

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992282** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.05.31

(51) Int. Cl. *C07K 14/025* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.03.12

(54) **УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ
ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 61/777,198

(72) Изобретатель:

(32) 2013.03.12

Уэйнер Дэвид, Янь Цзянь (US)

(33) US

(62) 201591688; 2014.03.12

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ; ИНОВИО
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Раскрыты усовершенствованные анти-ВПЧ иммуногены и молекулы нуклеиновой кислоты, которые их кодируют. Раскрытые иммуногены включают содержащие консенсус ВПЧ 6 Е6Е7, ВПЧ 11 Е6Е7, ВПЧ 16 Е6Е7, ВПЧ 18 Е6Е7, ВПЧ 31 Е6Е7, ВПЧ 33 Е6Е7, ВПЧ 39 Е6Е7, ВПЧ 45 Е6Е7, ВПЧ 52 Е6Е7 и ВПЧ 58 Е6Е7. Раскрыты фармацевтическая композиция, рекомбинантные вакцины, содержащие ДНК плазмиду и живые аттенуированные вакцины, а также раскрыты способы стимуляции иммунного ответа в индивидуума против ВПЧ.

201992282

A1

A1

201992282

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к усовершенствованным вакцинам против вируса папилломы человека (ВПЧ), усовершенствованным способам стимуляции иммунного ответа и профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидуумов против ВПЧ.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирусы папилломы – это маленькие ДНК-вирусы, содержащие семь ранних генов и два поздних гена. Обычно ранние гены вируса папилломы обозначаются как E1-E7, а поздние гены – как L1 и L2. Некоторые виды животных могут инфицироваться представителями семейства вирусов папилломы.

Инфекция вирусом папилломы человека (ВЧП) широко распространена и может передаваться половым путем. На основании гомологичных последовательностей ДНК различают 56 или более типов ВПЧ. ВПЧ 16 и 18 типов, вызывающие эпителиальную дисплазию и другие поражения, часто связаны с повышенным риском рака, особенно *in situ* и инвазивных карцином шейки матки, влагалища, вульвы и анального прохода. Примерно 88% случаев рака шейки матки по всему миру являются результатом подтипов ВПЧ 16, 18, 45, 31, 33, 52 и 58. Кроме того, различные исследования выявили присутствие ВПЧ 6 и ВПЧ 11 в большинстве случаев возникновения рецидивирующего респираторного папилломатоза. Однако будучи известными за свою взаимосвязь с остроконечными кондиломами и находясь только в небольшом проценте в случаях с раком шейки матки, ВПЧ 6 и ВПЧ 11 было выявлено в 2,6-5,2% всех случаев низкодифференцированных поражений шейки матки. Кроме того, была показана взаимосвязь ВПЧ 6 и ВПЧ 11 с примерно 20% низкодифференцированных сквамозных интраэпителиальных поражений, которые сейчас считают предшественниками рака шейки матки, включая интраэпителиальную неоплазию шейки 2 и 3 степени и цервикальную дисплазию легкой степени тяжести. Умножающиеся исследования выявили взаимосвязь двух серотипов с различными формами отоларингологических заболеваний, включая остроконечные кондиломы, рецидивирующий респираторный папилломатоз, карциному легких, тонзиллярную карциному, ларингеальную карциному и другие злокачественные трансформации других доброкачественных

новообразований и дисплазию головы и шеи. Результаты данного исследования пролили свет и предоставили возможность использования вакцин консенсусной последовательности ДНК против ВПЧ 6 и ВПЧ 11.

ДНК-вакцины обладают многими концептуальными преимуществами перед более традиционными способами вакцинации, такими как живые аттенуированные вирусы и рекомбинантные вакцины на основе белка. ДНК-вакцины безопасны, стабильны, легко производятся и хорошо переносятся людьми при доклинических исследованиях, выявивших мало доказательств плазмидной интеграции [Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 772: p. 30-9]. Кроме того, ДНК-вакцины хорошо подходят для повторных введений благодаря тому, что эффективность вакцины не зависит от титров предсуществующих антител к вектору [Chattergoon, M., J. Boyer, и D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J*, 1997. 11(10): p. 753-63]. Однако, одним из основных препятствий для клинического выбора ДНК-вакцин остается снижение платформы иммуногенности при переходе к более крупным животным [Liu, M.A. и J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40]. Последние технологические достижения в разработке иммуногенных ДНК-вакцин, такие как оптимизация кодонов, РНК-оптимизация и добавление лидерных последовательностей иммуноглобулина усиливают экспрессию и иммуногенность ДНК-вакцин [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33], а также недавно разработанная технология системы доставки плазмид, такая как

электропорация [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. Кроме того, исследования подтверждают, что использование консенсусных иммуногенов может обладать способностью увеличивать распространенность клеточного иммунного ответа по сравнению с естественными антигенами. [Yan., J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14].

Следовательно, остается потребность в усовершенствованных вакцинах и способах предотвращения и лечения инфекции ВПЧ, в частности, инфекций, ведущих к раку шейки матки и/или карциномам легкого, миндалин и гортани.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В аспектах изобретения предлагаются композиции, содержащие по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая содержит гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, выбранный из группы, состоящей из: ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 39, ВПЧ 45, ВПЧ 52 и ВПЧ 58.

В другом аспекте изобретения предлагаются композиции, содержащие одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, которые выбраны из группы, состоящей из: нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; нуклеотидной последовательности,

кодирующей SEQ ID NO: 2; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 25; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, не содержат на 5' конце лидерной последовательности, которая представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте изобретения предлагаются композиции, содержащие одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, которые выбраны из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 3; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 5; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 7; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой

кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 19; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 21; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 23; фрагмента SEQ ID NO: 1; фрагмента SEQ ID NO: 3; фрагмента SEQ ID NO: 5; фрагмента SEQ ID NO: 7; фрагмента SEQ ID NO: 17; фрагмента SEQ ID NO: 19; фрагмента SEQ ID NO: 21; фрагмента SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 3; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 5; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 7; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 19; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 21; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, не содержат на 5' конце лидерной последовательности, представляющей собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9.

Предложенные нуклеотидные последовательности могут представлять собой плазмиду.

В дополнительных аспектах изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие раскрытые нуклеотидные последовательности; предпочтительно с несколькими антигенами.

В некоторых аспектах изобретения присутствуют способы стимуляции у индивидуума эффективного иммунного ответа более чем против одного подтипа ВПЧ, включающие введение указанному индивидууму композиции, содержащей одну или несколько предложенных последовательностей нуклеотидов; предпочтительно, композиции содержат более чем один антиген. Способы предпочтительно включают стадию введения предложенных нуклеотидных последовательностей индивидууму электропорацией.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1 представляет собой филогенетическое дерево на основе оценки способа ближайшего связывания выравниваний E6 и E7 (A и B, соответственно). Звездочки указывают на расположение консенсусных последовательностей на каждом дереве.

Фиг. 2 иллюстрирует экспрессию p6E6E7 и p11E6E7 *in vivo*. Генные продукты были выделены из лизированных трансфицированных 293-T клеток, пропущены через гель SDS-PAGE и определены с использованием ауторадиографии. Оба белка ВПЧ 6 и ВПЧ 11 E6/E7 являются примерно 32 кДа каждый (A). Клетки рабдомиосаркомы человека (RD) также были трансфицированы p6E6E7 и p11E6E7 и затем фиксированы после иммунофлуоресцентного окрашивания. Флуоресценция ФИТЦ подтверждает экспрессию p6E6E7 и p11E6E7 (B). Флуоресценция ДАПИ подтверждает локализацию ядра как следствие окрашивания по Хехсту.

Фиг. 3. Анализы способом иммуноферментных пятен с ИФН- γ показали индукцию устойчивых клеточно-опосредованных ответов относительно p6E6E7 (A) и p11E6E7 (B) у мышей C57BL/6. Анализы проводили с использованием спленоцитов, выделенных у мышей в каждой соответствующей группе (5 мышей на группу) после трехразовой двухнедельной иммунизации. Каждая иммунизация состояла из 20 мкг на модель. Мыши в комбинированной группе принимали как p6E6E7, так и p11E6E7 в дозе 20 мкг на модель, в целом 40 мкг ДНК для иммунизации. ДНК вводили посредством в/м инъекции, затем проводили электропорацию (* обозначает $p < 0,0001$; † обозначает $p=0,0001$).

Фиг. 4. Дополнительные анализы способом иммуноферментных пятен с ИФН- γ проводили с использованием отдельных пептидов для характеристики доминантных эпитопов. Спленоциты, выделенные у вакцинированных мышей и отрицательного контроля, были стимулированы перекрывающимися пептидами, которые перекрывали весь белок слияния ВПЧ 6 E6/E7 (A) или белок слияния ВПЧ 11 E6/E7 (B).

Фиг. 5. Выработка цитокинов антиген-специфическими T-клетками, охарактеризованная окрашиванием внутриклеточных цитокинов. Спленоциты, выделенные у мышей, вакцинированных p6E6E7 (A) и p11E6E7 (B), были стимулированы средой роста R10, РМА или консенсусными генными пептидами в течение 4 часов перед воздействием поверхностного маркера и внутриклеточным окрашиванием. Представленные выше точечные диаграммы отображают различия в процентах при вычитании из исходного значения для

общих клеток CD4+ или CD8+ клеток, вырабатывающих ИФН- γ , ИЛ-2 и ФНО- α . Р-значения для графиков со звездочками были неспособны определить по причине того, что среднее в отрицательной контрольной группе было нулем.

Фиг. 6 Иллюстрирует аминокислотную последовательность для ВПЧ 31 E6/E7 (SEQ ID NO: 18), аннотированного таким образом, чтобы показать лидерную последовательность IgE (IgEL), сайт эндопротеолитического расщепления и сайты, где домены E6 и E7 мутировали таким образом, чтобы увеличить экспрессию и иммуногенность.

Фиг. 7. Иллюстрирует аминокислотную последовательность для ВПЧ 52 E6/E7 (SEQ ID NO: 20), аннотированного таким образом, чтобы показать лидерную последовательность IgE (IgEL), сайт эндопротеолитического расщепления и сайты, где домены E6 и E7 мутировали таким образом, чтобы увеличить экспрессию и иммуногенность.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения.

Терминология, применяемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения, но не для ограничения. В описании и приложенной формуле изобретения слова в единственном числе означают также и множественное число, если из контекста очевидно не следует иное.

При указании числовых диапазонов в данном документе, каждое промежуточное число в них явно включено с такой же степенью точности. Например, для диапазона 6-9, числа 7 и 8 охватываются в дополнение к 6 и 9, и для диапазона 6,0-7,0 явно включены числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

а. Адъювант

«Адъювант», как применяется в данном документе, может обозначать любую молекулу, добавленную к вакцинам ДНК плазмиды, раскрытым в данном документе, с целью увеличения антигенности одного или нескольких антигенов, кодируемых ДНК плазмидами и кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, раскрытыми в дальнейшем.

б. Антитело

«Антитело» может обозначать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или его фрагменты, фрагменты или производные, в том числе Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, диатела,

антитела с двойной специфичностью, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может быть антителом, выделенным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, очищенным аффинностью антителом или их смесями, которые демонстрируют достаточную специфичность связывания с целевым эпитопом или полученной из него последовательностью.

с. Антиген

«Антиген» обозначает: белки, содержащие домен ВПЧ Е6 или ВПЧ Е7, и предпочтительно слияние Е6 и Е7 с сайтом эндеопроотеолитического расщепления между ними. Антигены включают SEQ ID NO: 2 (подтип 6), 4 (подтип 11), 6 (подтип 33), 8 (подтип 58), 18 (подтип 31), 20 (подтип 52), 22 (подтип 16) и 24 (подтип 18); их фрагменты указанной в данном документе длины, варианты, т. е. белки с последовательностями, гомологичными SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 и 24, определенными в данном документе, фрагменты вариантов с длиной, указанной в данном документе, и их комбинации. Антигены могут содержать лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 или, в альтернативном варианте, такая последовательность может быть удалена с N-конца. Антигены необязательно могут содержать сигнальные пептиды, такие как пептиды из других белков.

d. Кодированная последовательность

«Кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота», как применяется в данном документе, может обозначать нуклеиновую кислоту (молекулу РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, как определено в разделе с. выше. Кодирующая последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, в том числе промотор и сигнал полиаденилирования, способный направлять экспрессию в клетках индивидуума или млекопитающего, которому введена нуклеиновая кислота. Кодирующая последовательность может дополнительно содержать последовательности, которые кодируют сигнальные пептиды, например, лидерную последовательность IgE, такую как SEQ ID NO: 9.

e. Комплемент

«Комплемент» или «комплементарный» в данном описании может означать, что нуклеиновая кислота может содержать спаривание оснований по Уотсону-Крику (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстону

между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами в молекулах нуклеиновой кислоты.

f. Фрагмент

«Фрагмент» может обозначать полипептидный фрагмент антигена, который способен индуцировать у млекопитающего иммунный ответ против антигена. Фрагмент антигена может быть на 100% идентичным полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N-и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретного полноразмерного антигена, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может включать фрагмент полипептида, который является на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более гомологичным антигену и дополнительно содержит N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Фрагменты могут дополнительно содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту антигена.

Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует антиген, может быть на 100% идентичным полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретной полноразмерной кодирующей последовательности, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, 96% или более,

97% или более, 98% или более или 99% или более гомологичным антигену, и необязательно дополнительно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Фрагменты могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту кодирующей последовательности.

