



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.19

(21) Номер заявки
201790976

(22) Дата подачи заявки
2015.11.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ HPV16

(31) 14191660.1

(32) 2014.11.04

(33) EP

(43) 2017.09.29

(86) PCT/EP2015/075516

(87) WO 2016/071306 2016.05.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Банник Эвелин М. (US), Кюстерс
Жером Х.Х.В., Схепер Геррит С.,
Остерхейс Кун, Эйл Тако Жилль, Кан
Селина (NL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2013083287
OHLSCHLAGER P. ET AL.: "An improved
rearranged Human Papi II omavirus Type 16 E7 DNA
vaccine candi date (HPV-16 E7SH) induces an E7 wi I
dtype-specific T cel I response", VACCINE, ELSEVIER
LTD, GB, vol. 24, no. 15, 5 April 2006 (2006-04-05), pages
2880-2893, XP028011167, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.
1016/J.VACCINE.2005.12.061 [retrieved on 2006-04-05]
cited in the application See e.g. the abstract

KOEN OOSTERHUIS ET AL.: "Preclinical
development of highly effective and safe DNA vaccines
directed against HPV 16 E6 and E7", INTERNATIONAL
JOURNAL OF CANCER, vol. 129, no. 2, 15 July
2011 (2011-07-15), pages 397-406, XP055031276, ISSN:
0020-7136, DOI: 10. 1002/ijc. 25894 See e.g. the abstract
WO-A1-2009106362

Q. ZHANG ET AL.: "Immune epitope database
analysis resource (I EDB-AR)", NUCLEIC ACIDS
RESEARCH, vol. 36, no. Web Server, 19 May 2008
(2008-05-19), pages W513-W518, XP055179474, ISSN:

0305-1048, DOI: 10. 1093/nar/gkn254, See the abstract or
the introduction section

C. LUNDEGAARD ET AL.: "NetMHC-3.0:
accurate web accessible predictions of human, mouse
and monkey MHC class I affinities for peptides of
length 8-11", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 36,
no. Web Server, 19 May 2008 (2008-05-19), pages
W509-W512, XP055179516, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.
1093/nar/gkn202 cited in the application See e.g., the
abstract

MOSCICKI ET AL.: "HPV Vaccines : Today and
in the Future", JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH,
ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NEW YORK, NY,
US, vol. 43, no. 4, 1 October 2008 (2008-10-01), pages
S26-S40, XP026640804, ISSN: 1054-139X, DOI: 10. 1016/
J.JADOHEALTH. 2008.07.010 [retrieved on 2008-09-20]
See e.g. page S36, right column, third paragraph

BRANDSMA ET AL.: "Therapeutic vaccination of
rabbits with a ubiquit in-fused papi II omavirus E1, E2,
E6 and E7 DNA vaccine", VACCINE, ELSEVIER LTD,
GB, vol. 25, no. 33, 24 July 2007 (2007-07-24), pages
6158-6163, XP022168615, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.
1016/J.VACCINE.2007.06.012 See e.g. the abstract
US-A1-2007014810

SASMITA MISHRA ET AL.: "Dendritic Cel
1-Mediated, DNA-Based Vaccination against Hepatitis
C Induces the Multi-Epitope-Specific Response of
Humanized, HLA Transgenic Mice", PLOS ONE, vol.
9, no. 8, 11 August 2014 (2014-08-11), page e104606,
XP055247057, DOI: 10. 1371/journal.pone. 0104606. See
page 2, right column, penultimate paragraph

MOISE L. ET AL.: "VennVax, a DNA-prime,
peptide-boost multi-T-cell epitope poxvirus vaccine, induces
protective immunity against vaccinia infection by T cell
I response alone", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol.
29, no. 3, 10 January 2011 (2011-01-10), pages 501-511,
XP027575654, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-11-04]
See page 505, left column, first full paragraph

STEVEN F. MOSS ET AL.: "HelicoVax: Epitope-
based therapeutic vaccination in a mouse model",
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 29, no. 11,
27 December 2010 (2010-12-27), pages 2085-2091,
XP028152754, ISSN: 0264-410X, DOI: 10. 1016/
J.VACCINE.2010. 12.130 [retrieved on 2011-01-07] See
page 2087, right column, last paragraph

(57) Настоящее изобретение относится к оригинальным конструкциям на основе нуклеиновых кислот и полипептидам, которые можно использовать в терапевтических вакцинах против HPV16. Такие полипептиды содержат практически все возможные Т-клеточные эпитопы онкобелков Е6 и Е7 HPV 16, но при этом они имеют сильно уменьшенную (по сравнению с Е6 и Е7 wt), вплоть до

необнаруживаемой, трансформирующую активность, посредством включения фрагментов белков E6 и E7, которые были переупорядочены, и в то же время содержат минимальное количество нежелательных неоэпитопов. Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп белка E2 вируса папилломы человека (HPV), например белок E2 HPV 16.

035461 B1

035461 B1

Настоящее изобретение относится к области медицины и более конкретно к конструкциям на основе нуклеиновых кислот и полипептидам, которые можно применять в терапевтических вакцинах против вируса папилломы человека 16 типа.

Предпосылки изобретения

Семейство вирусов папилломы человека (HPV) состоит из более чем 100 типов (также называемых подтипами), которые способны инфицировать кератиноциты кожи или слизистых оболочек. Более 40 типов HPV обычно передаются половым путем, и инфекции HPV аногенитальной области являются широко распространенными как у мужчин, так и у женщин. Некоторые типы HPV, передающиеся половым путем, могут вызывать появление остроконечных бородавок. Хронические инфекции, вызываемые типами HPV "высокого риска" (например, 16, 18, 31, 45 типами), отличными от тех, которые вызывают кожные бородавки, могут прогрессировать до предраковых поражений и инвазивного рака, например, шейки матки, вульвы, влагалища, пениса, ротоглотки и ануса. Большинство инфекций, вызываемых HPV, самопроизвольно проходят в течение одного-двух лет после инфицирования. У здоровых индивидуумов циркулирующие CD4+ Т-клетки типов Th1 и Th2, специфичные в отношении вирусных ранних белков E2, E6 и E7 HPV-16, а также E6-специфичные CD8+ Т-клетки мигрируют в кожу при контрольном заражении антигеном, что указывает на то, что успешная защита против инфекции, вызываемой HPV-16, обычно связана с системным эффекторным Т-клеточным ответом на эти вирусные ранние антигены. У меньшинства (~1%) инфицированных индивидуумов инфекция HPV сохраняется, что в конечном итоге приводит к опухолевым поражениям половых органов. Среди HPV высокого риска HPV16 и HPV18 являются основной причиной рака шейки матки, вместе вызывая приблизительно 70% случаев, а также эти два типа играют важную роль в других HPV-индуцированных опухолях, таких как анальный рак и рак ротоглотки. Во всем мире HPV является одним из наиболее серьезных инфекционных агентов, вызывающих рак.

Вакцинация против HPV считается оправданной стратегией снижения заболеваемости инфекцией, вызываемой HPV, или ее последствий (Van der Burg и Melief, 2011, *Curr Opin Immunol* 23: 252-257).

Профилактические вакцины против HPV на основе вирусоподобных частиц (VLP), образованных (оболочечным) белком L1 HPV 16 и 18 типов, очень эффективны для предупреждения хронической инфекции и связанного с ней заболевания, вызываемых HPV16 и HPV18. Считается, что эти вакцины обеспечивают стерильный иммунитет посредством индукции нейтрализующих антител против белков L1. Добавление VLP на основе L1 из дополнительных типов HPV высокого риска может дополнительно увеличить широту защиты, предоставляемой такими вакцинами.

Однако в то время как такие вакцины могут предупреждать начальную инфекцию (т.е. они обеспечивают профилактику), отсутствуют данные о положительном эффекте в отношении установленных половых поражений, вызванных HPV16 и HPV18, поэтому они не считаются терапевтическими вакцинами против HPV (Hildesheim et al., 2007, *JAMA* 298: 743-53).

Несмотря на внедрение таких профилактических вакцин, большое количество людей уже заражены или все еще подвержены риску заражения хроническими инфекциями HPV высокого риска и, следовательно, рискуют получить рак. Терапевтические вакцины для ликвидации установившихся инфекций HPV и связанных с ними заболеваний являются насущной неудовлетворенной потребностью медицины.

Были описаны некоторые попытки решить эту проблему. Например, клинические испытания проводили в отношении различных стратегий вакцинации, таких как белок слияния, состоящий из белка теплового шока (Hsp) из *Mycobacterium bovis* и E7 HPV-16 или состоящий из белка слияния E6, E7 и L2 из HPV-16 и HPV-18, химерные VLP L1-E7, рекомбинантные вирусы осповакцины, экспрессирующие либо E6 и E7 вирусов HPV-16 и HPV-18, либо E2 вируса папилломы крупного рогатого скота, ДНК-вакцины, экспрессирующие СТЛ-эпитопы E6 и E7 HPV-16 и HPV-18, живые аттенуированные возбудители листериоза, *Listeria monocytogenes* (Lm), которые секретируют антиген E7 HPV-16, и синтетические длинные пептиды (SLP), содержащие пептиды E6 и E7 HPV-16. Хотя некоторые из этих подходов показывают некоторую, но ограниченную клиническую эффективность, большинство из них потерпело неудачу, что свидетельствует о необходимости совершенствования существующих в настоящее время стратегий.

Интеграция ранних белков HPV E6 и E7 является необходимой стадией в процессе от инфицирования до рака, и для поддержания опухолевого фенотипа раковых клеток шейки матки необходима непрерывная экспрессия E6 и E7. Поэтому E6 и E7 считаются хорошими мишенями для терапевтической вакцинации. Как уже упоминалось, некоторые исследования показали, что терапевтическая вакцинация женщин, инфицированных HPV высокого риска, может вызывать регрессию существующих поражений. Kenter et al показали стойкую и полную регрессию у 47% пациентов с интраэпителиальной неоплазией вульвы (VIN) с помощью SLP, полученных из белков E6 и E7 HPV16, и адьюванта в качестве терапевтической вакцины (Kenter et al., 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47). Аналогичным образом исследование, в котором белковую вакцину (TA-CIN, состоящую из белка слияния E6, E7 и L2 HPV16) объединяли с местной иммуномодуляцией у 2/3 пациентов с VIN, показало полную регрессию у 63% пациентов (Daayana et al., 2010, *Bt J Cancer* 102: 1129-36). Возможные недостатки синтетических длинных пептидов в качестве вакцины включают технологичность производства в широком масштабе и связанные с этим затраты, потребность в потенциально высокоактивном адьюванте и связанные с этим неблагоприятные эффекты, связанные с иммунизацией (особенно боль и припухлость). В связи с высоким уровнем дискомфорта ма-

вероятно, что SLP будут использоваться на ранней стадии заболевания, когда самопроизвольный иммунный клиренс все еще высок. Аналогичным образом в связи с необходимостью местного лечения имиквимодом в случае лечения TA-CIN переносимость является важным вопросом, так как большинство женщин испытывают местные и системные побочные эффекты, продолжающиеся на протяжении лечения имиквимодом, что может повлиять на повседневную деятельность.

Возможной альтернативой является применение прививок на основе нуклеиновых кислот, таких как ДНК-вакцины или вирусные вакцины, кодирующие белок Е6 и/или Е7 HPV, для вакцинации.

Однако белки Е6 и Е7 HPV обладают онкогенным потенциалом, и, таким образом, вакцинация посредством вакцин, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие эти белки, создает риск индуцирования клеточной трансформации вследствие возможности длительной экспрессии антигенов.

Поэтому в случае генетической вакцинации можно применять неонкогенные/детоксифицированные варианты Е6 и/или Е7, чтобы исключить любой риск клеточной трансформации в результате вакцинации. Е6 и Е7 дикого типа без онкогенного потенциала обычно получают при помощи делеции и/или замены остатков, которые, как известно, важны для функционирования этих белков (например, Smahel et al., 2001, *Virology* 281:231-38; Yan et al., 2009, *Vaccine* 27: 431-40; Wiekling et al., 2012, *Cancer Gene Ther* 19: 667-74; WO 2009/106362). Однако недостатком этих подходов является то, что они несут риск удаления важных Т-клеточных эпитопов из белков и/или введения новых нежелательных Т-клеточных эпитопов в них и, таким образом, могут не приводить к необходимому иммунному ответу.

В альтернативной стратегии для устранения онкогенного потенциала Е6 и Е7 HPV16 были сконструированы "перетасованные" варианты (т.е. полипептиды, в которых фрагменты белка дикого типа перепорядочены) белков Е6 и Е7 (например, Öhlschläger et al., 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Oosterhuis et al., 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406; Oosterhuis et al., 2012, *Hum Gen Ther* 23: 1301-12). Однако эти подходы по-прежнему требуют получения, составления и введения многочисленных молекул для обеспечения включения всех возможных эпитопов обоих белков Е6 и Е7, что приводит к субоптимальной логистике и относительно высоким затратам, и, кроме того, с помощью описанных стратегий вводят потенциально сильные неприродные эпитопы, которые не присутствуют в Е6 и Е7, и поскольку иммунные ответы могут быть перенаправлены от соответствующих эпитопов Е6/Е7 к таким неприродным эпитопам, описанные конструкции могут не иметь оптимальных иммунологических характеристик.

Таким образом, в данной области остается потребность в терапевтических вакцинах против HPV, предпочтительно имеющих меньше недостатков описанных ранее подходов.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусматривают молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды, содержащие практически все возможные Т-клеточные эпитопы онкобелков Е6 и Е7 HPV16, но при этом они имеют сильно уменьшенную (по сравнению с Е6 и Е7 wt), вплоть до необнаруживаемой, трансформирующую активность, посредством включения фрагментов белков Е6 и Е7, которые были перепорядочены, и в то же время содержат минимальное количество нежелательных неэпитопов. Эти молекулы отличаются от молекул, ранее представленных другими исследователями.

В настоящем изобретении предусматривают молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1.

Кодируемый полипептид может дополнительно содержать лидерную последовательность.

В определенных вариантах осуществления кодируемый полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп белка Е2 вируса папилломы человека (HPV), например белок Е2 HPV16. Белок Е2 может быть подвергнут мутации для уменьшения связывания ДНК, например посредством делеции или мутации (мутаций) в своем ДНК-связывающем домене. В определенных вариантах осуществления кодируемый полипептид содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты является кодон-оптимизированной, например для экспрессии в клетках человека.

В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

В настоящем изобретении также предусматривают вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой ДНК-вектор, такой как плазмида. В других вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, такой как вектор на основе MVA или рекомбинантный аденовирусный вектор. В определенных предпочтительных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус.

В определенных вариантах осуществления промотор в векторе функционально соединен с репрессорной операторной последовательностью, с которой репрессорный белок может связываться для репрессии экспрессии промотора в присутствии указанного репрессорного белка. В определенных вариантах осуществления репрессорная операторная последовательность представляет собой последовательность TetO или последовательность CuO.

В настоящем изобретении также предусматривают композицию вакцины, содержащую вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В настоящем изобретении также предусматривают способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV, в частности HPV16, у субъекта, при этом способ включает введение субъекту композиции вакцины в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем изобретении также предусматривают вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения в индуцировании иммунного ответа в отношении HPV, в частности HPV16.

В определенных вариантах осуществления вакцину вводят субъекту более одного раза.

В настоящем изобретении также предусматривают способ лечения любого из хронической инфекции, вызванной HPV (в частности хронической инфекции, вызванной HPV16), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки, такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у субъекта, при этом способ включает введение субъекту вакцины в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем изобретении также предусматривают вакцину в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении любого из хронической инфекции, вызванной HPV (в частности хронической инфекции, вызванной HPV16), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки, такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у субъекта.

В настоящем изобретении также предусматривают полипептид, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Экспрессия белков слияния E6 и E7 HPV16. Клетки HEK-293T временно трансфицировали ДНК-векторами, экспрессирующими трансгены, указанные на фигуре выше. Через 24 ч после трансфекции клетки собирали и клеточные экстракты анализировали при помощи SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителом против E7 HPV16 (верхняя секция). Загрузочный контроль, показывающий NF-κB (нижняя секция), подтверждает аналогичную загрузку клеточных лизатов на всех дорожках. Слева показан маркер молекулярного веса. Предполагаемые размеры белков слияния: E6E7SH прим. 38 кДа; E2E6E7SH и E6E7E2SH прим. 75 кДа, LSE2E6E7SH прим. 78 кДа.

Фиг. 2. Образование колоний в мягком агаре. (A) Схематическое изображение постановки анализа в мягком агаре. (B) Иллюстративные изображения с микроскопа при 40-кратном увеличении клеток в агаре через шесть недель после посева. Белые стрелки указывают на колонии, наблюдаемые у трансфицированных E7wt клеток. (C) Определение количества колоний через шесть недель после посева в агар с использованием Gelcount™ и сопутствующего программного обеспечения. *: $p < 0,05$ (модель регрессии Пуассона); **: не наименьшая эффективность (обобщенная линейная модель с пределом не меньшей эффективности, составляющим 5%).

Фиг. 3. E6E7SH с утраченными активностями E6 и E7. (A) Иллюстративный вестерн-блоттинг, на котором видно отсутствие разрушения p53 при помощи E6E7SH. Клетки человека NCI-H1299 с нефункциональным p53 совместно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей p53, в комбинации с плазмидой, экспрессирующей E6 HPV16 дикого типа, E6E7SH, или пустым вектором. Отсутствие TF указывает на нетрансфицированные клетки. Через 24 ч после трансфекции готовили клеточные лизаты и 30 мкг общего белка загружали в гель. Верхняя секция - окрашивание p53, средняя секция - окрашивание E6, нижняя секция - окрашивание NF-κB (загрузочный контроль). (B) Количественная оценка уровней p53 в четырех независимых анализах. Сигнал p53 нормализовали по отношению к сигналу NF-κB. (C) Вестерн-блоттинг, на котором видно отсутствие разрушения pRb при помощи E6E7SH. Клетки Saos-2 с нефункциональным pRb трансфицировали плазмидой, экспрессирующей pRb, в комбинации с плазмидой, экспрессирующей E7 HPV16 дикого типа, E6E7SH, или пустым вектором. Отсутствие TF указывает на нетрансфицированные клетки. Через 24 ч после трансфекции готовили клеточные лизаты и 10 мкг общего белка загружали в гель. Верхняя секция - окрашивание pRb, средняя секция - окрашивание E7, нижняя секция - окрашивание NF-κB (загрузочный контроль). (D) Количественная оценка уровней pRb в четырех независимых анализах. Сигнал pRb нормализовали по отношению к сигналу NF-κB. *: $p < 0,05$ (модели дисперсионного анализа ANOVA); **: не наименьшая эффективность (тестирование основано на доверительном интервале, составляющем 95%, полученном из моделей дисперсионного анализа ANOVA. Предел не меньшей эффективности составлял 75%).

Фиг. 4. E6E7SH не иммортализует первичные эпидермальные кератиноциты человека. Первичные эпидермальные кератиноциты человека трансдуцировали лентивирусами, кодирующими любое из открытой рамки считывания E6 и E7 дикого типа из HPV16 (E6E7wt), последовательности E6E7SH или eGFP. Нетрансдуцированные донорные клетки использовали в качестве контроля. Только экспрессия E6E7wt индуцирует иммортализацию первичных кератиноцитов, что подтверждается увеличенной про-

должительностью жизни и активацией hTERT примерно на 200 день (не показано). Обозначение в виде крестика указывает, что клетки погибли при старении, и их нельзя было в дальнейшем культивировать. Подробности см. в примере 2. Аналогичные результаты были получены у двух дополнительных доноров (не показаны).

Фиг. 5. Иммунный ответ, индуцированный E6E7SH после ДНК-иммунизации - анализ $IFN\gamma$ ELISPOT. (А) Схема иммунизации. Мышей линии СВ6F1 иммунизировали ДНК-плазмидами, экспрессирующими E6E7SH, или плазмидами, не экспрессирующими трансген (контроль). Через две недели после иммунизации мышья умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пептидными пулами из олигонуклеотидов из 15 нуклеотидов, аналогичными E7. (В) E7-специфические иммунные ответы у отдельных мышья, измеренные с помощью анализов $IFN\gamma$ ELISPOT, представлены как пятнообразующие единицы (SFU) на 10^6 спленоцитов.

Фиг. 6. Иммуногенность E6E7SH - анализ $IFN\gamma$ ELISPOT. (А) Схема иммунизации. Мышей иммунизировали аденовекторами со вставками, которые указаны. E7-специфические ответы анализировали при помощи $IFN\gamma$ ELISPOT в момент времени две недели (В) и в момент времени восемь недель (С) (представлены как пятнообразующие единицы (SFU) на 10^6 спленоцитов). Темные кружочки представляют мышья, иммунизированных дозой, составляющей 1×10^{10} вр, а светлые кружочки представляют мышья, иммунизированных с помощью 5×10^9 вр. Черная полоса представляет собой среднее геометрическое ответов. Пунктирная линия указывает нижний предел обнаружения в анализе ELISPOT. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли с данными с логарифмическим преобразованием. *: $p < 0,05$. Подробности см. в примере 3.

