리의 마우스는 부분적인 종양 퇴행을 보였다. 후자의 경우 종양 부피가 67% 감소한 뒤 항PD-1 치료 종료 후 6~7일 후에 종양이 재발하여 종양이 완전히 사라질 때까지 항PD-1을 반복적으로 주사해야 할 필요성이 강조되었다. 차선 용량의 본 발명 백신으로만 치료한 12마리의 마우스 중 3마리만이 부분적인 종양 퇴행을 보였다. 따라서, 차선 용량의 Lenti-HPV-07으로 치료한 마우스에 비해 병용 치료 그룹에서 마우스 생존이 유의하게 증가하였다(도 12B). 따라서 Lenti-HPV-07 백신 후보물질과 항PD1 면역 관문 억제 치료를 병용하면 상승적 항종양 효과를 얻을 수 있다.
- [0418] **실시예 11: 본 발명에 따른 백신의 1회 주사는 TC1-nLuc 세포의 정맥주사로 유도된 폐 전이 병소를 가진 마우스를 치료한다**
- [0419] TC1 모 세포주를 유비퀴틴(UBC) 프로모터 아래에서 나노루시페레이즈 리포터 및 퓨로마이신 N-아세틸기전이효소(선택용)를 코딩하는 통합 렌티바이러스 벡터로 안정적으로 형질도입 시켰다. 퓨로마이신에 대한 선택 후, 세포를 서브클로닝하여 TC1-nLuc 세포주를 얻었다.
- [0420] Janvier Laboratory에서 구입한 6주령의 C57BL/6JRj 마우스에 150,000개의 TC1-nLuc 세포를 정맥주사 하였다. 5일째에 마우스에 근육 내 경로를 통해 1.10^9 TU/mouse 용량의 Lenti-HPV-07 또는 Control Lenti(빈 벡터)를 1회 주사하였다.
- [0421] 살아있는 동물에 대한 생체 발광 이미징은 전하 결합 장치(charged-couple device) 카메라와 연결된 IVIS 이미징 시스템(IVIS Spectrum, Perkin Elmer)을 사용하여 수행하였다. 생체 발광 이미징에 앞서 마우스를 산소 중 2% 이소플루란으로 마취하고 이미징하는 동안 노즈콘을 통해 산소 중 1.5% 이소플루란의 제어 흐름으로 유지했다. 기질 퓨리마진(Z108)(파스퇴르 연구소의 Yves Janin 박사가 제공)을 산성 에탄올에 2mg/ml로 용해시켰다. Z108은 정맥주사 하기 전에 멸균 D-PBS에 원하는 농도(0.4 mg/kg)로 추가 희석되었다. 그 후 마우스를 즉시 이미징 챔버에 넣고 이미지를 촬영하였다. 순차적 이미지는 최대 노출 시간이 2분인 자동 노출 설정에서 캡처되었다.
- [0422] 각 실험 세트의 이미지는 Living Image Software (Ver. 2.50.1 Xenogen)를 사용하여 분석되었다. 관심 영역에서 측정을 수행하고 발광 값을 총 플럭스(photons/second)로 평가하였다. 신호 대 잡음비를 높이기 위해 마우스의 배와 몸통을 면도하였다. 기준 신호는 아무 처리되지 않은 마우스, 즉 TC1-nLuc 세포나 렌티바이러스 벡터가 주입되지 않았지만 Z108이 주입된 마우스로부터 얻었다.
- [0423] 그 결과는 도 13A 및 13B에 나타나 있다.
- [0424] 본 발명자들은 본 발명에 따른 Lenti-HPV-07 백신(I-5759)의 1회 근육주사가 동물의 100%에서 피하 생착된 TC1 종양을 완전히 박멸한다는 사실을 확고히 확인하였다. 그러나 인간의 경우 HPV 유발 암을 포함한 많은 암이 점막 부위에 발생한다.
- [0425] 따라서 본 실험에서는 Lenti-HPV-07이 점막 부위에서 종양 성장을 억제하는 능력을 평가하였다.
- [0426] 이 문제를 해결하기 위해 나노루시페레이즈 리포터 유전자(TC1-nLuc)를 안정적으로 발현하는 TC1 세포주를 개발하였다. TC1-nLuc 정맥주사 후 마우스는 폐 전이 병소가 쉽게 발생했다.
- [0427] 생체 발광 이미징을 통해 살아있는 동물에서 종양의 종방향 성장을 추적했다.
- [0428] 종양 주사 5일 후, 마우스에 Lenti-HPV-07(1.10^9 TU/mouse) 또는 Control Lenti(빈 벡터)를 1회 근육주사로 투여하였다(도 13A).
- [0429] Lenti-HPV-07을 투여한 모든 마우스는 종양 주사 후 22일째에 완치된 반면, 대조군에서는 폐 전이 병소가 계속해서 성장하였다. 두 그룹의 생체 발광 신호 평균에서 관찰된 차이는 대부분 통계적으로 유의미하였다(도 13A 및 13B).
- [0430] 이러한 관찰은 본 발명에 따른 백신이 피하에 형성된 종양만큼 효율적으로 폐 종양을 박멸할 수 있음을 명확하게 나타낸다.
- [0431] **서열정보**