г. Идентичный

«Идентичный» или «идентичность», как применяется в данном описании в контексте двух или более нуклеиновых кислот или последовательностей полипептида может означать, что последовательности содержат указанный процент остатков, которые являются одинаковыми в рамках указанного участка. Процент можно вычислить путем оптимального выравнивая двух последовательностей, сравнивая две последовательности в пределах указанного участка с определением количества положений, в которых идентичный остаток встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, с делением количества совпадающих положений на общее количество положений в указанном участке, и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. В случаях, где длина двух последовательностей является различной или выравнивание дает один или несколько ступенчатых концов, и указанный участок сравнения содержит только одну последовательность, остатки одной последовательности включают в знаменатель, но не в числитель уравнения. При сравнении ДНК и РНК, тимин (Т) и урацил (U) могут считаться эквивалентами. Идентичность может быть определена вручную или с применением компьютерного алгоритма для последовательностей, такого как BLAST или BLAST 2.0.

h. Иммунный ответ

«Иммунный ответ» в данном описании может обозначать активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на введение одного или нескольких антигенов с помощью предложенных вакцин ДНК плазмиды. Иммунный ответ может

существовать в форме клеточной или гуморальной реакции, или обеих.

i. Нуклеиновая кислота

«Нуклеиновая кислота», или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид» в данном описании может обозначать по меньшей мере два нуклеотида, соединенные вместе ковалентной связью. Дополнительно, изображение одноцепочечной нити определяет последовательность комплементарной нити. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную нить изображенной одноцепочечной нити. Множество вариантов нуклеиновой кислоты может применяться для той же цели, что и указанная нуклеиновая кислота. Поэтому, нуклеиновая кислота дополнительно включает в существенной мере идентичные нуклеиновые кислоты и комплементарные к ним. Одноцепочечная нить предлагает зонд, который может гибридизоваться с последовательностью-мишенью в условиях строгой гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизуется в условиях строгой гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть однонитевыми или двухнитевыми, или могут содержать части как двухнитевой, так и однонитевой последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибрид, где нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, а также комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты могут быть получены способами химического синтеза или рекомбинантными способами.

j. Функционально связанный

«Функционально связанный» в данном описании может означать, что экспрессия гена осуществляется под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может располагаться в направлении 5' (выше) или 3' (ниже) гена, который он контролирует. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между таким промотором и геном, который он контролирует, в том гене, из которого получен промотор. Как известно из уровня техники, вариация указанного расстояния может быть применена без потери функции промотора.

k. Промотор

«Промотор» в данном описании может обозначать синтетическую молекулу или молекулу природного происхождения, которая способна обеспечивать, активировать или увеличивать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или несколько специфических транскрипционных регуляторных последовательностей с целью дополнительного увеличения экспрессии и/или модификации экспрессии в пространстве и/или времени. Кроме того, промотор может содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от стартового сайта транскрипции. Промотор может происходить из источников, которые включают вирусные, бактериальные, грибковые, растения насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференциально относительно клетки, ткани или органа, в котором происходит экспрессия, или относительно стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металла или индуцирующие агенты. Характерные примеры промоторов включают промотор T7 бактериофага, промотор T3 бактериофага, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

1. Строгие условия гибридизации

«Строгие условия гибридизации» в данном описании могут обозначать условия, в которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) гибридизуется со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в сложной смеси нуклеиновых кислот. Строгие условия зависят от последовательности и будут различными в различных обстоятельствах. Строгие условия могут быть выбраны таким образом, чтобы температура была ниже около на $5-10^{\circ}\text{C}$, чем температура плавления ($T_{пл}$) для конкретной последовательности при определенной ионной силе pH. $T_{пл}$ может представлять собой температуру (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных к мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесии (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке, при $T_{пл}$ 50% зондов заняты в равновесии). Строгими условиями могут быть такие, при которых концентрация соли составляет менее около

1,0 М иона натрия, такие как концентрация иона натрия (или других солей) около 0,01–1,0 М при рН 7,0–8,3 и температура, составляющая по меньшей мере 30°C для коротких зондов (например, около 10–50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для длинных зондов (например, более около 50 нуклеотидов). Дополнительно, строгие условия могут быть достигнуты добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал может превышать по меньшей мере в 2–10 раз фон гибридизации. Примеры строгих условий гибридизации включают следующее: 50% формамида, 5х стандартный солевой раствор и 1% натрия додецилсульфата (НДС), инкубация при 42°C, или 5х стандартный солевой раствор, 1% НДС, инкубация при 65°C, с промыванием в 0,2х стандартный солевой раствор и 0,1% НДС при 65°C.

м. В существенной мере комплементарный

«В существенной мере комплементарный» в данном описании может означать, что первая последовательность является по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичной комплементарной цепи второй последовательности в пределах участка длиной 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизуются в строгих условиях гибридизации.

н. В существенной мере идентичный

«В существенной мере идентичный» в данном описании может означать, что первая и вторая последовательности являются по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичными в пределах участка длиной 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или в отношении нуклеиновых кислот, если первая последовательность является в существенной мере комплементарной по отношению к комплементарной цепи второй последовательности.

о. Вариант

«Вариант», применяемый в данном описании к нуклеиновой кислоте, может обозначать (i) часть или фрагмент контрольной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную цепь контрольной нуклеотидной последовательности или ее часть; (iii)

нуклеиновую кислоту, которая в существенной мере идентична контрольной нуклеиновой кислоте или ее комплементарной цепи; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в строгих условиях с контрольной нуклеиновой кислотой, ее комплементарной цепью, или последовательности, в существенной мере им идентичные.

«Вариант» в отношении пептида или полипептида, аминокислотная последовательность которая отличается вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Дополнительно, вариант может обозначать белок с аминокислотной последовательностью, которая является в существенной мере идентичной контрольному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Консервативная замена аминокислоты, т. е. замена аминокислоты другой аминокислотой со сходными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных участков) признана в данной области техники как обычно влекущая за собой незначительное изменение. Такие незначительные изменения могут быть идентифицированы, частично, путем рассмотрения индекса гидрофобности аминокислот, как известно из уровня техники. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Индекс гидрофобности аминокислоты основан на рассмотрении ее гидрофобности и заряда. Из уровня техники известно, что аминокислоты со сходными индексами гидрофобности могут быть заменены, и все еще сохраняют функцию белка. В одном аспекте изобретения аминокислоты с индексами гидрофобности ± 2 заменяемы. Кроме того, гидрофильность аминокислот может применяться для выявления замен, которые будут приводить к белкам, сохраняющим биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет вычисление наибольшей локальной средней величины гидрофильности указанного пептида, пригодного показателя, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101, включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Замена аминокислот со сходными значениями гидрофильности может приводить к пептидам, сохраняющим биологическую активность, например, иммуногенность, как известно из уровня техники. Замены могут быть произведены для аминокислот со значениями гидрофильности в

пределах ± 2 друг относительно друга. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретная боковая цепь такой аминокислоты. В соответствии с таким наблюдением, понятно, что замены аминокислот, которые совместимы с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот, и особенно боковых цепей таких аминокислот, на что указывает гидрофобность, гидрофильность, заряд, размер и другие свойства.

р. Вектор

«Вектор», применяемый в данном описании может обозначать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может быть плазмидой, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или искусственной хромосомой дрожжей. Вектор может быть ДНК или РНК вектором. Вектор может быть либо самореплицирующимся экстрахромосомным вектором, либо вектором, который интегрирован в геном хозяина.

Раскрытые усовершенствованные вакцины основаны на мультифазной стратегии для усиления клеточных иммунных ответов, вызванных иммуногенами. Были разработаны модифицированные консенсусные последовательности. Также раскрыты генетические варианты воплощения, включающие кодонную оптимизацию, РНК-оптимизацию и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобина. Новая конструкция разработана для вызова более сильного и обширного клеточного иммунного ответа, чем соответствующие кодон-оптимизированные иммуногены.

Усовершенствованные ВПЧ вакцины основаны на белках и генетических конструкциях, которые кодируют белки с эпитопами, делающими их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых может быть вызван анти-ВПЧ. Соответственно, вакцины могут стимулировать терапевтический или профилактический иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения средствами, доставляющими иммуногены, являются ДНК-вакцина, рекомбинантная вакцина, белковая субъединичная вакцина, композиция, содержащая иммуноген, аттенуированная вакцина или инактивированная вакцина. В некоторых вариантах реализации изобретения вакцина содержит комбинацию, выделенную из групп, состоящих из: одной или нескольких ДНК-вакцин, одной или нескольких рекомбинантных вакцин, одной или нескольких белковых субъединичных вакцин, одной или нескольких композиций,

содержащих иммуноген, одной или нескольких аттенуированных вакцин и одной или нескольких инактивированных вакцин.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения вакцина, доставляемая индивидууму, модулирует активность иммунной системы индивидуума и тем самым усиливает иммунный ответ против ВПЧ. Когда молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, попадает в клетки индивидуума, в клетках экспрессируется нуклеотидная последовательность и таким образом к индивидууму доставляется белок. Предоставляются способы доставки последовательности, кодирующей белок, в молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плазида, как часть рекомбинантной вакцины и как часть аттенуированной вакцины, как выделенные белки или белки, входящие в вектор.

Предоставляются композиции и способы, которые профилактически и/или терапевтически иммунизируют индивидуума против ВПЧ.

Композиции для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуноген, функционально связаны с регуляторными элементами. Композиции могут содержать плазмиду, которая кодирует иммуноген, рекомбинантную вакцину, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуноген, живой аттенуированный патоген, который кодирует белок по изобретению и/или содержит белок по изобретению; инактивированный патоген, содержащий белок по изобретению, или композицию, такую как липосома или субъединичная вакцина, которая содержит белок по изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к инъекцируемым фармацевтическим композициям, которые содержат композиции по изобретению.

В аспектах изобретения предлагаются композиции, содержащие по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, содержащую гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, выбранный из группы, состоящей из: ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 39, ВПЧ 45, ВПЧ 52 и ВПЧ 58. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции могут содержать ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 52 и ВПЧ 58. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции могут содержать ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 52 и ВПЧ 58. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции могут содержать ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16 и

ВПЧ 18. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции могут содержать ВПЧ 16, ВПЧ 31 и ВПЧ 52.

В другом аспекте изобретения предлагаются композиции, содержащие одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, выбранный из группы, состоящей из: нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 25; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 26; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной последовательности нуклеиновой кислоты нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 25; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 26; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO:

4; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 25; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 26; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 25; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18;

8; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 6; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности,

кодирующей SEQ ID NO: 6; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 8; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной последовательности нуклеиновой кислоты нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 2; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 4; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO:

22; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; фрагмента нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 18; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 20; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 22.

В другом аспекте изобретения предлагаются композиции, содержащие одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих гибридный антиген ВПЧ Е6-Е7, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 3; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 5; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 7; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 19;

последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 21; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 23; фрагмента SEQ ID NO: 1; фрагмента SEQ ID NO: 3; фрагмента SEQ ID NO: 5; фрагмента SEQ ID NO: 7; фрагмента SEQ ID NO: 17; фрагмента SEQ ID NO: 19; фрагмента SEQ ID NO: 21; фрагмента SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 3; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 5; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 7; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 19; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 21; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 5; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 7; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 19; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 21; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 23; фрагмента SEQ ID NO: 5; фрагмента SEQ ID NO: 7; фрагмента SEQ ID NO: 17; фрагмента SEQ ID NO: 19; фрагмента SEQ ID NO: 21; фрагмента SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 5; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 7; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 17;

последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 19; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 21; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 3; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 21; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 23; фрагмента SEQ ID NO: 1; фрагмента SEQ ID NO: 3; фрагмента SEQ ID NO: 21; фрагмента SEQ ID NO: 23; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 1; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 3; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 21; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 19; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной SEQ ID NO: 21; фрагмента SEQ ID NO: 17; фрагмента SEQ ID NO: 19; фрагмента SEQ ID NO: 21; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 17; последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 19; и последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 95% гомологичной фрагменту SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, раскрытые в данном документе, не содержат

лидерной последовательности. Нуклеотидные последовательности, содержащие ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 39, ВПЧ 45, ВПЧ 52 и ВПЧ 58, не содержат лидерной последовательности. В частности, гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, включая нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 2; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 4; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 6; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 8; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 18; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 20; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 22; нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 24; и нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 25, не содержат лидерной последовательности на 5' конце, например, нуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO: 10. В частности, гибридные антигены ВПЧ Е6-Е7, включая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 23, не содержат лидерной последовательности на 5' конце, например, нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологичными предложенным нуклеотидным последовательностям; предпочтительно на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%; или 98% или 99%.

Предложенные нуклеотидные последовательности могут быть введены в один из множества известных векторов или систем доставки, в том числе плазмиду, вирусный вектор, липидный вектор, наночастицу; предпочтительно плазмиду.

В дополнительных аспектах предложены фармацевтические композиции, содержащие раскрытые нуклеотидные последовательности; предпочтительно с несколькими антигенами.

В некоторых аспектах изобретения присутствуют способы стимуляции у индивидуума эффективного иммунного ответа более чем против одного подтипа ВПЧ, включающие введение указанному индивидууму композиции, содержащей одну или несколько предложенных последовательностей нуклеотидов; предпочтительно, композиции содержат более одного антигена. Способы

предпочтительно включают стадию введения предложенных нуклеотидных последовательностей индивидууму электропорацией.

SEQ ID NO: 1 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 6 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 1 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, связанную с нуклеотидной последовательностью на 5'-конце SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 6 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 2 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце консенсусной иммуногенной последовательности. Лидерная последовательность IgE – это SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 2 или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 2.

Фрагменты SEQ ID NO: 2 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 2 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 2, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 2, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 2, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с

последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 1, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 2 и дополнительно необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 1 могут содержать 786 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 830 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 856 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 865 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 1, такие как раскрытые в данном документе, могут, кроме того, содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 1 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 2 могут содержать 252 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 266 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 275 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 278 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 3 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 11 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 3 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, связанную с нуклеотидной последовательностью на 5' конце SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 4 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 11 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 4 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце консенсусной иммуногенной последовательности. Лидерная последовательность IgE является SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 4 или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 4.

Фрагменты SEQ ID NO: 4 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 4 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 4, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 4, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 4, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать

60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 3, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 4, и дополнительно необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 3 могут содержать 786 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 830 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 856 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 865 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 3, такие как раскрытые в данном документе, могут, кроме того, содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации фрагменты SEQ ID NO: 3 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 4 могут содержать 252 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 266 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 275 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 278 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 5 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 33 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 5 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO:

9, связанную с нуклеотидной последовательностью на 5' конце SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 6 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 33 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 6 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце консенсусной иммуногенной последовательности. Лидерная последовательность IgE является SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 6 или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 6.

Фрагменты SEQ ID NO: 6 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 6 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 6, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 6, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 6, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или

более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 5, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 6, и дополнительно необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 5 могут содержать 746 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 787 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 812 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 820 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 5, такие как раскрытые в данном документе, могут, кроме того, содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 5 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 6 могут содержать 235 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 248 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 256 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 259 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 7 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 58 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 7 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, связанную с нуклеотидной последовательностью на 5' конце SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 8 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 58 Е6

и E7. SEQ ID NO: 8 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце консенсусной иммуногенной последовательности. Лидерная последовательность IgE является SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 8 или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 8.

Фрагменты SEQ ID NO: 8 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 8 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 8, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 8, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 8, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 7, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид.

Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 8, и дополнительно необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 7 могут содержать 752 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 794 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 819 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 827 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 7, такие как раскрытые в данном документе, могут, кроме того, содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 7 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 8 могут содержать 235 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 249 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 257 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 260 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 17 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 31 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 17 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, присоединенную к нуклеотидной последовательности на 5' конце SEQ ID NO: 17. SEQ ID NO: 18 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 31 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 18 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце последовательности консенсусного иммуногена. Лидерная последовательность IgE

представляет собой SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 18 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 18.