Фиг. 7. Иммуногенность E2E6E7SH - E7-тетрамерном окрашивании. (А) Схема иммунизации. Мышей линии СВ6F1 иммунизировали с помощью 1×10^{10} вр аденовекторов, экспрессирующих трансгены, которые указаны. Через две недели после иммунизации мышья умерщвляли и выделенные спленоциты анализировали на присутствие клеток CD8+, способных взаимодействовать с тетрамерами E7₄₉₋₅₇-H2-Db (В) Процент положительных по E7-тетрамеру CD8+ Т-клеток указан на оси у. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли на данных с логарифмическим преобразованием, различия между различными вариантами E6E7SH не были статистически значимыми.

Фиг. 8. Иммуногенность E2E6E7SH - анализ $IFN\gamma$ ELISPOT. (А) Схема иммунизации. Мышей линии СВ6F1 иммунизировали аденовекторами, экспрессирующими трансгены, указанные внизу секций В и С. Через две недели после иммунизации мышья умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пептидными пулами из олигонуклеотидов из 15 нуклеотидов, аналогичными E2 (В), E6 (не показано) или E7 (С). Ответы представлены как SFU на 10^6 спленоцитов. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли с данными с логарифмическим преобразованием. Ответ E2, индуцированный аденовекторами, кодирующими только E2, выше, чем ответ, индуцированный полипептидами по настоящему изобретению, которые включают фрагменты E6 и E7. Различия были значимыми для E2 по сравнению с E2E6E7SH и для E2 по сравнению с E6E7E2SH (*: $p < 0,05$). Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли с данными с логарифмическим преобразованием.

Фиг. 9. Устойчивые ответы у иммунизированных мышья. (А) Схема иммунизации. Мышей линии СВ6F1 иммунизировали с помощью 1×10^{10} вр векторов Ad35, экспрессирующих варианты LSE2E6E7SH, E2E6E7SH, E6E7SH, или с помощью аденовекторов, не экспрессирующих трансген (пустых). Образцы крови брали каждые две недели для определения процента E7-специфических CD8+ Т-клеток путем тетрамерного окрашивания. (В) Иммунные ответы через две недели после иммунизации. Вектор, включающий лидерную последовательность, индуцировал более высокий ответ, чем векторы без лидерной последовательности; LSE2E6E7SH по сравнению с E2E6E7SH (*: $p < 0,05$). (С) Кинетика ответов. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли с данными с логарифмическим преобразованием с использованием массива данных 2 недели. Ответ в отношении E7, индуцируемый молекулами, включающими E2, имеет тенденцию быть более высоким по сравнению с молекулой без E2, хотя результаты не были статистически значимыми.

Фиг. 10. Применение различных аденовирусных векторов для усиления видов иммунного ответа. (А) Схема иммунизации. Мышей линии СВ6F1 иммунизировали с помощью вектора Ad26, экспрессирующего E2E6E7SH HPV16 (HPV16-Tx), или с помощью вектора Ad26, не экспрессирующего трансген (пустого). Через две недели иммунизацию повторяли с помощью векторов на основе Ad35, как указано ниже на фигуре. Через четыре недели после второй иммунизации мышья умерщвляли и образцы крови использовали для определения процента E7-специфических CD8+ Т-клеток путем тетрамерного окрашивания (В) * обозначает сравнение Ad26.HPV16-Tx/Ad35.HPV16-Tx и Ad26.HPV16-Tx/пустой Ad35, $p < 0,05$ (Т-критерий Стьюдента для данных с логарифмическим преобразованием, с $\alpha = 0,01$ для множественных сравнений).

Фиг. 11. Клеточная иммуногенность E2E6E7SH у макаков-резус. (А) Схема иммунизации. Макаков-резус иммунизировали на 0 день. Восемь животных получали Ad26.HPV16-E2E6E7SH и два контрольных животных получали пустой Ad26 посредством внутримышечного пути иммунизации (i.m.). Бустер-

ную иммунизацию (Ad26.HPV16-E2E6E7SH или пустым Ad26) проводили через 8 недель. Через 16 недель животные получали вторую бустерную иммунизацию при помощи векторов Ad35, экспрессирующих тот же E2E6E7SH, в то время как контрольные животные получали пустой Ad35. Доза аденовекторов составляла 1×10^{11} ур при каждой иммунизации. Взятие крови выполняли на нескольких моментах времени. (B) Клеточные иммунные ответы в РВМС измеряли с помощью IFN γ ELISPOT. РВМС стимулировали при помощи пептидных пулов, соответствующих E2, E6 или E7 HPV16 и отображали количество пятнообразующих единиц (SFU) в 1×10^6 РВМС. У животных с пустым контролем (n=2) не было выявлено ответа. Подробности см. в примере 4.

Фиг. 12. Терапевтический эффект аденовекторов, экспрессирующих HPV16-E2E6E7SH. (A) Инъекция TC-1 и схема иммунизации. Мышам линии СВ6F1 подкожно вводили 1×10^5 TC-1 клеток на 0 день. Через шесть дней, когда опухоли можно было пальпировать, мышей иммунизировали двумя SLP, предусматривающими иммунодоминантные эпитопы E6 и E7 HPV16 (т.е. E6 HPV16, а.к. 41-65 (KQQLLRREVYDFAFRDLICIVYRDGN; SEQ ID NO:18) и E7 HPV16 а.к. 43-77 (GQAEPDRAHYNIIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR; SEQ ID NO:19)) в концентрации, составляющей 150 мкг, в конечном объеме, составляющем 200 мкл, 0,9% солевого раствора, дополненного 5 нмоль ODN1826-CpG (B) или Ad26.HPV16-E2E6E7SH (C). Контрольные мыши получали либо только CpG (D), либо пустой Ad26 (E). Всех мышей подвергали бустерной иммунизации на 20 день. Мышей, которые получали векторы Ad26 при первичной иммунизации, впоследствии иммунизированы соответствующими векторами Ad35. Другие мыши получали SLP с добавленным CpG в качестве адъюванта или исключительно CpG, как при первичных иммунизациях. (B-E) Измерение опухоли у мышей, которым вводили TC-1. Объем опухоли рассчитывали как (ширина² × длина)/2. Мышей умерщвляли, когда объемы опухолей превышали 1000 мм³. Двух мышей должны были умертвить из-за потери веса более чем на 20% (обозначены звездочками). (F-G) Увеличенное изображение секций B и C в первые 35 дней. (H) Выживаемость после инъекции TC-1. Выживание мышей, обработанных Ad.HPV16-E2E6E7SH существенно повышалась по сравнению с мышами, иммунизированными SLP и CpG (логарифмический ранговый критерий $p < 0,05$). Три мыши, иммунизированные Ad.HPV16-E2E6E7SH, не имели опухолей в конце эксперимента (на 92 день).

Фиг. 13. При использовании аденовирусных векторов, несущих трансгены, кодирующие либо Ag HPV, либо LSE2E6E7SH, видны повышенные выходы вирусов в клетках, способных репрессировать экспрессию трансгена. (A) Анализ выхода вируса для векторов Ad35. Клетки PER.C6, PER.C6/CymR и PER.C6/TetR инфицировали векторами Ad35, несущими трансгены, которые кодируют GFP-Luc или HPVAg. Эти трансгены находятся под управлением промоторов CMV, содержащих либо CuO, либо TetO. Выходы вируса определяли через четыре дня после инфицирования Ad35 с помощью способа на основе гексон-специфичной qPCR. (B) Анализ выхода вируса для векторов Ad26. Клетки PER.C6 и PER.C6/TetR инфицировали векторами Ad26, несущими трансгены, которые кодируют GFP-Luc, HPVAg или LSE2E6E7SH и все из которых находятся под управлением промоторов CMV, содержащих TetO. Выходы вируса определяли через три дня после инфицирования Ad26 с помощью способа на основе гексон-специфичной qPCR. Подробности см. в примере 6.

Фиг. 14. Применение репрессорной системы для репрессии экспрессии трансгена в ходе продукции вектора предотвращает нестабильность кассеты трансгена в аденовирусном векторе, несущем трансген, кодирующий HPVAg. Вектор Ad35, экспрессирующий HPVAg, под контролем CMVCuO "спасали" посредством трансфекции ДНК на клеточных линиях либо PER.C6, либо PER.C6/CymR. Полученные в результате вирусные бляшки собирали - по пять на клеточную линию - и использовали для последовательных циклов инфицирования соответствующих клеточных линий. А) Анализ целостности области векторной кассеты трансгена с помощью ПЦР после 10 пассажей вируса. Продукты ПЦР, полученные из вирусных изолятов, пассированных на PER.C6 и PER.C6/CymR, показаны соответственно на средней и правой секциях. Наблюдаемые полноразмерные продукты ПЦР, полученные для пассированных на PER.C6 вирусных изолятов 1, 2, 4 и 5, и таковые, обнаруженные для изолятов с 1 по 5, пассированных на PER.C6/CymR, анализировали посредством секвенирования ДНК по Сэнгеру. При помощи анализа следов хроматограммы (не показано) выявили, что все изоляты, выращенные на PER.C6, но не те, которые выращены на PER.C6/CymR, характеризовались либо небольшими делециями со сдвигом рамки считывания, либо мутациями с образованием преждевременного стоп-кодона в кодирующей последовательности для HPVAg. В) Анализ способности векторов экспрессировать HPVAg после семи вирусных пассажей. Клетки A549 трансдуцировали вирусными изолятами, выращенными на PER.C6 и PER.C6/CymR, и экспрессию HPVAg анализировали при помощи вестерн-блоттинга с использованием специфичного для E7 HPV16 антитела. Прогнозируемый размер HPVAg составляет 83 кДа. Подробности см. в примере 6.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусматривают молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит SEQ ID NO:1. Полипептид представляет собой полипептид слияния, и в данном документе иногда упоминается как полипептид по настоящему изобретению или полипептид слияния по настоящему изобретению. Этот полипептид пригоден для получения иммунного ответа в отношении белков E6 и E7 HPV16, и, таким образом, молекулу нуклеиновой кислоты можно применять в каче-

стве терапевтической вакцины для предупреждения хронической инфекции HPV16 и связанных с ней заболеваний.

Полипептид по настоящему изобретению представляет собой тщательно разработанную молекулу, которая содержит практически полные аминокислотные последовательности E6 и E7 HPV16 (отсутствует только одна аминокислота с С-конца нативного белка E6 HPV16) в виде фрагментов, которые перепорядочены и частично перекрываются таким образом, что (по сути) присутствуют все Т-клеточные эпитопы белков E6 и E7 HPV16. Другими исследователями ранее были описаны молекулы с некоторым потенциалом, как у вакцин HPV (например Kenter et al., 2009, N Engl J Med 361: 1838-47; Daayana et al., 2010, Br J Cancer 102: 1129-36; Smahel et al., 2001, Virology 281: 231-38; Yan et al., 2009, Vaccine 27: 431-40; Öhlschläger et al., 2006, Vaccine 24: 2880-93; Oosterhuis et al., 2011, Int J Cancer 129: 397-406; EP1183368, WO 2013/083287), но каждая из этих молекул имеет один или несколько недостатков. Оригинальные полипептидные молекулы по настоящему изобретению являются преимущественными по меньшей мере в одном и, как правило, в нескольких аспектах относительно описанных ранее подходов. В частности, преимущества молекул и/или векторов по настоящему изобретению включают в себя следующее: (i) они имеют необходимый профиль безопасности, так как нуклеиновая кислота имеет сильно уменьшенную (по сравнению с нативными белками E6 и E7), вплоть до необнаруживаемой, трансформирующую активность; (ii) они представляют собой молекулы с одной нуклеиновой кислотой, которые легко получать в промышленном масштабе экономически осуществимым образом и не вызывают логистических проблем, в отличие от подходов с многочисленными молекулами; (iii) кодируемые полипептиды содержат практически все Т-клеточные эпитопы нативных белков E6 и E7 HPV16; (iv) разработка кодируемых полипептидов сводит к минимуму внедрение нежелательных потенциально сильных неоэпитопов (т.е. эпитопов, не присутствующих в нативных белках E6 и E7); и (v) в определенных вариантах осуществления они не зависят от высокоактивных адъювантов для повышения необходимого иммунного ответа. Таким образом, молекулы по настоящему изобретению представляют собой большой шаг вперед путем объединения различных выгодных характеристик в единую разработку и являются превосходными кандидатами, в первую очередь для терапевтической вакцинации против HPV16. Эти молекулы также могут работать как профилактические вакцины против HPV16, а это означает, что они, вероятно, способны предупреждать хроническую инфекцию, вызываемую HPV16, у вакцинированных субъектов.

В определенных вариантах осуществления путем тщательной разработки количество неоэпитопов с длиной, составляющей девять аминокислот, с прогнозируемой аффинностью связывания, составляющей <50 нМ, в отношении 20 наиболее распространенных HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C аллелей, было минимизировано только до 1. Это является значительным улучшением по сравнению с конструкциями, описанными другими исследователями, которые для одного "перетасованного" белка E6 уже содержали более 30 таких неоэпитопов, и такие конструкции, вероятно, будут содержать еще несколько неоэпитопов в последовательностях, которые были присоединены к этим конструкциям для предупреждения потери эпитопов (Öhlschläger et al., 2006, Vaccine 24: 2880-93). Следовательно, конструкции по настоящему изобретению характеризуются значительно улучшенным иммунологическим профилем, поскольку вероятность измененного иммунного ответа по сравнению с нативными E6 и E7 была сведена к минимуму в молекулах по настоящему изобретению по сравнению с подходами, описанными другими исследователями.

Специалисты в данной области могут при помощи традиционных методик делать нуклеотидные замены, которые не влияют на полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидами, описанными для отражения частоты использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно не указано иное, то "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки, и РНК могут включать интроны.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид в соответствии с настоящим изобретением, является кодон-оптимизированной для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно клетках человека. Способы оптимизации по кодонам известны или были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается кодон-оптимизированной, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется менее часто в организме, чем другой кодон, кодирующий такую же аминокислоту, и кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется более часто в организме, чем кодон, не являющийся предпочтительным. Частоту использования кодонов для конкретного организма можно найти в таблицах частоты использования кодонов, таких как в <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, например более 10, 40, 60, 80% кодонов, не являющихся предпочтительными, предпочтительно большинство (например, по меньшей мере 90%) или

все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещают кодонами, которые являются более предпочтительными. Предпочтительно наиболее часто используемые кодоны в организме используют в кодон-оптимизированной последовательности. Замещение предпочтительными кодонами, как правило, приводит к более высокой экспрессии.

Последовательности нуклеиновых кислот можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или получать *de novo* путем синтеза ДНК, который можно осуществлять с помощью стандартных процедур с участием компаний, предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

Специалисту в данной области будет понятно, что в белке можно производить изменения, например с помощью замен, делеций, добавлений аминокислот и т.д., например с помощью традиционных методик молекулярной биологии. В целом консервативные замены аминокислот можно применять без потери функции или иммуногенности полипептида. Это можно проверять на основании традиционных методик, хорошо известных специалисту в данной области.

В определенных вариантах осуществления кодируемый полипептид в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит лидерную последовательность, также называемую сигнальной последовательностью или сигнальным пептидом. Она представляет собой короткий (длиной, как правило, составляющей 5-30 аминокислот) пептид, присутствующий на N-конце большинства вновь синтезируемых белков, которые предназначены для поступления в секреторный путь. Наличие такой последовательности может приводить к увеличению экспрессии и иммуногенности. Неограничивающими примерами, которые можно применять, являются лидерный пептид IgE (см., например, US 6733994); например, характеризующийся последовательностью MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO: 7), или лидерный пептид HAVT20, например, характеризующийся последовательностью MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 9). Один из них может быть необязательно присоединен к N-концу полипептида по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением не содержит лидерную последовательность.

Существуют различные типы HPV (идентифицированы более 120 типов, и они указаны по их номеру), и в целом для каждого типа, который должен быть охвачен вакциной, может быть необходимым включение в вакцину специфичных к этому типу антигенов, несмотря на то, что для определенных антигенов может существовать некоторая перекрестная реактивность. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82 типы являются канцерогенными HPV "высокого риска", передающимися половым путем, и могут приводить к развитию интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN) и/или анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN). HPV в соответствии с настоящим изобретением (т.е. HPV, из которого получают фрагменты E6 и E7 в кодируемом полипептиде) представляет собой HPV16. Его можно применять для субъектов, инфицированных HPV16. В определенных вариантах осуществления его также можно подходящим образом комбинировать с вакцинами против других типов HPV. В определенных вариантах осуществления такая комбинация представляет собой комбинацию с вакциной против HPV типа высокого риска, описанного выше, например с вакциной против HPV18. В других вариантах осуществления вакцину по настоящему изобретению комбинируют с вакциной против одного или нескольких из HPV-18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 или -82. Такие комбинации можно, например, применять, если точный тип инфекции, вызванной HPV, еще не определен, или если желателен иммунный ответ с профилактическим эффектом против более чем одного типа HPV. Также предусматривают комбинации вакцин по настоящему изобретению с вакцинами против типов HPV, которые вызывают остроконечные бородавки, такие как HPV6 и/или HPV11. Последовательности таких типов HPV и белков, кодируемых ими (например, E6, E7, E2), доступны специалисту в данной области из общедоступных баз данных, таких как база данных последовательностей GenBank, представленная Национальным центром биотехнологической информации (NCBI).

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит SEQ ID NO: 1, и в одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением содержит SEQ ID NO: 2.

В данном документе последовательности приведены в направлении от 5' к 3' или от N- к C-концу, как принято в данной области.

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит эпитопы белков E6 и E7 HPV16. В определенных вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит (и, следовательно, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, дополнительно кодирует) по меньшей мере один дополнительный антиген или эпитоп (эпитопы) такого дополнительного антигена. Такой дополнительный антиген предпочтительно представляет собой антиген HPV, предпочтительно такого же типа HPV, что и белки E6 и E7 в полипептиде, т.е. HPV16. Такой дополнительный антиген может, таким образом, представлять собой белок HPV или его иммуногенный фрагмент, и в определенных вариантах осуществления содержит белок E2 или его фрагмент, содержащий по меньшей мере один эпитоп E2 HPV, предпочтительно из HPV16. Такие дополнительные антигены или эпитопы могут быть помещены внутрь между двумя фрагментами E6 и/или E7 в полипептиде, содержащем SEQ

ID NO:1, но предпочтительно слиты на N-конце или C-конце с полипептидом E6/E7, содержащим SEQ ID NO:1. Альтернативно или дополнительно могут присутствовать аминокислотные последовательности, которые стимулируют иммунный ответ. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусматривают молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, кодирующие полипептид, содержащий SEQ ID NO:1, и при этом полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один другой антиген, например белок E2 HPV или по меньшей мере один его эпитоп, но предпочтительно большее количество эпитопов. Одним преимуществом добавления антигена E2 по настоящему изобретению является то, что E2, как известно, экспрессируется на ранних стадиях инфекции/при низкой степени повреждений, когда экспрессия E6 и E7 все еще очень низкая. В ходе развития рака шейки матки экспрессия E2 утрачивается, и в результате возрастают уровни E6 и E7 (Yugawa и Kiyono, 2009, Rev Med Virol 19: 97-113). Объединение эпитопов из E2, E6 и E7 в одной вакцине обеспечивает лечение широкой целевой группы пациентов, начиная с пациентов с хронической инфекцией до пациентов с инвазивным раком шейки матки (или другими вызванными HPV16 видами рака). В определенных вариантах осуществления белок E2 представляет собой белок E2 дикого типа. В других определенных вариантах осуществления белок E2 характеризуется делецией или одной или несколькими мутациями в своем ДНК-связывающем домене (по сравнению с белком E2 дикого типа). Последовательность белка E2 HPV16 (NP_041328.1) можно найти в базе данных белков NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) под номером NP_041328.1. Несколько одиночных аминокислотных замен в E2, таких как G293V, K299M или C300R в C-концевой части этого белка, как известно, подавляют связывание ДНК. Преимущество применения варианта или фрагмента E2, лишённого ДНК-связывающей способности, заключается в том, что он может предотвращать непредсказуемые транскрипционные изменения путем прямого связывания с ДНК клетки-хозяина в клетках, где он экспрессируется. Белок E2 или его часть или вариант можно добавлять внутрь, но предпочтительно к N-концу или к C-концу полипептида по настоящему изобретению, имеющего SEQ ID NO:1. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий SEQ ID NO:3. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO:4. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий SEQ ID NO:5. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO:6.