- [0432] 서열번호 1은 HPV 16의 E6 단백질(NC_001526.4)을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0433] ATGCACCAAAAGAGAAGTCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAATAACATGATATAATA TTAGAATGTGTGACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCT GTATGTGATAAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAAACCG TTGTGTGATTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAAGCCACTGTGTCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGG GGTCCGGTGGACCGGTCGATGTATGCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAAACCCAGCTGTAA
- [0434] 서열번호 2는 HPV 16의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0435] GACCCCAAGAACGGCCAGAAAAGCTGCCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTG CTGAGAAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACCTGTGCATCGTGTACCGGAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATC AGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTGCTGATCAGATGCATCAACTGCCAG AAGCCCTGCGGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACCGCCGGTGCATGAGCTGCTGCAGA
- [0436] 서열번호 3은 HPV 16의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0437] ATGGGACCCCTGGGCATCGTGTGCCCATCGACCCCAAGAACGGCCAGAAAAGCTGCCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATC CTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTGCTGAGAAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACCTGTGCATCGTGTACCGGAACCCCTACGCCGTGTGC GACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGC GACCTGCTGATCAGATGCATCAACTGCCAGAAGCCCTGCGGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACCGCCGGTGCATGAGCTGCTGCAGA
- [0438] 서열번호 4는 HPV 16의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0439] ATGGACCCCAAGAACGGCCAGAAAAGCTGCCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAG CTGCTGAGAAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACCTGTGCATCGTGTACCGGAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAG ATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTGCTGATCAGATGCATCAACTGC CAGAAGCCCTGCGGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACCGCCGGTGCATGAGCTGCTGCAGA
- [0440] 서열번호 5는 HPV 16의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0441] TTTCAGGACCCCAAGAAAAGGCCAGGAAGTTGCCAGCTCTGCACCGAACTGCAGACCACCATTCATGACATCATCCTCGAATGCGTGTACTGCAAGCAG CAGCTCCTGAGGAGGGAGGTGTACGATTTCCGCTTCCAGAGACGGCTGTATCGTCTACAGGAACCCCTATGCCGTGTGCGACAAATGCTGAAGTTTATTC AAGATCTCCGAGTACAGGCACTATTGCTACAGCCTGTATGGACCACCCTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTCCTGATCAGGTGCATCAAC TGCCAGAAGCCCTGAGGTTCCACAACATCCGGGGCAGGTGGACCGGAAGGTGCATGTCCTGCTGCAGG
- [0442] 서열번호 6은 HPV 16의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0443] TTCCAGGACCCCAAGGAGAGGCCAGAAAAGTGCCAGTTGTGCACCGAGCTCCAGACAACCATCCACGACATCATCCTGGAGTGCCTGTACTGTAAGCAG CAGTTGCTGAGGAGAGAGGTGTATGACTTCCGCTTCCAGAGACGGATGCATTGTCTATAGGAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACTCC AAGATCAGTGTGAGTACAGGCACTACTGCTACAGCCTGTATGGAACCACTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTCCTGATTAGGTGCATCAAC TGCCAGAAGCCCTCAGGTTCCACAACATCCGGGGCAGGTGGACCGGAAGGTGCATGTCCTGCTGCAGGTC
- [0444] 서열번호 7은 HPV 16의 야생형(WT) E6 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0445] MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKP LCDLL IRC INCQKPLRPFHNRGRWTGRCMSSCRSRTRRETQL
- [0446] 서열번호 8은 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0447] DPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRC INCQ KPLRFHNRGRWTGRCMSSCR
- [0448] 서열번호 9는 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0449] MGTGLIVCPIDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLC DLL IRC INCQKPLRFHNRGRWTGRCMSSCR
- [0450] 서열번호 10은 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0451] MDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRC INC

QKPLRFHNIIRGRWTGRCMSCCR

[0452] 서열번호 11은 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.

[0453] FQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLRREVDYDFAFRDGCIYVRNPYAVCDKCLKFYYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCIN
CQKPLRFHNIIRGRWTGRCMSCCR

[0454] 서열번호 12는 HPV 16에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.

[0455] FQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLRREVDYDFAFRDGCIYVRNPYAVCDKCLKFYYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCIN
CQKPLRFHNIIRGRWTGRCMSCCRS

[0456] 서열번호 13은 HPV 16의 E7 단백질(NP-041326.1)을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0457] ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATAAATGACAGCTCAGAGGAG
GAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGC
GTACAAAGCACACACGTAGACATTCTGACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTCTCAGAAACCATAA

[0458] 서열번호 14는 HPV 16의 E7 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0459] ACCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCGAGACAACCGACCCGACCGGGCCACTACAATATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGCACAGC
ACCCTGCGGCTGTGCGTGCAGACACCCACGTGGACATCCGGACCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCTGGGCATCGTGTGCCCAT

[0460] 서열번호 15는 HPV 16의 E7 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0461] CCCGGAGACACCCACCTGCACGAATACATGCTGGACCTGCAGCCGAAACCACCGACCCGACCGCGCTCACTACAACATCGTTACATTCTGTTGTA
TGCAGCTCCACCCTGAGAAGATGCGTGCAGTCCACCACGTGGACATCAGGACCCTGGAGGACCTCTCATGGGAACCTGGGTATCGTCTGCCCATC

[0462] 서열번호 16은 HPV 16의 야생형(WT) E7 단백질의 아미노산 서열이다.

[0463] MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLIVCPICSQKP

[0464] 서열번호 17은 HPV 16에서 유래한 E7 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.

[0465] TPTLHEYMLDLQPETDPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLIVCPI

[0466] 서열번호 18은 HPV 16에서 유래한 E7 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.

[0467] PGDPTLHEYMLDLQPETDPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLIVCPI

[0468] 서열번호 19는 HPV 18의 E6 단백질(MF288727.1)을 코딩하는 핵산 서열이다.

[0469] ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACCTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAAATAACCTGTGTATAT
TGCAAGACAGTATTGGAACCTACAGAGGATTTGAATTTGATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAGTATACCGCATGCTGCATGCCATAAATGT
ATAGATTTTATTCTAGAATTAGAGAATTAAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTGGAGAACTAACTAACTGGGTTATACAATTTATTA
ATAAGGTGCTGCGGTGCGAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAGACACCTTAATGAAAAACGACGATTCCACAACATAGCTGGGCACTATAGAGGC
CAGTGCCATTCTGTGTGCAACCGAGCAGACAGGAAAGACTCCAACGACGAGAGAAACACAAGTATAA

[0470] 서열번호 20은 HPV 18의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0471] CCCTACAAGCTGCCTGACCTGTGTACAGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGTGTATTGCAAGACCGTGTGGAACCTGACCGAGGTG
TTCGAGTTTGCTTCAAGGATCTGTTCTGTGGTGTACCGGACAGCATCCCCACGCGCTGCCACAAGCTGGAAGCTGACCAACACCGGCTGTACAAC
CTGCTGATTCGGTGCCTGCGGTGTCAGAAGCCTCTGAACCCCGGAGAAGCTGCGGACCTGAACGAGAAGCGGAGATTCCACAATATCGCC

[0472] 서열번호 21은 HPV 18의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0473] CCCTACAAGCTGCCTGACCTGTGTACAGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGTGTATTGCAAGACCGTGTGGAACCTGACCGAGGTG
TTCGAGTTTGCTTCAAGGATCTGTTCTGTGGTGTACCGGACAGCATCCCCACGCGCTGCCACAAG

[0474] 서열번호 22는 HPV 18의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0475] CCCTACAAGCTGCCGATCTGTGCACAGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTCTACTGCAAGACCGTGTGGAACCTGACCGAGGTG
TTCGAATTCGCTTCAAGGACGCTCTGTGGTGTACAGGACAGCATCCCCACGCGCTGCCATAAGCTGGAGAACTGACCAACACCGGACTGTATAAC
CTGCTGATCAGGTGTCTGAGGTGCCAGAAGGACAGAACTGAGACATCTGAACGAGAAAAGGAGTTCCACAATATTGCCGGGCACTGATAA