Фрагменты SEQ ID NO: 18 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 18 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 18, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 18, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 18, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 17, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более,

на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 18, и дополнительно необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 17 могут содержать 713 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 752 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 776 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 784 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 17, такие как раскрытые в данном описании, могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 17 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 18 могут содержать 236 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 249 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 257 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 259 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 19 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 52 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 19 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, присоединенную к нуклеотидной последовательности на 5' конце SEQ ID NO: 19. SEQ ID NO: 20 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 52 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 20 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце последовательности консенсусного иммуногена. Лидерная последовательность IgE представляет собой SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 20 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 20.

Фрагменты SEQ ID NO: 20 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 20 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 20, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 20, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 20, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 19 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 19, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 20, и дополнительно

необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 19 могут содержать 713 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 752 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 776 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 784 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 19, такие как раскрытые в данном описании, могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 19 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 20 могут содержать 236 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 249 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 257 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 259 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 21 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 16 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 21 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, присоединенную к нуклеотидной последовательности на 5' конце SEQ ID NO: 21. SEQ ID NO: 22 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 16 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 22 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце последовательности консенсусного иммуногена. Лидерная последовательность IgE представляет собой SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 22 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 22.

Фрагменты SEQ ID NO: 22 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 22 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 22, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 22, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 22, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 21, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 22, и дополнительно

необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 21 могут содержать 736 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 777 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 802 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 810 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 21, такие как раскрытые в данном описании, могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 21 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 22 могут содержать 238 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 251 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 259 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 261 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 23 содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует консенсусный иммуноген белков ВПЧ 18 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 23 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 9, присоединенную к нуклеотидной последовательности на 5' конце SEQ ID NO: 23. SEQ ID NO: 24 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 Е6 и Е7. SEQ ID NO: 24 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце последовательности консенсусного иммуногена. Лидерная последовательность IgE представляет собой SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации изобретения вакцины содержат SEQ ID NO: 24 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 24.

Фрагменты SEQ ID NO: 24 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты SEQ ID NO: 24 могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной SEQ ID NO: 24, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент SEQ ID NO: 24, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным SEQ ID NO: 24, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Кроме того, фрагменты могут содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть присоединены к фрагменту.

Фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 23 могут быть на 100% идентичными полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1, или без них. Фрагменты могут содержать 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины полноразмерной кодирующей последовательности SEQ ID NO: 23, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Предпочтительно, фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который является на 95% или более, на 96% или более, на 97% или более, на 98% или более или на 99% или более гомологичным антигену SEQ ID NO: 24, и дополнительно

необязательно содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при вычислении процента гомологии. Дополнительно, фрагменты могут содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, которая кодирует N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть присоединена к фрагменту.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 23 могут содержать 705 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 744 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах реализации изобретения 767 или более нуклеотидов вариантов; и в некоторых вариантах реализации изобретения 775 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 23, такие как раскрытые в данном описании, могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 23 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 24 могут содержать 234 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 247 или более аминокислот; в некоторых вариантах реализации изобретения 255 или более аминокислот; и в некоторых вариантах реализации изобретения 257 или более аминокислот.

SEQ ID NO: 25 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 45 E6 и E7. SEQ ID NO: 25 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце последовательности консенсусного иммуногена. Лидерная последовательность IgE представляет собой SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 26 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 39 E6 и E7. SEQ ID NO: 26 содержит лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 на N-терминальном конце последовательности консенсусного иммуногена. Лидерная последовательность IgE представляет собой SEQ ID NO: 10 и может кодироваться SEQ ID NO: 9.

Существуют композиции, содержащие аминокислотную последовательность, которая выбрана из SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; или SEQ ID NO: 26; или их фрагментов, по меньшей мере на 95% гомологичных; или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции содержат SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22.

Аминокислотная последовательность может представлять собой фрагменты, по меньшей мере на 95% гомологичные любой из аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность может быть фрагментами, по меньшей мере на 98% гомологичными любой из аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность может быть фрагментами, по меньшей мере на 99% гомологичными любой из аминокислотных последовательностей.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения способы стимуляции иммунного ответа в индивидуумов против иммуногена включают введение индивидууму аминокислотной последовательности для консенсусного иммуногена, выбранного из группы, состоящей из ВПЧ 6 Е6 и Е7, ВПЧ 11 Е6 и Е7, ВПЧ 16 Е6 и Е7, ВПЧ 18 Е6 и Е7, ВПЧ 31 Е6 и Е7, ВПЧ 33 Е6 и Е7, ВПЧ 52 Е6 и Е7, ВПЧ 58 Е6 и Е7, ВПЧ 45 Е6 и Е7, ВПЧ 39 Е6 и Е7, их функциональных фрагментов и их экспрессирующихся кодирующих последовательностей. Предпочтительно, иммуногены представляют собой консенсусные ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 52 и ВПЧ 58. Предпочтительно, иммуногены представляют собой консенсусные ВПЧ 16, ВПЧ 18, ВПЧ 31, ВПЧ 33, ВПЧ 52 и ВПЧ 58. Предпочтительно, иммуногены представляют собой консенсусные ВПЧ 6, ВПЧ 11, ВПЧ 16 и ВПЧ 18. Предпочтительно, иммуногены представляют собой консенсусные ВПЧ 16, ВПЧ 31 и ВПЧ 52.

Некоторые варианты реализации изобретения включают выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена, выбранного из группы, состоящей из ВПЧ 6 Е6 и Е7, ВПЧ 11 Е6 и Е7, ВПЧ 16 Е6 и Е7, ВПЧ 18 Е6 и Е7, ВПЧ 31 Е6 и Е7, ВПЧ 33 Е6 и Е7, ВПЧ 52 Е6 и Е7, ВПЧ 58 Е6 и Е7, ВПЧ 45 Е6 и Е7 и ВПЧ 39 Е6 и Е7 и их фрагментов. Некоторые варианты реализации изобретения включают рекомбинантную вакцину, которая кодирует аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена, выбранного из группы, состоящей из ВПЧ 6 Е6 и Е7, ВПЧ 11 Е6 и Е7, ВПЧ 16 Е6 и Е7, ВПЧ 18 Е6 и Е7, ВПЧ 31 Е6 и Е7, ВПЧ 33 Е6 и Е7, ВПЧ 52 Е6 и Е7, ВПЧ 58 Е6 и Е7, ВПЧ 45 Е6 и Е7 и ВПЧ 39 Е6 и Е7 и их фрагментов. Некоторые варианты реализации изобретения включают субъединичную вакцину, которая содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена, выбранного из группы, состоящей из ВПЧ 6 Е6 и Е7, ВПЧ 11 Е6 и Е7, ВПЧ 16 Е6 и Е7, ВПЧ 18 Е6 и Е7, ВПЧ 31 Е6 и Е7, ВПЧ 33 Е6 и Е7, ВПЧ 52 Е6 и Е7, ВПЧ 58 Е6 и Е7, ВПЧ 45 Е6 и Е7 и ВПЧ 39 Е6 и Е7 и их фрагментов. Некоторые варианты реализации изобретения включают живую аттенуированную вакцину и/или инактивированную вакцину, которая содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена, выбранного из группы, состоящей из ВПЧ 6 Е6 и Е7, ВПЧ 11 Е6 и Е7, ВПЧ 16 Е6 и Е7, ВПЧ 18 Е6 и Е7, ВПЧ 31 Е6 и Е7, ВПЧ 33 Е6 и Е7, ВПЧ 52 Е6 и Е7, ВПЧ 58 Е6 и Е7, ВПЧ 45 Е6 и Е7 и ВПЧ 39 Е6 и Е7.

Существуют способы стимуляции иммунного ответа у индивидуума против ВПЧ, включающие введение указанному индивидууму композиции, содержащей последовательности нуклеиновых кислот, предложенные в данном описании. В некоторых вариантах реализации изобретения способы дополнительно включают введение последовательностей нуклеиновых кислот индивидууму электропорацией.

В некоторых аспектах присутствуют способы стимуляции иммунного ответа у индивидуума против ВПЧ, включающие введение указанному индивидууму композиции, содержащей аминокислотную последовательность, предложенную в данном описании. В некоторых вариантах реализации изобретения способы дополнительно включают введение аминокислотных последовательностей индивидууму электропорацией.

В одном аспекте изобретения вакцины являются такими, которые возбуждают иммунный ответ против подтипов ВПЧ, которые, как было выявлено, преимущественно связаны с формами рака головы и шеи и другими формами отоларингологических заболеваний, в частности, вакцины включают ВПЧ 6 Е6 и Е7 и ВПЧ 11 Е6 и Е7, и, преимущественно, обе.

В другом аспекте изобретения вакцины являются такими, которые возбуждают иммунный ответ против подтипов ВПЧ, которые, как было выявлено, преимущественно связаны с формами рака шейки матки у пациентов из США и, точнее, у пациентов из Азии, в частности, вакцины включают ВПЧ 33 Е6 и Е7 и ВПЧ 58 Е6 и Е7, и, преимущественно, обе.

Предпочтительными являются комбинации, пригодные для возбуждения иммунного ответа против подтипов ВПЧ, для которых обнаружена связь с раком шейки матки, в том числе предраковыми поражениями, и которые включают: подтипы ВПЧ 16, 18, 31, 33, 52, 58, 6, 11, 39 и 45 или ВПЧ подтипы 16, 18, 31, 33, 52, 58, 6 и 11. Другие подкомбинации для такого рака шейки матки включают:

16 и 18; 16, 18 и 6; 16, 18 и 11; 16, 18 и 31; 16, 18 и 33; 16, 18 и 52; 16, 18 и 58; 16, 18, 6 и 11; 16, 18, 6 и 31; 16, 18, 6 и 33; 16, 18, 6 и 52; 16, 18, 6 и 58; 16, 18, 11 и 31; 16, 18, 11 и 33, 16, 18, 11 и 52; 16, 18, 11 и 58; 16, 18, 31 и 33; 16, 18, 31 и 52; 16, 18, 31 и 58; 16, 18, 33 и 52; 16, 18, 33 и 58; 16, 18, 52 и 58;

6, 11 и 16; 6, 11 и 18; 6, 11 и 31; 6, 11 и 33; 6, 11 и 52; 6, 11 и 58; 6, 11, 16 и 31; 6, 11, 16 и 33; 6, 11, 16 и 52; 6, 11, 16 и 58; 6, 11, 18 и 31; 6, 11, 18 и 33; 6, 11, 18 и 52; 6, 11, 18 и 58; 6, 11, 31 и 33; 6, 11, 31 и 52; 6, 11, 31 и 58; 6, 11, 33 и 52; 6, 11, 33 и 58; 6, 11, 52 и 58;

6, 16 и 31; 6, 16 и 33; 6, 16 и 52; 6, 16 и 58; 6, 16, 31 и 33; 6, 16, 31 и 52; 6, 16, 31 и 58; 6, 16, 33 и 52; 6, 16, 33 и 58; 6, 16, 52 и 58;

6, 18 и 31; 6, 18 и 33; 6, 18 и 52; 6, 18 и 58; 6, 18, 31 и 33; 6, 18, 31 и 52; 6, 18, 31 и 58; 6, 18, 33 и 52; 6, 18, 33 и 58;

6, 31 и 33; 6, 31 и 52; 6, 31 и 58; 6, 31, 33 и 52; 6, 31, 33 и 58;

6, 33 и 52; 6, 33 и 58; 6, 33, 52 и 58;

6, 52 и 58;

11, 31 и 33; 11, 31 и 52; 11, 31 и 58; 11, 31, 33 и 52; 11, 31, 33 и 58; 11, 31, 52 и 58;

11, 31 и 52; 11, 31 и 58; 11, 31, 52 и 58;

11, 52 и 58;

16, 31 и 33; 16, 31 и 52; 16, 31 и 58; 16, 31, 33 и 52; 16, 31, 52 и 58;

16, 33 и 52; 16, 33 и 58; 16, 33, 52 и 58;

18, 31 и 33; 18, 31 и 52; 18, 31 и 58; 18, 31, 33 и 52; 18, 31, 33 и 58;

31, 33 и 52; 31, 33 и 58; 31, 33, 52 и 58; и

31, 52 и 58.

Усовершенствованные вакцины содержат белки и генетические конструкции, которые кодируют белки с эпитопами, делающие их особенно эффективными как иммуногены, против которых можно вызвать анти-ВПЧ иммунный ответ. Соответственно, вакцины можно предоставить для выработки терапевтического или профилактического иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации изобретения средствами, доставляющими иммуногены, являются ДНК-вакцина, рекомбинантная вакцина, белковая субъединичная вакцина, композиция, содержащая иммуноген, аттенуированная вакцина или инактивированная вакцина. В некоторых вариантах реализации изобретения вакцина содержит комбинацию, выделенную из групп, состоящих из: одной или нескольких ДНК-вакцин, одной или нескольких рекомбинантных вакцин, одной или нескольких белковых субъединичных вакцин, одной или нескольких композиций, содержащих иммуноген, одной или нескольких аттенуированных вакцин и одной или нескольких инактивированных вакцин.

Аспекты изобретения предоставляют способы доставки последовательности, кодирующей белок, в молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плаزمид, как часть рекомбинантной вакцины и как часть аттенуированной вакцины, как выделенные белки или белки, входящие в вектор.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения, предоставляются композиции и способы, которые профилактически и/или терапевтически иммунизируют индивидуума.

ДНК-вакцины описаны в патентах США №№. 5593972, 5739118, 5817637, 5830876, 5962428, 5981505, 5580859, 5703055, 5676594 и предварительных заявках, цитированных здесь, каждая из которых включена в данное описание путем ссылки. В дополнение к

протоколам доставки, описанным в этих заявках, альтернативные способы доставки ДНК описаны в патентах США №№. 4945050 и 5036006, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение связано с усовершенствованными живыми аттенуированными вакцинами, усовершенствованными инактивированными вакцинами и усовершенствованными вакцинами, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных генов, которые кодируют антигены, а также с субъединичными и гликопротеидными вакцинами. Примеры живых аттенуированных вакцин, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных антигенов, субъединичных вакцин и гликопротеидных вакцин описаны в патентах США №№: 4510245; 4797368; 4722848; 4790987; 4920209; 5017487; 5077044; 5110587; 5112749; 5174993; 5223424; 5225336; 5240703; 5242829; 5294441; 5294548; 5310668; 5387744; 5389368; 5424065; 5451499; 54533 64; 5462734; 5470734; 5474935; 5482713; 5591439; 5643579; 5650309; 5698202; 5955088; 6034298; 6042836; 6156319 и 6589529, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Попадая в клетку, генетическая конструкция(и) может остаться в клетке как функционирующая экстрахромосомная молекула и/или интегрированная в хромосомную ДНК клетки. ДНК может быть интродуцирована в клетку, где она остается как отдельный генетический материал в форме плазмиды или плазмид. В альтернативном варианте, линейная ДНК, которая может интегрироваться с хромосомой, может быть интродуцирована в клетку. Когда ДНК интродуцируется в клетку, могут быть добавлены реагенты, которые стимулируют интеграцию ДНК в хромосомы. Последовательности ДНК, которые полезны для стимуляции интеграции, также могут быть включены в молекулу ДНК. Альтернативно, РНК может вводиться в клетку. Также предусматривается предоставлять генетические конструкции как линейные микрохромосомы, включающие центромеру, теломеры и точку начала репликации. Генные конструкции могут оставаться частью генетического материала в аттенуированных живых микроорганизмах или рекомбинантных бактериальных векторах, которые живут в клетках. Генные конструкции могут быть частью геномов рекомбинантных вирусных вакцин, когда генетический материал или интегрируется в хромосому клетки, или остается экстрахромосомным. Генетические конструкции включают регуляторные элементы, необходимые для генной экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты.