Также возможно производить дополнительные слияния оригинальных полипептидов по настоящему изобретению с дополнительными белками, например с так называемыми белками-носителями, такими как кальретикулин, белок теплового шока-70 *Mycobacterium Tubercelosis*, IP10 или фрагмент С столбнячного токсина (см. Oosterhuis et al., Human Gene Ther, 2012, выше, для большего количества примеров), которые могут дополнительно усиливать иммунные ответы на эпитопы E6 и E7 (и необязательно E2) HPV. Таким образом, в настоящем изобретении также предусматривают такие дополнительные белки слияния и кодирующие их нуклеиновые кислоты.

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включена в вектор. Термин "вектор", используемый в данном документе, как правило, представляет собой носитель для искусственного переноса чужеродного генетического материала в другую клетку, где он может быть реплицирован и/или экспрессирован, и в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Его можно получать в соответствии с обычными методами молекулярной биологии, такими как клонирование. Обычно такие векторы можно размножать по меньшей мере в одном типе подходящих хозяев, таких как бактерии, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих и т.п. Четыре основных типа векторов представляют собой плазмиды, вирусные векторы, космиды и искусственные хромосомы. Сам вектор обычно представляет собой последовательность ДНК, которая состоит из вставки (трансген, в настоящем изобретении нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид слияния по настоящему изобретению) и последовательности, которая служит в качестве "остова" вектора. Цель вектора, который передает генетическую информацию в другую клетку, как правило, заключается в том, чтобы выделить, размножить или экспрессировать вставку в клетке-мишени. Предпочтительно последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором в векторе. Подразумевают, что термин "функционально связанный" обозначает, что нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, связана с промотором способом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в клетке-хозяине, когда вектор введен в клетку-хозяина). Регуляторные последовательности экспрессии могут быть функционально связаны с трансгеном. В определенных вариантах осуществления векторы разработаны для экспрессии трансгена в клетке-мишени и, как правило, имеют промоторную последовательность, которая управляет экспрессией трансгена. В определенных вариантах осуществления могут присутствовать один или несколько из обычных используемых элементов вектора, таких как последовательности терминатора транскрипции, хвостовые последовательности полиаденилирования, последовательности Kozak, UTR, точки начала репликации, множественные сайты клонирования, генетические маркеры, устойчивость к антибиотикам и другие последовательности, и специалист в данной области

может разработать вектор таким образом, чтобы он обладал требуемыми свойствами, например для репликации в определенных клетках с целью распространения и размножения вектора и экспрессии трансгена вектора в клетках-мишенях, в которые вводят вектор. Векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид слияния в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно разработанные для экспрессии в клетках млекопитающих, пригодны в качестве вакцины в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой плазмиду, космиду, искусственную хромосому дрожжей, бактериальную искусственную хромосому, вирусный вектор или т.п. Специалист в данной области осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Некоторые хорошо известные и наиболее часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как предранний (IE) промотор CMV, называемый в данном документе промотором CMV, получаемый, например, из pcDNA, Invitrogen, промоторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), например получаемые из pIRES, № по кат. 631605, BD Sciences, и т.п. Из эукариотических клеток также можно получать подходящие промоторы, такие как промоторы генов металлотронеинов (MT), промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1 α), промотор гена убиквитина C или UB6, промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов теплового шока и т.п. (см., например, WO 2006/048459). Неограничивающим примером подходящего промотора для получения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (патент США № 5385839), например предранний промотор CMV, например, содержащий нуклеотиды от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV, например промотора CMV, как предусмотрено в данном документе, с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:13. Сигнал полиаденилирования, например сигнал полиА гена бычьего гормона роста (US 5122458), может располагаться позади трансгена (трансгенов).

Также можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Термин "регуляторная последовательность" используют взаимозаменяемо с "регуляторным элементом" в данном документе, и он относится к сегменту нуклеиновой кислоты, как правило, но без ограничения ДНК, которая модулирует транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана, и, таким образом, действует как транскрипционный модулятор. Регуляторная последовательность часто содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые являются транскрипционными доменами связывания, которые распознаются доменами связывания нуклеиновых кислот транскрипционных белков и/или факторов транскрипции, энхансерами или репрессорами и т.д. Например, возможно функционально связать репрессорную последовательность с промотором, при этом репрессорная последовательность может быть связана репрессорным белком, который может уменьшать или предотвращать экспрессию трансгена в линии клеток-продуцентов, которая экспрессирует этот репрессорный белок. Это может улучшить генетическую стабильность и/или уровни экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты при пасировании и/или при продуцировании в больших количествах в линии клеток-продуцентов. Такие системы были описаны в уровне техники. Например, регуляторная последовательность может включать одну или несколько последовательностей операторов оперона тетрациклина (tetO), так что экспрессия ингибируется в присутствии белка-репрессора оперона тетрациклина (tetR). В отсутствие тетрациклина белок tetR способен связываться с сайтами tetO и репрессировать транскрипцию гена, функционально связанного с сайтами tetO. Однако в присутствии тетрациклина конформационное изменение белка tetR предотвращает его связывание с операторными последовательностями, что обеспечивает транскрипцию функционально связанных генов. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, например когда она присутствует в рекомбинантном аденовирусном векторе, по настоящему изобретению может необязательно включать tetO, функционально связанный с промотором, так что экспрессия одного или нескольких трансгенов ингибируется в рекомбинантных аденовирусах, которые продуцируются в линии клеток-продуцентов, в которых экспрессируется белок tetR. Впоследствии экспрессия не будет ингибироваться, если рекомбинантный аденовирус вводить субъекту или в клетки, которые не экспрессируют белок tetR (например, международная заявка на выдачу патента WO 07/073513). В других определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, например, когда она присутствует в рекомбинантном аденовирусе, может необязательно включать систему переключения генов с использованием кумата, в которой регуляция экспрессии опосредуется связыванием репрессора (CymR) с сайтом оператором (CuO), расположенным ниже промотора (например, Mullick et al. BMC Biotechnol. 2006 6:43). Используемый в данном документе термин "репрессор" относится к объектам (например, белкам или другим молекулам), обладающим способностью ингибировать, препятствовать, замедлять и/или репрессировать продукцию гетерологичного белкового продукта рекомбинантного вектора экспрессии. Например, путем воздействия на сайт связывания в подходящем месте вдоль вектора экспрессии, как, например, в экспрессионной кассете. Примеры репрессоров включают tetR, CymR, lac-репрессор, trp-репрессор, gal-репрессор, лямбда-репрессор и другие соответствующие репрессоры, известные в уровне техники.

Примеры применения операторной/репрессорной системы tetO/tetR и операторной/репрессорной

системы CuO/CumR предусмотрены в данном документе. Репрессия экспрессии трансгена вектора в ходе размножения вектора может предотвратить трансгенную нестабильность и может увеличить выходы векторов, имеющих трансген по настоящему изобретению, в ходе продуцирования. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению имеют промотор, который может быть репрессирован посредством связывания репрессорного белка, например путем обеспечения промотора, который функционально соединен с репрессорной операторной последовательностью (например, в неограничивающих вариантах осуществления последовательностью, содержащей TetO, например, последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:11, или последовательностью, содержащей CuO, например последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:12), с которой репрессорный белок (например, белок TetR, например, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:15, или белок CumR, например, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:17), может связываться.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой молекулу плазмидной ДНК или ее фрагмент. Их можно применять для ДНК-вакцинации. Также в качестве векторов можно использовать другие платформы, например живые аттенуированные штаммы *Listeria monocytogenes* с двойной делецией.

В других вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор, который может быть способным к репликации или неспособным к репликации. В определенных вариантах осуществления вирусный вектор содержит рекомбинантный ДНК-геном. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению представляет собой, например, рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный ретровирус, рекомбинантный поксвирус, такой как вирус осповакцины, например модифицированный вирус коровьей оспы анкара (MVA), рекомбинантный альфавирус, такой как вирус леса Семлики, рекомбинантный парамиксовирус, такой как рекомбинантный вирус кори, или другой рекомбинантный вирус. В определенных вариантах осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вектор на основе MVA.

В предпочтительных вариантах осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный аденовирус. Преимущества аденовирусов при применении в качестве вакцин включают легкость манипулирования, хорошую технологичность производства в широком масштабе и отличные показатели безопасности, основанные на многолетнем опыте исследований, разработок, производства и клинических испытаний с многочисленными аденовирусными векторами, о которых сообщалось. Аденовирусные векторы, которые применяют в качестве вакцин, как правило, обеспечивают хороший иммунный ответ на белок, кодируемый трансгеном, в том числе клеточный иммунный ответ. Аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением может быть основан на любом типе аденовируса и в некоторых вариантах осуществления представляет собой аденовирус человека, который может принадлежать любому серотипу. В других вариантах осуществления он представляет собой обезьяний аденовирус, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы, который может принадлежать любому серотипу. В определенных вариантах осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой аденовирус человека серотипа 5, 26 или 35. Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно в области техники. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену участка E1, например участка E1a и/или участка E1b, аденовирусного генома, который требуется для вирусной репликации. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением является дефектным по меньшей мере по части участка E3, не являющегося существенно важным. В определенных вариантах осуществления вектор является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену участка E1 и по меньшей мере по части участка E3, не являющегося существенно важным.

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны в уровне техники и описаны, например, в патентах США № 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913 и Thomas Shen, "Adenoviridae and their Replication", M.S. Horwitz, "Adenoviruses", Chapters 67 and 68 соответственно, в *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), а также других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов включает применение общепринятых методик молекулярной биологии, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также других источниках, упомянутых в данном документе.

Особенно предпочтительными серотипами для рекомбинантного аденовируса являются человеческий серотип 35 или человеческий серотип 26. Получение векторов гAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., 2007 *Virology* 81: 4654-63. Иллюстративные последовательности генома Ad26 указаны в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO:1 из WO 2007/104792. Получение векторов гAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels et al.,

2003, J Virol 77: 8263-71. Иллюстративные последовательности генома Ad35 указаны в GenBank под номером доступа AC_000019 и на фиг. 6 из WO 00/70071.

В определенных вариантах осуществления аденовирус является репликативно-дефектным, например, потому что он содержит делецию в участке E1 генома. Как известно специалисту, в случае делеций существенно важных участков из генома аденовируса функциональные элементы, кодируемые этими участками, должны быть обеспечены в транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, т.е. если части или целые участки E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, например встроены в ее геном или находятся в форме так называемого вспомогательного аденовируса или вспомогательной плазмиды. Аденовирус также может иметь делецию в участке E3, который не является существенным для репликации, и, следовательно, такую делецию не следует восполнять.

Клетка-продуцент (также иногда называемая в уровне техники и в данном документе как "пакующая клетка", или "дополняющая клетка"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может быть размножен. Например, размножение векторов на основе рекомбинантного аденовируса осуществляют в клетках-продуцентах, которые восполняют дефициты в аденовирусе. Предпочтительно такие клетки-продуценты имеют в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса, и, таким образом, они способны к дополнению рекомбинантных аденовирусов с делецией в участке E1. Можно использовать любую E1-дополняющую клетку-продуцент, как, например, клетки сетчатки глаза человека, иммортализованные с помощью E1, например клетки 911 или PER.C6 (см. патент США № 5994128), E1-трансформированные амнициты (см. патент EP № 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (см., например, WO 98/39411, патент США № 5891690), GH329:HeLa (Gao et al., 2000, Hum Gene Ther 11: 213-19), 293 и т.п. В определенных вариантах осуществления клетками-продуцентами являются, например клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и т.п. Продуцирование аденовирусных векторов в клетках-продуцентах описано в Kovesi et al., 2010, Viruses 2: 1681-703.

В определенных вариантах осуществления E1-дефектный аденовирус содержит кодирующую последовательность E4-orf6 из аденовируса подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как клетки 293 или клетки PER.C6 (см., например Havenga et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43; WO 03/104467, включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

"Гетерологичная нуклеиновая кислота" (также называемая в данном документе "трансгеном") в векторах по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях не присутствует в векторе, и в соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид слияния по настоящему изобретению, считается гетерологичной нуклеиновой кислотой, когда она присутствует в векторе. Ее вводят в вектор с помощью, например, стандартных методов молекулярной биологии. Например, ее можно клонировать в удаленный участок E1 или E3 аденовирусного вектора или в участок между участком E4 и pTR. Трансген обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. В предпочтительных вариантах осуществления трансген клонируют в участок E1 аденовирусного вектора.

Продуцирование векторов, таких как ДНК-векторы или рекомбинантные аденовирусные векторы, может быть выполнено в соответствии с различными способами, хорошо известными специалисту в данной области. Как правило, продуцирование предусматривает размножение в культивируемых клетках с получением значительного количества векторного материала с последующим сбором вектора из клеточной культуры и обычно с последующей дополнительной очисткой вектора с удалением других веществ и получением очищенных векторов, которые могут быть составлены в фармацевтические композиции (например, Hogganson et al., 2002, BioProcessing J 1: 43-8; Evans et al., 2004, J Pharm Sci 93:2458-75). Например, способы сбора аденовируса из культур клеток-продуцентов, например, были подробно описаны в WO 2005/080556. Например, в WO 2010/060719 и WO 2011/098592, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки, описаны подходящие способы получения и очистки больших количеств рекомбинантных аденовирусов.

В определенных аспектах в настоящем изобретении также предусматривают полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Такой полипептид содержит SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления такой полипептид может содержать SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5. Характеристики такого полипептида описаны выше. Такой полипептид можно, например, непосредственно применять в качестве вакцины против HPV.

В настоящем изобретении дополнительно предусматривают вакцины, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы или полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, где варианты осуществления для каждого из этих аспектов могут включать варианты, описанные выше. В предпочтительных вариантах осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления вакцина содержит вектор в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно ДНК-вектор, вектор на основе MVA или рекомбинантный аденовирусный вектор.

В определенных вариантах осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит дополнительные активные ингредиенты, например нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один эпитоп белка Е6 и/или Е7 по меньшей мере одного типа HPV, отличного от HPV16, например типа HPV высокого риска, такого как HPV18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 или -82.

Термин "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, эффективный для индукции у субъекта профилактической и/или терапевтической степени иммунитета в отношении определенного патогена или заболевания, в данном случае терапевтически против HPV. Вакцина, как правило, содержит молекулу нуклеиновой кислоты или вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый наполнитель. После введения субъекту полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, будет экспрессироваться в организме субъекта, что приведет к возникновению иммунного ответа в отношении антигенных фрагментов Е6 и/или Е7, которые присутствуют в полипептиде. Преимущество молекул по настоящему изобретению заключается в том, что присутствуют практически все Т-клеточные эпитопы Е6 и Е7 HPV16, и, таким образом, Т-клеточный ответ в отношении любого эпитопа, присутствующего в Е6 или Е7 дикого типа, может быть обеспечен при помощи вакцины. Кроме того, вакцина обладает всеми преимуществами безопасности и эффективности, которые описаны выше для молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Для введения людям при осуществлении настоящего изобретения на практике могут быть использованы фармацевтические композиции, содержащие вектор и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В настоящем контексте термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в используемых дозах и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые наполнители хорошо известны в уровне техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer и L. Novgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Наполнитель, как правило, представляет собой фармакологически неактивное вещество, составленное с активным ингредиентом лекарственного препарата. Наполнители обычно используют для увеличения объемов составов, которые содержат сильнодействующие активные ингредиенты (которые часто называют "объемообразующими средствами", "заполнителями" или "разбавителями"), чтобы обеспечить удобное и точное распределение лекарственного средства при получении лекарственной формы. Они также могут служить для различных терапевтически-усиливающих целей, таких как облегчение абсорбции лекарственного средства или растворимость, или других фармакокинетических факторов. Наполнители могут также быть пригодны в производственном процессе для упрощения обращения с активным веществом, относящегося, например, к обеспечению текучести порошка или обеспечению неадгезионных свойств, в дополнение к поддержанию стабильности *in vitro*, как, например, для предупреждения денатурации в течение ожидаемого срока хранения. Выбор подходящих наполнителей также зависит от пути введения и лекарственной формы, а также от активного ингредиента и других факторов.

Очищенные молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или полипептид предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно использование лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают при помощи стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных *per se* в уровне техники. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают в контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне от pH 3,0 до 9,5, например от pH 5,0 до 7,5. Как правило, молекула нуклеиновой кислоты, или вектор, или полипептид находится в растворе с подходящим буфером, при этом раствор вектора может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления вакцину можно составлять в виде инъекционного препарата. Эти составы, содержащие эффективные количества молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или полипептида, являются либо стерильными жидкими растворами, жидкими суспензиями, либо лиофилизированными вариантами и необязательно содержат стабилизаторы или наполнители.

Например, рекомбинантный аденовирусный вектор можно хранить в буфере, который также используют для Adenovirus World Standard (Hoganson et al., 2002, Bioprocessing J 1: 43-8): 20 mM Трис, pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерина. Другой пригодный состав буфера, который подходит для введения людям, представляет собой 20 mM Трис, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, сахароза 10% вес./об., полисорбат-80 0,02% вес./об. Другой состав буфера, который подходит для рекомбинантного аденовируса, содержит 10-25 mM цитратного буфера, pH 5,9-6,2, 4-6% (вес./вес.) гидроксипропил-бета-циклодекстрина (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (вес./вес.) полисорбата-80 и необязательно 0,3-0,45% (вес./вес.) этанола.

Безусловно можно использовать множество других буферов, при этом хорошо известны некоторые примеры подходящих составов для хранения и для фармацевтического введения очищенных векторов.

В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая вектор, дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно в уровне техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используют в данном документе взаимозаменяемо и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот в векторах по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия, и/или фосфат алюминия, и/или алюминия-калия фосфат; композиции, представляющие собой масляные эмульсии (или композиции типа "масло-в-воде"), в том числе водные эмульсии сквалена, например MF59 (см., например, WO 90/14837); сапониновые составы, например QS21, и комплексы с иммуностимулирующими свойствами (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацетилованный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутанты, такие как термостабильный энтеротоксин LT E. coli, холерный токсин СТ и т.п. Также возможно использование адъюванта, кодируемого вектором, например путем использования гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации C4-связывающего белка (C4bp) с антигеном, представляющим интерес (например, Solabomi et al., 2008, Infect Immun 76: 3817-23), или путем использования вектора, кодирующего и трансген, представляющий интерес, и агонист TLR-3, такой как гетерологичная dsRNA (например, WO 2007/100908), или т.п.

В других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению не содержат адъюванты.

Фармацевтические композиции можно вводить субъекту, например субъекту-человеку. Как известно квалифицированному практику, общая доза активного компонента вакцины, предоставляемая субъекту при однократном введении, может варьировать и для аденовируса, как правило, составляет от 1×10^7 вирусных частиц (vp) до 1×10^{12} vp, предпочтительно от 1×10^8 vp до 1×10^{11} vp, например от 3×10^8 до 5×10^{10} vp, например от 10^9 до 3×10^{10} vp. Для ДНК-вакцины общее количество ДНК на введение может, например, составлять от 1 мкг до 10 мг. При использовании для введения генной пушки обычно используют более низкие количества, например 10 мкг. Для внутримышечной инъекции обычно используют более высокие количества, например до 5 мг.

Введение фармацевтических композиций можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как инъекция, например внутрикожная, внутримышечная и т.д., или подкожное, или чрескожное введение, или введение через слизистые, например интраназальное, пероральное, интравагинальное, ректальное и т.п. В одном варианте осуществления композицию вводят посредством внутримышечной инъекции, например, в дельтовидную мышцу руки или латеральную широкую мышцу бедра. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой ДНК-вакцину, и ее можно вводить, например, внутрикожно, например посредством ДНК-татуирования (см., например, Oosterhuis et al., 2012, Curr Top Microbiol Immunol 351: 221-50). Этот путь также возможен для аденовирусных векторов. В определенных вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит аденовирусный вектор, и ее вводят путем внутримышечной инъекции. Специалисту известны различные возможности введения композиции, такой как вакцина, для индуцирования иммунного ответа к антигену (антигенам), присутствующему (присутствующим) в вакцине.

Субъект, используемый в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, к примеру грызуна, например мышь, или отличного от человека примата, или человека. Субъект предпочтительно является субъектом-человеком.