- [0476] 서열번호 23은 HPV 18의 E6 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0477] ATGAGCGCGCCTACAAGCTGCCGACCTGTGCACCGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTGTACTGCAAGACCGTGTGGAGCTGACCGAGGTGTTGAATTCGATTCAAGGACGGATTCGTGTATAGGACAGCATCCACACGCCCGCTGCCACAAGCTGGAGAAATGACTAACACCGGACTGTATAATCTGCTGATCCGGTGCCTGAGGTGCAGAAGCCGAGAAGCTGAGGCATCTGAACGAGAAAAGGAGATCCACAATATCGCCGGACAC
- [0478] 서열번호 24는 HPV 18의 야생형(WT) E6 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0479] MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFVFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHLEKRRRFHNIAGHYRQGHSCCNRRARQERLQRRRETQV
- [0480] 서열번호 25는 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0481] PYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFVFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHLEKRRRFHNIAG
- [0482] 서열번호 26은 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0483] PYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFVFAFKDLFVVYRDSIPHAACHK
- [0484] 서열번호 27은 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0485] PYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFVFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRLHLEKRRRFHNIAGH
- [0486] 서열번호 28은 HPV 18에서 유래한 E6 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0487] MRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFVFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRLHLEKRRRFHNIAGH
- [0488] 서열번호 29는 HPV 18의 E7 단백질(NC_001357.1)을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0489] ATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCCCAAAATGAAATTCGGTTGACCTTCTATGTCAGGACAAATTAAGCGACTCAGAGAAAGAAAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCGACGAGCCGAACCAACGTCACACAATGTTGTGTATGTGTTGTAAGTGTGAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCCTGTCTTGTGTGTCGGTGGTGTGCAATCCAGCAGTAA
- [0490] 서열번호 30은 HPV 18의 E7 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0491] AAGGCCCACTGCAGGATATCGTGTGCACCTGGAACCCAGAACGAGATCCCCGTGGACAGCGAGGAAGAGAACGACGAGATCGACGGCGTGAACCACCAGCATCTGCCGCCAGAAAGGCCGAGCCCCAGAGACACCATGCTGTGCATGTGTTGCAAATGCGAGGCCCGATCAAGCTGGTGGTGGAAAGCAGCGCCGACGACCTGCGGGCCTCCAGCAGCTGTCTCTGAACACCCCTGTCTTCTGTGTGCCCTGG
- [0492] 서열번호 31은 HPV 18의 E7 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0493] GGACCTAAAGCCACCCTCCAGGACATCGTGTGCACCTGGAGCCCCAGAACGAGATCCCCGTGACTCAGAGGAGGAGAACGACGAAATTGACGGCGTCAACCACCAGCACCTGCCCCTGCAGAGCCGAACCCAGAGACACCATGCTCTGCATGTGCTGCAAATGCGAGGCCCGGATTAAGCTGGTGGTGGAGAGTCCGCCGACGATCTGAGACCTCCAGCAGCTCTCCTGAACACCCCTGTCTTCTGTGTGCCCTGG
- [0494] 서열번호 32는 HPV 18의 E7 단백질의 비종양성 변이체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0495] GGACCTAAAGCCACCCTCCAGGACATCCGTCTGGAGCCCCAGAACGAGATCCCCGTGACTCAGAGGAGGAGAACGACGAAATTGACGGCAACCACCAGCACCTGCCGCTGCAGAGCCGAACCCAGAGACACCATGCTCTGCATGTGCTGCAAATGCGAGGCCCGGATTAAGCTGGTGGTGGAGAGCTCCGCCGACGATCTGAGAGCCTCCAGCAGCTCTCCTGAACACCCCTGTCTTCTGTGTGCCCTGG
- [0496] 서열번호 33은 HPV 18의 야생형(WT) E7 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0497] MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESADDLRAFQQLFLNNTLSFVCPWCA SQQ
- [0498] 서열번호 34는 HPV 18에서 유래한 E7 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0499] KATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVESADDLRAFQQLFLNNTLSFVCPW
- [0500] 서열번호 35는 HPV 18에서 유래한 E7 단백질의 비종양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0501] GPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVESADDLRAFQQLFLNNTLSFVCPW