Элементы включают: промотор, иницирующий кодон, терминирующий кодон и сигнал полиаденилирования. Кроме того, для экспрессии генной последовательности, которая кодирует белок-мишень или иммуномодулирующий белок, часто требуются энхансеры. Необходимо, чтобы эти элементы были функционально встроены в последовательность, которая кодирует требуемые белки и чтобы регуляторные элементы работали у тех, кому они вводятся.

Иницирующие кодоны и терминирующий кодон обычно считаются частью нуклеотидной последовательности, которая кодирует требуемый белок. Однако необходимо, чтобы эти элементы функционировали у тех, кому вводится генная конструкция. Иницирующий и терминирующий кодоны должны быть внутри кодирующей последовательности.

Используемые промоторы и сигнал полиаденилирования должны работать в клетках тех, кому они вводятся.

Примеры промоторов полезны для осуществления на практике настоящего изобретения, особенно в производстве генетической вакцины для индивидуумов, включая, но не ограничиваясь промоторами обезьяньего вируса 40 (SV40), промотором мышинного вируса опухоли молочной железы (MMTV), вируса иммунодефицита человека (MV), такого как промотор ВIV длинного концевого повтора (LTR), вируса Молони, ALV, цитомегаловируса (CMV), такого как CMV предранний промотор, вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус саркомы Рауса (RSV), а также промоторы из генов человека, таких как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин и человеческий металлотioneин.

Примеры сигналов полиаденилирования полезны для осуществления на практике настоящего изобретения, особенно для производства генетических вакцин для людей, включая, но не ограничиваясь SV40 сигналами полиаденилирования и LTR сигналами полиаденилирования. Преимущественно используется SV40 сигнал полиаденилирования, который находится в pCEP4 плазмиде (Invitrogen, Сан Диего, КА), называемый SV40 сигналом полиаденилирования.

Кроме регуляторных элементов, требуемых для экспрессии ДНК, другие элементы также могут быть включены в молекулу ДНК. Такие дополнительные элементы включают энхансеры. Энхансер может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной: человеческим актином, человеческим миозином, человеческим гемоглобином,

человеческим мышечным креатином и вирусными энхансерами, такими как CMV, RSV и EBV.

Генетические конструкции могут предоставляться с точкой начала репликации у млекопитающих для создания экстрахромосомной конструкции и выработки множественных копий конструкции в клетке. Плазмиды pVAX1, pCER4 и pREP4 из Invitrogen (Сан-Диего, Калифорния) содержат точку начала репликации вируса Эпштейна-Барра и ядерный кодирующий регион антигена EBNA-1, который генерирует многокопийную эписомную репликацию без интеграции.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения, связанных с применением иммунизации, используются молекула(ы) нуклеиновой кислоты, которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие белок изобретения; и, дополнительно, гены белков, которые добавочно усиливают иммунный ответ против таких белков-мишеней. Примерами таких генов являются гены, кодирующие другие цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 и IL-15, включая IL-15, обладающий сигнальной последовательностью, удаляющей и необязательно включающей сигнальный пептид из IgE. Другие гены, которые могут быть полезны, включают гены, кодирующие: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, TNF рецептор, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены интерферонового ответа, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O \times 40, O \times 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

Может быть добавлен дополнительный элемент, который служит мишенью для клеточной деструкции, если по каким-либо причинам желательно элиминировать клетки, получившие генетическую конструкцию. Ген тимидинкиназы (tk) герпеса в экспрессирующейся форме может быть включен в генетическую конструкцию. Лекарство

ганцикловир может быть введено индивидууму и это лекарство станет причиной избирательного цитолиза любой клетки, продуцирующей tk, тем самым предоставляя средство для избирательной деструкции клеток с генетической конструкцией.

Для того, чтобы максимизировать продукцию белка, могут быть выбраны регуляторные последовательности, которые хорошо подходят для генной экспрессии в клетках, куда введена конструкция. Больше того, могут быть выбраны кодоны, которые наиболее эффективно транскрибируются в клетке. Специалист в данной области может получить конструкции ДНК, являющиеся функциональными в клетке.

В некоторых вариантах реализации изобретения могут быть предоставлены генные конструкты, в которых кодирующие последовательности для белков, описанных здесь, связаны с IgE сигнальным белком. В некоторых вариантах реализации изобретения белки, описанные здесь, связаны с IgE сигнальным белком.

В некоторых вариантах реализации изобретения, для которых используется белок, например, имея средние специальные знания и используя хорошо известные технологии, можно продуцировать и изолировать белки изобретения, используя хорошо известные технологии. В некоторых вариантах реализации изобретения, для которых используется белок, например, имея средние специальные знания, можно, используя хорошо известные технологии, вставлять молекулы ДНК, которые кодируют белок изобретения в коммерчески доступные векторы экспрессии для использования в хорошо известных системах экспрессии. Например, коммерчески доступная плаزمида pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может быть использована для продукции белка в *E. coli*. Коммерчески доступная плаزمида pYES2 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может, например, быть использована для продукции в штаммах дрожжей *S. cerevisiae*. Коммерчески доступная MAXBAC™ полная бакуловирусная система экспрессии (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может, например, быть использована для продукции в клетках насекомых. Коммерчески доступная плазмида pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может, например, быть использована для продукции в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка. Обладая средними специальными знаниями, можно использовать эти коммерческие векторы и системы экспрессии или другое для продуцирования белка с помощью стандартных технологий и легко доступных исходных материалов.

(См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989), включенный в данный документ посредством ссылки.) Таким образом, требуемые белки можно получить как в прокариотических, так и в эукариотических системах, результатом чего будет диапазон обработанных форм белка.

Обладая средними специальными знаниями, можно использовать другие коммерчески доступные векторы экспрессии и системы или создать векторы, используя хорошо известные способы и легко доступные исходные материалы. Системы экспрессии, содержащие необходимые контрольные последовательности, такие как промоторы и сигналы полиаденилирования и предпочтительные энхансеры, легко доступны и известны специалистам у множества хозяев. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Генетические конструкции включают белки, кодирующие последовательность, функционально связанную с промотором, который работает в клеточной линии, в которую трансфицированы конструкции. Примеры конститутивных промоторов включают промоторы из цитомегаловируса или SV40. Примеры индуцируемых промоторов включают мышинный вирус лейкемии молочной железы или промоторы металлотионеина. Имея средние специальные знания, можно легко создать генетические конструкции, полезные для трансфекции в клетки ДНК, которая кодирует белок изобретения, из легко доступных исходных материалов. Вектор экспрессии, включающий ДНК, которая кодирует белок, используется для трансформации совместимых хозяев, которые затем культивируются и содержатся при условиях, в которых происходит экспрессия чужеродной ДНК.

Произведенный белок извлекается из культуры путем лизиса клеток, или из среды культуры, как принято и известно специалистам. Имея средние специальные знания и используя хорошо известные технологии, можно выделить белок, произведенный с использованием таких систем экспрессии. Способы очистки белка из естественных источников с использованием антител, которые специфически связываются с определенным белком, как описано выше, могут также применяться для очистки белка, произведенного по методологии рекомбинантной ДНК.

В дополнение к производству белков путем рекомбинантных техник, автоматизированные белковые синтезаторы также могут быть использованы для производства выделенного, исключительно чистого

белка. Такие техники хорошо известны специалистам и полезны, если производные, у которых есть замена, не обеспечиваются в производстве белка, кодируемого ДНК.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены при использовании любой из нескольких хорошо известных технологий, включая введение ДНК (также известное как ДНК-вакцинация), рекомбинантные векторы, такие как рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный аденовирус, ассоциированный с вирусом и рекомбинантная вакцина.

Способы введения включают, но не ограничиваются, введение внутримышечно, внутриназально, внутрибрюшинно, внутрикожно, подкожно, внутривенно, внутриартериально, интраокулярно и орально, а также местно, трансдермально, путем ингаляции или суппозиториумом или в ткань слизистой оболочки, в виде орошения вагинальной, ректальной, уретральной, ротовой и подъязычной тканей. Предпочтительные пути введения включают внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрикожную и подкожную инъекцию. Генетические конструкции могут вводиться посредством, включая, но не ограничиваясь, способов и устройств электропорации, традиционных шприцов, устройств для безыгольной инъекции или «генной пушки для баллистической трансфекции».

Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, предпочтительных для легкой доставки ДНК-вакцин, включают те, что описаны в патенте США № 7245963 Draghia-Akli, et al., патент США изд. 2005/0052630 подписан Smith, et al., полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Также предпочтительными являются устройства для электропорации и способы электропорации для легкой доставки ДНК-вакцин, предоставляемые в одновременно находящейся на рассмотрении заявке того же владельца на патент США, серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 года, заявляющей приоритет по статье 35 USC 119(e) предварительных заявок с серийными номерами: 60/852149, поданной 17 октября 2006 года и 60/978982, поданной 10 октября 2007 года, включенными в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Нижеследующее представляет собой пример реализации с использованием технологии электропорации и обсуждается более детально в патентных ссылках, описанных выше: устройства электропорации могут быть сконфигурированы для доставки в требуемую ткань млекопитающего импульсом энергии, производимым

постоянным током, таким же, как заданный ток, введенный пользователем. Устройство для электропорации содержит электропорационную составляющую и набор электродов или набор рукояток. Электропорационная составляющая может содержать один или несколько из различных элементов приспособлений для электропорации, включая: контроллер, волновой генератор тока, тестер импеданса, регистратор волн, входной элемент, элемент сообщения о статусе, коммуникационный порт, компонент памяти, источник питания и переключатель энергии и выключатель питания. Электропорационная составляющая может функционировать как один элемент электропорационных приборов и другие элементы являются отдельными элементами (или составляющими) в сообщении с электропорационной составляющей. В некоторых вариантах реализации изобретения электропорационная составляющая может функционировать как более чем один элемент устройства для электропорации, который может находиться в сообщении с другими элементами устройства для электропорации, отдельно от электропорационной составляющей. Использование электропорационной технологии для доставки усовершенствованной ВПЧ-вакцины не ограничено элементами устройств для электропорации, существующих как части одного электромеханического или механического устройства, поскольку элементы могут функционировать как одно устройство или как различные элементы, сообщаемые друг с другом. Электропорационная составляющая способна доставить энергетический импульс, который производит постоянный ток в нужной ткани и содержит механизм обратной связи. Набор электродов содержит комплект электродов, в который входит множество электродов различного размера, где набор электродов получает импульс энергии от электропорационной составляющей и доставляет ее в нужную ткань посредством электродов. По меньшей мере один из множества электродов является нейтральным во время доставки импульса энергии и измеряет импеданс в нужной ткани и передает значение импеданса к электропорационной составляющей. Механизм обратной связи может получить значение импеданса и может подогнать импульс энергии, доставляемый электропорационной составляющей, для поддержания постоянного тока.

В некоторых вариантах реализации изобретения множество электродов может доставлять импульс энергии в децентрализованную структуру. В некоторых вариантах реализации изобретения

множество электродов может доставлять импульс энергии в децентрализованную структуру благодаря контролю электродов запрограммированной последовательностью, причем запрограммированная последовательность вводится пользователем электропорационной составляющей. В некоторых вариантах реализации изобретения запрограммированная последовательность содержит множество импульсов, доставляемых последовательно, где каждый импульс из множества импульсов доставляется по крайней мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который оценивает импеданс, и где последующий импульс из множества импульсов доставляется различно одним из по меньшей мере двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который оценивает импеданс.

В некоторых вариантах реализации изобретения механизм обратной связи выполняется или аппаратурой, или программным обеспечением. Предпочтительно, механизм обратной связи выполняется аналоговой системой управления с обратной связью. Предпочтительно, эта обратная связь происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но предпочтительна обратная связь в режиме реального времени или мгновенная (т. е. практически мгновенная, как определяется в доступных техниках установленное время ответа). В некоторых вариантах реализации изобретения нейтральный электрод оценивает импеданс в нужной ткани и передает импеданс механизму обратной связи, и механизм обратной связи реагирует на импеданс и корректирует импульс энергии, поддерживая значение постоянного тока, равное заданному значению. В некоторых вариантах реализации изобретения механизм обратной связи непрерывно и мгновенно поддерживает постоянный ток в течение доставки импульса энергии.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты доставляется в клетки вместе с введением полинуклеотида с функцией энхансера или организующего агента генетической вакцины. Полинуклеотиды с функцией энхансера описаны в патентах США сер. №№ 5593972, 5962428 и в международной заявке PCT/US94/00899, поданной 26 января 1994, которые включены посредством ссылки. Организующие агенты генетической вакцины описаны в патенте США № 021579, в соответствии с заявкой, поданной 1 апреля 1994, который включен в данный документ посредством ссылки. Коагенты, которые вводятся вместе с молекулами нуклеиновых кислот, могут вводиться в смеси

с молекулами нуклеиновой кислоты или одновременно вводиться отдельно, до или после введения молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, другие агенты, которые могут выполнять функции трансфектирующих агентов и/или реплицирующих агентов и/или воспалительных агентов и которые могут вводиться совместно с GVF, включая факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как α -интерферон, гамма-интерферон, GM-CSF, фактор роста тромбоцитов (PDGF), ФНО, эпидермальный фактор роста (ЭФР), ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12 и ИЛ-15, а также фактор роста фибробластов, поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, LPS-аналог, включающий монофосфорилированный липид А (WL), мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и гиалуроновая кислота, могут также быть использованы для совместного введения с генетической конструкцией. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть использован иммуномодулирующий белок, такой как GVF. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты предоставляется совместно с PLG, чтобы обеспечить доставку энхансера.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат от около 1 нанограмма до около 2000 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат от около 5 нанограмм до около 1000 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 10 нанограмм до около 800 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 0,1 до около 500 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 1 до около 350 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 25 до около 250 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 100 до около 200 микрограмм ДНК.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению разработаны в соответствии с используемым способом введения. В случаях, когда фармацевтические композиции являются

инъекцируемыми фармацевтическими композициями, они стерильны, не содержат пирогенных препаратов и не содержат твердых частиц. Предпочтительно используется изотоническая формула. Обычно добавки для изотоничности могут включать хлористый натрий, декстрозу, манит, сорбитол и лактозу. В некоторых случаях предпочтаются изотонические растворы, такие как фосфатный солевой буфер. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. В некоторых вариантах реализации изобретения в формулу добавляется сосудосуживающий агент.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения предоставляются способы стимуляции иммунных ответов. Вакцина может быть основанной на белке, живой аттенуированной вакциной, клеточной вакциной, рекомбинантной вакциной или вакциной нуклеиновой кислоты или ДНК-вакциной. В некоторых вариантах реализации изобретения способы стимуляции в индивидуума иммунного ответа против иммуногена включают способы стимуляции мышечных иммунных ответов, состоящих из введения индивидууму одного или нескольких СТАСК белка, ТЕСК белка, МЕС белка и их функциональных фрагментов, или их экспрессирующихся кодирующих последовательностей в комбинации с очищенными молекулами нуклеиновой кислоты, которые кодируют белок по изобретению, и/или рекомбинантной вакциной, которая кодирует белок по изобретению, и/или субъединичной вакциной, содержащей белок по изобретению, и/или живой аттенуированной вакциной, и/или инактивированной вакциной. Один или несколько СТАСК белок, ТЕСК белок, МЕС белок и их функциональные фрагменты могут быть введены прежде, одновременно или после введения очищенной молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуноген, и/или рекомбинантной вакцины, которая кодирует иммуноген, и/или субъединичной вакцины, которая содержит иммуноген, и/или живой аттенуированной вакцины и/или инактивированной вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидууму вводится выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или несколько белков, выбранных из группы, содержащей: СТАСК, ТЕСК, МЕС и их функциональные фрагменты.