Вакцины по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов с одной из различных стадий заболеваний, вызванных HPV (в частности, 16 типом), от эпизодической и хронической инфекции, вызванной HPV, как таковой (например, при обнаружении с помощью ДНК-тестирования HPV), таким образом, до формирующихся предраковых поражений, а также интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN, также известной как дисплазия шейки матки и интерстициальная неоплазия шейки матки, которая представляет собой потенциально предопухолевую трансформацию и аномальный рост (дисплазию) чешуйчатых клеток на поверхности шейки матки) вплоть до и включая рак шейки матки, например плоскоклеточную карциному шейки матки (SCC). Кроме того, мишенями могут быть другие HPV-индуцированные неоплазии, такие как интраэпителиальная неоплазия вульвы (VIN), интраэпителиальная неоплазия влагалища (VaIN), интраэпителиальная неоплазия полового члена (PIN), анальная интраэпителиальная неоплазия (AIN), а также более поздние стадии рака ротоглотки (также известный как рак головы и шеи), рака полового члена, вагинального рака, рака вульвы и анального рака. Вакцины по настоящему изобретению, таким образом, могут целенаправленно воздействовать на широкий спектр HPV-индуцированных поражений и, вероятно, являются наиболее эффективными на предраковых стадиях HPV-индуцированного заболевания, например при (хронической) инфекции и/или стадиях неоплазии, когда экспрессия E2, E6 и/или E7 является наивысшей. Также возможно комбинировать лечение с ис-

пользованием вакцины по настоящему изобретению с соединениями, которые противодействуют или могут преодолевать механизмы ускользания от иммунологического надзора клеток прогрессирующего рака, например антителами к PD1/PD-L1, антителами к CTLA-4, такими как ипилимумаб, антителами к LAG-3, антителами к CD25, IDO-ингибиторами, CD40 агонистическими антителами, CD137 агонистическими антителами и т.д. (см., например, Hamid и Carvajal, 2013, Expert Opinion Biol Ther 13: 847-861; Mellman et al., 2011, Nature Rev 480: 480-89). Способ терапевтической вакцинации в принципе можно также применять для лечения внешних остроконечных бородавок или их предшественников в том случае, если вакцина содержит дополнительно кодирующие последовательности E6 и/или E7 типа HPV, вызывающего внешние остроконечные бородавки, и ее вводят субъекту, инфицированному таким типом HPV.

Используемый в данном документе термин "лечение" означает введение вакцины для индукции терапевтического иммунного ответа в отношении клеток, которые экспрессируют (эпитопы) E6 и/или E7 HPV16 у пациента, что приводит, по меньшей мере, к снижению уровня и предпочтительно полному устранению инфекции, вызванной HPV16, что приводит в результате, по меньшей мере, к замедлению и предпочтительно к прекращению прогрессирования вызванного HPV16 заболевания, такого как виды неоплазии и/или ее симптомы. Предпочтительно лечение с помощью вакцины приводит также к ремиссии более поздних стадий HPV-индуцированных видов рака. Предпочтительно вводить вакцину пациентам с установившейся инфекцией, вызванной HPV известного типа, таким образом, можно вводить вакцину, которая кодирует полипептид соответствующего типа HPV. При отсутствии скрининга вакцину можно также вводить той части населения, которая, вероятно, будет инфицирована HPV, т.е. сексуально активным людям. Также возможно вводить вакцину по настоящему изобретению субъектам, которые не были инфицированы HPV16, например для профилактических целей, возможно, в комбинации с вакциной против другого типа HPV, которым был заражен пациент, или альтернативно неинфицированным субъектам. Вакцину по настоящему изобретению можно также вводить субъекту, которого подвергают дополнительному лечению другими способами, например хирургическому вмешательству (устранению поражения, вызванного инфекцией, вызванной HPV16) или лечению имиквимодом (содержащим агонист TLR-7/8, см., например, Dayaana et al., 2010, Br J Cancer 102: 1129-36). Эффект лечения можно оценить либо с помощью цитологического тестирования, либо с помощью тестирования на наличие HPV.

Вакцинация включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту или пациенту по меньшей мере один раз. Также возможным является обеспечение одного или нескольких бустерных введений одной или нескольких дополнительных вакцин. При проведении бустерной вакцинации, как правило, такую бустерную прививку будут вводить одному и тому же субъекту в промежуток времени от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев, после введения иммуногенной композиции с тем же антигеном субъекту, что и в первый раз (которое в данном случае называется "первичной вакцинацией"). В альтернативных бустерных режимах также возможным является введение различных векторов, например одного или нескольких аденовирусов различных серотипов или других векторов, таких как на основе MVA, или ДНК, или белка субъекту в качестве первичной или бустерной вакцинации. В определенных вариантах осуществления одну и ту же форму вакцины по настоящему изобретению вводят, по меньшей мере, дважды одному и тому же пациенту согласно режиму "прайм-буст", например с тем же рекомбинантным аденовирусом (таким как Ad26) в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления вакцину по настоящему изобретению вводят, по меньшей мере, дважды согласно режиму "прайм-буст", но вектор в вакцине отличается, например при использовании двух разных серотипов аденовирусных векторов, например первичную вакцинацию проводят рекомбинантным Ad26, а бустерную - с помощью рекомбинантного Ad35 или vice versa; или первичную вакцинацию проводят при помощи ДНК, а бустерную - аденовирусным вектором или vice versa; или первичную вакцинацию проводят аденовирусным вектором, а бустерную - с помощью вектора на основе MVA или vice versa. В определенных вариантах осуществления вакцину в соответствии с настоящим изобретением вводят по меньшей мере три раза согласно режиму "прайм-буст-буст". В режим могут быть добавлены дополнительные бустерные введения.

Также одним аспектом настоящего изобретения является индуцирование CTL-ответа в отношении HPV16 у субъекта, включающее введение субъекту вакцины в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем изобретении также предусматривают следующие неограничивающие варианты осуществления:

- 1) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий SEQ ID NO:1;
- 2) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 1, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере часть белка E2 HPV;
- 3) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где по меньшей мере часть белка E2 HPV получают из белка E2 HPV16;
- 4) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с N-концевой стороной полипептида с SEQ ID NO:1;
- 5) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с C-концевой стороной полипептида с SEQ ID NO:1;
- 6) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, где полипептид содержит по

- 106) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 55 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 107) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 56 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 108) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 57 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 109) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 58 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 110) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 59 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 111) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 60 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 112) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 61 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 113) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 62 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 114) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 63 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 115) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 64 и фармацевтически приемлемый наполнитель;
- 116) способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, включающий введение субъекту композиции вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115;
- 117) способ лечения хронической инфекции, вызванной HPV (16 типом), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает хронической инфекцией, вызванной HPV;
- 118) способ лечения интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает VIN;
- 119) способ лечения рака вульвы (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает раком вульвы;
- 120) способ лечения интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает CIN;
- 121) способ лечения рака шейки матки (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает раком шейки матки;
- 122) способ лечения рака ротоглотки (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает раком ротоглотки;
- 123) способ лечения интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает PIN;
- 124) способ лечения рака полового члена (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает раком полового члена;
- 125) способ лечения интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает VaIN;
- 126) способ лечения рака влагалища (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает раком влагалища;
- 127) способ лечения анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает AIN;
- 128) способ лечения рака анального канала (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает раком анального канала;
- 129) полипептид, содержащий SEQ ID NO:1;
- 130) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 129, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере часть белка E2 HPV;
- 131) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка

Е2 HPV получают из белка Е2 HPV16;

132) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка Е2 является слитой с N-концевой стороной полипептида с SEQ ID NO:1;

133) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка Е2 является слитой с C-концевой стороной полипептида с SEQ ID NO:1;

134) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 131, где по меньшей мере часть белка Е2 является слитой с N-концевой стороной полипептида с SEQ ID NO:1;

135) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 131, где по меньшей мере часть белка Е2 является слитой с C-концевой стороной полипептида с SEQ ID NO:1;

136) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка Е2 содержит вариант белка Е2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у Е2;

137) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 131, где по меньшей мере часть белка Е2 содержит вариант белка Е2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у Е2;

138) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 132, где по меньшей мере часть белка Е2 содержит вариант белка Е2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у Е2;

139) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 133, где по меньшей мере часть белка Е2 содержит вариант белка Е2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у Е2;

140) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 134, где по меньшей мере часть белка Е2 содержит вариант белка Е2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у Е2;

141) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 135, где по меньшей мере часть белка Е2 содержит вариант белка Е2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у Е2;

142) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, кодирующая полипептид согласно SEQ ID NO:3;

143) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, кодирующая полипептид согласно SEQ ID NO:5;

144) вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту в соответствии с вариантом осуществления 142, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором;

145) вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту в соответствии с вариантом осуществления 143, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором;

146) вектор в соответствии с вариантом осуществления 144, где вектор представляет собой аденовирус;

147) вектор в соответствии с вариантом осуществления 145, где вектор представляет собой аденовирус;

148) вектор в соответствии с вариантом осуществления 146, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

149) вектор в соответствии с вариантом осуществления 147, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

150) вектор в соответствии с вариантом осуществления 146, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

151) вектор в соответствии с вариантом осуществления 147, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

152) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 144 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

153) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 145 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

154) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 146 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

155) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 147 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

156) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 148 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

157) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 149 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

158) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 150 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

159) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 151 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

160) способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, включающий введение субъекту композиции вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159;

161) способ лечения интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает VIN;

162) способ лечения рака вульвы, включающий введение вакцины в соответствии с любым из вари-

антов осуществления 152-159 субъекту, который страдает раком вульвы;

163) способ лечения интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает CIN;

164) способ лечения рака шейки матки, включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает раком шейки матки;

165) способ лечения рака ротоглотки, включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает раком ротоглотки;

166) способ лечения интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает PIN;

167) способ лечения рака полового члена, включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает раком полового члена;

168) способ лечения интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает VaIN;

169) способ лечения рака влагалища, включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает раком влагалища;

170) способ лечения анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает AIN;

171) способ лечения рака анального канала, включающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает раком анального канала.

При осуществлении на практике данного изобретения будут использовать, если не указано иное, общепринятые методики иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантной ДНК, которые находятся в компетенции специалистов в данной области. См., например, Sambrook, Fritsch и Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al., eds, 1987; серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR2: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow и Lane, eds, 1988.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется в приведенных далее примерах. Примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для пояснения настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Конструкция оригинального полипептида, содержащего практически все CTL-эпитопы E6 и E7 HPV16.

Авторы настоящего изобретения разработали новый, неонкогенный полипептид (и кодирующую его нуклеиновую кислоту), который содержит практически все CTL-эпитопы белков E6 и E7 HPV16 и характеризуется минимальным количеством ожидаемых/прогнозируемых сильных неозпитопов (неозпитопы в значении эпитопов, отсутствующих в белках дикого типа E6 и E7 HPV16). Полипептид по настоящему изобретению (также иногда называемый в данном документе "E6E7SH") содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO:1. Кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая этот полипептид, представлена под SEQ ID NO:2.

Молекулы по настоящему изобретению представляют собой отдельные молекулы, что обеспечивает преимущества в получении по сравнению со стратегиями, в которых применяют многочисленные молекулы. Кроме того, полипептид по настоящему изобретению содержит практически все предполагаемые CTL-эпитопы, которые присутствуют в E6 и E7 дикого типа HPV16, и в то же время имеют минимальное количество ожидаемых/прогнозируемых сильных неозпитопов, которые могут быть потенциально иммунодоминантными и, таким образом, перенаправляют иммунный ответ от соответствующих CTL-эпитопов дикого типа. Таким образом, конструкции по настоящему изобретению являются иммунологически более благоприятными, чем молекулы, описанные другими исследователями, которые либо не имеют возможных CTL-эпитопов и/или содержат большее количество неозпитопов или более сильные неозпитопы.

Например, конструкция с SEQ ID NO:1 содержит только один неозпитоп с длиной девять аминокислот с прогнозируемой аффинностью связывания, составляющей <50 нМ, в отношении 20 наиболее распространенных HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C аллелей:

(HLA-A*01:01,

HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*03:01,
 HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*29:02,
 HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:01,
 HLA-A*33:03, HLA-A*34:01, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02,
 HLA-B*07:04, HLA-B*08:01, HLA-B*13:01, HLA-B*15:01, HLA-B*18:01,
 HLA-B*35:01, HLA-B*37:01, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*40:02,
 HLA-B*40:06, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*46:01, HLA-B*48:01,
 HLA-B*51:01, HLA-B*52:01, HLA-B*53:01, HLA-B*58:01, HLA-C*07:02,
 HLA-C*04:01, HLA-C*03:04, HLA-C*01:02, HLA-C*07:01, HLA-C*06:02,
 HLA-C*03:03, HLA-C*08:01, HLA-C*15:02, HLA-C*12:02, HLA-C*02:02,
 HLA-C*05:01, HLA-C*14:02, HLA-C*03:02, HLA-C*16:01, HLA-C*08:02,
 HLA-C*12:03, HLA-C*04:03, HLA-C*17:01, HLA-C*14:03),

как определено с помощью способов ANN (Lundegaard et al., 2008, Nucl Acids Res 36: W509-12) и SMM (Peters et al., 2003, Bioinformatics 19: 1765-72) для HLA-A и HLA-B и способа NetMHCpan (Hoof et al., 2009, Immunogenetics 61: 1-13) для HLA-C инструмента прогнозирования для "пептидного связывания с молекулами MHC I класса" на веб-сайте IEDB (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html, версия 2009-09-01B).

В качестве неограничивающего примера при использовании инструмента прогнозирования SMM на веб-сайте IEDB, "перетасованные" последовательности E6 и E7, описанные Oosterhuis et al., 2011, Int J Cancer 129: 397-406 и Öhlschläger et al., 2006, Vaccine 24: 2880-93, содержат девять потенциальных сильных уникальных неопитопов (ANN или SMM IC50 <50 нМ) для 20 наиболее распространенных HLA-A и -B в основной части. Это даже исключает добавления, используемые в этом подходе (в котором добавления будут также приводить к дополнительным неопитопам и могут упустить более нативные эпитопы MHC II из-за ограниченной длины "перекрывания"). Действительно, по имеющимся сведениям улучшенная молекула, содержащая вариант с "перетасованными" белками E6 и E7, которые описаны в WO 2013/083287, содержит 22 уникальных неопитопа длиной девять аминокислот с прогнозируемой IC50 <50 нМ (ANN, SMM или NetMHCpan) для 20 наиболее распространенных HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C аллелей.

Следовательно, оригинальные молекулы по настоящему изобретению, несомненно, благоприятны тем, что они имеют гораздо меньшее количество прогнозируемых неопитопов по сравнению с другими известными подходами, где E6 и E7 "перетасованы" для удаления функциональности.

Синтезировали нуклеиновую кислоту, кодирующую разработанную, таким образом, авторами настоящего изобретения молекулу E6E7SH HPV16 (т.е. полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO:1), последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO:2, и фланкированную сайтом HindIII и последовательностью Kozak на 5'-конце и сайтом XbaI на 3'-конце (синтез под заказ и стандартное молекулярное клонирование в Invitrogen Life technologies, Германия).

Синтезированные фрагменты клонировали с использованием HindIII и XbaI в стандартный вектор экспрессии pCDNA2004.Neo, несущий как бактериальный маркер устойчивости (к ампициллину), так и маркер устойчивости млекопитающих (к неомицину), для получения плазмидных векторов, кодирующих молекулу по настоящему изобретению, т.е. для экспериментов на основе (временных) трансфекций.

Эти молекулы могут быть использованы как таковые, а также в качестве основы для последующих молекул, в которых предусмотрены дополнительные признаки. В качестве неограничивающих примеров были получены некоторые дополнительные варианты, которые описаны ниже.

Последовательность белка слияния E6E7SH HPV16 можно комбинировать с последовательностями других ранних белков HPV16 для целенаправленного воздействия на организмы индивидуумов с хронической инфекцией и для расширения иммунного репертуара у иммунизированного индивидуума. Предполагают, что иммунные ответы в отношении E2 играют важную роль в устранении инфекций, вызванных HPV16 (de Jong et al., 2002, Cancer Res 62: 472-479). Слияние E2 с E6E7SH даст компонент вакцины, который несет антигены против стадий HPV-ассоциированного рака от хронической инфекции до инвазивного рака или рецидивирующего/рефрактерного заболевания после операции ЛЕЕР. Таким образом, в качестве неограничивающего примера таких вариантов осуществления авторы настоящего изобретения приводят последовательность, кодирующую белок слияния E6E7SH с E2 на его N-конце. В последовательности E2 можно выполнять модификации для подавления активности связывания ДНК, которая может влиять на экспрессию генов в клетках, экспрессирующих белок слияния. Авторы настоящего изобретения подвергали мутации глицин в положении 293, лизин в положении 299 и цистеин в положении 300 белка E2 wt HPV16 соответственно на валин, метионин и аргинин. Каждая из этих мутаций сама по себе

уже полностью подавляет связывание E2 с последовательностями ДНК, которые несут E2-связывающие домены (Prakash et al., 1992, Genes Dev 6: 105-16).

Полученный полипептид обозначают как E2E6E7SH HPV16, и он содержит SEQ ID NO:3. Получали кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую этот полипептид, и она представлена под SEQ ID NO:4.

Авторы настоящего изобретения также сконструировали вариант, в котором тот же мутантный белок E2 сливали с С-концом полипептида слияния E6E7SH HPV16, что приводило к образованию полипептида, представленного как E6E7E2SH HPV16, который содержит SEQ ID NO:5. Последовательность, кодирующая эту конструкцию, представлена как SEQ ID NO:6.

Для целей контроля авторы настоящего изобретения также сконструировали последовательности, кодирующие полипептид, который содержит последовательности дикого типа для полноразмерных E6 и E7 HPV16, в качестве белка слияния (E6 от а.к. 1 до 158, непосредственно слитый с E7 от а.к. 1 до 98, обозначенный в данном документе E6E7wt).

Авторы настоящего изобретения также исследовали влияние добавления лидерных последовательностей к полипептиду. В качестве неограничивающего примера последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE, см., например, US 6733994 (последовательность лидерного пептида представлена под SEQ ID NO:7), сливали с N-концом некоторых конструкций, например в конструкции E6E7wt, которая представлена LSE6E7wt, и в конструкции E2E6E7SH, которая представлена LSE2E6E7SH. Под их влиянием существенно ($p < 0,05$) увеличивалась иммуногенность по сравнению с таким же антигеном без последовательности LS, что измеряли при помощи E7-тетрамерного анализа у иммунизированных мышей (как, например, можно видеть на фиг. 9).

Последовательности, которые кодируют полипептиды E6E7SH по настоящему изобретению, с E2 или без него, могут, например, экспрессироваться с ДНК-конструкциями, с РНК или с вирусных векторов. На фиг. 1 показана экспрессия в клетках HEK-293T при временной трансфекции ДНК-векторами, экспрессирующими трансгены, которые описаны выше. После трансфекции клетки собирали и клеточные экстракты анализировали при помощи SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителом к E7 HPV16. При этом эксперименте видна экспрессия ожидаемых белков слияния соответствующего размера после трансфекции векторов экспрессии.

Аденовирусные векторы можно использовать для экспрессии E6E7, либо с E2, либо без него, и с дополнительными последовательностями или без них для повышения иммуногенности кодируемого белка слияния.

Гены, кодирующие контроль, представляющий собой E6E7wt HPV16, или оригинальные последовательности HPV, описанные выше, подвергали генной оптимизации для экспрессии у человека и синтезировали согласно Genart. Последовательность Kozak (5' GCCACC 3') включали непосредственно перед стартовым кодоном ATG и два стоп-кодона (5' TGA TAA 3') добавляли в конце соответствующей кодирующей последовательности. Гены вставляли в плазмиду pAdApt35BSU и в плазмиду pAdApt26 (Havenga et al., 2006, J Gen Virol 87, 2135-43) по сайтам HindIII и XbaI.

Все аденовирусы выращивали в клетках PER.C6 при помощи однократной гомологичной рекомбинации и получали, как описано ранее (относительно rAd35: Havenga et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43; относительно rAd26: Abbink et al., 2007, J Virol 81: 4654-63). Клетки PER.C6 (Fallaux et al., 1998, Hum Gene Ther 9: 1909-17) поддерживали на среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), дополненной 10 mM MgCl₂.

Вкратце, клетки PER.C6 трансфицировали с помощью Ad векторных плазмид с использованием липофектамина согласно инструкциям, представленным производителем (Life Technologies). Клетки собирали через один день после достижения полного цитопатического эффекта (CPE), подвергали замораживанию-размораживанию, центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин и хранили при -20°C. Вирусы очищали методом бляшкообразования и амплифицировали в клетках PER.C6, культивируемых в отдельной лунке 24-луночного планшета для культуры тканей. Дальнейшую амплификацию проводили в клетках PER.C6, культивируемых в колбе для культуры тканей T25 и затем в колбе для культуры тканей T175. Неочищенные лизаты, приготовленные из клеток, полученных после культивирования в колбе T175, 3-5 мл, использовали для инокуляции в 24×T1000 пятислойных колбах для культуры тканей, содержащих слои клеток PER.C6 с 70% конfluence. Вирус очищали при помощи способа двухэтапной очистки с использованием CsCl. В заключение вирус хранили в аликвотах при -85°C.