- [0502] 서열번호 36은 HPV 18에서 유래한 E7 단백질의 비중양성 변이체의 아미노산 서열이다.
- [0503] GPKATLQDIRLEPQNEIPVDSEENDEIDGNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVLESSADDLRAFQQLFLDSFVCPW
- [0504] 서열번호 37은 cPPT/CTS 서열을 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0505] AATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATT
ACAAAAATTCAAAATTTT
- [0506] 서열번호 38은 우드척 B형 간염 바이러스(woodchuck hepatitis B virus, WHV) 전사 후 조절 요소(post-transcriptional regulatory element, WPRE)의 돌연변이 형태를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0507] TTCCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGC
CTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTGTATAAACTCGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGGCCCGTTGTCAGGC
AACGTGGCGTGGTGTGACTGTGTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCTCC
CTATTGCCAGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTTGGTGTGTCGGGAAGCTGA
CGTCCCTTCCGGGCTGCTCGCTGTGTGACACCTGGATTCTGCGCGGACGTCTTCTGCTACGTCCTTCCGGCCCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC
CGGCGCTGCTGCCGCTCTGCGGCTCTCCGCTTTCGCTTCCGCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCGGCTCCCGC
- [0508] 서열번호 39는 RAHYNIVTF H-2D^b 제한 T 세포 에피토프를 포함하는 합성 E7_{HPV16} 유래 펩타이드이다.
- [0509] ETDPDRAHYNIVTF
- [0510] 서열번호 40은 RAHYNIVTF H-2D^b 제한 T 세포 에피토프를 포함하는 합성 E7_{HPV16} 유래 펩타이드이다.
- [0511] PDRAHYNIVTFCKC
- [0512] 서열번호 41은 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0513] ATGCCCGGAGACACCCACCCTGCACGAATACATGCTGGACCTGCAGCCGAAACCACCGACCCCGACCGCTCACTACAACATCGTTACATTCTGTGT
AAATGCGACTCCACCCTGAGAAGATGCGTGCAGTCCACCACGTGGACATCAGGACCTGGAGGACCTCCTCATGGGAACCTGGGTATCGTCTGCCCCATC
GCCTCCAGGCTTTTCAGGACCCAGGAAAGGCCAGGAAAGTTGCCCCAGCTCTGCACGAACTGCAGACCACCATTCATGACATCATCTCGAATGCGTG
TACTGCAAGCAGCAGCTCCTGAGGAGGGAGGTGTACGATTTGCGCTTACAGACGGTGTATCGTCTACAGGAACCCCTATGCCGCTGTCGACAAATGCCTG
AAGTTTTATTCCAAGATCTCGAGTACAGGCACTATTGCTACAGCTGTATGGGACCACCCTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTCTGATC
AGGTGATCAACTGCCAGAAGCCCTGAGGTTCCACAACATCCGCGGAGGTGGACCAGGAGGTGCATGCTGCTGCAGGTCGCGGCCCGGACCTAAA
GCCACCCTCCAGGACATCGTTTCCACCTGGAGCCCGAAGCAGATCCCGTGGACTCAGAAGAGGAGAACGACGAGATCGACGGCTCAACCACCAGCAC
CTGCCCGCTCGAGAGCCGAAACCCAGAGACACACCATGCTCTGCATGTGCTGCAATGCGAAGCCCGGATTAAGTTGGTGGTGGAAAGCAGCGCCGACGAT
CTGAGGGCCTTCCAGCAGCTTCTCCTAACACCCTGTCCCTCGTGTGCCCTGGGTGGGCGAGCCCGGTAGAACCATCCCTACAAGCTGCCCGATCTGTGC
ACAGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTCTACTGCAAGACCGTGTGAACTGACCGAGGTGTTGCAATTGCGCTCAAGGACGGC
TTCGTGGTGTACAGGACAGCATTCCCCACGCCCTGCCATAAGCTGGAGAAAAGTACCAACACCGGACTGTATAACCTGCTGATCAGGTGTCTGAGGTGC
CAGAAGCAGAGAACTGAGACATCTGAACGAGAAAAGGAGTTCCACAATATTGCCGGGCACTGATAA
- [0514] 서열번호 42는 CNCM에 수탁번호 I-5759로 제출된 렌티바이러스 벡터에 의해 코딩된 항원 구성체의 아미노산 서열이다.
- [0515] MPGDTPTLHEYMLDLQPETDPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRVCQSTHVDIRTELELLMGTLGIVCPIASQAFQDPQERPKLPQLCTELQTTIHDIIIECV
YCKQQLLRREVVYDFAFRDGCI VYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHICYSLYGTTLQYQYKPLCDLLIRINCQKPLRFHNI RGRWTGRMSSCRSAGPGPK
ATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVLESSADDLRAFQQLFLNLSFVCPVWVGEPRGRTIPYKLPDLC
TELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDGFVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRHLNEKRRFHNIAGH
- [0516] 서열번호 43은 CNCM에 수탁번호 I-5760으로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 코딩하는 핵산 서열이다.
- [0517] ATGTTCCAGGACCCAGGAGAGGCCCGGAAGTTGCCCGACTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCAGACATCATCCTCGAATGCGTGTACTGCAAG
CAGCAGCTGCTGAGGAGGAGGTGTATGACTTTCCTTCCAGAGACGGATGCATTGTCTACAGGAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAATGCCTGAAGTTCTAC
TCCAAGATCAGCGAGTACAGGCACTACTGCTACTCCTGTACGGACACCCTCGAACAGCAGTACAACAACCCCTGTGCGACCTCCTGATTAGGTGCATC
AACTGCCAGAAGCCCTCAGGTTCCACAACATCCGCGCCGCTGGACCGCCGATGCATGCTTGTGTCAGGGGCCCCGACGACCCCTACAAGCTCCCCGAC
CTGTGCACCGAATCAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTGTATTGCAAGACCGTGTGAGCTGACCGAGGTTTTGCAATTTGCCCTTAAAG

GACGGCTTCGTCGTATAGGGACTCCATCCCCACGCCGCTGCCATAAGCTGGAGAAGCTACCAACACCGGACTGTATAATCTGCTGATCAGGTGCCTC
AGGTGCCAGAAGGCAGAAAAGCTGAGGCATCTCAACGAGAAGCGCCGGTCCACAATATTGCCGGCCCCGGAGACACCCACACTCCATGAGTACATGCTC
GACCTGCAGCCGAAACCACCGACCCCGACAGAGCCCACTACAACATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGGACTCCACCCTGAGAAGATGCGTGCAGTCCACC
CACGTGGACATCCGCACACTCGAAGACTGCTGATGGGAACCCCTGGGCATCGTGTGCCCCATCGGCCCGATGACAAGGCCACCTTGACAGGACATCGTGTG
CACCTGGAACCACAGAACGAGATCCCGTGCCTCGAAGAAGAAAACGACGAAATCGACGGAGTGAATCACCAGCACCTGCCCGCAGAAGGGCCGAGCCT
CAGAGACACACCATGCTCTGCATGTGCTGCAATGCGAAGCCAGGATTAAGCTGGTGGTGGAGAGACGCCGACGACCTGAGGGCCTTCCAGCAGCTCTC
CTGAACACACTGTCTTCGTGTGCCCTGGGCTGATAA

[0518] 서열번호 44는 CNCM에 수탁번호 I-5760으로 제출된 렌티바이러스 벡터에 의해 코딩된 항원 구성체의 아미노산 서열이다.

[0519] MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIIECVYCKQQLLRREYDFAFRDGCI VYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRCI
NCQKPLRFHNI RGRWTGRCMSSCRGPPDPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLEL TEVFEFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLL IRCL
RCQKAEKLRHLNEKRRFHNIAGPGDPTLHEYMLDLQPETTDPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRCVQSTHVDI RTLEDLLMGTGLIVCP IGPDDKATLQDIVL
HLEPQNEIPVDSEEEENDEIDGVNHQHL PARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQLFLNLSFVCPWA

[0520] 서열번호 45는 CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0521] ATGAGGCGCCCTACAAGCTGCCGACCTGTGCACCGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATCGAGATCACCTGCGTGTACTGCAAGACCGTGTGGAGCTG
ACCGAGGTGTTCGAATTCGATTCAGGACGGATTGCTGCTGATAGGGACAGCATTCACACGCCGCTGCCACAAGCTGGAGAAATGACTAACACCCGGA
CTGTATAATCTGCTGATCCGGTGCCTGAGGTGTCAGAAGCCGAGAAGCTGAGGCATCTGAACGAGAAAAGGAGATCCACAATATCGCCGACACTTCCAG
GACCCAGGAGAGGCCAGAACTGCCAGTTGTGCACCGAGCTCCAGACAACCATCCAGCATCATCTGGAGTGCCTGACTGTAAGCAGCAGTTG
CTGAGGAGAGAGGTGATGACTTCGCTTCAGAGACGGATGCTATAGTAAGCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACTCCAAGATC
AGTGAGTACAGGCATTACTGCTACAGCCTGTATGGAACCACTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTCTGATTAGGTGCATCACTGCCAG
AAGCCCTCAGGTTCACAACATCCGGGGCAGGTGGACCGGAAGGTGCATGTCTGTGACGGTCCGCCGCCCGGACCTAAAGCCACCTCCAGGACATC
GTGCTGCACCTGGAGCCCGAAGAGATCCCGTGCCTCAGAGGAGGAGAACGACGAAATGACGGCGTCAACCACCAGCACCTGCCGCTCGCAGAGCC
GAACCCAGAGACACACCATGCTCTGCATGTGCTGCAAATGCGAGGCCGGATTAAGCTGGTGGTGGAGAGCTCCGCCGACGATCTGAGAGCCTCCAGCAG
CTTCTCTGAACACCTGTCTTCGTGTGCCCTGGCCGGTCCCGTGACACCTACCCTGCACGAGTACATGCTCGATCTGCAGCCGAGACCACCGAC
CCCGATCGCGCACACTACAACATCGTGACCTTCTGTGCAAATGTGACAGCACCTGAGACGGTGCCTCAGTCCACCCACGTTGACATCCGCACCCCTCGAA
GACCTGCTCATGGAAACCTGGGCATCGTGTGCCCATCGCTGATAA

[0522] 서열번호 46는 CNCM에 수탁번호 I-5761로 제출된 렌티바이러스 벡터에 의해 코딩된 항원 구성체의 아미노산 서열이다.

[0523] MRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLEL TEVFEFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLL IRCLRCQKAEKLRHLNEKRRFHNIAGHFQ
DPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIIECVYCKQQLLRREYDFAFRDGCI VYRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL IRCINQ
KPLRFHNI RGRWTGRCMSSCRSAGPGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEEEENDEIDGVNHQHL PARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQ
LFLNLSFVCPWAGPGDPTLHEYMLDLQPETTDPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRCVQSTHVDI RTLEDLLMGTGLIVCP I A

[0524] 서열번호 47는 CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터의 항원 구성체를 코딩하는 핵산 서열이다.

[0525] ATGGGCCCTAAGGCCACCTGCAGGACATCGTGTGCACTTGGAGCCCGAAGAGATCCCGTGGACAGCGAGGAGGAGAACGACGAAATCGACGGCGTG
AACCACCAGCACCTGCCGCAAGAGGGCCGAACCCAGAGGCACACCATGCTCTGCATGTGCTGCAAATGCGAGGCCAGGATCAAGCTGGTGGTGGAAAGC
AGCGCCGACGATCTGAGGCATTCCAGCAGCTGTTCTGAAACCCCTCCTCTCGTGTGCCCTGGGGAACCCGGCAGGACCATCCCTATAAACTGCCGAC
CTCTGCACCGAGCTGAACACCTCCCTGCAGGACATTGAGATCACCTGCGTCTACTGAAAACCGTCTGGAAGTACCAGGAGTGTTCGAGTTCGCCTTCAA
GACGGCTTCGTGCTGACAGGACAGCATCCCCACGCCCTGCCATAAGCTGGAGAAACTGACCAACACCGGCTGTACAACCTGCTGATCCGTTGCCCTG
AGATGTCAGAAGGCCGAGAACTGAGGCACCTCAACGAGAAAAGGAGATTCCACAATATTGCCGGCCCCGGCAGACCCCAACCTGCACGAATACATGCTC
GACCTGCAGCCGAAACCACCGACCCCGACAGAGCCCACTACAACATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGGACTCCACCCTGAGAAGATGCGTGCAGTCCACC
CACGTGGACATCCGCACACTCGAAGACTGCTGATGGGAACCCCTGGGCATCGTGTGCCCCATCGCTTCCAGGCCCTTTCAGGACCCCGAGAACCGCCAAGA
AAGCTGCCCGAGCTCTGCACCGAACTGCAGACCACCATCCAGCAGATCATCTGGAATGCGTCTACTGTAAGCAGCAGTTGCTGAGGAGGGAGGTGATGAT
TTCGCCTTCAGAGACGGCTGCATGCTTACAGGAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAATGCTGAAGTTCTACTCCAAGATCTCCGAATACAGACACTATTGC
TACAGCCTGTACGGACACCCCTCGAACAGCAGTACAACAACCCCTGTGCGACCTCTGATCAGGTGCATCAACTGCCAGAAGCCCTCCGGTCCACAAC
ATCCGAGGAAGATGGACCGCCGGTGCATGTCTGTGACGGTCTGATAA

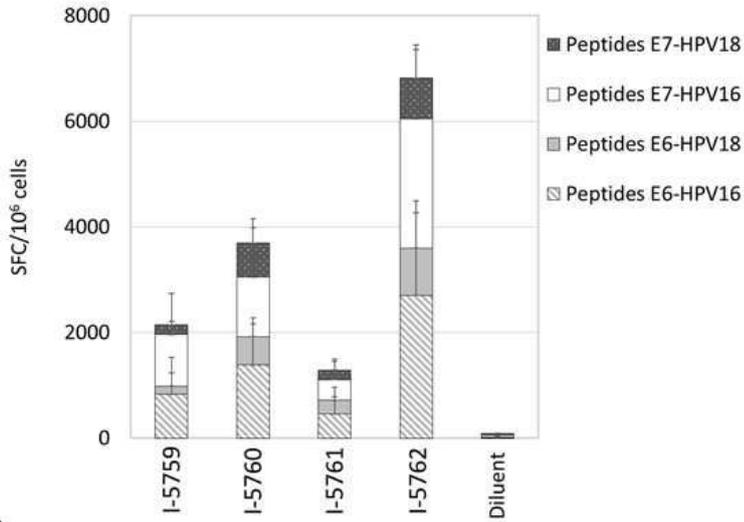
[0526] 서열번호 48는 CNCM에 수탁번호 I-5762로 제출된 렌티바이러스 벡터에 의해 코딩된 항원 구성체의 아미노산 서열이다.