Кроме того, настоящее изобретение иллюстрируется на следующем примере. Должно быть понятно, что этот пример, показывающий варианты реализации изобретения, предоставляет лишь способ иллюстрации. Из вышеизложенного обсуждения и этого примера специалист может убедиться в важнейших характеристиках

этого изобретения и, без отступления от объема его притязаний и не выходя за его границы, может внести различные изменения и модифицировать изобретение, чтобы адаптировать его к различным использованиям и условиям. Таким образом, различные варианты реализации изобретения в дополнение к тем, что показаны и описаны здесь, будут очевидны специалистам из вышеизложенного описания. Такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Каждый из патентов США, заявок США и ссылок на литературу, цитируемых в ходе этого раскрытия, тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется на следующих примерах. Должно быть понятно, что эти примеры, показывающие преимущественные варианты реализации изобретения, предоставляют лишь способ иллюстрации. Из вышеизложенного обсуждения и этих примеров специалист может убедиться в важнейших характеристиках этого изобретения и без отступления от объема его притязаний и не выходя за его границы, может внести различные изменения и модифицировать изобретение, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, различные варианты реализации изобретения в дополнение к тем, что показаны и описаны здесь, будут очевидны специалистам из вышеизложенного описания. Такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1

Новая созданная ВПЧ -16 ДНК вакцина, кодирующая гибридный белок E6/E7

Иммуноген разработан для экспрессии в виде полипротеина, при этом последовательности E6 и E7 разделены сайтом протеолитического расщепления. Кроме того, полипротеин экспрессируется с лидерной последовательностью IgE. Дизайн полипротеина включает делеции или мутации в последовательности E6, которые важны для связывания p53 и деградации, а также мутации в сайте связывания с рибосомой на белке E7.

Кодирующие последовательности ВПЧ 16 E6/E7 (SEQ ID NO:21), которые кодируют полипротеин (SEQ ID NO: 22), вставляют в вектор pVAX, чтобы генерировать экспрессионную плазмиду. В оптимизированных антигенах вируса папилломы человека 16-6&7 (ВПЧ 16 E6&7) под управлением промотора ЦМВ (PCMV), с бычьим гормоном

роста на 3' конце и сигналом полиаденилирования (bGHpA), применяется основа pVAX, которая содержит ген резистентности к канамицину (Kan) и плазмидную точку начала репликации (pUC ori).

Дизайн и экспрессия вакцины ВПЧ 18 Е6/Е7

Получены оптимизированные консенсусные последовательности для человеческих вирусных белков 18 Е6&7 вируса папилломы человека (ВПЧ). Последовательность сконструирована для высоких уровней экспрессии. Данная последовательность пригодна для нашей технологии генетической иммунизации. Результаты экспериментов, выполняемых с применением консенсусной последовательности, являются положительными. Плазмидная конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты консенсуса ВПЧ 18-6&7 (SEQ ID NO: 23). Последовательность нуклеиновой кислоты консенсуса ВПЧ 18-6&7, которая введена в плазмиду, содержит кодирующую последовательность для лидерного пептида IgE, присоединенного к кодирующим последовательностям консенсуса ВПЧ 18-6&7.

Генерируют экспрессионную плазмиду рGX3002, которая экспрессирует оптимизированные антигены вируса папилломы человека 18-6&7 (ВПЧ 18 Е6&7) (SEQ ID NO: 24) под управлением промотора ЦМВ (PCMV), с бычьим гормоном роста на 3' конце и сигналом полиаденилирования (bGHpA), в которой применяется основа pVAX, содержащая ген резистентности к канамицину (Kan) и плазмидную точку начала репликации (pUC ori).

Схема и экспрессия вакцины ВПЧ 6 и ВПЧ11 Е6/Е7

Конструкция ВПЧ6 и 11 Е6/Е7 гибридных иммуногенов на основе консенсусной последовательности

Тип ВПЧ 6 или 11 Е6 и Е7 генных последовательностей был собран из GeneBank, и консенсусные нуклеотидные последовательности Е6 и Е7 были получены после проведения множественного выравнивания. Консенсусная последовательность ВПЧ 6 Е6 или Е7 белков была получена из 98 или 20 последовательностей, соответственно, в то время как консенсусная последовательность ВПЧ 11 Е6 или Е7 белков была получена из 76 или 13 последовательностей, соответственно. Процедура множественного выравнивания, используемая в филогенетическом исследовании, включала применение Clustal X (версия 2.0). Как это показано на Фиг. 1А и В, отмечалась примерно 0-2% дивергенция последовательности между штаммами ВПЧ, принадлежащих к одному и тому же виду в белках Е6 и Е7. Однако генетические

расстояния могли составлять до 19,3% в белке Е6 и 16,3% в белке Е7 между ВПЧ 6 и 11. На основе таких результатов филогенетических анализов, мы разработали две видоспецифические Е6/Е7 консенсусные ДНК-вакцины.

Несколько модификаций было проведено после получения консенсусной последовательности слияния Е6/Е7 (Фиг. 1С). Высокоэффективная лидерная последовательность была слита в рамке кверху от старт-кодона для облегчения экспрессии. Кодон и РНК оптимизация также были проведены, как это описано ранее (J. Yan, et al., Cellular immunity induced by a novel ВПЧ 18 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques, *Vaccine*. 26 (2008) 5210-5215; и J. Yan, et al., Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel ВПЧ -16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen, *Vaccine*. 27 (2009) 431-440). Эндопротеолитический сайт расщепления был введен между белком Е6 и Е7 для надлежащего скручивания белка и лучшего процессинга СТЛ. Оба синтезированных рекомбинантных гена 6Е6Е7 и 11Е6Е7 имели в длину 840 пар оснований. Синтезированные гены с верифицированной последовательностью были субклонированы в вектор экспрессии рVAX в сайтах BamHI и XhoI, соответственно, для дальнейшего исследования. Консенсусные аминокислотные последовательности были получены трансляцией консенсусных нуклеотидных последовательностей.

После получения ВПЧ 6 и 11 консенсусных Е6 и Е7 последовательностей, оптимизация кодоном и РНК оптимизация были проведены, как это описано ранее (J. Yan, et al., *Vaccine*. 26 (2008) 5210-5215; и J. Yan, et al., *Induction, Vaccine*. 27 (2009) 431-440). Белки слияния, кодирующие тип 6 или 11 ВПЧ консенсусный белок слияния Е6/Е7 (6Е6Е7 или 11Е6Е7) были синтезированы, и последовательности верифицированы. Синтезированные 6Е6Е7 или 11Е6Е7 были расщеплены BamHI и XhoI, клонированы в вектор экспрессии рVAX (Invitrogen) при контроле непосредственно-раннего промотора цитомегаловируса, и такие конструкции были названы р6Е6Е7 или р11Е6Е7.

293-Т клетки были культивированы в 6-луночных планшетах и трансфицированы рVAX, р6Е6Е7 или р11Е6Е7 с использованием трансфекционного реагента FuGENE6 (Roche Applied Science, Индианаполис, Индиана). Спустя два дня после трансфекции, клетки были лизированы с использованием модифицированного буфера для

лизиса клеток RIPA, и клеточный лизат был собран. Были проведены анализы вестерн-блоттингом с использованием моноклонального антитела к НА (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) с визуализацией антимышиного козьего IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), с использованием системы для анализа вестерн-блоттингом ECLTM (Amersham, Пискатавей, Нью-Йорк).

Непрямые иммунофлуоресцентные анализы были проведены с использованием клеток рабдомиосаркомы человека (клетки RD) для верификации экспрессии p6E6E7 и p11E6E7. Клетки RD, культивированные в слайд-камерах, были культивированы с pVAX, p6E6E7 или p11E6E7 с использованием Turbofectin 8.0 (Origene, Роквил, Мэриленд). После клетки были фиксированы с PFA и пермеабелизированы 0,1% Triton-X в ФСБ. Клетки были подвергнуты 1-2 ч инкубациям с первичными и вторичными антителами в добавлении к промыванию ФСБ, дополненным глицином и БСА между инкубациями. Используемые первичные и вторичные антитела были моноклональным мышинным антителом к НА (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и FITC-конъюгированным антимышиным IgG (Abcam, Кембридж, Массачусетс), соответственно. Окрашивание по Хехсту также проводили для идентификации ядер клеток и локализации RD клеток. После завершения всех инкубаций, клетки были погружены на предметное стекло и фиксированы Fluoromount-G (Southern Biotech, Бирмингем, Алабама). Образцы были проанализированы и визуализированы с использованием конфокального микроскопа (CDB Microscopy Core, University of Pennsylvania Cell and Developmental Biology, Филадельфия, Пенсильвания).

Антигены ВПЧ 31, 33, 39, 45, 52 и 58 E6E7

Генные последовательности E6 и E7 ВПЧ типа 31, 33, 39, 45, 52 и 58, индивидуально, были получены от GeneBank, и консенсусные нуклеотидные последовательности E6 и E7 были получены после проведения многократного выравнивания (тип 31 – SEQ ID NO: 18; тип 33 – SEQ ID NO: 6; тип 52 – SEQ ID NO: 20; и тип 58 – SEQ ID NO: 8). Методика многократного выравнивания, примененная в филогенетическом исследовании, включает применение Clustal X (версия 2.0). На основании результатов филогенетических анализов, нами разработаны типоспецифические консенсусные ДНК вакцины E6/E7.

Несколько модификаций были осуществлены после генерации консенсусной гибридной последовательности E6/E7.

Высокоэффективная лидерная последовательность была введена внутри рамки считывания в конструкцию выше стартового кодона, чтобы облегчить экспрессию. Кроме того, осуществляют оптимизацию кодонов и РНК, как было описано ранее (J. Yan, et al., Cellular immunity induced by a novel HPV18 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques, *Vaccine*. 26 (2008) 5210–5215; and J. Yan, et al., Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen, *Vaccine*. 27 (2009) 431–440). Сайт эндепротеолитического расщепления был введен между белком E6 и E7 для надлежащего сворачивания белка и лучшего процессинга цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). Синтетические гены с верифицированной последовательностью субклонировать в вектор экспрессии pVAX в сайтах BamHI и XhoI, соответственно, для дальнейшего изучения. Консенсусные последовательности аминокислот получают, транслируя консенсусные нуклеотидные последовательности.

Генерируют экспрессионную плазмиду, которая экспрессирует оптимизированные антигены вируса папилломы человека 31, 33, 52 и 58-E6&7 (ВПЧ 31 E6&7 – SEQ ID NO: 17, ВПЧ 33 E6&7 – SEQ ID NO: 5, ВПЧ 52 E6&7 – SEQ ID NO: 19, и ВПЧ 58 E6&7 – SEQ ID NO: 7) под управлением промотора ЦМВ (PCMV), с бычьим гормоном роста на 3' конце и сигналом полиаденилирования (bGHpA), в которой применяется основа pVAX, содержащая ген резистентности к канамицину (Kan) и плазмидную точку начала репликации (pUC ori). Подобным образом, генерируют экспрессионную плазмиду, содержащую вставку, которая представляет собой оптимизированные антигены вируса папилломы человека 39 и 45 E6&E7 (последовательность ВПЧ 39 E6&E7, которая кодирует SEQ ID NO: 26; и последовательность ВПЧ 45 E6&E7, которая кодирует SEQ ID NO: 25).

Пример 2

Мыши и вакцинация групп лечения

В этом эксперименте использовали самок мышей C57BL/6 в возрасте между 6 и 8 неделями. Мыши были получены в Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мышей содержали в университетской лаборатории по животным ресурсам в университете Пенсильвании (шт. Филадельфия, PA) в соответствии с политикой Комитета по использованию и содержанию животных университета Пенсильвании (IACUC) и национальных институтов здравоохранения. Мыши, используемые в этих экспериментах, были разделены на группы по

четыре для иммунизации. Мыши были иммунизированы р6E6E7, р11E6E7, или обоими конструкциями, и группа рVAX служила в качестве отрицательного контроля.

Вакцинация ДНК и электропорация

Каждая мышь получала три дозы по 20 мкг каждый ДНК плазмиды с интервалом в 14 дней. Мыши в группе, получавшей оба р6E6E7 и р11E6E7, получали 20 мкг обеих плазмид, в целом 40 мкг ДНК на вакцинацию. ДНК конструкции вводили посредством внутримышечной инъекции в правую четырехглавую мышцу, затем получали прямоугольные импульсы, вырабатываемые электропоратором CELLECTRA™ (Inovio Pharmaceuticals, Блу Белл, Пенсильвания). Электропоратор был настроен для доставки двух электрических импульсов при 0,2 А при 52 мс/пульс с разноской и задержкой в 1 секунду. Способ электропорации проводился, как это описано ранее [12,13].