Ad35.HPV16-E6E7wt и Ad35.HPV16-E6E7SH являются векторами на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 35 (Ad35), содержащими кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности для экспрессии соответственно белка слияния белков E6 и E7 дикого типа HPV16 (E6E7wt) и оригинального белка слияния, который описан выше (E6E7SH, с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO:1). Объединенные последовательности E6 и E7 помещали под контроль промотора CMV в область E1 генома аденовируса с удаленными E1, E3. Ad26.HPV16-E6E7wt и Ad26.HPV16-E6E7SH являются эквивалентными векторами на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 26.

Аналогичным образом были получены рекомбинантные аденовирусные векторы на основе Ad26 и Ad35, которые кодируют вариант E2E6E7SH HPV16 (SEQ ID NO:3). Аналогично были получены Ad26 и Ad35, кодирующие вариант E6E7E2SH HPV16 (SEQ ID NO:5). Также был получен вектор Ad35, кодирующий белок слияния E2E6E7SH с лидерной последовательностью IgE на N-конце, названный Ad35.HPV16-LSE2E6E7SH. Также был получен контрольный аденовирус с E6E7wt, слитый с лидерной последовательностью IgE на N-конце.

Рекомбинантные аденовирусы получали на клетках PER.C6 и очищали центрифугированием на градиентах хлорида цезия.

Дополнительные примеры конструкций по настоящему изобретению, которые были связаны с репрессорными системами, предусмотрены в следующем ниже примере.

Пример 2. Отсутствие трансформирующей активности у оригинальных конструкций.

Белки E6 и E7 дикого типа HPV16 обладают онкогенным потенциалом, который проявляется как трансформирующая активность в определенных анализах, как, например, колониеобразование при анализе с мягким агаром (Massimi и Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Полипептид E6E7SH, который описан в примере 1, содержит фрагменты белков E6 и E7 в переупорядоченном виде. Предполагают, что это приведет к устранению онкогенного потенциала, что может быть определено, например, по значительно сниженной трансформирующей активности по сравнению с любым из белков E6 и E7 wt в таких анализах.

Другие исследователи сообщали, что "генно-перетасованные" варианты E6 и E7 HPV16 действительно теряли свой онкогенный потенциал (Öhlschläger et al., 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Henken et al., 2012, *Vaccine* 30: 4259-66), демонстрируя, что "перетасовка генов" нейтрализует функции белков E6 и E7 дикого типа.

Для оценки потери онкогенных свойств авторы настоящего изобретения оценивали способность конструкций E6E7SH по настоящему изобретению придавать способность расти в мягком агаре клеткам NIH 3T3 (как описано, например, Massimi и Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Трансфекция клеток NIH3T3 с помощью плазмиды, экспрессирующей E7 дикого типа HPV16, неизменно приводила к колониеобразованию. В этих анализах экспрессия только E6 дикого типа HPV16 не вызывала колониеобразование выше фонового уровня. Это соответствует опубликованным наблюдениям, что E7wt намного эффективнее, чем E6wt в таком анализе (Sedman et al., 1991, *J Virol* 65: 4860-66). Трансфекция с помощью конструкции E6E7SH по настоящему изобретению не приводила к росту колоний клеток в мягком агаре (фиг. 2) в четырех независимых экспериментах, что показало, что нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид по настоящему изобретению, E6E7SH, утратили трансформирующую способность, которая связана с E7.

Онкогенный потенциал E6 и E7 связан с их способностью снижать уровни клеточных белков p53 и pRb соответственно. Анализы разрушения P53 и pRb проводили для демонстрации того, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по настоящему изобретению, E6E7SH, конструкцию, не обладает биологической активностью, связанной с E6 и E7 дикого типа на молекулярном уровне. Вкратце, E6wt HPV16 и конструкция E6E7SH по настоящему изобретению экспрессировали в клетках NCI-H1299, у которых отсутствовал эндогенный p53, для анализа разрушения p53. Для анализа разрушения pRb E7wt HPV16 и конструкцию E6E7SH экспрессировали в клетках Saos-2 с нефункциональным pRb. Как можно видеть на фиг. 3, совместная экспрессия p53 с E6wt, но не с E6E7SH, приводит к снижению уровней p53 (секции A и B).

Аналогично на секциях 3C и 3D показано, что совместная экспрессия pRb с E7wt, но не с E6E7SH, приводит к снижению уровней pRB. Из этих данных видно, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по настоящему изобретению, не обладает способностью колониеобразования в мягком агаре и не ограничивает биологические активности полипептидов E6 и E7 дикого типа, а именно инактивацию p53 и pRb соответственно.

Для дополнительной демонстрации безопасности конструкций нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид по настоящему изобретению, авторы настоящего изобретения использовали первичные кератиноциты крайней плоти человека, которые являются естественными клетками-мишенями для HPV-опосредованной трансформации. Для иммортализации первичных кератиноцитов человека требуется действие как E6, так и E7 дикого типа (Munger et al., 1989, *J Virol* 63: 4417-21). Этот анализ, вероятно, является физиологически наиболее важным анализом *in vitro* для демонстрации безопасности конструкций по настоящему изобретению (Massimi и Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Клетки, трансдуцированные лентивирусами, экспрессирующими E6 и E7 дикого типа HPV16 (E6E7wt), индуцируют иммортализацию первичных кератиноцитов, что подтверждается увеличением их продолжительности жизни по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками (фиг. 4) и активацией hTERT, каталитической субъединицы теломеразы (данные не показаны). Экспрессия полипептида по настоящему изобретению (E6E7SH) не способна продлить продолжительность жизни по сравнению с GFP-трансдуцированными или нетрансдуцированными кератиноцитами. Аналогичные результаты были получены у двух дополнительных независимых доноров (данные не показаны). Все эти данные указывают на то, что конструкции по настоящему изобретению утратили способность индуцировать иммортализацию.

цию первичных кератиноцитов человека, которые считаются в значительной степени физиологической моделью.

Другая конструкция, в которой фрагменты E6 и E7 HPV16 рекомбинировали в другом порядке, также была неспособна к иммортализации первичных кератиноцитов крайней плоти человека.

Однако для этой конструкции наблюдалась увеличенная продолжительность жизни до примерно 120-150 дней. Это указывает на некоторую непредсказуемость в этой области и показывает превосходство оригинальных молекул в соответствии с настоящим изобретением в этом аспекте, связанном с безопасностью.

Все вместе эксперименты в данном примере предоставляют убедительные доказательства отсутствия трансформирующей активности нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, и, таким образом, значительно улучшенной безопасности в сравнении с конструкциями E6 и E7 HPV16.

Пример 3. Иммунные ответы в отношении оригинальных конструкций E6E7SH.

Авторы настоящего изобретения получали ДНК-векторы и аденовирусные векторы, которые описаны в примере 1.

Авторы настоящего изобретения использовали линию мышей CB6F1 для оценки иммунных ответов, основываясь на первоначальных экспериментах, в которых мышью иммунизировали ДНК-плазмидами, кодирующими E2, или E6, или E7 дикого типа, и иммунизация антигенами E2, E6 и E7 HPV16 индуцировала более широкий клеточный иммунный ответ у CB6F1, чем у мышей линии C57BL/6 или мышей линии Balb/c. В отдельном эксперименте мышью иммунизировали ДНК-векторами, кодирующими молекулы по настоящему изобретению, и оценивали клеточные иммунные ответы. Специфические в отношении E7 HPV16 иммунные ответы можно оценивать у мышей, иммунизированных ДНК-плазмидами, экспрессирующими E6E7SH (фиг. 5).

Следующие данные, показанные в этом примере, получены из экспериментов с мышами, которым были введены аденовирусные векторы.

Для оценки иммуногенности, индуцированной вакциной, мышью линии CB6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов (Ad35), экспрессирующих E6E7wt, LSE6E7wt, E6E7SH, и аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых). Тестировали две дозы для введения мышам: 5×10^9 вирусных частиц (vp) и 1×10^{10} vp. Через две и восемь недель после иммунизации мышью умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пептидными пулами из олигонуклеотидов из 15 нуклеотидов E7 HPV16. E7-специфические ответы через две недели и через восемь недель анализировали с помощью IFN γ ELISPOT. Данные представлены на фиг. 6.

Из результатов видно, что иммунизация мышью с помощью Ad35.HPV16-E6E7SH индуцирует E7-специфические иммунные ответы, которые измерены с помощью анализа ELISPOT. Кроме того, из результатов на фиг. 6 видна возможность усиления иммунного ответа в отношении экспрессируемого аденовирусом трансгена путем добавления N-концевой лидерной последовательности к трансгену.

Затем исследовали эффект добавления E2 к полипептиду E6E7SH в отношении иммуногенности. Векторы Ad35 кодировали полипептиды, которые характеризовались наличием E2, слитым либо с N-концом (E2E6E7SH), либо с C-концом (E6E7E2SH). Мышь линии CB6F1 иммунизировали дозой, составляющей 1×10^{10} vp. На фиг. 7 (E7-тетрамерное окрашивание) и фиг. 8 (секция C, IFN γ ELISPOT) показаны иммунные ответы в отношении E7, которые для оригинальных конструкций, включающих E2, имели тенденцию к повышению по сравнению с конструкцией без E2, хотя различия не были статистически значимыми. Ответ в отношении E2 был выше для аденовирусных векторов, кодирующих только E2, по сравнению с ответом на аденовирусные векторы, у которых E2 слит с оригинальным полипептидом E6E7SH (фиг. 8B), причем различия значимы между E2 и E2E6E7SH и между E2 и E6E7E2SH (р-значение: $<0,05$).

Можно сделать вывод, что оригинальные конструкции, которые дополнительно включают E2, могут все еще обеспечивать иммунный ответ в отношении E7 и, кроме того, также обеспечивать иммунный ответ в отношении E2, таким образом увеличивая широту иммунного ответа по сравнению с конструкциями, которые не включают E2.

Было показано, что добавление лидерной последовательности приводит к более высоким E7-специфическим ответам при слиянии с N-концом белка слияния E6 и E7 дикого типа (фиг. 6C). Аналогичным образом определяли влияние лидерной последовательности на иммуногенность белка слияния E2E6E7SH.

Таким образом, для иммунизации мышью использовали векторы Ad35, кодирующие оригинальный полипептид, с N-концевым E2 или без него, и вектор Ad35, кодирующий LSE2E6E7SH, и образцы крови брали с двухнедельными интервалами для оценки E7-специфических иммунных ответов (фиг. 9) Как показано на фиг. 7 и 8, присутствие E2, слитого с E6E7SH либо на N-конце, либо на C-конце, приводило к увеличению иммунных ответов. Добавление лидерной последовательности IgE дополнительно увеличивало E7-специфический ответ (фиг. 9B). Со временем устойчивые иммунные ответы наблюдали для всех трех аденовирусных векторов, которые кодировали оригинальные молекулы в соответствии с на-

стоящим изобретением, а наивысший ответ после иммунизации соответствовал самым высоким ответам в течение всего эксперимента.

Можно сделать вывод, что ответы, которые индуцируются оригинальной конструкцией, которая дополнительно включает N-концевой E2, могут быть увеличены путем добавления определенных последовательностей, например лидерной последовательности IgE, которые нацеливают кодируемый белок на конкретные клеточные компартменты.

Клеточный иммунный ответ в отношении пептида по настоящему изобретению можно индуцировать различными типами аденовирусных векторов. В предыдущем эксперименте авторы настоящего изобретения использовали векторы Ad35, а в эксперименте на фиг. 10 мышей иммунизировали аденовирусным вектором Ad26, экспрессирующим E2E6E7SH. Из данных видно, что иммунизация с помощью вакцины на основе Ad26 также индуцировала E7-специфические Т-клетки. Кроме того, из результатов видно, что вторая иммунизация с помощью аденовирусного вектора Ad35, экспрессирующего E2E6E7SH, дополнительно усиливала клеточный иммунный ответ (фиг. 10).

Пример 4. Иммуногенность оригинальных конструкций у макаков-резус.

Для оценки способности аденовирусных векторов, экспрессирующих оригинальную последовательность по настоящему изобретению, индуцировать иммунные ответы у приматов, отличных от человека, макаков-резус иммунизировали при помощи внутримышечной инъекции аденовекторов (Ad26), экспрессирующих E2E6E7SH, или аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых), с дозой, составляющей 1×10^{11} вр. Через восемь недель после иммунизации иммунные ответы усиливали посредством иммунизации векторами Ad26, экспрессирующими тот же антиген. На 16 неделе животные получали еще одну инъекцию, содержащую векторы Ad35, экспрессирующие тот же антиген. Образцы крови брали на нескольких моментах времени, а выделенные белые клетки крови стимулировали в течение ночи пулами пептидов, соответствующими E2, E6 или E7 HPV16. Специфические ответы оценивали с помощью IFN γ ELISPOT. Данные представлены на фиг. 11. Кроме того, на 10 и 18 неделе после первичной иммунизации оценивали клеточный иммунный ответ, специфичный в отношении пептидов, охватывающих новые сочетания в настоящем изобретении. Индукция ответа IFN γ у всех животных была ниже предела обнаружения, составляющего <50 SFU на 1×10^6 PBMC (данные не показаны).

Из данных видно, что иммунизация приматов, отличных от человека, с помощью Ad26.HPV16-E2E6E7SH приводила к клеточным иммунным ответам в отношении всех трех белков HPV16, которые присутствуют в кодируемом трансгене, но не в отношении новых сочетаний. Ответы могут быть усилены за счет дополнительной иммунизации с помощью Ad26.HPV16-E2E6E7SH, а дополнительная бустерная доза на 16 неделе с соответствующим вектором Ad35 дополнительно увеличивала иммунные ответы, специфичные в отношении E2, E6 и E7 HPV16.

Позднее введение на 72 неделе бустерной дозы Ad26.HPV16-E2E6E7SH снова приводило к увеличению клеточного иммунного ответа в отношении HPV16, который спадал через несколько недель (не показан).

В отдельном эксперименте (не показан) макаков-резус иммунизировали путем внутривлагалищного введения комбинации двух аденовирусных векторов, один из которых экспрессирует E6E7SH HPV16, а другой - белок L1 HPV16. Низкие, но обнаруживаемые клеточные ответы измеряли в периферических мононуклеарных клетках крови как в отношении E6, так и в отношении E7. В этих экспериментах были выявлены сильные клеточные иммунные ответы в отношении L1.

Пример 5. Терапевтическая эффективность на мышинной модели опухоли.

Полипептид по настоящему изобретению способен индуцировать HPV16-специфический клеточный иммунный ответ у животных, который может оказывать терапевтический эффект на клетки, экспрессирующие E6 и/или E7 HPV16. Терапевтическую иммунизацию, т.е. иммунизацию после начала роста опухоли, можно применять для демонстрации эффективности варианта терапевтической вакцины против HPV. Терапевтический эффект векторов Ad26 и Ad35 исследовали на мышах, которым инъецировали клетки TC-1 (клетки мыши, экспрессирующие E6 и E7 HPV16) (Lin et al., 1996, Cancer Res 56: 21-6). Клетки TC-1 образуют солидную опухоль в течение от нескольких дней до недель после подкожной инъекции мышам. Без вакцины опухоли быстро росли и достигали предопределенного размера, составляющего 1000 мм^3 , в течение 30 дней (секции D и E). После достижения данного размера мышей умерщвляли по соображениям этики.

Вместе с иммунизацией по схеме "прайм-буст" при помощи SLP (использованные в качестве положительного контроля; Kenter et al., 2009, N Engl J Med 361:1838-47; Zwaveling et al., 2002, J Immunol 169:350-8) или аденовирусных векторов, экспрессирующих HPV16-E2E6E7SH, наблюдали заметное снижение роста опухолей, индуцированных TC-1 (фиг. 12, секции B и C). Более детальное изучение первых 30 дней после первичных иммунизаций (секции F и G) показывает, что иммунизация аденовекторами, экспрессирующими E2E6E7SH, характеризуется существенно большим воздействием на рост опухолей, чем иммунизация при помощи SLP. Начальная скорость роста является намного более низкой, и в большинстве случаев опухоли сжимались. У 3 из 11 мышей, иммунизированных аденовирусными векторами, опухоли были полностью устранены, что отображено на графике выживания (секция H).

В заключение, иммунизация аденовирусными векторами, экспрессирующими полипептид по настоящему изобретению, значительно снижала рост опухолей или полностью устраняла установившиеся опухоли в общепринятой модели контрольного заражения для рака, индуцированного HPV16.

Пример 6. Применение репрессорных систем для улучшения продуктивности и генетической стабильности аденовирусных векторов, экспрессирующих антигены, полученные из HPV.

Ранее сообщалось, что трансгены, помещенные в аденовирусные векторы под контролем сильных конститутивно активных промоторов, могут, в зависимости от свойств трансгенного продукта, отрицательно воздействовать на продукцию векторов (Yoshida & Yamada, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-30; Rubinchik et al., 2000, *Gene Ther* 7:875-85; Matthews et al., 1999, *J Gen Virol* 80:345-53; Edholm et al., 2001, *J Virol* 75:9579-84; Gall et al., 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73). Примеры затруднений в отношении продуктивности векторов, зависящей от трансгенов, включают недостаточные "спасение" и рост векторов, низкие конечные выходы векторов и в ряде случаев быстрое увеличение количества вирусных мутантов с дефектными кассетами трансгена. Для решения этих затруднений при помощи множества исследований изучали возможность подавления экспрессии трансгенов векторов во время репликации векторов в клетках-продуцентах (Matthews et al., 1999, *J Gen Virol* 80:345-53; Edholm et al., 2001, *J Virol* 75:9579-84; Gall et al., 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham et al., 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert et al., 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). В связи с этим, в случае Ad-векторов ранее внедряли различные репрессорные системы, и в самом деле было показано, что они улучшают продуктивность векторов и генетическую стабильность векторов, кодирующих различные типы (ингибиторных) трансгенов.

Обнаружили, что у некоторых из аденовирусных векторов, описанных в данном документе, а также у некоторых других аденовирусных векторов, кодирующих определенные варианты антигенов HPV, проявлялись некоторые из затруднений в отношении продуктивности векторов, зависящей от трансгенов, описанных выше, и, таким образом, их возможно можно дополнительно улучшать в этом отношении. Авторы настоящего изобретения, таким образом, желали изучить, может ли применение систем для репрессии экспрессии трансгенов векторов улучшить характеристики продукции Ad-векторов, экспрессирующих антигены, полученные из HPV, как те, что описаны в данном документе. С этой целью авторы настоящего изобретения внедряли две существующие системы репрессора-оператора, т.е. TetR/TetO (Yao & Eriksson, 1999, *Hum Gene Ther* 10:419-22, EP0990041B1) и CymR/CuO (Mullick et al., 2006, *BMC Biotechnol* 6:43), в платформу аденовирусного вектора по настоящему изобретению. Как систему TetR/TetO, так и систему CymR/CuO ранее применяли другие исследователи для улучшения продуктивности аденовирусных векторов посредством сайленсинга трансгенов векторов во время репликации векторов (Gall et al., 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham et al., 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert et al., 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). Внедрение этих двух систем включало выработку аденовирусных векторов, экспрессирующих гены, представляющие интерес, под контролем промоторов CMV, содержащих последовательность либо TetO, либо CuO. Более того, внедрение предусматривало получение линий клеток, стабильно экспрессирующих соответствующие родственные репрессорные белки (т.е. TetR или CymR).

Получали несколько векторов на основе Ad26 и Ad35 с удаленным E1, в которых последовательности, кодирующие гетерологичные полипептиды, были функционально связаны с промотором CMV, содержащим последовательности либо оператора TetO, либо оператора CuO. Вначале определенные последовательности, содержащие либо TetO, либо CuO (SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12 соответственно) вставляли возле сайта инициации транскрипции (TSS) промотора CMV (SEQ ID NO:13) плазмид pAdapt26 и pAdapt35.Bsu (Abbink et al., 2007, *J Virol* 81:4654-63; Havenga et al., 2006, *J Gen Virol* 87:2135-43). Последовательности, содержащие оператор, вставляли в точно те же положения промотора CMV, как было ранее описано для двух систем (Yao & Eriksson, 1999, *Human Gene Ther* 10:419-22; EP0990041B1; Mullick et al., 2006, *BMC Biotechnol* 6:43; EP1385946B1). В частности, сходные с TSS (как первоначально установлено; Stenberg et al., 1984, *J. Virol.* 49: 190-9), последовательности, содержащие TetO и CuO, вставляли непосредственно ниже положений -20 и +7 соответственно. В SEQ ID NO:13 эти два положения соответствуют положениям 716 и 742 соответственно. Полученные промоторы CMV, содержащие операторы, называют соответственно CMVTetO и CMVCuO. Далее различные трансгены включали ниже (модифицированных) промоторов CMV полученных конструкций с использованием сайтов рестрикции HindIII и XbaI. Эти трансгены включали гены, кодирующие белок слияния зеленого флуоресцентного белка и люциферазы (GFP-Luc), LSE2E6E7SH из настоящего изобретения и другой полипептид с определенным сходством с LSE2E6E7SH (конструкцию, называемую в данном примере "HPVAg"). HPVAg содержит ту же самую лидерную последовательность, как и присутствующая в LSE2E6E7SH, а также последовательности E2, E6 и E7 HPV16. С применением способов, которые описаны в данном документе, полученные модифицированные плазмиды pAdapt26 и pAdapt35.Bsu использовали для получения аденовирусных векторов, экспрессирующих вышеупомянутые репортер и трансгены HPV под контролем промотора либо CMVTetO, либо CMVCuO.