[0527]

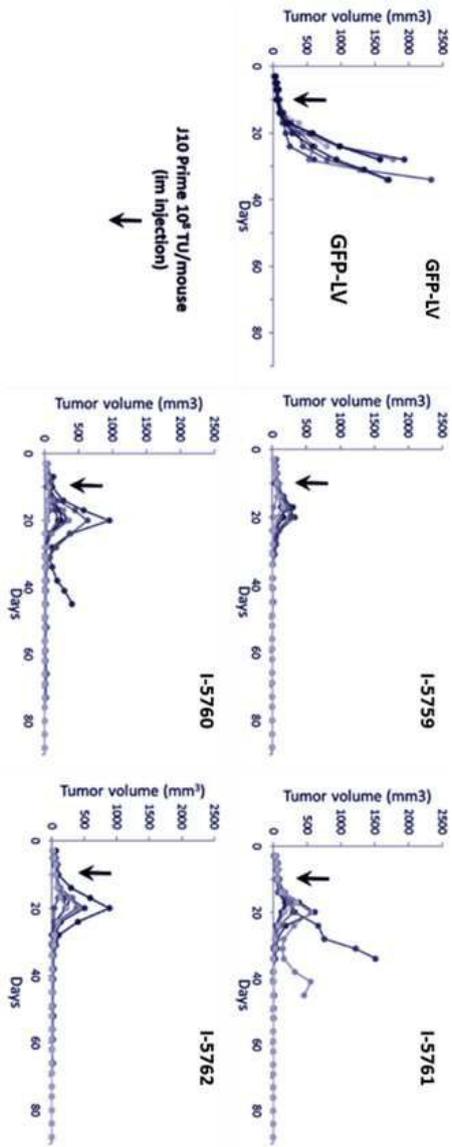
MGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDSEEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIKLVVSSADDLRAFQQFLNLTLSFVCPGEPGRTIPYKLPD
 LCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTVFEFAFKDGFVVYRDSIPHAACHKLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKAEKLRHLNEKRRFHNIAGPGDPTLHEYML
 DLQPETTPDRAHYNIVTFCKCDSTLRRCVQSTHVDIRTEDLLMGTGIVCPIASQAFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLRREVVD
 FAFRDGCIYVRNPYAVCDKCLKFYSKI SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLRFHNI RGRWTGRMSSCRS

도면

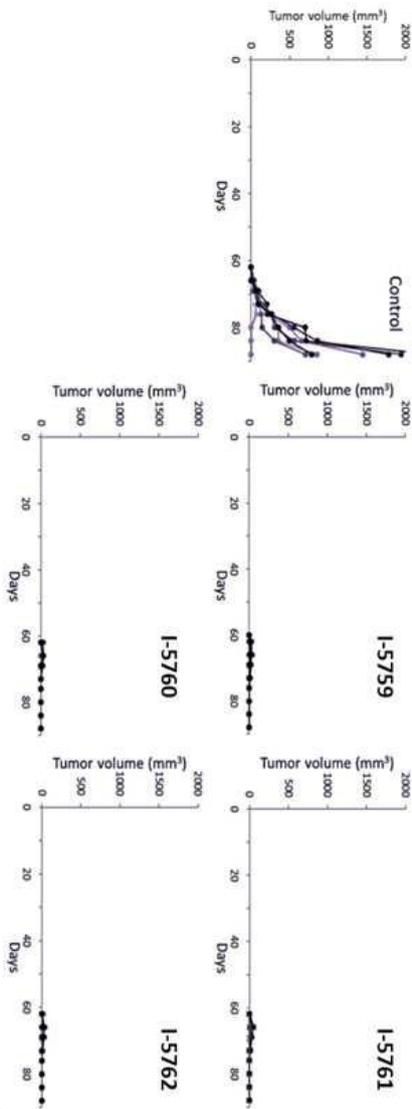
도면1



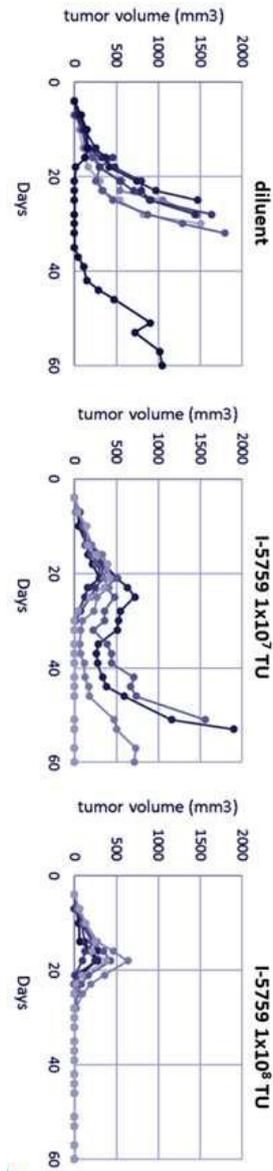
도면2



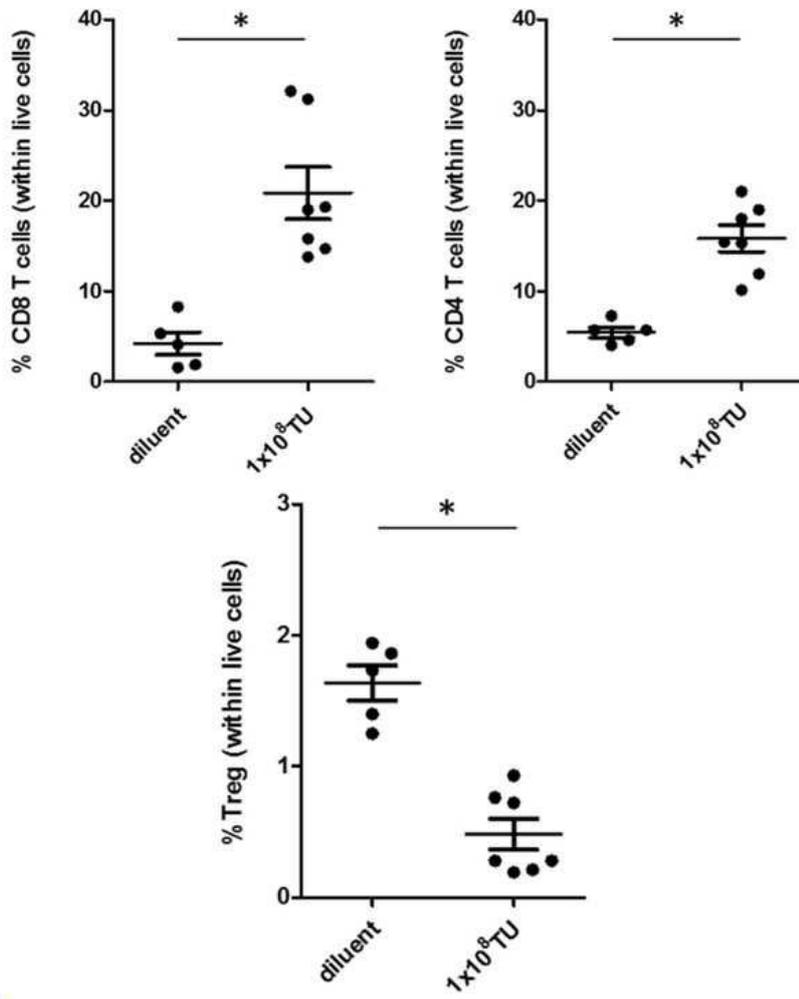
도면3



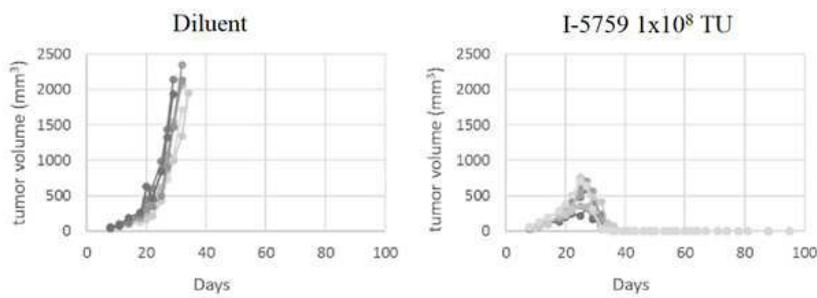
도면4



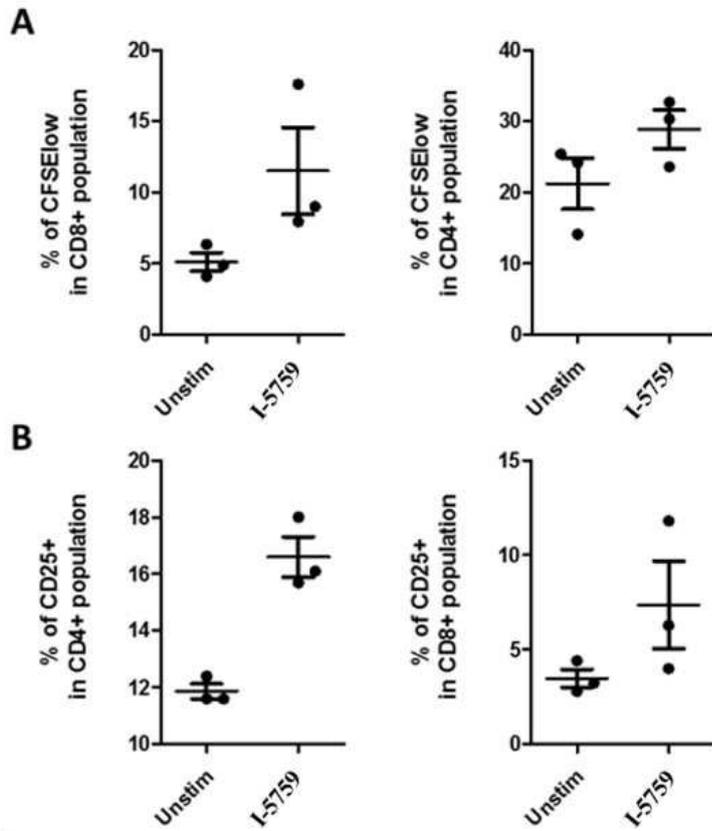
도면5



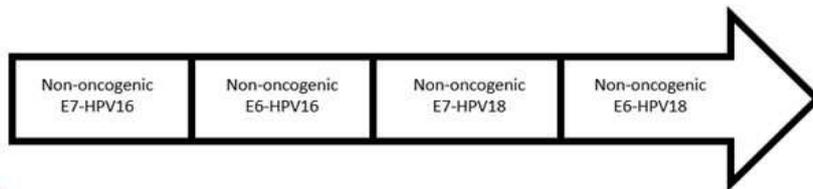
도면6



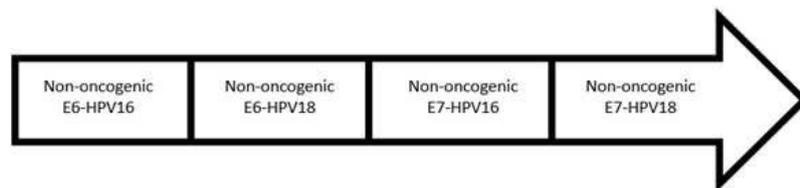
도면7



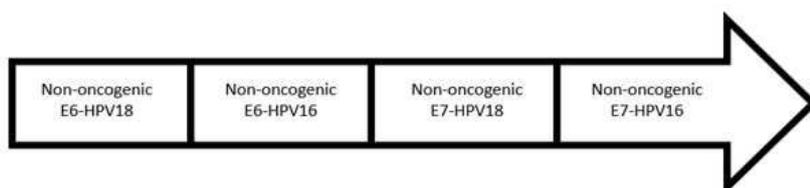