Анализ способом иммуноферментных пятен ИФН-γ

Мыши в обеих группах контроля и лечения были умерщвлены спустя 1 неделю после третьей иммунизации. Селезенка была собрана у каждой мыши и перенесена в среду RPMI-1640 с 10% ФБС и антибиотиками (R10). С использованием гомогенизатора (Seward Laboratory Systems, Bohemia, NY), селезенка была пульверизирована и впоследствии перенесена в краситель для клеток и суспендирована в лизирующем буфере АСК. После удаления эритроцитов, спленоциты были выделены и суспендированы в среде R10. 96-луночные IP планшеты Multiscreen™ с высоким содержанием белка (Millipore, Бедфорд, Массачусетс) были предварительно покрыты моноклональным мышинным антителом захвата ИФН-γ (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) и инкубированы в течение ночи при 4°C. После трех промываний 1 x ФБС, планшеты были блокированы 1% БСА и 5% сахарозой в 1 x ФБС в течение 2 часов при комнатной температуре. Выделенные спленоциты в среде R10 были подсчитаны и внесены в трех повторностях в лунки в концентрации 2 x 10⁵ клеток на лунку. Два набора пептидов, распространяющихся на консенсусную последовательность E6/E7 для ВПЧ6 и ВПЧ11 были восстановлены в ДМСО (GenScript USA, Пискатавей, Нью-Йорк). Пептиды содержали 15 аминокислотных последовательностей, из которых 8 остатков частично совпадали с каждым последующим пептидом. Пептиды для ВПЧ6 и 11 каждый были разделены на два пула – один пул для E6 и другой для E7 – в концентрациях 2 мкг/мл в ДМСО. В лунки, оставленные для

положительного и отрицательного контроля, был внесен Конкавалин А (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и питательная среда R10 вместо пептидов, соответственно. Планшеты были впоследствии помещены в инкубатор с атмосферой 5% CO₂. После инкубации в течение 24 часов при 37°C планшеты были промыты 1 x ФСБ. В каждую лунку было добавлено биотинилированное антимышиное антитело ИФН-γ для определения (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), и затем проводили инкубацию в течение ночи при 4°C. Планшеты были впоследствии промыты и обработаны в соответствии с протоколом проявления цвета, предоставленным R&D Systems с использованием стрептавидина-АР и BCIP/NBT Plus (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота). Лунки были высушены на воздухе в течение ночи, и пятна внутри лунок были просканированы и подсчитаны на системе считывания планшетов ELISpot с программным обеспечением ImmunoSpot®3 и ImmunoSpot®4 (Cellular Technology Ltd., Шейкер Хайтс, Огайо). Сообщенные показатели образующих пятна клеток были преобразованы в пятнообразующие единицы на 1×10⁶ спленоцитов с использованием арифметики.

Принимая во внимание их чувствительность и способность обладать Т-клеточной активностью, анализы способом иммуноферментных пятен ИФН-γ использовали для определения количества антигенспецифических клеток, секретирующих ИФН-гамма в ответ на стимуляцию пептидами Е6 и Е7 ВПЧ 6 или 11.

Как это показано на Фиг. 3А и 3В, среднее количество СОЕ/106 спленоцитов для мышей, вакцинированных р6Е6Е7, было 1442,8, в то время как среднее количество СОЕ/106 спленоцитов для мышей, иммунизированных р11Е6Е7, было 2845, что было по существу выше, чем в отрицательной контрольной группе. Таким образом, оба р6Е6Е7 и р11Е6Е7 были эффективны в вызове робастного типоспецифического Е6 и Е7-специфического иммунного ответа у мышей.

Интересно то, что вакцинация р6Е6Е7 или р11Е6Е7 также индуцировала перекрестный клеточный иммунный ответ. Аддитивная частота СОЕ/106 спленоцитов у мышей, иммунизированных р11Е6Е7 относительно пептидов ВПЧ 6 Е6/Е7, была 552,8 СОЕ/106 спленоцитов, и Е6/Е7 ВПЧ 11-специфический иммунный ответ у мышей с иммунизацией р6Е6Е7 был 888,3 СОЕ/106 спленоцитов. Белки Е6 ВПЧ 6 или 11 обладают примерно 80% идентичностью, в то время как белки Е7 ВПЧ 6 или 11 обладают примерно 84% идентичностью. Могут быть некоторые общие иммунные эпитопы между антигенами Е6 и Е7

ВПЧ 6 или 11. Перекрестная реакционность, отмечаемая в анализе ELISpot для ИФН-гамма, указала на наличие общих иммунных эпитопов между антигенами Е6 и Е7 ВПЧ6 и 11.

Спленоциты у мышей, получавших оба р6Е6Е7 и р11Е6Е7 (комбинированная группа) также были подвержены анализу ELISpot для изучения иммунной интерференции этих двух конструкций при совместной вакцинации (Фиг. 3А и В). В комбинированной группе отмечалось среднее число 1670 СОЕ/106 спленоцитов ($\mu=55,7$, $p < 0,001$) относительно пептидов Е6 и Е7 ВПЧ 6. Эта же группа спленоцитов выработала 2010 СОЕ/106 спленоцитов ($\mu=247,8$, $p=0,002$) относительно пептидов Е6 и Е7 ВПЧ 11. Данные указывают, что совместная вакцинация двумя конструкциями может вызвать статистически значимый Е6 и Е7-специфический клеточный ответ относительно ВПЧ6 и ВПЧ 11, и что такой ответ не мешает один другому.

Эпитопное картирование

Исследования эпитопным картированием были проведены для определения доминантных эпитопов в пептидных пулах для определения иммунных доминантных пептидов в консенсусных антигенах Е6/Е7 (Фиг. 4А и 4В). Исследования проводили, как это было описано ранее для анализа ELISpot ИФН- γ . Вместо пулов для стимуляции спленоцитов использовали отдельные пептиды.

Каждый пептид, используемый в этом однопептидном анализе, являлся частично перекрывающимся фрагментом антигенов Е6 и Е7 ВПЧ6 или ВПЧ11. Данные картирования указали, что пептид 7 (TAEIYSYAYKQLKVL) SEQ ID NO:11 был доминантным эпитопом для иммуногенов Е6 и Е7 ВПЧ6 (Фиг. 4А). TAEIYSYAYKQLKVL SEQ ID NO:11 содержал 8,9,10-мерных аминокислотных эпитопов, которые при верифицировании оказались H2-Kb ограниченными с использованием программного обеспечения для прогнозирования связывания HLA, предоставленного NIH BIMAS. Далее опишем ВПЧ11 Е6 и Е7-специфический Т-клеточный иммунный ответ (Фиг. 4В). Пептидный анализ также был проведен с перекрывающимися фрагментами Е6 и Е7 ВПЧ11. Эпитопное картирование показало, что доминантные эпитопы для антигенов Е6 и Е7 ВПЧ11 были пептидами 7 (TAEIYAYAYKNLKV) SEQ ID NO:12 и 27 (HCYEQLSDSSEDEV) SEQ ID NO:13. Как и для пептида 7 в анализе эпитопным картированием ВПЧ6, прогнозирующее HLA связывание программное обеспечение BIMAS подтвердило TAEIYAYAYKNLKV SEQ ID NO:12 как эпитоп, ограниченный H2-Kb. Другая база данных пептидного связывания HLA, Immune Epitope

Database and Analysis Resource, предоставленная NIH NIAID, подтвердила, что HCYEQLEDSSSEDEVD SEQ ID NO:13 является эпитопом, ограниченным H2-Kb. Посредством исследования картирования эпитопов было выявлено три иммунных субдоминантных пептида под номерами 6 (FCKNALTTAEIYSYA) SEQ ID NO:14, 9 (LFRGGYPYAACACCL) SEQ ID NO:15 и 13 (YAGYATTVEEETKQD) SEQ ID NO:16.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов

В свете высокого иммунного ответа, показанного ELISpot для ИФН- γ , анализы внутриклеточного окрашивания цитокинов были проведены для предоставления более целостного взгляда на клеточный ответ, индуцируемый рЕ6Е7 и р11Е6Е7. Спленциты из вакцинированных и невакцинированных групп мышей были выделены и стимулированы пептидами, перекрывающими Е6 и Е7 участки ВПЧ6 и ВПЧ11 в течение 4 часов при 37°C в 5% CO₂. Положительный и отрицательный контроль использовали в анализе способом замещения клеток в форбол 12-миристат 13-ацетате (PMA) и клеточной среде R10, соответственно. После инкубации, клетки были вначале окрашены красителем ViViD (Invitrogen, Карлсбед, Калифорния) для дифференциации между живыми и мертвыми клетками, и затем все клетки были окрашены следующими поверхностными маркерами антител: APC-Cy7 антимышиное CD3e хомяка, PerCP-Cy5.5 антимышиное CD4 крысы и APC антимышиное CD8a крысы (BD Biosciences, Сан-Диего, КА). Клетки впоследствии были фиксированы с использованием набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния). После фиксации в соответствии с протоколом производителя, клетки были окрашены следующими внутриклеточными маркерами антител: Alexa Fluor 700 антимышиный ИФН- γ крысы, клон PE-Cy7 антимышиный ФНО крысы и PE антимышиный IL-2 крысы (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния). После окрашивания клетки были фиксированы раствором ФСБ, содержащим 2% параформальдегида. Подготовленные клетки были получены с использованием проточного цитометра LSR II, оснащенного программным обеспечением BD FACSDiva (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Полученные данные были проанализированы с использованием последней версии программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Ашленд, Орегон). Явления CD4+ и CD8+ были выделены с использованием следующей последовательности блоков: синглет из FSC-A в сравнении с FSC-H, все спленциты из FSC-A в сравнении с SSC-A, живые клетки из красителя ViViD (Pacific Blue) в сравнении с SSC-A, CD3+ клетки из CD3 (APC-Cy7)

в сравнении с SSC-A, и CD4+ или CD8+ из CD4 (PerCP-Cy5.5: положительный - CD4+, отрицательный - CD8+) в сравнении с SSC-A. Последние две популяции были блокированы относительно Alexa Fluor 700, PE-Cy7 и PE для наблюдения изменений в выработке IL-2, ИФН- γ и ФНО- α , соответственно.

Клетки были блокированы таким образом, что данные внутриклеточного окрашивания цитокинов могут быть дифференцированы по CD4+ и CD8+ клеточному ответу. При стимуляции ВПЧ6 Е6 и Е7-специфическими пептидами, у мышей, вакцинированных р6Е6Е7, отмечались средние значения 0,163% ($y=0,09$), 0,003% ($y=0,07$) и 0,188% ($y=0,20$) для всех клеток CD4+, вырабатывающих ИФН- γ , ФНО- α и IL-2, соответственно (Фиг. 5А). У такой же группы мышей были средние показатели 3,323% ($y=1,39$), 0,838% ($y=0,32$) и 1,172% ($y=1,81$) для всех клеток CD8+, вырабатывающих ИФН- γ , ФНО- α и IL-2, соответственно. Подобные данные для внутриклеточных цитокинов были собраны с использованием спленоцитов у мышей, вакцинированных р11Е6Е7, после инкубации с антигенами Е6 и Е7 ВПЧ11 (Фиг. 5В). Для всех клеток CD4+ у мышей с вакцинацией р11Е6Е7 средний показатель 0,051% ($y=0,04$) привел к выработке ИФН- γ , 0,068% ($y=0,09$) привел к выработке ФНО- α и 0,026% ($y=0,037$) привел к выработке IL-2. Кроме того, среднее значение 4,52% ($y=2,53$), 2,08% ($y=1,56$) и 0,21% ($y=0,22$) всех клеток CD8+ у мышей с вакцинацией р11Е6Е7 привело к выработке ИФН- γ , ФНО- α и IL-2, соответственно. За исключением нескольких панелей, процент клеток, вырабатывающих цитокины, при лечении в сравнении с соответствующими группами без лечения был статистически значимым при доверительном интервале 89% или выше. При наблюдении величины выработки цитокинов клетками CD4+ в сравнении с Т-клетками CD8+ можно прийти к выводу, что иммунный ответ, вызванный р6Е6Е7 и р11Е6Е7, сильно смещен в сторону выработки CD8+ лимфоцитов, которые связаны со всеми моделями в собственном клеточном клиренсе.

Статистический анализ

Для анализа статической значимости всех количественных данных, полученных в этом исследовании, использовали критерий Стьюдента. Если не указано иное, значения p были рассчитаны для определения статистической значимости при различных доверительных интервалах.

Данное исследование выявило убедительные доказательства того, что ДНК-вакцины могут достичь уровня иммуногенности,

выявленного в экспериментах с использованием других популярных и традиционных платформ вакцин. Высокие уровни клеточного ответа, измеренные в других подобных исследованиях ДНК-вакцины, специфической к Е6 и Е7 ВПЧ, были связаны с данными, указывающими на предположительную профилактическую и терапевтическую противоопухолевую эффективность. Большая часть ВПЧ-связанных моделей исследования и стимуляции возникновения заболевания направлены на рак шейки матки. Принимая во внимание, что ВПЧ6 и ВПЧ11 являются такими же релевантными к раку шейки матки, как и другие серотипы ВПЧ, терапевтическая эффективность р6Е6Е7 и р11Е6Е7 не может быть полностью оценена с использованием стандартных моделей стимуляции возникновения заболевания ВПЧ. Было бы полезным определение защитного и терапевтического потенциала р6Е6Е7 и р11Е6Е7 при возникновении соответствующих моделей стимуляции возникновения заболевания. Таким образом, можно только предложить иммуногенную эффективность р6Е6Е7 и р11Е6Е7 при отслеживании высоких уровней ИФН- γ и выработке цитокинов, определенных анализами ELISpot и внутриклеточным окрашиванием цитокинов. Тем не менее, было выявлено, что такие уровни являются по существу робастными по величине и обещанием того, что две конструкции будут вызывать значительные уровни клеточного иммунного ответа. По причине того, что злокачественные новообразования, связанные с ВПЧ, являются вторичными после сопутствующей инфекции множественных серотипов, существует большая необходимость в дополнительном изучении возможности комбинации вакцин, направленных на различные серотипы вируса. Дополнительное исследование, изучающее динамику Т-клеток и конкуренцию вакцин, оправдано для дальнейшей характеристики эффектов конкурентной вакцинации из двух плазмид.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов показало, что вакцинация р6Е6Е7 и р11Е6Е7 была способна вызвать значительный процент Т-клеток, вырабатывающих ИФН- γ , ФНО- α и IL-2. С учетом известной в данный момент функции на иммунную систему, ИФН- γ исторически использовался в качестве меры клеточного иммунного ответа. Некоторые из таких важных ролей включают способность модулировать и стимулировать врожденный и адаптивный иммунитет. Кроме того, широко принято, что основными производителями ИФН- γ являются Т-клетки, что делает выработку ИФН- γ приемлемой мерой измерения клеточной иммуногенности после воздействия отдельной

вакцины на антигены. ФНО- α является другим цитокином, который участвует в регуляции иммунной системы. Его известная способность индуцировать апоптоз и регулировать пролиферацию опухоли делает его важным параметром для учета при характеристике иммунного ответа после вакцинации. Выработка ФНО- α может быть дополнительно интересна с учетом потенциальных свойств пролиферации опухоли ВПЧ6 и ВПЧ11. IL-2 является другой сигнальной молекулой, которая, как отмечалось, играет центральную роль в пролиферации и дифференциации Т-клеток в иммунной системе. Как следствие, IL-2 часто исследуют в сочетании с другими цитокинами для получения дополнительной перспективы на значение и качество отдельного иммунного ответа. Принимая во внимание все указанное выше, процент по существу клеток CD4+ и CD8+, вырабатывающих ИФН- γ , ФНО- α и IL-2 после вакцинации р6Е6Е7, указывает на то, что вакцина была успешной в индуцировании сильного иммунного ответа. За исключением клеток CD4+, секретирующих IL-2, такая же тенденция справедлива для клеток, выделенных у мышей, вакцинированных р11Е6Е7. Кроме того, следует отметить, что то, что клетки CD8+ вызывают сильный иммунный ответ у вакцинированных мышей – признак того, что это является важным в оценке противоопухолевой эффективности двух плазмид.