Линии клеток, экспрессирующих либо TetR, либо CymR, получали путем стабильной трансфекции клеток PER.C6® с использованием соответственно плазмиды pcDNA™6/TR (LifeTechnologies, V1025-20)

и производного pcDNA™6/TR, у которых последовательность, кодирующая TetR (SEQ ID NO:14, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:15), заменена на кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую CymR (SEQ ID NO:16, которая кодирует полипептид SEQ ID NO:17). Получение стабильных линий клеток выполняли в основном, как описано у поставщика pcDNA™6/TR, с использованием анализа, основанного на временной трансфекции, для скрининга в отношении клонов клеток, способных репрессировать экспрессию генов, которые находятся под управлением CMVTetO или CMVCuO. Полученные линии клеток PER.C6/TetR и PER.C6/CymR анализировали в отношении их способности репрессировать экспрессию трансгена во время репликации векторов в этих клетках. Из экспериментов, проводимых с векторами, экспрессирующими GFP-Luc под контролем промоторов CMV, содержащих операторы, видно по меньшей мере 10-кратное снижение экспрессии гена люциферазы на протяжении полного цикла репликации вируса в линиях клеток, экспрессирующих репрессор, соответствующий соответственным последовательностям оператора (данные не показаны). Это подтверждает то, что линии клеток PER.C6/TetR и PER.C6/CymR были способны репрессировать экспрессию трансгена вектора в случае репликации аденовирусных векторов.

Эффект опосредованной TetR и CymR репрессии экспрессии трансгена аденовектора на выходы векторов изучали в отношении векторов на основе Ad35, экспрессирующих HPVAg (фиг. 13A). С этой целью линии клеток PER.C6, PER.C6/TetR и PER.C6/CymR, посеянные при 3×10^5 клеток на лунку в лунки 24-луночного планшета, подвергали инфицированию в четырех параллельных анализах - по 1000 вирусных частиц на клетку и на протяжении 3 ч - при помощи векторов, экспрессирующих HPVAg из либо промотора CMVTetO, либо промотора CMVCuO. В качестве контролей проводили параллельные инфицирования соответствующими векторами, экспрессирующими GFP-Luc вместо HPVAg. Через четыре дня после инфицирования неочищенные вирусные лизаты получали, подвергая содержимое лунок (т.е. инфицированные клетки и среду) двум циклам замораживания-размораживания. Титры аденовекторов последовательно определяли при помощи протокола, основанного на количественной ПЦР, специфичной к последовательности гексонов Ad35, при котором используют очищенный вектор Ad35 с известным титром вирусных частиц в качестве стандарта. Из результатов видно, что векторы Ad35, кодирующие HPVAg, содержащие как TetO, так и CuO, в сравнении с контрольными векторами, экспрессирующими GFP-Luc, проявляли сниженные выходы векторов для нормальных клеток PER.C6. Для сравнения, при получении в клетках, экспрессирующих их родственные репрессоры (т.е. TetR и CymR соответственно), те же самые векторы давали выходы такие же высокие, как и те, что получены с контрольными векторами. Из этих данных видно, что репрессия экспрессии трансгена во время продукции векторов в клетках-продуцентах может быть выгодной для продуктивности векторов Ad35, переносящих HPVAg в качестве трансгена.

Эффект того, что репрессия экспрессии трансгена аденовектора может влиять на выходы векторов, также изучали для векторов, полученных из аденовируса серотипа 26 (Ad26) (фиг. 13B). В анализе, выполненном, по сути, как описано выше для векторов Ad35, векторы Ad26, несущие трансгены, контролируемые промотором CMVTetO, кодирующие либо GFP-Luc, HPVAg либо LSE2E6E7SH, использовали для инфицирования клеток PER.C6 и PER.C6/TetR при 1500 вирусных частицах на клетку. Через три дня области инфицирования собирали и титры вирусных частиц определяли при помощи способа, основанного на количественной ПЦР, специфичной к последовательности гексонов Ad26. Из результатов видно, что для клеток PER.C6 выходы векторов, кодирующих HPVAg и LSE2E6E7SH, являются более низкими, чем наблюдаемые для контрольных векторов, кодирующих GFP-Luc. В противоположность этому, для клеток PER.C6/TetR оба эти вектора показали титры, которые являются такими же высокими, как и те, что получали для контрольного вектора. Вместе с результатами выше (для векторов Ad35) из этих данных видно, что репрессия экспрессии трансгена во время продукции аденовектора повышает выходы векторов, экспрессирующих HPVAg и LSE2E6E7SH.

Авторы настоящего изобретения наблюдали существенные затруднения, касающиеся генетической стабильности аденовирусного вектора, который нес трансген для HPVAg, управляемый промотором CMV. Например, было обнаружено, что после нескольких циклов пассирования данного вектора в PER.C6 большая часть популяции вектора состояла из мутантного вектора, который характеризовался крупной делецией в последовательности, кодирующей HPVAg (данные не показаны).

Авторы настоящего изобретения полагали, что использование репрессорной системы экспрессии трансгена, как, например, одной из двух, описанных выше, может предотвратить затруднения в отношении генетической стабильности, связанные с трансгенами, как, например, HPVAg, которые являются ингибиторными для роста векторов. Чтобы изучить это, векторы на основе Ad35 с экспрессией HPVAg, управляемой промотором CMVCuO, оценивали в отношении стабильности кассеты трансгена при росте вектора либо в клетках PER.C6, либо в клетках PER.C6/CymR (фиг. 14). Коротко, ДНК вектора трансфицировали в две различные линии клеток и полученным вирусным бляшкам обеспечивали возможность роста под агарозным слоем. Для каждой из двух трансфекций выделяли пять вирусных бляшек и дополнительно отдельно пассировали в той же линии клеток (т.е. в той же, которую использовали для трансфекций) в течение десяти последовательных вирусных пассажей. Целостность трансгена оценивали с

помощью ПЦР-амплификации кассеты трансгена при вирусном пассаже номер десять (VPN10) и последующего анализа полученных продуктов ПЦР при помощи гель-электрофореза и секвенирования по Сэнгеру. В дополнение, в VPN7 пассированные вирусные клоны оценивали в отношении их способности экспрессировать HPVAg. Это осуществляли с использованием пассированных вирусных изолятов для инфицирования клеток A549 при 1000 вирусных частицах на клетку, с лизисом клеток через 48 ч после инфицирования и последующим анализом экспрессии HPVAg при помощи вестерн-блоттинга с использованием моноклонального антитела, направленного против E7 HPV16 (Santa-Cruz Biotechnology). Из результатов анализов гель-электрофореза и секвенирования видно, что каждый из всех пяти вирусных изолятов, которые пассировали в PER.C6, характеризовались либо небольшими делециями со сдвигом рамки считывания, либо мутациями с образованием преждевременного стоп-кодона в пределах кассеты трансгена. Для сравнения, такие делеции или мутации нельзя выявить ни в одном из изолятов векторов, которые пассировали в линии клеток, экспрессирующей CymR (PER.C6/CymR). В соответствии с этими данными все размноженные в PER.C6/CymR изоляты векторов были способны экспрессировать HPVAg, в то время как векторы, выращенные в PER.C6, полностью утрачивали эту способность, что позволяет предположить наличие дефектных кассет трансгена для этих векторов. В заключение, из данных авторов настоящего исследования видно, что использование репрессорной системы, как, например, системы CymR/CuO, для репрессии экспрессии трансгена вектора в ходе размножения вектора является эффективным средством для предотвращения серьезной нестабильности кассеты трансгена, как, например, той, которую наблюдали для векторов, несущих трансген, экспрессирующий HPVAg.

Ссылки.

Aebink P, Lemckert AA, Ewald BA, Lynch DM, Denholtz M, Smits S, Holterman L, Damen I, Vogels R, Thorner AR, O'Brien KL, Carville A, Mansfield KC, Goudsmit J, Havenga MJ, Barouch DH (2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol* 81:4654-4663

Ausubel FM (1995) Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Wiley, [Chichester]

Collingham MG, Carroll F, Morris SJ, Turner AV, Vaughan AM, Kapulu MC, Colloca S, Siani L, Gilbert SC, Hill AV (2012) Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. *Biotechnol Bioeng* 109:719-728

Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern PL, Kitchener HC (2010) Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 102:1129-1136

de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, van Meijgaarden KE, Drifhout JW, Kenter G, Vermeij P, Melief CJ, Offringa R (2002) Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 62:472-479

Edholm D, Molin M, Bajak E, Akusjarvi G (2001) Adenovirus vector designed for expression of toxic proteins. *J Virol* 75:9579-9584

Evans RK, Nawrocki DK, Isopi IA, Williams DM, Casimiro DR, Chin S, Chen M, Zhu DM, Shiver JW, Volkin DB (2004) Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines. *J Pharm Sci* 93:2458-2475

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998) New helper cells and matched

early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9:1909-1917

Frokjær S, Hovgaard L (2000) Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Taylor & Francis, London

Gall JG, Lizorova A, EllyReddy D, McVey D, Zuber M, Kovsedl T, Aughtman B, King CR, Brough DE (2007) Rescue and production of vaccine and therapeutic adenovirus vectors expressing inhibitory transgenes. *Mol Biotechnol* 35:263-273

Gao GP, Engdahl RK, Wilson JM (2000) A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther* 11:213-219

Gennaro AR (1990) Remington's pharmaceutical sciences. Mack

Gilbert R, Guilbault C, Gagnon D, Bernier A, Bourget L, Elahi SM, Kamen A, Massie B (2014) Establishment and validation of new complementing cells for production of E1-deleted adenovirus vectors in serum-free suspension culture. *J Virol Methods* 208:177-188

Hamid O, Carvajal RD (2013) Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 13:847-861

Harlow E, Lane D (1988) Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Havenga M, Vogels R, Zuijdgheest D, Radosevic K, Mueller S, Sieuwerts M, Weichold F, Danen I, Kaspers J, Lemckert A, van Meerendonk M, van der Vlugt R, Holtermar L, Hone D, Skeiky Y, Mintardjo R, Gillissen G, Barouch D, Sadoff J, Goudsmit C (2006) Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells. *J Gen Virol* 87:2135-2143

Henken FE, Oosterhuis K, Ohlschlager P, Bosch L, Hooijberg E, Haanen JB, Steenbergen RD (2012) Preclinical safety evaluation of DNA vaccines encoding modified HPV16 E6 and E7. *Vaccine* 30:4259-4266

Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, Schiller JT, Gonzalez P, Dubin G, Porras C,

Jimenez SB, Lowy DR (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298:743-753

Hoganson DK, Ma JC, Asato L, Ong M, Printz MA, Huyghe BG, Sosnowski BA, D'Andrea MJ (2002) Development of a stable adenoviral vector formulation. *Bioprocess J* 1:43-48

Hoof I, Peters B, Sidney J, Pedersen LE, Sette A, Lund O, Baus S, Nielsen M (2009) NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* 61:1-13

Horwitz MS (1996) Adenoviruses. B: Fields BN, Kriple DM, Baines JD (eds) *Virology*. Raven Press Ltd, New York

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, Essahsah F, Fathers LM, Offringa R, Driifhout JW, Wafoiman AR, Oostendorp J, Fleurbaey GJ, van der Burg SH, Melief CJ (2009) Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361:1838-1847

Kibbe AH (2000) *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press, London

Kovesdi I, Hedley SJ (2010) Adenoviral producer cells. *Viruses* 2:1681-1703

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56:21-26

Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Baus S, Lund O, Nielsen M (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res* 36:W509-512

Massimi P, Banks L (2005) Transformation Assays for HPV Oncoproteins. B: Davy C, Doorbar J (eds) *Human Papillomaviruses: Methods and Protocols*. Vol 119: *Methods in Molecular Medicine* Springer, Berlin, pp 381-395

Matthews DA, Cummings D, Eveleigh C, Graham FL, Prevec I (1999) Development and use of a 293 cell line expressing lac

repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):345-353

McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) PCR 2: a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford

Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-489

Mullick A, Xu Y, Warren R, Koutroumanis M, Guilbault C, Broussau S, Malenfant F, Bourget L, Lamoureux L, Lo R, Caron AW, Pilotte A, Massie B (2006) The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 6:43

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63:4417-4421

Ogun SA, Dumon-Seignovert L, Marchand JB, Holder AA, Hill F (2008) The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria. *Infect Immun* 76:3817-3823

Oosterhuis K, Aleyd E, Vrijland K, Schumacher TN, Haanen JB (2012a) Rational Design of DNA Vaccines for the Induction of Human Papillomavirus Type 16 E6- and E7-Specific Cytotoxic T-Cell Responses. *Hum Gene Ther* 23:1301-1312

Oosterhuis K, Ohlschlager P, van der Berg JH, Toebes M, Gomez R, Schumacher TN, Haanen JB (2011) Preclinical development of highly effective and safe DNA vaccines directed against HPV 16 E6 and E7. *Int J Cancer* 129:397-406

Oosterhuis K, van den Berg JH, Schumacher TN, Haanen JB (2012b) DNA vaccines and intradermal vaccination by DNA tattooing. *Curr Top Microbiol Immunol* 351:221-250

Peters B, Tong W, Sidney J, Sette A, Weng Z (2003) Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-I molecules. *Bioinformatics* 19:1765-1772

Prakash SS, Grossman SR, Pepinsky RB, Laimins LA, Androphy

EJ (1992) Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 trans-activator. *Genes Dev* 6:105-116

Rubinchik S, Ding R, Qiu AJ, Zhang F, Dong C (2000) Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein regulated by the Tet-inducible expression system. *Gene Ther* 7:875-885

Sambrook JEFMT (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT (1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 65:4860-4866

Shenk T (1996) *Adenoviridae and their Replication*. B: Fields BN, Knipe DM, Baines JD (eds) *Virology*. Raven Press Ltd, New York

Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V (2001) Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology* 281:231-238

van der Burg SH, Melief CJ (2011) Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol* 23:252-257

Watson JD (1992) *Recombinant DNA*. Scientific American Books, New York

Wieking BG, Vermeer DW, Spanos WC, Lee KM, Vermeer P, Lee WT, Xu Y, Gabitzsch ES, Balcaitis S, Balint CP, Jr., Jones FR, Lee JH (2012) A non-oncogenic HPV 16 E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors. *Cancer Gene Ther* 19:667-674

Yan J, Reichenbach DK, Corbill N, Hokey DA, Ramanathan MP, McKinney KA, Weiner DB, Sewell D (2009) Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen. *Vaccine* 27:431-440

Yao F, Eriksson E (1999) A novel tetracycline-inducible viral replication switch. *Hum Gene Ther* 10:419-427

Yoshida Y, Hamada H (1997) Adenovirus-mediated inducible

gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. Biochem Biophys Res Commun 230:426-430

Yugawa T, Kiyono T (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Rev Med Virol 19:97-113

Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. J Immunol 169:350-358

Последовательности

SEQ ID NO:1 (HPV16-E6E7SH, аминокислотная последовательность оригинального полипептида E6/E7 HPV16)

MEQKRTAMFQ	DPQERPRKLP	QLCTELQTTI	HDIILECVYC	KQOLEDEIDG
PAGQAEPRRA	HYNIVTFCKK	CDSTLRLCVQ	STHVDIRTLE	DLIMGTLGIV
CPICSQKPGT	TLEQQYNKPL	CDLLIRCINC	QKPLCPPEEKQ	RHLDKKQRFH
NTRGRWTGRC	MSCCRSSRTR	RETQMEGDTF	TLHFYMLDIQ	PETTDIYCYE
QLNDSSEED	EIDGFAGQAE	PDRAHYNIVT	FCCQLCTELQ	TTIHDIILEC
VYCKQQLLR	EVYDFAFRDL	CIVYRDGNPY	AVCDKCLKFY	SKISEYRHYC
YSLYGTTLQ	QYNKPLCDLL	IRCINCQK		

SEQ ID NO:2 (HPV16-E6E7SH, нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность оригинального полипептида E6/E7 HPV16)

ATGCACCAGA	AACGGACCGC	CATGTTCCAG	GACCCCCAGG	AACGGCCCCAG
AAAGCTGCCC	CAGCTGTGCA	CCGAGCTGCA	GACCACCATC	CACGACATCA
TCCTGGAATG	CGTGTACTGC	AAGCAGCAGC	TGGAAGATGA	GATCGACGGC
CCTGCTGGCC	AGGCCGAACC	CCACAGAGCC	CACACAAATA	TCGTGACCTT
CTGCTGCAAG	TGCGACAGCA	CCCTGCGGCT	GTGCGTGCAG	AGCACCCACG
TGACATCCG	GACCCCTGGAA	GATCTGTCTGA	TGGGCACCCCT	GGGCATCGTG
TGCCCATCT	GCAGCCAGAA	CCCCGGCACC	ACCCCTGGAAC	AGCAGTACAA
CAAGCCCCTG	TCCGACCTGC	TGATCCGGTG	CATCAACTGC	CAGAAACCCC
TGTGCCCCGA	GGAAAAGCAG	CGGCACCTGG	ACAAGAAGCA	GCGGTTCAC
AACAICCGGG	GCAGATGGAC	AGGCAGATGC	ATGAGCTGCT	GCAGAAGCAG
CCGGACCAGA	CGGGAAAACCC	AGATGCACGG	CGACACCCCC	ACCCCTGCACG
AGTACATGCT	GGACCTGCAG	CCCAGACAA	CCGACCTGTA	CTGCTACGAG
CAGCTGAACG	ACAGCAGCGA	GGAAAGAGGAC	GAGATTGACG	GACCCGCTGG
ACAGGCCGAG	CCTGACCCGG	CTCACTATAA	CATCGTGACA	TTTTGCTGTC
AGCTCTGTAC	TGAACTCCAG	ACAACAATTC	ACGATATTAT	TCTCGAATGT
GTGTATTGTA	AACAGCAGCT	CCTGCGGAGA	GAGGTGTACG	ACTTCGCTT
CCGGGACCTC	TGCATCGTGT	ATCGGGACGG	CAACCCCTAC	GCCGTGTGCG
ACAAGTGCCT	GAAATTCTAC	AGCAAGATCA	GCGAGTACCG	GCACTACTGC
TACAGCCTGT	ACGGAACAAC	ACTCGAACAG	CAGTATAACA	AACCACTCTG
TGATCTGCTG	ATTGCTGTA	TCAATTGTCA	GAAGTGATAA	

SEQ ID NO:3 (E2E6E7SH HPV16, аминокислотная последовательность
оригинального полипептида E2/E6/E7 HPV16)

MEETLCQRINVCQDKTILTHYFENDSTDIRDHTDYWKHMRIECCATYYKAREFMGFKEINHQVV
PTLAVSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLDQVSLLEVYLTAPTGCICKKHGYTVEVQFDG
DICNTMHYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYYGLYYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNKVWEVH
AGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRSEPDTGNPC
HTTKLLHRDSVDSAPILTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYREKHKCTLYTAV
SSTWHWTGHNKHSKSAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTIIVSTGFMSIMHQKRTAMFQDPQE
RPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLEDEIDGPAGQAEPRAHYNIIVTFCCCKCDSLRLC
VQSTIIVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPBEKQRRI
LDKKQRFHNIRGRWTGRMCCRSSRTRRETQMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSS
EEEDEIDGPAGQAEPRAHYNIIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDL
CIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQK

SEQ ID NO:4 (E2E6E7SH HPV16, нуклеотидная последовательность,
кодирующая оригинальный полипептид E2/E6/E7 HPV16)

ATGGAAACCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGACCCACTACGA
GAACGACAGCACCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGAAGCACATGCGGCTGGAATGCGCC
ATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGCTTCAAGCACATCAACCACCAGGTGGTGCCACCCTGG
CCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCAGCTGACCCTGGAAACCATCTACAA
CAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCTGCAGGACGTGTCCCTGGAAGTGTACCTGACCGCT
CCCACCGGCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGTGGAAAGTGCAGTTCGACGGCGACATCTGCA
ACACCATGCACTACACCAACTGGACCCACATCTACATCTGCGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGT
GGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGTACTACGTGCACGAGGGCATCCGGACCTACTTCGTG
CAGTTCAAGGACGACGCCGAGAAGTACAGCAAGAACAAGTGTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCC
AGGTCATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCCCGAGATCATCCG
GCAGCACCTGGCCAATCACCCCTGCCGCCACCCACACAAAGGCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAA
ACCCAGACCACCATCCAGCGGCCCCAGAAGCGAGCCCACACCGGCAATCCCTGCCACACCACCA

AGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCTATCCTGACCGCCTTCAACAGCAGCCACAA
 GGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTGCACCTGAAGGTGGACGCCAACACC
 CTGATGCGGGTGCGGTACAGATTCAAGAAGCACTGCACCCTGTACACCGCCGTGTCTCCACCT
 GGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGCGCCATCGTGCACCTGACCTACGACAGCGA
 GTGGCAGCGGGACCAGTTCCTGAGCCAGGTCAAAATCCCCAAGACCATCACCGTGTCCACCGGC
 TTCATGAGCATCATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCAGAA
 AGCTGCCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCTGGAATGCGTGTA
 CTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATCGACGGCCCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGAGCC
 CACTACAATATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGGCAGCAGCACCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCA
 CCCACGTGGACATCCGGACCCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGCCCCAT
 CTGCAGCCAGAAGCCCCGGCACCCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCCCTGTGCGACCTGCTG
 ATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGA
 AGCAGCGGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAG
 CCGGACCAGACGGGAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGAC
 CTGCAGCCCGAGACAACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAAGAGG
 ACGAGATTGACGGACCCGCTGGACAGGCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATT
 TTGCTGTCAGCTCTGTACTGAACTCCAGACAACAATTCACGATATTATTCTCGAATGTGTGTAT
 TGTAACAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACCTCTGCATCGTGT
 ATCGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTCTACAGCAAGATCAGCGA
 GTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTC
 TGTGATCTGCTGATTTCGCTGTATCAATTGTCAGAAGTGATAA

SEQ ID NO:5 (E6E7E2SH HPV16, аминокислотная последовательность,
 кодирующая оригинальный полипептид E6/E7/E2 HPV16)

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLEDEIDGPAGQAEPRD
 AHYNIIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLGIVCPICSQKPGTTLEQQYNKPLCDL
 LIRINCQKPLCPEEKQRHLDDKQRFHNIRGRWTGRMSSCRSSRTRRETQMHGDTPTLHEYML
 DLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRDAHNYIIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECV
 YCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNK
 LCDLLIRINCQKMETLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGF
 KHINHQVPTLAVSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLQDVSLEVYLTAPTGCICKHGY
 TVEVQFDGDI CNMHTYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYGLYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYS
 KNKVWEVHAGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRS
 EPDTGNPCHTTKLLHRDSVDSAPILTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFFK
 HCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKSIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTIIVSTGFMSI

SEQ ID NO:6 (E6E7E2SH HPV16, нуклеотидная последовательность,
кодирующая оригинальный полипептид E6/E7/E2 HPV16)

ATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCAGAAAGCTGCC
CCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAATGCGTGTACTGCAAG
CAGCAGCTGGAAGATGAGATCGACGGCCCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGAGCCCАСТАСА
АТАТСГТГАССТТСТГСТГСААГТСГСАСАГСАСССТСГССГТСТСГТСТСГСАСАГСАСССАСГТ
GGACATCCGGACCCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGCCCCATCTGCAGC
CAGAAGCCCGCACCCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCCTGTGCGACCTGCTGATCCGGT
GCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGAAGCAGCG
GTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAGCCGGACC
AGACGGGAAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGC
CCGAGACAACCGACCTGТАСТГСТАСАГСАСГТГААСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАС
TGACGGACCCGCTGGACAGGCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATTTTGTGT
CAGCTCTGТАСТГСААСТССАСАСАСАААТТСАСАТТАТТАТТСТСГААТСТГТТАТТГАААА
AGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCCGCTTCCGGGACCTCTGCATCGTGTATCGGGA
CGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGG
CACTACTGCTACAGCCTGTACGGAAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTCTGTGATC
TGCTGATTCGCTGTATCAATTGTСАГААГАТGGAAACCCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCA
GGACAAGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGCACCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGG
AAGCAGATGCGGCTGGAATGCGCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGCTTCAAGCAGATCA
ACCACCAGGTGGTGCCACCCCTGGCCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCA
GCTGACCCCTGGAAACCATCTACAACAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCCTGCAGGACGCTG
TCCCTGGAAGTGTACCTGACCGCTCCACCGGCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGTGGAAГ
TGCAGTTCGACGGCGACATCTGCAACACCATGCACTACACCAACTGGACCCACATCTACATCTG
CGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGTGGAAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGТАСТАСГТСАС
GAGGGCATCCGGACCTACTTCGTGCAГТТСААГСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАСАС
TGTTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTCACTCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGA
GGTGTCCAGCCCGAGATCATCCGGCAGCACCTGGCCAATCACCCCTGCCGCCACCCACACAAAG
GCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAAACCCAGACCACCATCCAGCGGCCAGAAAGCGAGCCCGACA
CCGGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCCATCCT
GACCGCCTTCAACAGCAGCCACAAGGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTГ
CACCTGAAGTGGACGCCAACACCCTGATGCGGCTGCGGTACAGATTCAAGAAGCACTGCACCC
TGTACACCGCCGTGTCCTCCACCTGGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGCGCCAT
CGTGACCCCTGACCTACGACAGCGAGTGGCAGCGGGACCAGTTCCCTGAGCCAGGTCAAААТССС
AAGACCATCACCGTGTCCACCGGCTTCATGAGCATCTGATAA

SEQ ID NO:7 (аминокислотная последовательность лидерного пептида IgE)

MDWTWILFLVAAATRVHS

SEQ ID NO:8 (нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид IgE)

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCCGCAACCCGGGTGCACAGC

SEQ ID NO:9 (аминокислотная последовательность лидерного пептида aa HAVT20)

MACPGFLWALVISTCLEFSMA

SEQ ID NO:10 (нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид HAVT20)

ATGGCCTGCCCCGGCTTTCTGTGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAATTCAGCAT
GGCC

SEQ ID NO:11 (2xTetO-содержащая последовательность)

GAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGAC

SEQ ID NO:12 (CuQ-содержащая последовательность)

ААСАААСАGАСААТСТGGТСТGТТТGТА

SEQ ID NO:13 (промотор CMV, присутствующий в плаزمидах pAdApt26 и pAdApt35)

ТСААТАТТGGCCАТТАGССАТАТТАТТСАТТGGТТАТАТАGСАТАААТСААТАТТGGCT
 АТТGGCCАТТGCАТАСGТТGTАТССАТАТСАТААТАТGTАСАТТТАТАТТGGCTСАТGTCCAAC
 АТТАССGCCАТГТТGСАТТGАТТАТТGАСТAGТТАТТААТАGТААТСААТТАССGGGТСАТТА
 GTTСАТАGСССАТАТАТGGAGТТССGCGТТАСАТААСТТАССGТAAАТGGCCCGCCTGGCTGAC
 CGCCCAACGACCCCGCCАТТGACGTCAАТААТGACGTATGТТСССАТАGТАACGCCAАТАGG
 GACTТТССАТТGACGTCAАТGGGTGGAGТАТТТАССGТAAАСТGCCCACTTGGCAGTACATCAA
 GTGTATСАТАТGCCAAGTACGCCCCCTАТТGACGTCAАТGACGGTAAАТGGCCCGCCTGGCАТТ
 АТGCCCAGTACATGACCTТАТGGGACTТТССТАCTTGGCAGTACATCTACGTАТТАGТСАТCGC
 ТАТТАССАТGGTGTATGCGGТТТТGGCAGTACATCAАТGGGCGTGGATAGCGGТТТGACTCACGG
 GGАТТТССАAGTCTCCACCCАТТGACGTCAАТGGGAGТТТGТТТТGGCACCAAAАТСАACGGG
 АСТТТССААААТGTСGТААСААСТССGCCCCАТТGACGCAААТGGGCGGTAGGCGTGTACGGT
 GGAGGTCTАТАТАAGCAGAGCTCGТТТАGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCАТССACGC
 TGТТТТGACCTCCАТАGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCАТТG
 GA

SEQ ID NO:14 (TetR, нуклеотидная последовательность, кодирующая
 аминокислотную последовательность полипептида TetR, экспрессируемого pcDNA™6/TR)

АТGТСТАGАТТАGАТААААGТААAGТGАТТААСАGСGСАТТАGAGCTGCTТААТGAGGT
 CGGAАТCGAAGGTТТААСААССCGТАААСТCGCCАGАAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACАТТG
 ТАТТGGCAТGТААААААТАAGCGGGCTТТGCTCGACGCCTTAGCCАТТGAGATGTТАGАТАGGC
 ACCАТАСТСАСТТТТGCCCTТТАGАAGGGGAAAGCTGGCAAGАТТТТТАCGТААТАACGCTAA
 AAGТТТТАGАТGTGCTТТАСТАAGТСАТCGCGATGGAGCAААAGTACАТТТАGGTACACGGCCT
 ACAGАААААСАGТАТGAAАСТCTCGААААТСААТТАGСCTТТТТАТGCCAАСАAGGTТТТТCAC
 TAGAGAAТGСАТТАТАТGCACTCAAGCGCTGTGGGGCAТТТТАСТТТАGGТTGCCTАТТGGAAGA
 TSAAGAGCAТCAAGTСGCTAAAGAAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCАТТА
 TTACGACAAGCTATCGAАТТАТТТGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTТАТТCGGCCTTG
 ААТТGATСАТАТGCGGATТАGАААААСААСТТАААТGTGAAAGTGGGTCCGCGTACAGCGGATC
 CCGGGAАТТСАGATCTТАТТАА

SEQ ID NO:15 (TetR, аминокислотная последовательность полипептида

TetR, экспрессируемого pcDNA™6/TR)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEM
 LDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQ
 GFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFL
 FGLELIICGLEKQLKCESGSAYSGSREFRSY

SEQ ID NO:16 (СумR, нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность полипептида СумR)

ATGTCTCCCAAACGACGGACTCAAGCGGAAAGGGCAATGGAAACTCAGGGTAAGCTGAT
TGCCGCGGCTCTGGGAGTGCTGCGAGAGAAAGGGTATGCCGGGTTTCGCATAGCCGACGTTCTCT
GGAGCTGCAGGCGTAAGCAGAGGAGCCCAATCTCATCACTTTCCGACCAAGCTGGAGCTTTTGC
TGGCTACCTTCGAATGGCTGTACGAGCAGATCACGGAAAGGAGTCGTGCTAGGCTGGCCAAGCT
GAAACCCGAGGATGATGTCATTCAGCAGATGCTGGACGATGCAGCCGAGTTCTTCCTGGACGAC
GACTTCAGCATCAGTCTCGACCTCATCGTAGCCGCAGATCGCGATCCAGCTTTGCGCGAGGGCA
TACAGAGAACAGTTCGAGCGGAATCGGTTTGTGGTGGAGGACATGTGGCTTGGTGTCTGGTGGAG
CAGAGGCCTCTCACGGGATGATGCCGAGGACATCCTGTGGCTGATCTTAACTCCGTGAGAGGG
TTGGCAGTGAGGTCCCTTTGGCAGAAGGACAAAGAACGGTTTGAACGTGTGCGAAACTCAACAC
TCGAGATTGCTAGGGAACGCTACGCCAAGTTCAAGAGATGA

SEQ ID NO:17 (СумR, аминокислотная последовательность полипептида СумR)

MSPKRRTQAERAMETQGKLIAAALGVLREKGYAGFRIADVPGAAGVSRGAQSHHFPTKL
ELLLATFEWLYEQITERSRARLAKLKPEDDVIQQMLDDAAEFFLDDDFSISLDLIVAADRDPAL
REGIQRTVERNRFVVEDMWLGVLSRGLSRDDAEDILWLI FNSVVRGLAVRSLWQKDKERFERVR
NSTLEIARERYAKFKR

SEQ ID NO:18 (E6 HPV16, а.к. 41-65)

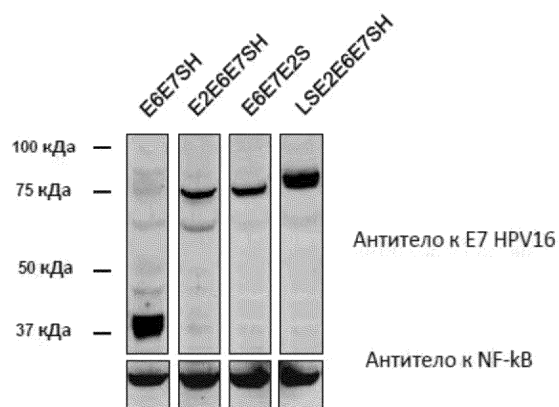
KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN

SEQ ID NO:19 (E7 HPV16, а.к. 43-77)

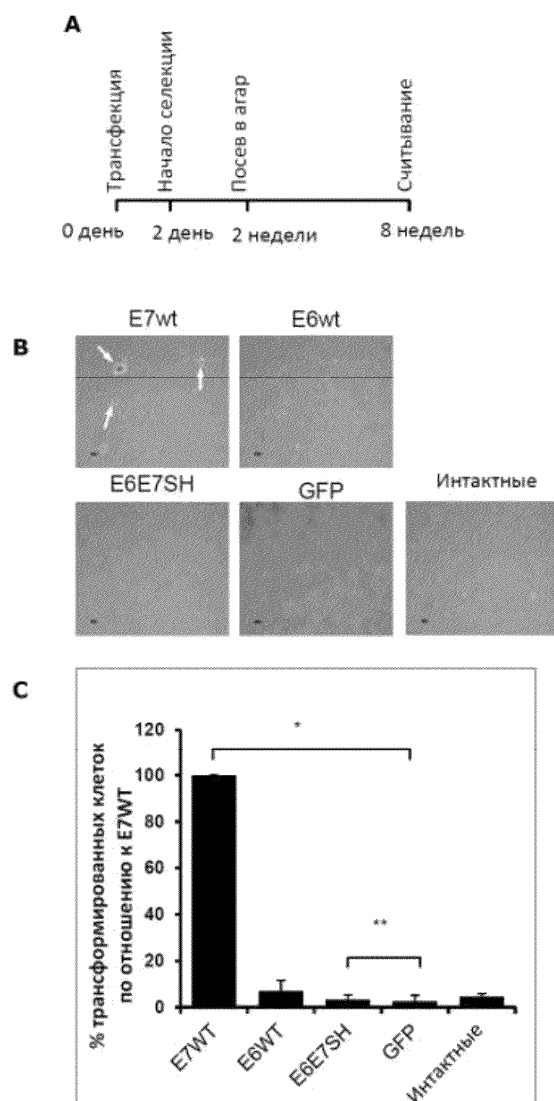
GQAEPRAHYNIIVTFCKKCDSTLRRCVQSTHVDIR

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

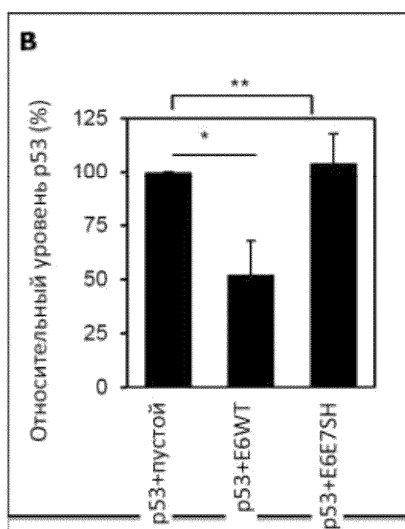
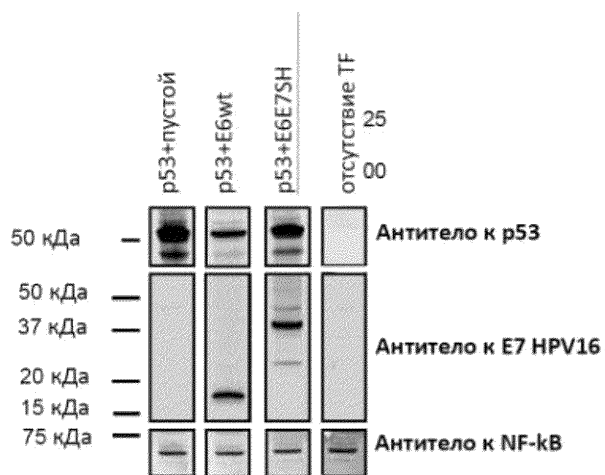
1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид HPV16 E6E7SH, содержащий SEQ ID NO:1.
2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где кодируемый полипептид дополнительно содержит лидерную последовательность.
3. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1 или 2, где кодируемый полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп белка E2 вируса папилломы человека (HPV).
4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.3, где кодируемый полипептид содержит белок E2 HPV16, который характеризуется делецией или мутацией в своем ДНК-связывающем домене.
5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.4, где кодируемый полипептид содержит SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5.
6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, где последовательность нуклеиновой кислоты является кодон-оптимизированной.
7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-6, содержащая SEQ ID NO:2.
8. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, содержащая SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.
9. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-8, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором.
10. Вектор по п.9, где вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус.
11. Вектор по п.9 или 10, где промотор функционально соединен с репрессорной операторной последовательностью, с которой репрессорный белок может связываться для репрессии экспрессии промотора в присутствии указанного репрессорного белка.
12. Композиция вакцины для индукции иммунного ответа в отношении HPV, содержащая вектор по любому из пп.9-11 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
13. Способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у пациента, включающий введение пациенту композиции вакцины по п.12.
14. Способ по п.13, включающий введение вакцины по п.12 пациенту более одного раза.
15. Способ лечения хронической инфекции, вызванной HPV, интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки, такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у пациента, включающий введение пациенту вакцины по п.12.
16. Полипептид HPV16 E6E7SH для индукции иммунного ответа в отношении HPV, содержащий SEQ ID NO:1.
17. Полипептид по п.16, содержащий SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5.