도면8a



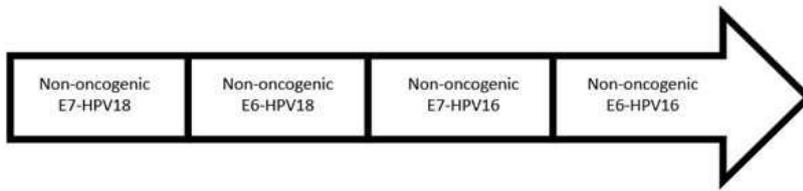
도면8b



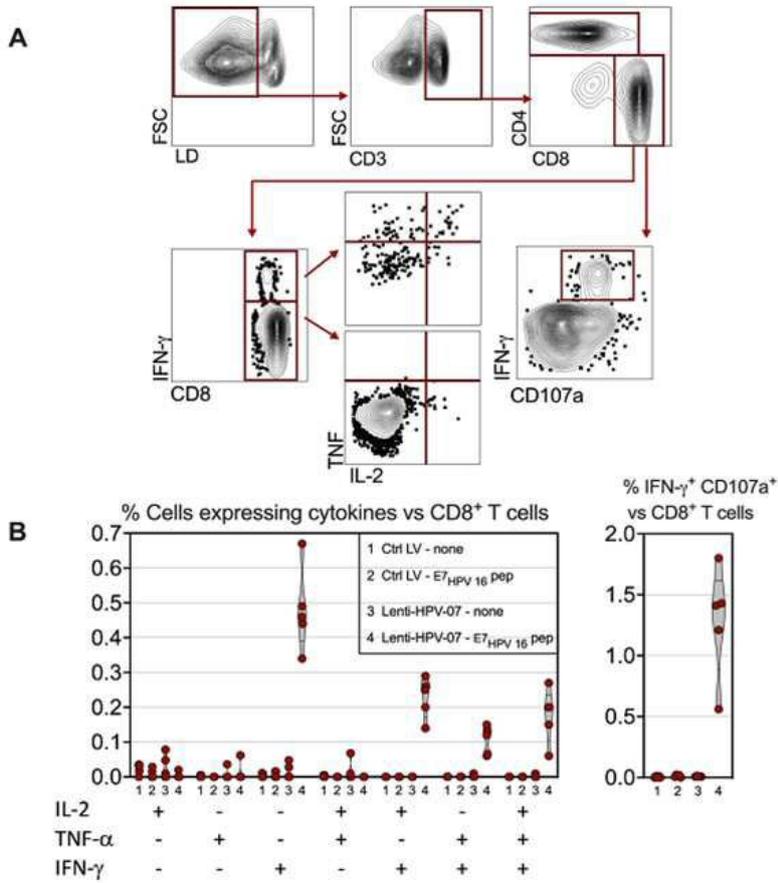
도면8c



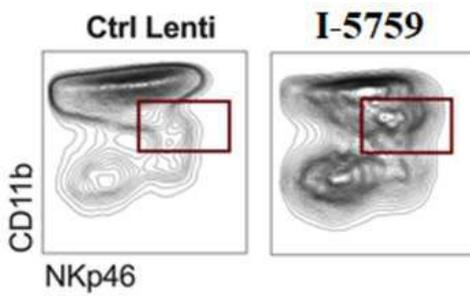
도면8d



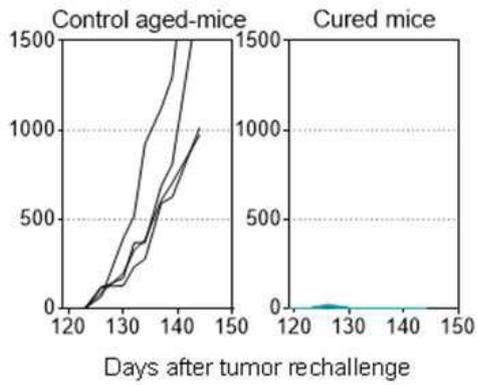
도면9



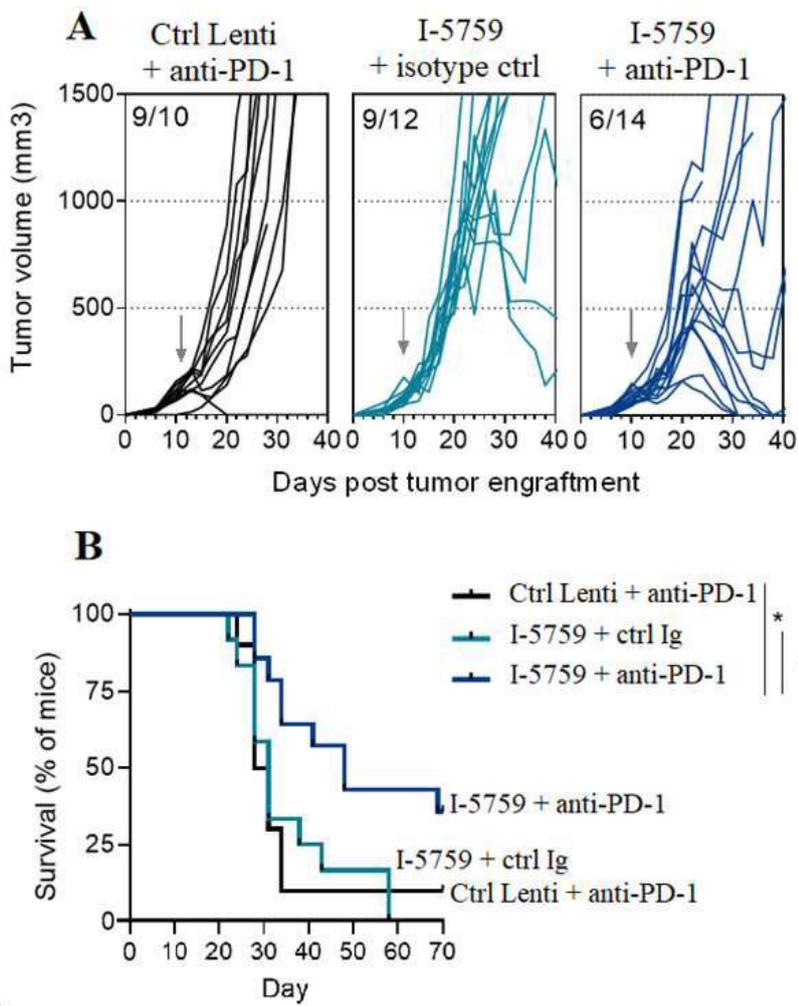
도면10



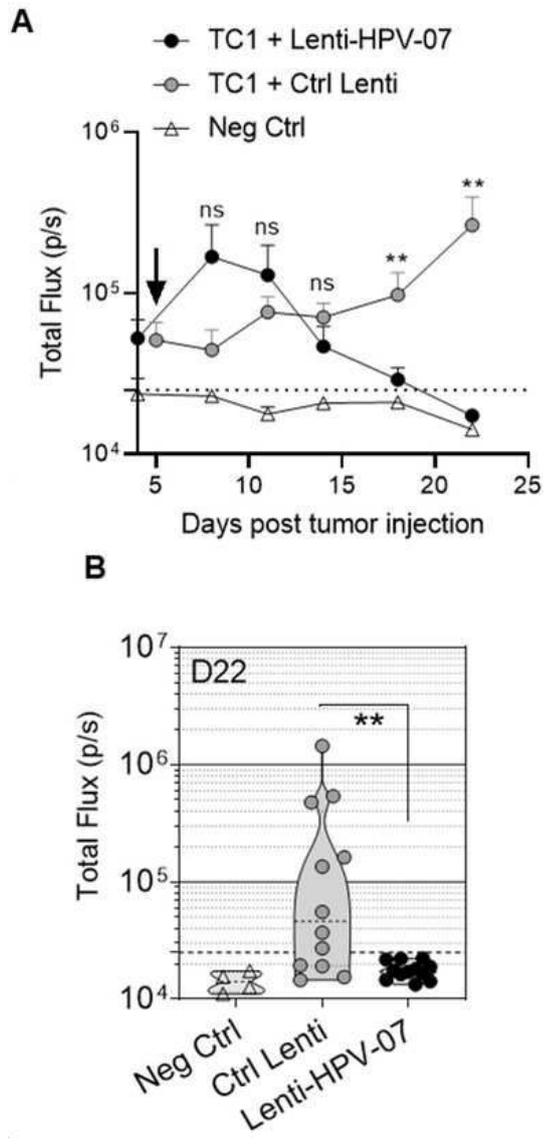
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.