Пример 3

Мыши и вакцинация групп лечения

Можно использовать мышей-самок C57BL/6 в возрасте 6–8 недель. Мышей можно получить из Jackson Laboratory (Бар-Харбор, Мэн). Мышей можно разделить на группы по 4 для иммунизации. Мышей можно иммунизировать одной из следующих комбинаций: а) плазида, кодирующая ВПЧ 16Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 18Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 6Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 11Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 31Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 33Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 52Е6Е7 и плазида, кодирующая ВПЧ 58Е6Е7; б) плазида, кодирующая ВПЧ 16Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 18Е6Е7, плазида, кодирующая плазида, кодирующая ВПЧ 31Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 33Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 52Е6Е7 и плазида, кодирующая ВПЧ 58Е6Е7; в) плазида, кодирующая ВПЧ 16Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 18Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 31Е6Е7 и плазида, кодирующая ВПЧ 33Е6Е7; д) плазида, кодирующая ВПЧ 16Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 18Е6Е7, плазида, кодирующая ВПЧ 6Е6Е7

и плазмиды, кодирующая ВПЧ 11E6E7; и группа pVAX, служащая отрицательным контролем.

ДНК вакцинация и электропорация

Каждая мышь получает три дозы по 20 мкг суммарно каждой ДНК плазмиды с промежутками 14 дней. Конструкции ДНК вводят внутримышечной инъекцией в мышцу правого квадрицепса, с последующими прямоугольными импульсами, генерируемыми электропоратором CELLECTRA (Inovio Pharmaceuticals, Блю Белл, Пенсильвания). Электропоратор настраивают таким образом, чтобы доставлять два электрических импульса по 0,2 А, 52 мс/импульс, разделенные 1-секундной задержкой. Процедуру электропорации осуществляют, как было описано ранее, в соответствии с информацией CELLECTRA, любезно предоставленной Inovio Pharmaceuticals.

Анализ IFN- γ ELISpot

Мышей в группах лечения и контрольных группах умерщвляют через 1 неделю после третьей иммунизации. Извлекают селезенку каждой мыши и переносят в среду RPMI-1640, содержащую 10% сыворотки телячьего эмбриона (СТЭ) и антибиотики (R10). С помощью гомогенизатора Stomacher (Seward Laboratory Systems, Богемия, Нью-Йорк), селезенку измельчают, затем пропускают сквозь фильтр для клеток и суспендируют в лизирующем буфере АСК. После удаления эритроцитов, спленоциты выделяют и суспендируют в среде R10. 96-луночные планшеты Multiscreen IP с высоким содержанием белка (Millipore, Бэдфорд, Массачусетс) предварительно покрывают моноклональным мышинным IFN- γ захватывающим антителом (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) и инкубируют в течение ночи при 4°C. После трехкратного промывания 1 X фосфатно-солевым буфером (ФСБ), планшеты блокируют 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 5% сахарозы в 1 x ФСБ в течение 2 часов при комнатной температуре. Выделенные спленоциты в среде R10 подсчитывают и помещают в трех экземплярах в лунки с плотностью 2×10^5 клеток на лунку. Два набора пептидов, соединяющих консенсусную последовательность E6/E7, для каждой ВПЧ плазмиды разбавляют ДМСО (GenScript USA, Пискатавей, Нью-Йорк). Пептиды содержат последовательности из 15 аминокислот, из которых 8 остатков перекрываются для каждого последующего пептида. Пептиды для каждой ВПЧ плазмиды делят на 2 пула – один пул для E6 и другой для E7 – в концентрациях 2 мкг/мл в ДМСО. Лунки, зарезервированные для положительного и отрицательного

контроля, получают Конкавалин А (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и питательную среду R10 вместо пептидов, соответственно. Затем планшеты помешают в инкубатор с атмосферой, содержащей 5% CO₂. После инкубации в течение 24 часов при 37°C, лунки промывают 1 x ФСБ. Биотинилированное анти-мышинное антитело для выявления IFN-γ (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) добавляют в каждую лунку, и затем инкубируют на протяжении ночи при 4°C. Далее планшеты промывают и обрабатывают в соответствии с протоколом проявления цвета, предоставленным R&D Systems, с применением Стрептавидина-щелочной фосфатазы (ЩФ) и 5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфата/нитро-голубого тетразолия BCIP/NBT Plus (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота). Лунки сушат на воздухе на протяжении ночи, пятна в лунках сканируют и производят подсчет с помощью системы для считывания планшетов ELISpot и программного обеспечения ImmunoSpot®3 и ImmunoSpot®4 (Cellular Technology Ltd., Шейкер Хайтс, Огайо). Зарегистрированные импульсы бляшкообразующих клеток преобразуют в показательные бляшкообразующие единицы на 1×10⁶ спленоцитов с помощью расчетов.

С учетом их чувствительности и способности иллюстрировать Т-клеточную активность, анализы ELISpot IFN-γ применяют для определения количества антиген-специфичных интерферон-гамма-секретирующих клеток в ответ на стимуляцию пептидами Е6 и Е7 ВПЧ 6 или 11.

**Пример 4 Результаты VGX-3100 фазы 1 у человека
(комбинация ВПЧ 16 Е6Е7 и ВПЧ 18 Е6Е7)**

Пациенты с предварительно леченной цервикальной интраэпителиальной дисплазией (CIN) 2/3

В\м введение комбинированной ДНК вакцины VGX-3100 с применением электропорационного устройства (EP) постоянного тока CELLECTRA®.

См. Bagarazzi et al. *Sci Transl Med* 4, 155ra138 (2012), которая включена в настоящий документ в полном объеме.

Когорта	Количество пациентов	Доза (мг)
1	6	0,3 X 2 плазмиды (ВПЧ16/ВПЧ18)
2	6	1 X 2 плазмиды (ВПЧ16/ВПЧ18)
3	6	3 X 2 плазмиды (ВПЧ16/ВПЧ18)

Ответ в форме антител:

Антитела против всех 4 антигенов с высокими титрами у 15/18 (83%), и подтверждение вестерн-блоттингом наличия у всех пациентов до 9 месяцев.

Антиген-специфические клеточные ответы на ВПЧ 16,18 Е6, Е7:

-14/18 (78%) положительный по данным ELISpot IFN- γ (> 50 синцитий-образующих единиц (СОЕ)/106 МКПК)

-Увеличение при повышении дозы до > 2500 СОЕ/106 МКПК для 1 антигена, > 5670 СОЕ/106 МКПК для всех 4 антигенов

-5 субъектов отвечали на все 4 антигена

-Ответ длился до 9 месяцев после первичной серии

-4-я доза усиливает Т-клеточные ответы до > 2 лет

-Лейкоцитарный антиген человека (HLA) DR+/CD38+ CD8+ Т-клетки высвобождают Гранзим В/перфорин для уничтожения клеток

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок для стимуляции иммунного ответа против ВПЧ, содержащий консенсусный антиген ВПЧ, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:20; аминокислотной последовательности, гомологичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:18, аминокислотной последовательности, гомологичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:20, фрагмента последовательности SEQ ID NO:18, содержащего 60% или более последовательности SEQ ID NO:18, и фрагмента последовательности SEQ ID NO:20, содержащего 60% или более последовательности SEQ ID NO:20.

2. Белок по п. 1, содержащий фрагмент последовательности SEQ ID NO: 18 без лидерной последовательности на N-конце, которая представляет собой последовательность, представленную SEQ ID NO:10; или фрагмент SEQ ID NO:20 без лидерной последовательности на N-конце, которая представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO:10.

3. Белок по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:20.

4. Белок по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, гомологичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:20.

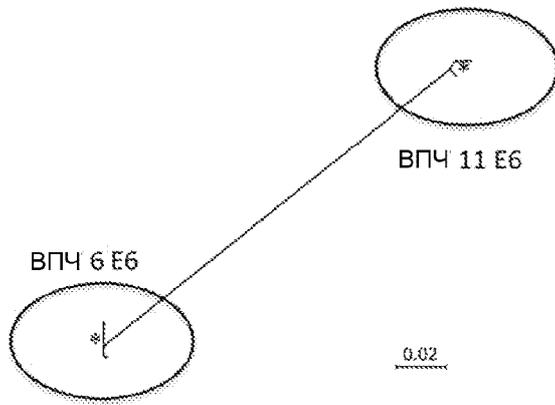
5. Белок по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, гомологичную по меньшей мере на 98% последовательности SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:20.

6. Белок по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, гомологичную по меньшей мере на 99% последовательности SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:20.

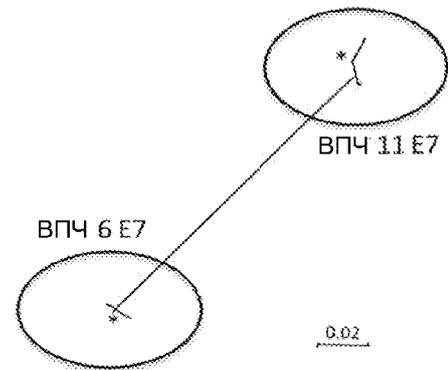
7. Фармацевтическая композиция для применения против ВПЧ, содержащая активный ингредиент, который представляет собой антиген ВПЧ, содержащий белок по п. 1.

8. Способ стимуляции эффективного иммунного ответа против ВПЧ, включающий введение фармацевтической композиции по п. 6.