Фиг. 1

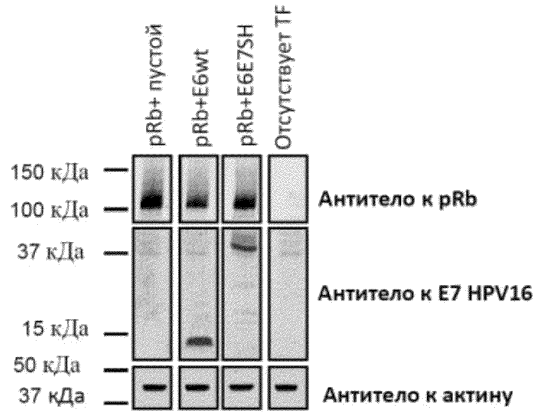


Фиг. 2

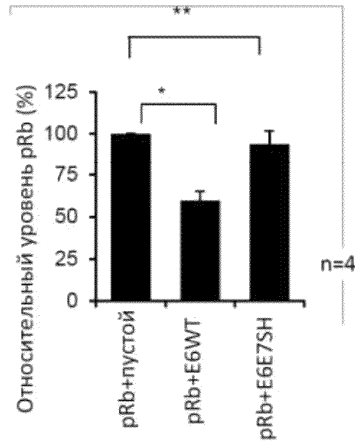


Фиг. 3

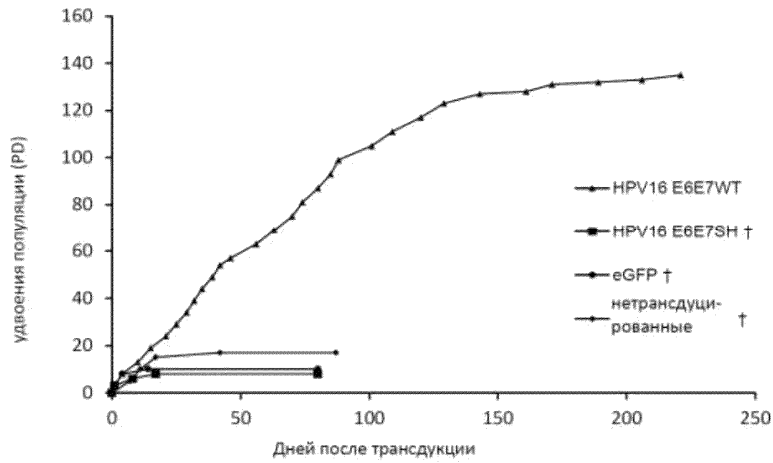
C



D

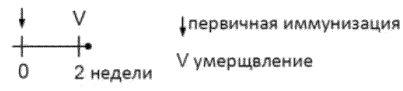


Фиг. 3 (продолжение)

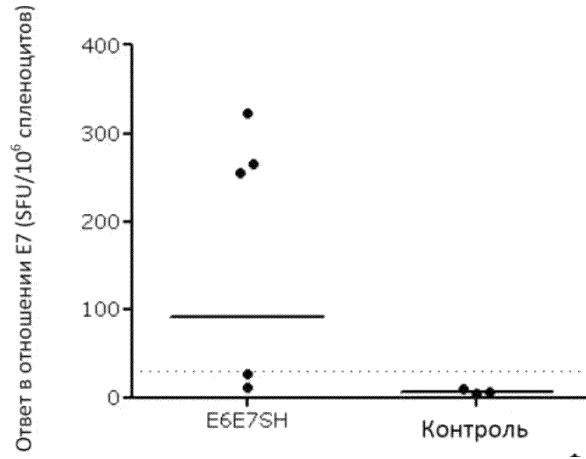


Фиг. 4

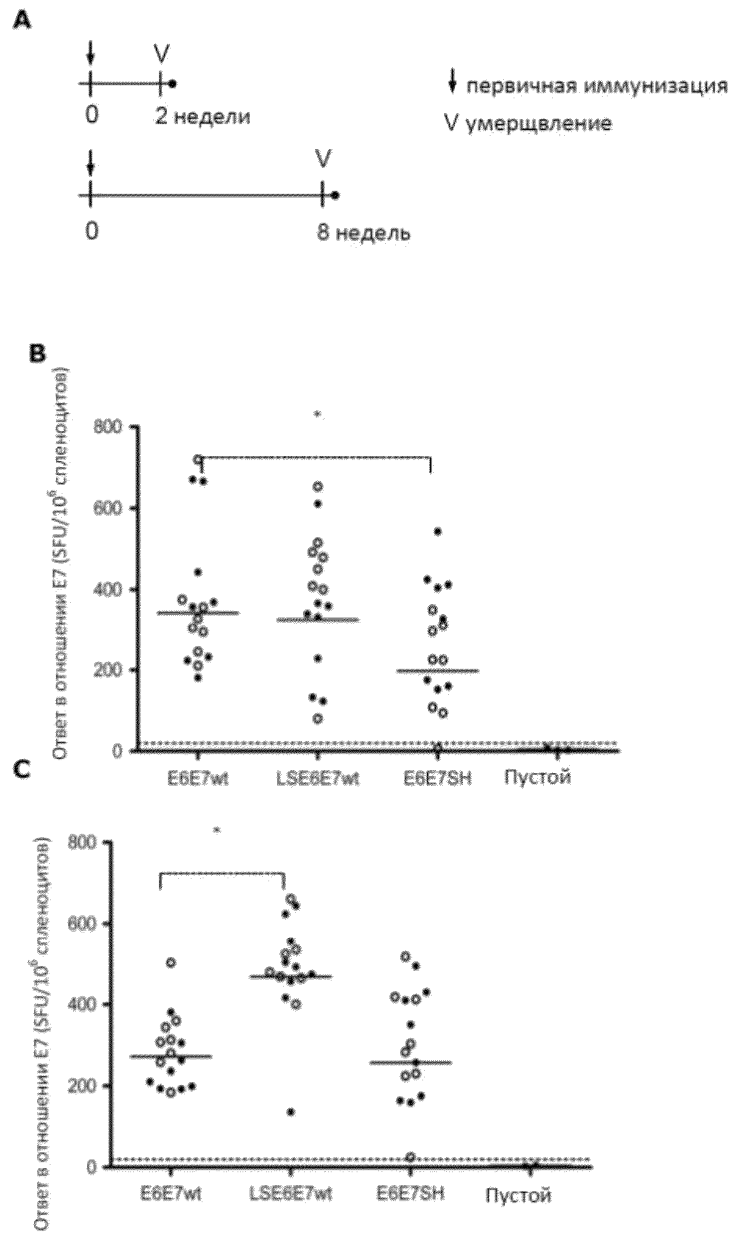
A



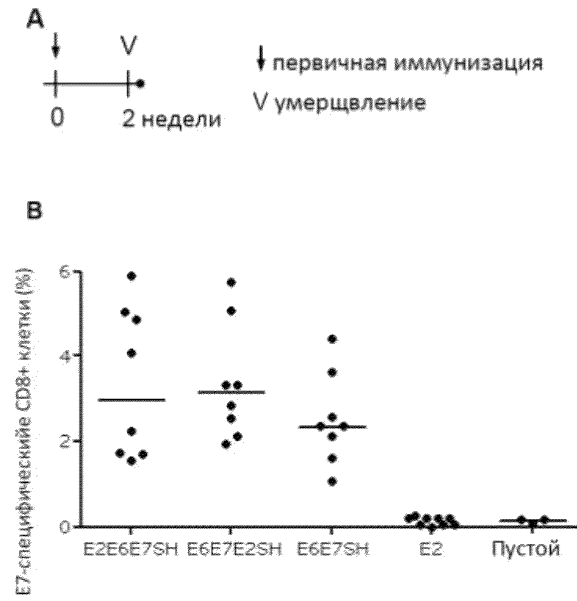
B



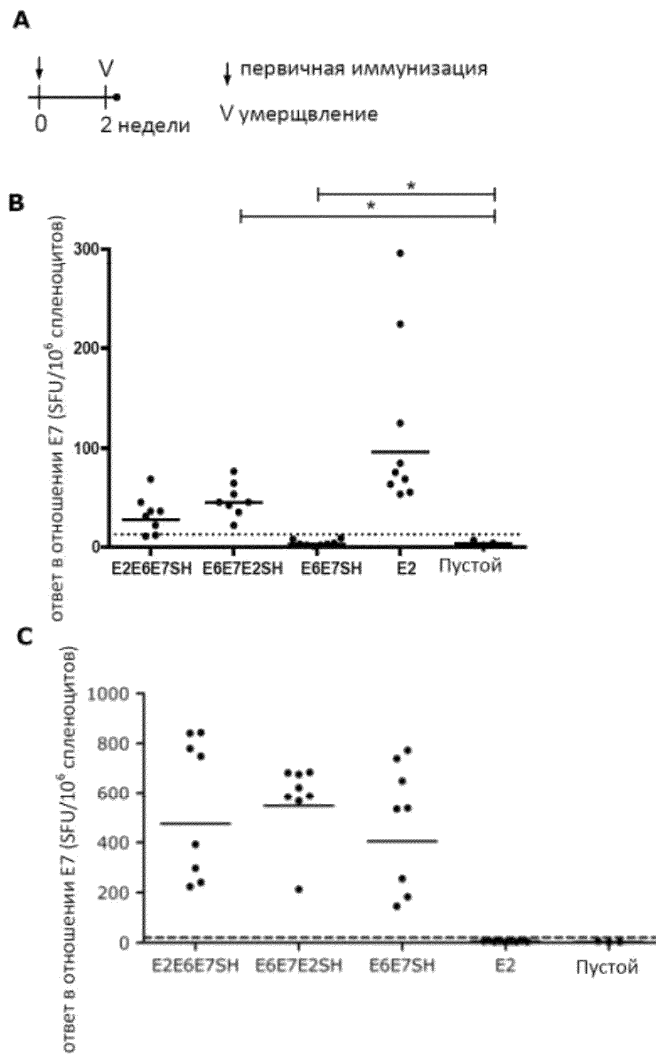
Фиг. 5



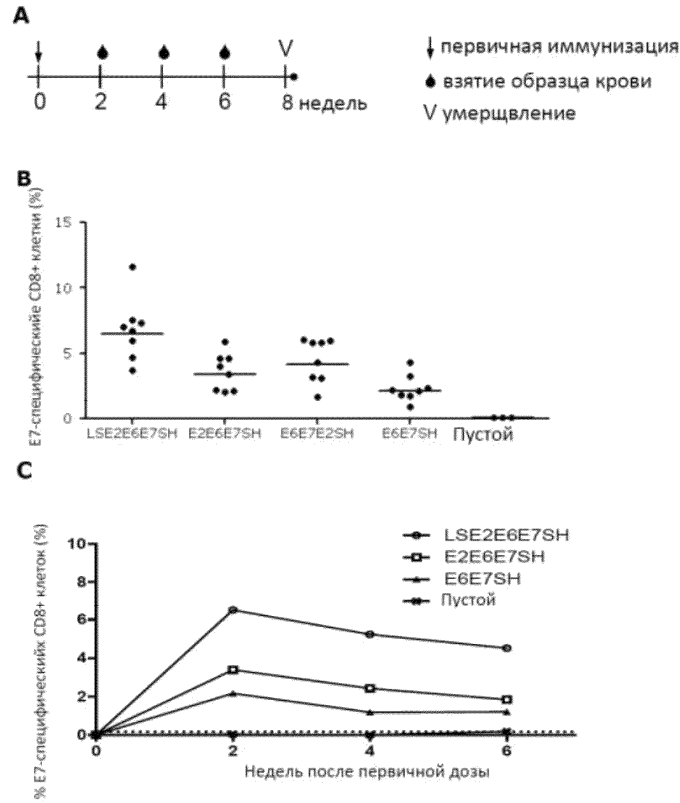
Фиг. 6



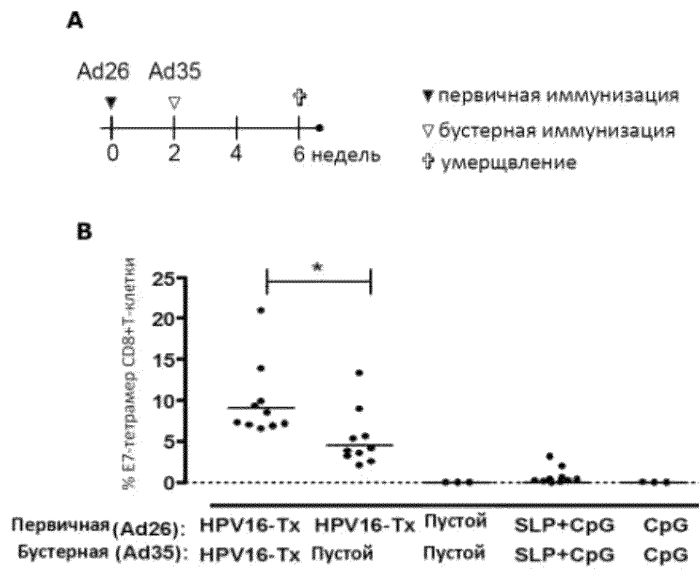
Фиг. 7



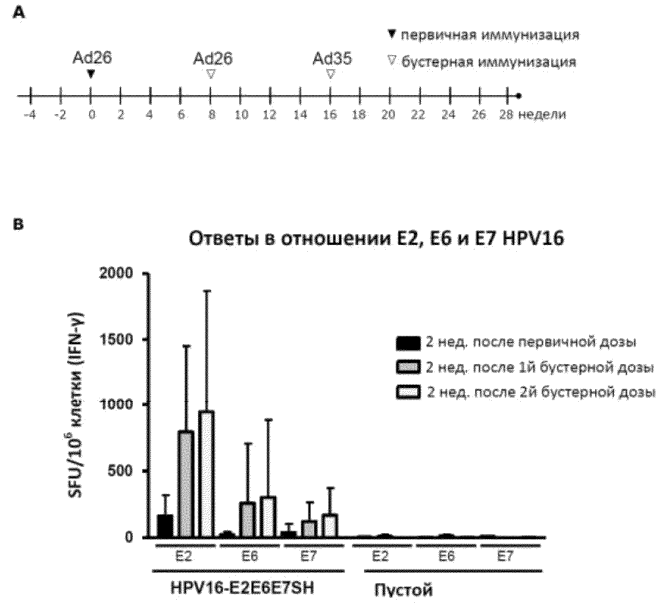
Фиг. 8



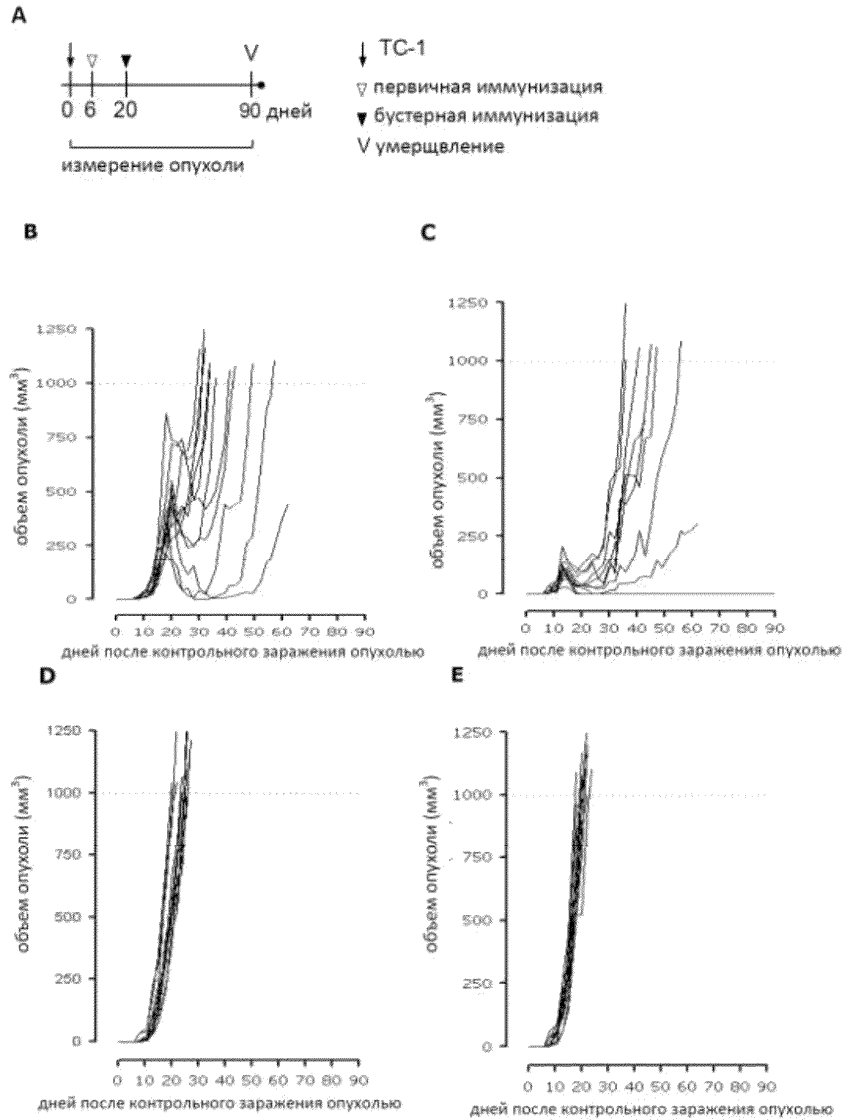
Фиг. 9



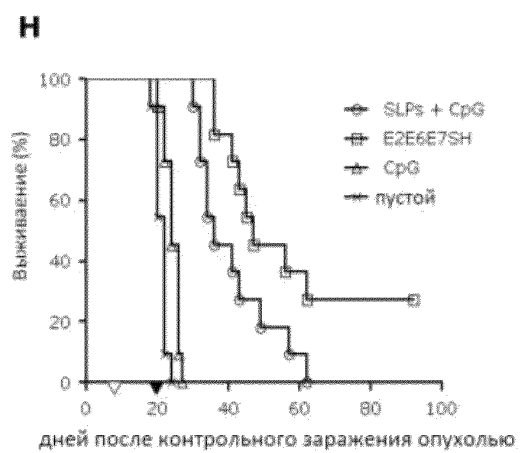
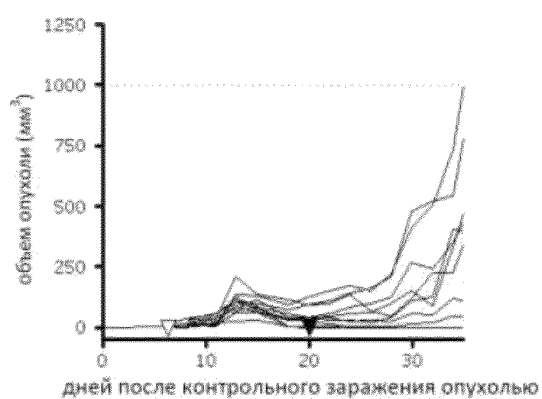
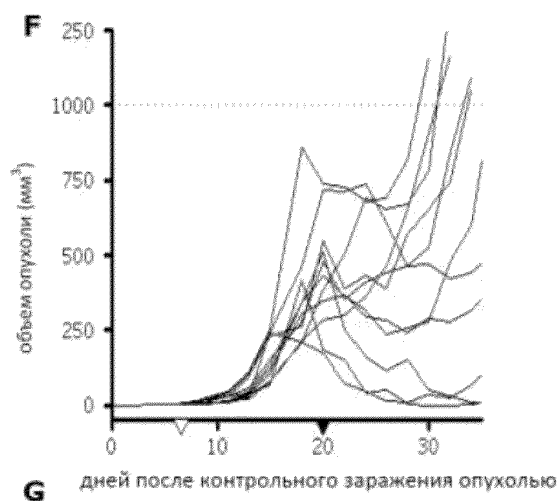
Фиг. 10



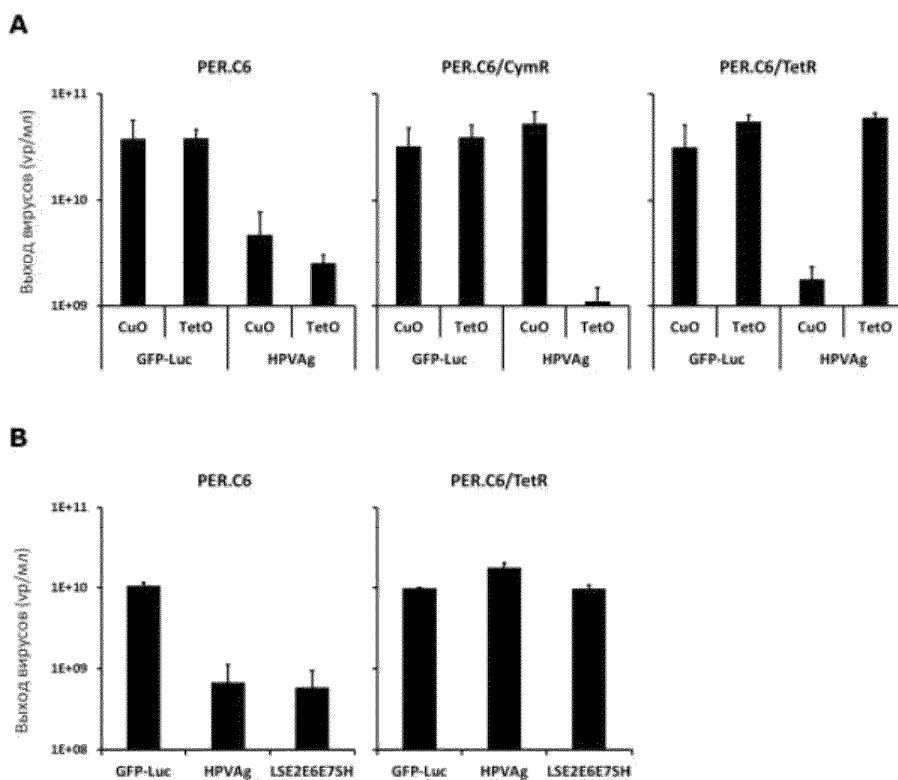
Фиг. 11



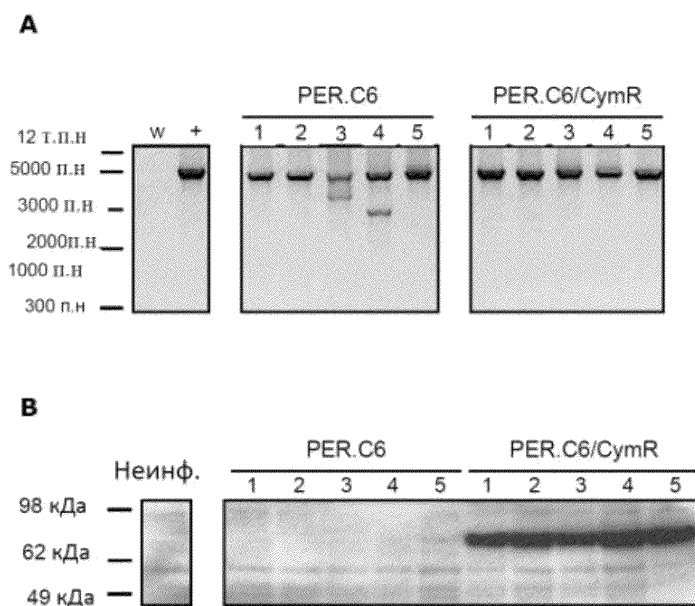
Фиг. 12



Фиг. 12 (продолжение)



Фиг. 13



Фиг. 14