По доверенности

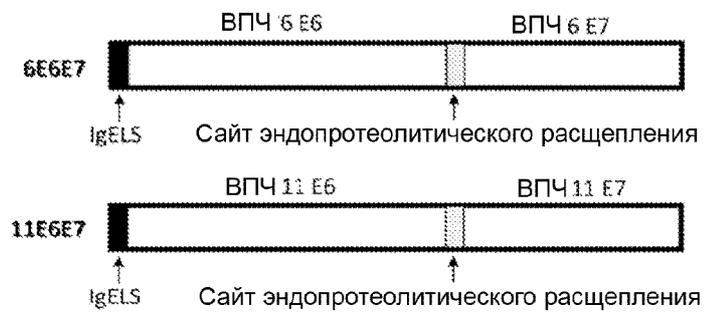


ФИГ. 1А

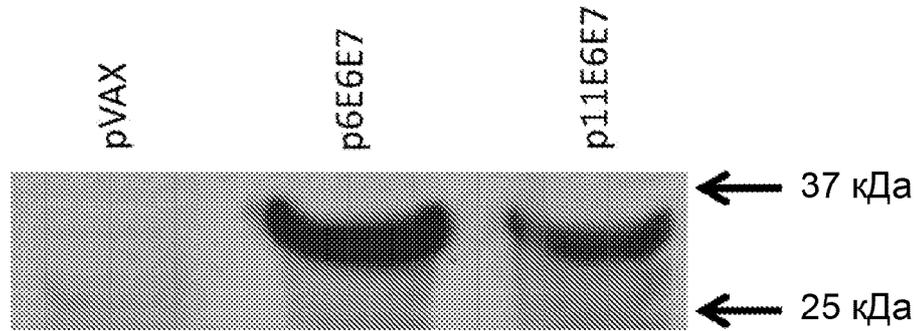


ФИГ. 1В

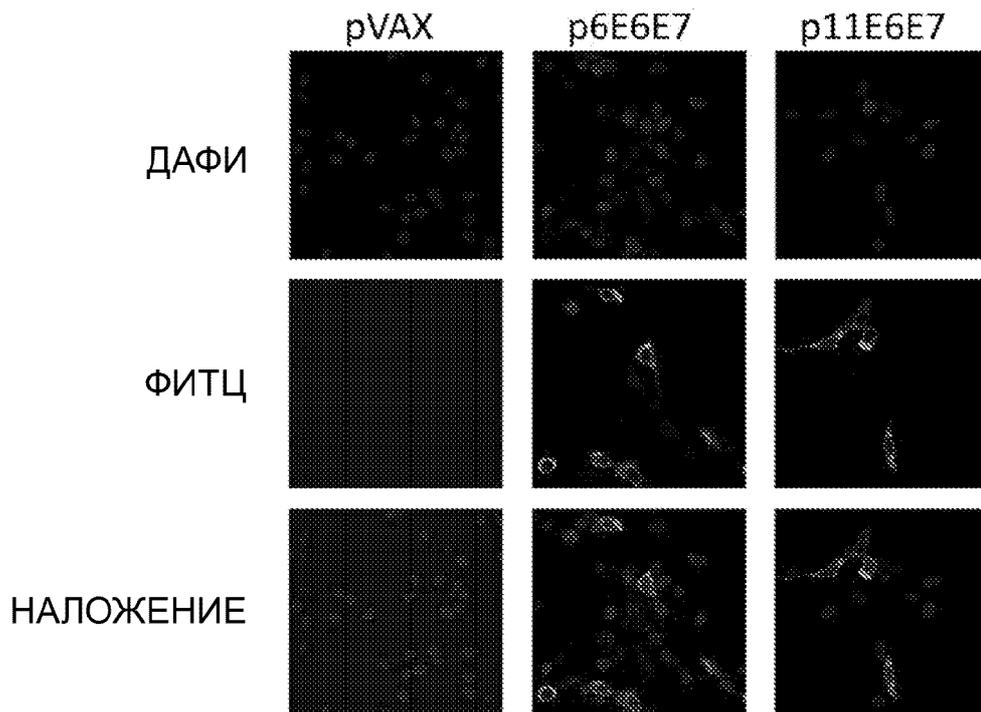
Дизайн иммуногена



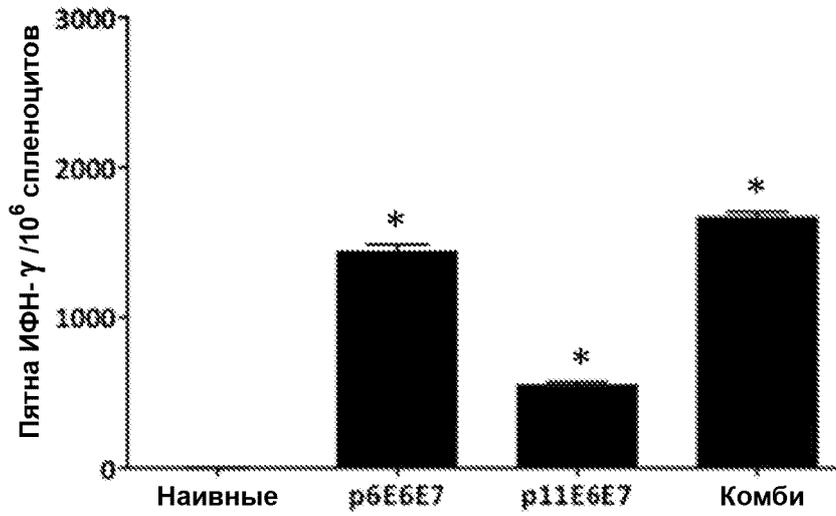
ФИГ. 1С



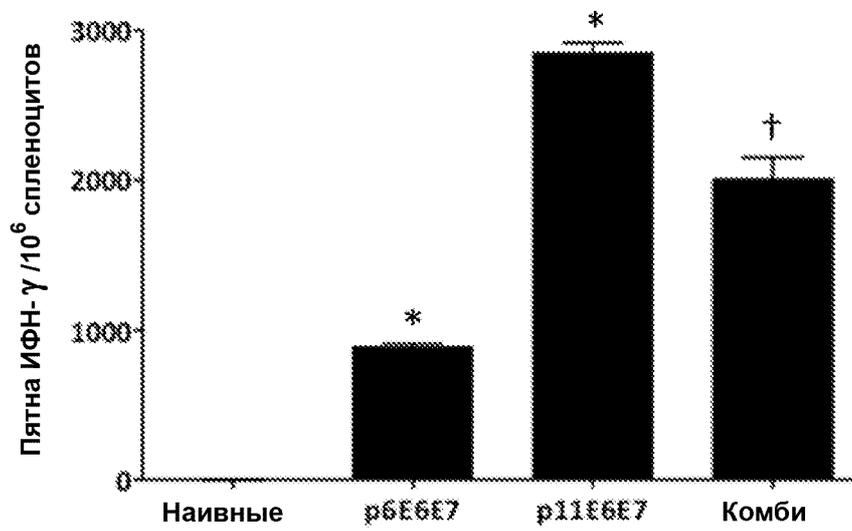
ФИГ. 2А



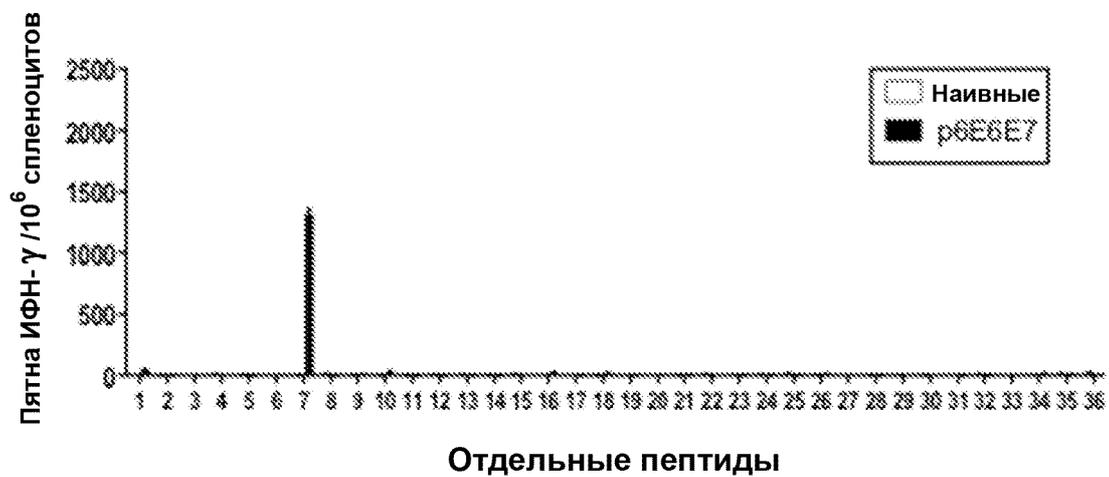
ФИГ. 2В



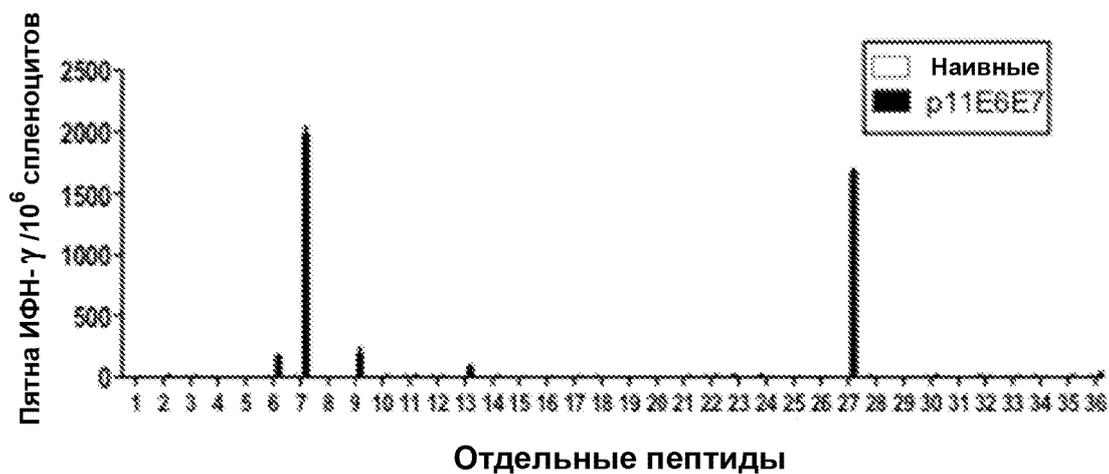
ФИГ. 3А



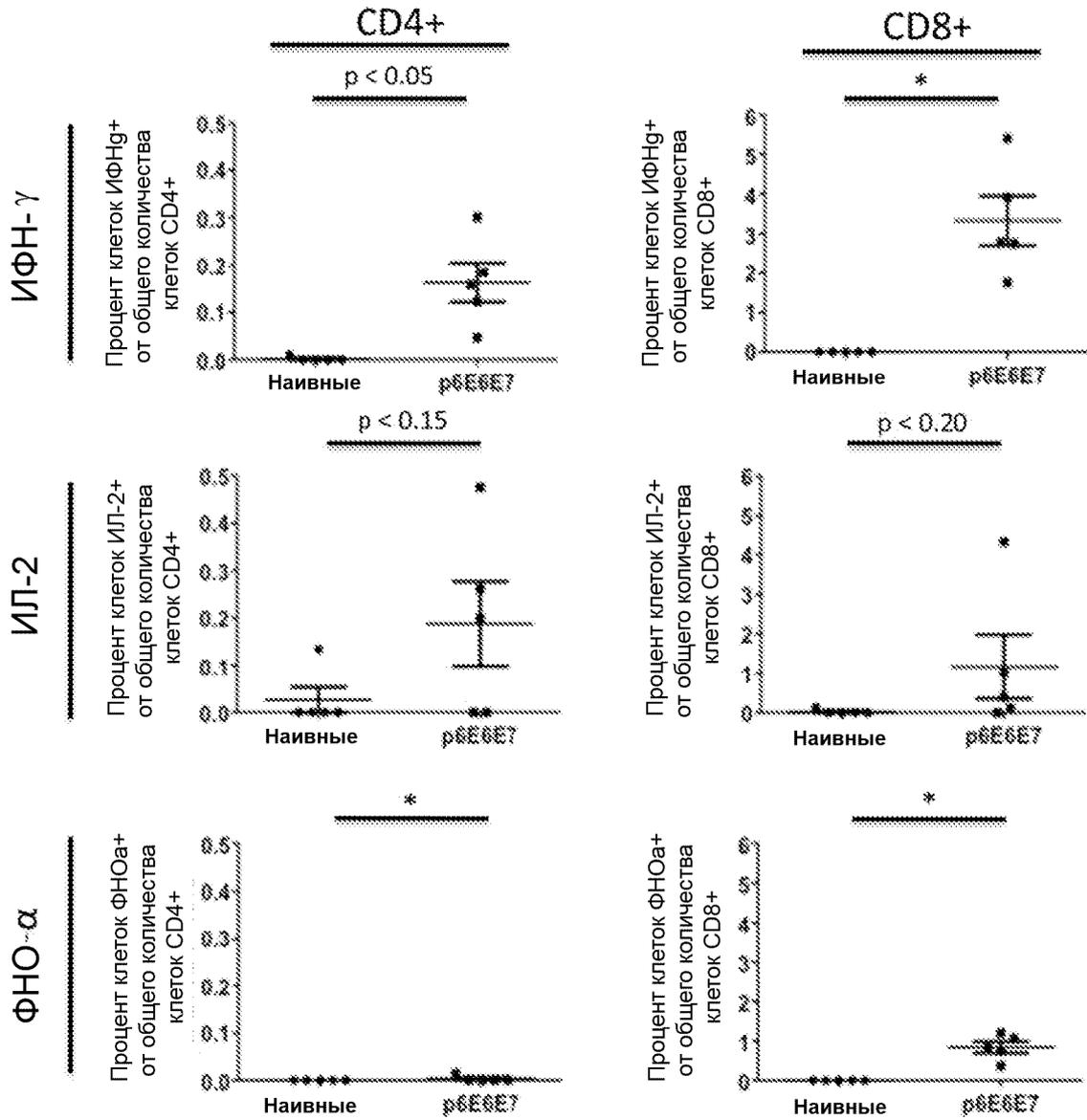
ФИГ. 3В



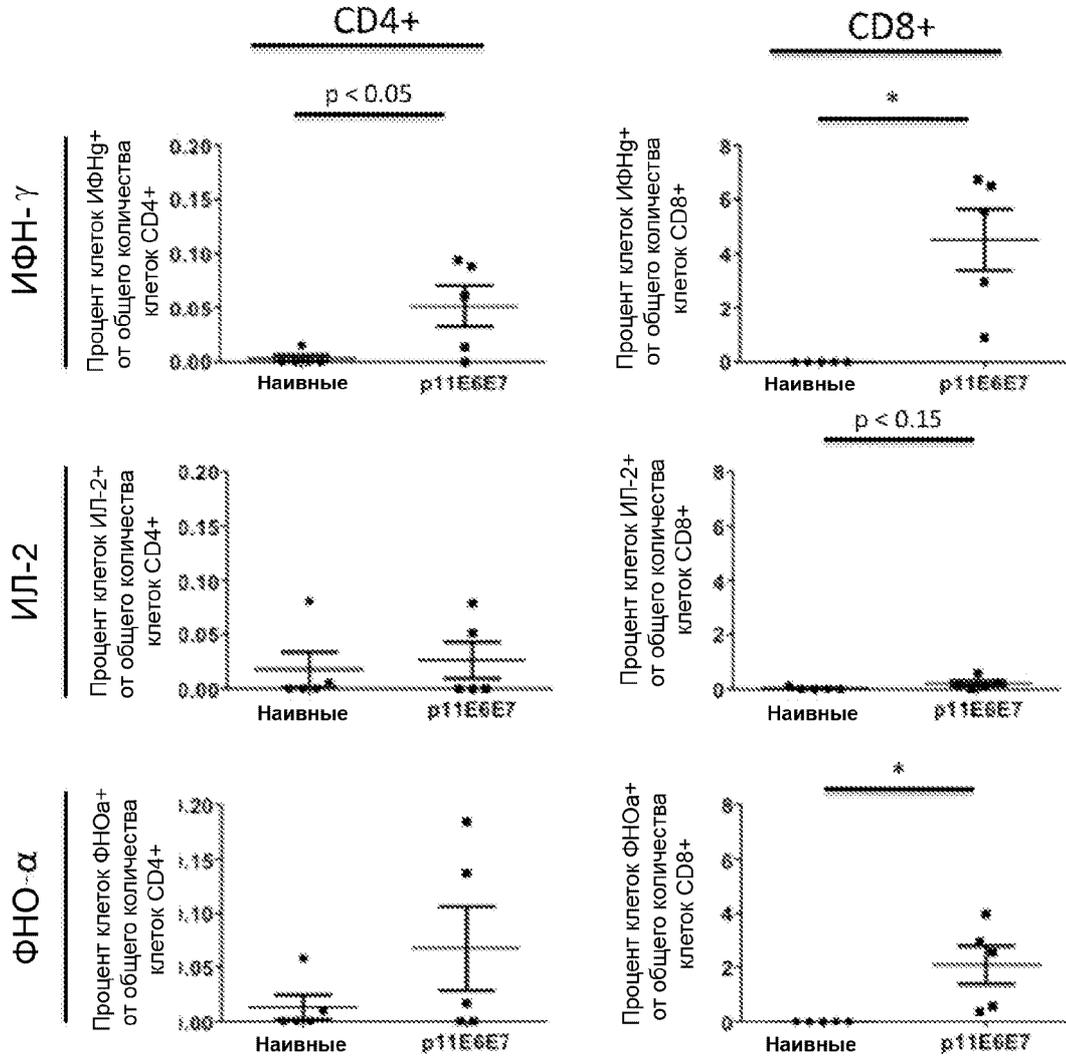
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201992282

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 14/025 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 14/025, A61K 39/12, A61P 31/20

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X A	US 7223408 B2 (WYETH HOLDINGS CORPORATION) 29.05.2007, соединение 28, 34, кол. 1 строки 11-19, кол. 3 строки 50-62, кол. 4 строки 35-43, кол. 16 строки 20-28, фиг. 3A-C	1, 4, 7-8 2-3, 5-6
A	US 8168769 B2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 01.05.2012, соединение 23, кол. 5 строки 33-35, 42-53, 64-67, кол. 6 строки 1-12, кол. 24 строки 29-67, кол. 25 строки 1-32	1-8

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

«P» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

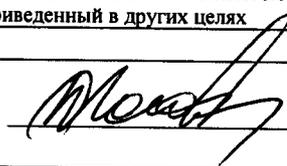
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **14/04/2020**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин