

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293315** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.06

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

(22) Дата подачи заявки
2021.05.14

**(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО РЕСПИРАТОРНОГО
ПАПИЛЛОМАТОЗА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/024,912**

(32) **2020.05.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/032545**

(87) **WO 2021/231925 2021.11.18**

(71) Заявитель:
**ИНОВИО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

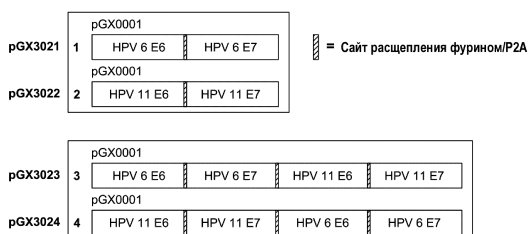
**Рамос Стефани, Рид Чарльз, Уолтерс
Джуэлл, Янь Цзянь, Слагер Анна,
Бродерик Кейт (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антиген ВПЧ. Также представлены вакцины против папилломавируса человека (ВПЧ), включающие нуклеиновые кислоты, способы индуцирования иммунных ответов и способы профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидов против рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП). Описаны фармацевтические композиции, рекомбинантные вакцины, включающие ДНК-плазмиду, и живые аттенуированные вакцины, а также описаны способы индуцирования иммунного ответа для лечения или предупреждения РРП.

Плазмиды, кодирующие антигены ВПЧ6 и ВПЧ11 E6 и E7



A1

202293315

202293315

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576428EA/032

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО РЕСПИРАТОРНОГО ПАПИЛЛОМАТОЗА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявки на патент США № 63/024,912, поданной 14 мая 2020 года, содержание которой включено в данный документ в полном своем объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и настоящим включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Копия указанного файла ASCII, созданная 14 мая 2021 г., называется 104409_000619_US_SL.txt и имеет размер 37913 байтов.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к вакцинам против папилломавируса человека (ВПЧ), способам индуцирования иммунных ответов и способам профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидов против ВПЧ6 и/или ВПЧ11, а также к способам предупреждения или лечения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Злокачественные опухоли, ассоциированные с вирусом папилломы человека (ВПЧ+), являются новой глобальной эпидемией (Gradishar et al., JNCCN 2014;12(4):542-90). Ассоциированные с ВПЧ аэродигестивные предраковые поражения и злокачественные опухоли могут возникать в ротоглотке, гортани и верхних дыхательных путях. Хотя роли ВПЧ6 и ВПЧ11 в этиологии большинства аэродигестивных злокачественных опухолей остаются неясными, широко признается их причинная связь с рецидивирующим респираторным папилломатозом (РРП) (Mounts et al., PNAS USA 1982;79(17):5425-9; Gissmann et al., PNAS USA 1983;80(2):560-3; Bonagura et al., APMIS. 2010;118(6-7):455-70), наиболее распространенной доброкачественной опухолью эпителия гортани. РРП встречается редко, при этом заболеваемость оценивают в 1,8 случая на 100000 взрослых в Соединенных Штатах Америки (Winton et al., NEJM 2005;352(25):2589-97). Хотя большинство поражений являются доброкачественными, некоторые из них подвергаются злокачественной трансформации, и у пациентов с РРП повышен риск развития неоплазий и карцином гортани (Omeland et al., PloS One. 2014;9(6):e99114).

Рецидивирующий респираторный папилломатоз остается сложным заболеванием, поражающим детей и взрослых, что приводит к ежегодным расходам на здравоохранение в США, оцениваемым в 120 миллионов долларов, при этом ежегодные расходы на одного пациента приближаются к 60000 долларов. Хотя распространенность РРП снизилась, РРП остается самым распространенным доброкачественным новообразованием гортани у детей. РРП уникален своей высокой частотой многоочаговых рецидивов, высокой нагрузкой на качество жизни пациентов и высокими сопутствующими расходами на

здравоохранение. Таким образом, существует потребность в улучшенных композициях и способах лечения или предупреждения РРП. Настоящее изобретение удовлетворяет эту неудовлетворенную потребность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антиген папилломавируса человека (ВПЧ), при этом антиген ВПЧ включает антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ6 включает антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ11 включает антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7. Молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в данном документе, могут кодировать антиген ВПЧ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, или фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым аспектам молекулы нуклеиновой кислоты включают нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 95% гомологичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12; нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или нуклеотидную последовательность SEQ ID NO 12.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ11, располагается 5' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6. В альтернативных вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ6, располагается 5' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ11.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более сайтов посттрансляционного расщепления, один или более сайтов трансляционного проскока или и то, и другое. Такая(такие) последовательность(последовательности) может(могут) быть включена(ы) между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ11, между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6 Е6, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6 Е7, между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ11 Е6, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ11 Е7, или любой их комбинацией.

Также в данном документе представлены векторы экспрессии, включающие любую из раскрываемых молекул нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации

изобретения вектор экспрессии представляет собой ДНК-плазмиду. В качестве примера, вектор экспрессии может включать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

Кроме того, в данном документе раскрываются иммуногенные белки, включающие антигенный домен папилломавируса человека (ВПЧ) 6, слитый с антигенным доменом ВПЧ11. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ6 включает ВПЧ6 Е6 и ВПЧ6 Е7; антигенный домен ВПЧ11 включает ВПЧ11 Е6 и ВПЧ11 Е7 или оба. Антигенный домен ВПЧ11 может располагаться N-терминально или С-терминально по отношению к антигенному домену ВПЧ6. Иммуногенные белки могут содержать один или более сайтов посттрансляционного расщепления, один или более сайтов трансляционного проскока, или те, и другие. Такие сайты могут располагаться между антигенными доменами ВПЧ6 и ВПЧ11, между антигенными доменами ВПЧ6 Е6 и ВПЧ6 Е7, между антигенными доменами ВПЧ11 Е6 и ВПЧ11 Е7 или любой их комбинацией.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения иммуногенный белок включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, или аминокислотную последовательности, на по меньшей мере 95% гомологичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, или фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

Также в данном документе представлены композиции, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы экспрессии, иммуногенные белки или любую их комбинацию и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах представлены вакцины, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы экспрессии, иммуногенные белки или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации изобретения представлены фармацевтические композиции, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы экспрессии, иммуногенные белки или любую их комбинацию и адъювант. Адъювант может представлять собой, например, интерлейкин 12 (IL-12). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения IL-12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, такой как вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения адъювант включает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу p35 IL-12, может включать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; фрагмента нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6. В

некоторых аспектах нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р40 IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; фрагмента нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; фрагмента нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4.

Кроме того, в данном документе описаны способы индуцирования иммунного ответа у субъекта путем введения субъекту эффективного количества любых из раскрываемых молекул нуклеиновой кислоты, векторов экспрессии, иммуногенных белков, фармацевтических композиций или вакцин с индуцированием тем самым иммунного ответа.

Также в данном документе представлены способы профилактической или терапевтической иммунизации субъекта против ВПЧ6 и/или ВПЧ11, включающие введение субъекту эффективного количества любых из раскрываемых молекул нуклеиновой кислоты, векторов экспрессии, иммуногенных белков, фармацевтических композиций или вакцин с индуцированием тем самым иммунного ответа против ВПЧ6, ВПЧ11 или обоих.

Кроме того, в данном документе представлены способы лечения или предупреждения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП) у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества любых из раскрываемых молекул нуклеиновой кислоты, векторов экспрессии, иммуногенных белков, фармацевтических композиций или вакцин с лечением или предупреждением тем самым РРП. РРП может быть ювенильным РРП или РРП взрослых.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения раскрываемых способов молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12, вводят субъекту.

В некоторых аспектах раскрываемых способов субъекту дополнительно вводят адъювант. Адъювант может представлять собой интерлейкин-12 (IL-12). IL-12 может кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты, такой как, например, вектор экспрессии или плазида. В некоторых вариантах реализации изобретения адъювант включает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность,

кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе. Нуклеотидная последовательность, кодирующая p35, может включать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; фрагмента нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6. Нуклеотидная последовательность, кодирующая p40, может включать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; фрагмента нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, может включать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; фрагмента нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 и нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12, представляет собой pGX6010.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект является человеком.

Согласно некоторым вариантам реализации способов, представленных в данном документе, способы включают введение pGX3024 и pGX6010 субъекту. В некоторых аспектах способов pGX3024 и pGX6010 вводят в виде композиции, например, в виде INO-3107. Некоторые варианты реализации способов включают введение 6 миллиграмм pGX3024 и 0,25 миллиграмма pGX6010 субъекту. В некоторых аспектах раскрываемых способов введение включает внутривенную или внутримышечную инъекцию. Введение может дополнительно включать электропорацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Краткое описание, а также следующее подробное описание становятся более понятными при прочтении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации раскрываемых способов в графических материалах показаны их иллюстративные варианты реализации изобретения; однако способы не ограничиваются конкретными раскрываемыми вариантами реализации изобретения. В графических материалах:

На **фигуре 1А** показана схема антигенов, кодируемых в разных плазмидах ВПЧ6 и/или ВПЧ11. Отдельные антигены разделены сайтом расщепления Р2А для трансляционного проскока и сайтом расщепления фурином для посттрансляционного расщепления последовательности Р2А. ДНК-плазмида рGX3024 кодирует консенсусные антигены Е6 и Е7 SynCon® как ВПЧ6, так и ВПЧ11. На **фигуре 1В** представлена карта плазмиды рGX3024.

На **фигуре 2** показана экспрессию антигенов белков Е6 и Е7 рGX3024 *in vitro*. Клетки НЕК-293Т трансфицировали либо плазмидой рGX3024, плазмидой рGX3021 или рGX3022 положительного контроля, либо пустой плазмидой рGX0001 отрицательного контроля с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 3000. Клетки собирали через 48 часов после трансфекции, а затем клеточные лизаты анализировали с антителом против ВПЧ11 Е7 (левая панель) или антителом против 2А (средняя панель) с помощью вестерн-блоттинга. Блоты отделяли и повторно зондировали с антителом против β -актина (правая панель) для подтверждения равной нагрузки белка. Белки Е6 и Е7 выявляли в клетках, трансфицированных плазмидой рGX3024 и контрольными плазмидами рGX3021 и рGX3022, но не плазмидой рGX0001 отрицательного контроля.

На **фигуре 3** показаны ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после иммунизации мышей С57BL/6 с помощью рGX3024. Спленоциты мыши С57BL/6 собирали через одну неделю после иммунизации либо рGX3024, либо контрольными плазмидами, кодирующими антигены ВПЧ6 (рGX3021) или ВПЧ11 (рGX3022), либо плазмидой отрицательного контроля (рGX0001). Специфические клеточные ответы на пептиды ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6 и Е7 измеряли с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Звездочка указывает на значительную разницу в общем клеточном ответе по сравнению с контролем рGX0001 по результатам однофакторного ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

На **фигуре 4** показаны гуморальные ответы на ВПЧ6 и ВПЧ11 после иммунизации мышей С57BL/6 с помощью рGX3024. Образцы сыворотки мыши С57BL/6 собирали до иммунизации (неделя 0) и после первой (неделя 2) и второй (неделя 3) иммунизации либо рGX3024, либо плазмидой отрицательного контроля (рGX0001). Специфические IgG-связывающие антитела против антигенов ВПЧ6 Е7 (левая панель) или ВПЧ11 Е7 (правая панель) измеряли с помощью ELISA.

На **фигуре 5** показаны ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после иммунизации мышей BALB/6 с помощью рGX3024. Спленоциты мыши BALB/с собирали через одну неделю после иммунизации указанной дозой либо рGX3024 отдельно или в комбинации с указанной дозой плазмиды мышинового IL-12 (рGX6012), либо плазмидой отрицательного контроля (рGX0001). Специфические клеточные ответы на пептиды ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6 и Е7 измеряли с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Звездочка указывает на значительную разницу в общем клеточном ответе по сравнению с контролем рGX0001 по результатам однофакторного ANOVA с критерием Даннетта.

На **фигуре 6** показаны гуморальные ответы на ВПЧ6 и ВПЧ11 после иммунизации мышей BALB/с с помощью рGX3024. Образцы сыворотки мыши BALB/с собирали до

иммунизации (неделя 0) и после первой (неделя 2) и второй (неделя 3) иммунизации указанной дозой либо pGX3024 отдельно или в комбинации с указанной дозой плазмиды мышинового IL-12 (pGX6012), либо плазмидой отрицательного контроля (pGX0001). Специфические IgG-связывающие антитела против антигенов ВПЧ6 Е7 (левая панель) или ВПЧ11 Е7 (правая панель) измеряли с помощью ELISA. Звездочка указывает на значительную разницу, а «ns» указывает на отсутствие значительной разницы по сравнению с неделей 0 по результатам двухфакторного ANOVA.

На **фигуре 7** показана временная динамика ВПЧ6- и ВПЧ11-специфических клеточных ответов после иммунизации кроликов NZW с помощью INO-3107. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) кроликов NZW собирали в указанные временные точки после иммунизации либо INO-3107, либо 1X солевым буфером с цитратом натрия (SSC). Специфические клеточные ответы на пептиды ВПЧ6 Е6 и Е7, а также пептиды ВПЧ11 Е6 и Е7 измеряли с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Данные представлены как сумма ответов на ВПЧ6 Е6 и Е7 (левая панель) или ВПЧ11 Е6 и Е7 (правая панель) для отдельных животных.

На **фигуре 8** показаны ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после иммунизации кроликов NZW с помощью INO-3107. Неделя 11 (две недели после четвертой иммунизации), ответы Т-клеток против антигенов ВПЧ6 Е6, ВПЧ6 Е7, ВПЧ11 Е6 или ВПЧ11 Е7 у кроликов NZW на неделе 11 (две недели после четвертой иммунизации) с использованием INO-3107 или 1X SSC, как описано на фигуре 7. Данные представлены для отдельных кроликов (левая панель) или среднее $\pm$ SEM для каждой получавшей обработку группы (правая панель). Звездочка указывает на значительную разницу ($p < 0,05$), определенную с помощью U-теста Манна-Уитни.

На **фигуре 9** показана временная динамика гуморальных ответов на ВПЧ6 и ВПЧ11 после иммунизации кроликов NZW с помощью INO-3107. Образцы сыворотки кроликов NZW собирали в указанные временные точки после иммунизации с помощью INO-3107 или 1X SSC. Специфические гуморальные ответы на антигены ВПЧ6 Е7 (левая панель) и ВПЧ11 Е7 (правая панель) измеряли с помощью ELISA связывания IgG. Данные представлены для отдельных животных.

На **фигуре 10** показана временная динамика измерений массы тела кроликов NZW, которым вводили INO-3107 (левая панель) или 1X SSC (правая панель).

На **фигуре 11** показана временная динамика ВПЧ6- и ВПЧ11-специфических клеточных ответов после иммунизации морских свинок Hartley с помощью pGX3024. Морских свинок (n из 5) иммунизировали на неделях 0, 2 и 4 с помощью 100 мкг pGX3024, вводимых путем внутрикожной электропорации CELLECTRA. Необработанные морские свинки (n из 2) служили отрицательным контролем. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) морских свинок собирали в указанные временные точки после иммунизации с помощью pGX3024 или у необработанных морских свинок. Специфические клеточные ответы на пептиды ВПЧ6 Е6 и Е7, а также пептиды ВПЧ11 Е6

и E7 измеряли с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Данные представлены как среднее $\pm$ SEM для каждой получавшей обработку ВПЧ6 E6 и E7 группы.

На **фигуре 12** показана временная динамика ВПЧ6- и ВПЧ11-специфических гуморальных ответов после иммунизации морских свинок Hartley с помощью pGX3024. Морских свинок Hartley (n из 5) иммунизировали на неделях 0, 2 и 4 с помощью 100 мкг pGX3024, вводимых путем внутрикожной электропорации CELLECTRA. В указанные временные точки после иммунизации с помощью pGX3024 собирали образцы сыворотки морских свинок для измерения специфических IgG-связывающих антител против антигенов ВПЧ6 E7 (слева) или ВПЧ11 E7 (справа) с помощью ELISA. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от пяти животных.

На **фигуре 13** показаны иммунные ответы, индуцированные после внутрикожной доставки INO-3107 кроликам NZW. Клеточные иммунные ответы оценивали с помощью ELISpot IFN- γ до иммунизации (неделя 0) и через две недели после каждой иммунизации (недели 2, 5 и 8). Комбинированный иммунный ответ на оба антигена, ВПЧ6 и ВПЧ11, повышался после каждой иммунизации, при этом Т-клеточные ответы были более специфичными в отношении ВПЧ6 E6 и ВПЧ11 E6.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрываемые молекулы нуклеиновой кислоты, белки, вакцины и способы могут быть более понятны из следующего подробного описания вместе с сопроводительными графическими материалами, которые являются частью настоящего изобретения. Следует учитывать, что раскрываемые молекулы нуклеиновой кислоты, белки, вакцины и способы не ограничиваются конкретными молекулами нуклеиновой кислоты, белками, вакцинами и способами, описанными и/или показанными в данном документе, и что терминология, используемая в данном документе, предназначена для описания конкретных вариантов реализации изобретения исключительно в качестве примера и не предназначена для ограничения заявленных молекул нуклеиновой кислоты, белков, вакцин и способов.

Если специально не указано иное, любое описание возможного механизма или способа действия или причины улучшения предназначено исключительно для иллюстрации, и раскрываемые молекулы нуклеиновой кислоты, белки, вакцины и способы не должны быть ограничены корректностью или некорректностью любого такого предполагаемого механизма или способа действия или причины улучшения.

По всему тексту описания относятся к композициям и способам применения указанных композиций. Если в настоящем изобретении описывается или заявляется признак или вариант реализации изобретения, связанный с композицией, такой признак или вариант реализации изобретения в равной степени применим к способам применения указанной композиции. Подобным образом, если в настоящем изобретении описывается или заявляется признак или вариант реализации изобретения, связанный со способом применения композиции, такой признак или вариант реализации изобретения в равной степени применим к композиции.

Следует оценить, что некоторые признаки раскрываемых молекул нуклеиновой кислоты, белков, вакцин и способов, которые для ясности описаны в данном документе в контексте отдельных вариантов реализации изобретения, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте реализации изобретения. И наоборот, различные признаки раскрываемых молекул нуклеиновых кислот, белков, вакцин и способов, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации изобретения, также могут быть представлены отдельно или в любой подкомбинации.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понимаемые специалистом в данной области техники. В случае противоречий преимущество имеет настоящий документ, включая определения. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя при практической реализации или тестировании настоящего изобретения можно применять способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в данном документе. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие литературные источники, упоминаемые в данном документе, в полном своем объеме включены посредством ссылки. Описанные в данном документе материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не подразумевают ограничения. Используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения.

Используемые в данном документе термины «содержат(ит)», «включают(ет)», «имеющий», «имеет», «может», «включают(ет) в себя» и их варианты являются неограничивающими переходными выражениями, терминами или словами, которые не исключают возможности наличия дополнительных действий или структур. Термин «включающий» предназначен для включения примеров, охватываемых терминами «состоящий преимущественно из» и «состоящий из»; подобным образом, термин «состоящий преимущественно из» предназначен для включения примеров, охватываемых термином «состоящий из». В настоящем изобретении также предусмотрены другие варианты реализации изобретения, «содержащие», «состоящие из» и «состоящие преимущественно из» вариантов реализации изобретения или элементов, представленных в данном документе, вне зависимости от того, явно это указано или нет.

Формы единственного числа включают множественные отсылки, если из контекста четко не следует иное.

В случае перечисления в данном документе числовых диапазонов с той же степенью точности явным образом предусмотрено каждое промежуточное числовое значение. Например, в случае диапазона 6-9 предусмотрены числа 7 и 8 в дополнение к 6 и 9, а в случае диапазона 6,0-7,0 явным образом предусмотрены числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Некоторые количественные выражения, приведенные в данном документе, не сопровождаются термином «приблизительно». Подразумевается, что независимо от того, используется ли термин «приблизительно» явно или нет, каждая приведенная величина

предназначена для обозначения фактического заданного значения, а также подразумевается для обозначения приближения к такому заданному значению, которое можно обоснованно вывести на основании уровня техники, включая приближения, обусловленные условиями эксперимента и/или измерения для такого значения.

«Адьювант», как используется в данном документе, означает любую молекулу, добавленную к иммуногенным композициям, описанным в данном документе, для повышения иммуногенности антигенов и кодирующих антиген молекул нуклеиновой кислоты и последовательностей, описанных далее.

«Антиген» относится к белкам, имеющим домен ВПЧ6 Е6, домен ВПЧ6 Е7, домен ВПЧ11 Е6, домен ВПЧ11 Е7 или любую их комбинацию, и предпочтительно к белку слияния домена ВПЧ6 Е6, домена ВПЧ6 Е7, домена ВПЧ11 Е6 и домена ВПЧ11 Е7 с сайтом эндопротеолитического расщепления между каждым доменом. Антигены включают SEQ ID NO: 1; его фрагменты длины, указанной в данном документе, варианты, т. е. белки с последовательностями, гомологичными SEQ ID NO: 1, как указано в данном документе, фрагменты вариантов, имеющие длину, указанную в данном документе, и их комбинации. Антигены могут иметь лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 10 или, в качестве альтернативы, могут иметь такую последовательность, удаленную с N-терминального конца. Например, антиген ВПЧ, включающий домен ВПЧ6 Е6, домен ВПЧ6 Е7, домен ВПЧ11 Е6 и домен ВПЧ11 Е7, с сайтом эндопротеолитического расщепления между каждым доменом или без такового, может иметь лидерную последовательность IgE, расположенную N-терминально по отношению к N-концу домена ВПЧ антигена ВПЧ. Антигены необязательно могут включать сигнальные пептиды, например, пептиды из других белков.

Термин «биоаналог» (одобренного эталонного продукта/биологического лекарственного средства, т. е. лекарственное средство, включенное в референтный перечень) относится к биологическому продукту, который в высокой степени подобен эталонному продукту, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, без клинически значимых различий между биоаналогом и эталонным продуктом с точки зрения безопасности, чистоты и эффективности, на основании данных, полученных в результате (а) аналитических исследований, которые демонстрируют, что биологический продукт в высокой степени подобен эталонному продукту, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах; (b) исследований на животных (включая оценку токсичности); и/или (с) клинического исследования или исследований (включая оценку иммуногенности и фармакокинетических показателей или фармакодинамических показателей), достаточных для демонстрации безопасности, чистоты и эффективности в одном или более соответствующих условиях применения, для которых эталонный продукт лицензирован и предназначен для применения, и для которых требуется лицензия на биоаналог. Биоаналог может быть взаимозаменяемым продуктом, который может быть заменен на эталонный продукт в аптеке без вмешательства лечащего врача. Чтобы соответствовать дополнительному стандарту «взаимозаменяемости»,

следует ожидать, что биоаналог даст тот же клинический результат, что и эталонный продукт у любого конкретного пациента, и, если биоаналог вводят индивиду более одного раза, риск с точки зрения безопасности или снижения эффективности при чередовании или переходе от применения биоаналога к эталонному продукту не выше, чем риск применения эталонного продукта без такого чередования или перехода. Биоаналог использует те же механизмы действия для предполагаемых условий применения в той степени, в которой эти механизмы известны для эталонного продукта. Условия или условия применения, предписанные, рекомендованные или предложенные в маркировке, предлагаемой для биоаналога, были ранее одобрены для эталонного продукта. Путь введения, дозированная форма и/или сила биоаналога являются такими же, как у эталонного продукта, и биоаналог изготавливается, обрабатывается, упаковывается или хранится на предприятии, которое соответствует стандартам, призванным обеспечивать безопасность, чистоту и эффективность биоаналога. Биоаналог может включать незначительные модификации в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным продуктом, такие как N- или C-концевые усечения, которые, как ожидается, не изменят эффективность биоаналога.

В контексте данного документа «кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота» может означать нуклеиновые кислоты (молекулу РНК или ДНК), которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодированная последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивида или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту.

В контексте данного документа «комплементарная последовательность» или «комплементарность» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая характеризуется Уотсон-Криковским (например, A-T/U и C-G) или Хугстеновским спариванием оснований между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

«Консенсус» или «консенсусная последовательность», как используется в данном документе, означает полипептидную последовательность, основанную на анализе выравнивания нескольких последовательностей для одного и того же гена из разных организмов. Могут быть получены последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют консенсусную полипептидную последовательность. Иммуногенные композиции, содержащие белки, включающие консенсусные последовательности, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие белки, могут быть использованы для индуцирования широкого иммунитета против антигена.

В контексте данного документа термины «электропорация», «электропермеабилитация» или «электрокинетическое усиление» («ЭП») используются взаимозаменяемо и могут относиться к применению трансмембранного импульса электрического поля для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране; при

этом их наличие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, кРНК, лекарственные средства, ионы и вода, переходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

«Фрагмент», как используется в данном документе в отношении последовательностей нуклеиновой кислоты, означает последовательность нуклеиновой кислоты или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который вступает в перекрестную реакцию с антигеном, раскрываемым в данном документе. Фрагменты могут быть фрагментами ДНК, выбранными по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют фрагменты белка, изложенные ниже. Фрагменты могут включать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% одной или более из последовательностей нуклеиновой кислоты, изложенных ниже. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты могут включать по меньшей мере 20 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 30 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 40 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 50 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 60 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 70 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 80 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 90 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 100 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 150 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 200 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 250 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 300 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 350 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 400 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 450 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 500 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 550 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 600 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 650 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 700 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 750 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 800 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 850 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 900 нуклеотидов или больше, по меньшей мере 950 нуклеотидов или больше, или по меньшей мере 1000 нуклеотидов или больше по меньшей мере одной из последовательностей нуклеиновой кислоты, изложенных ниже.

«Фрагмент» или «иммуногенный фрагмент» в отношении полипептидной последовательности означает полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который вступает в перекрестную реакцию с антигеном, раскрываемым в данном документе. Фрагменты могут представлять собой полипептидные фрагменты, выбранные из по меньшей мере одной из различных аминокислотных последовательностей, изложенных ниже. Фрагмент консенсусных белков могут включать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% консенсусного белка. В

некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты консенсусных белков могут включать по меньшей мере 20 аминокислот или больше, по меньшей мере 30 аминокислот или больше, по меньшей мере 40 аминокислот или больше, по меньшей мере 50 аминокислот или больше, по меньшей мере 60 аминокислот или больше, по меньшей мере 70 аминокислот или больше, по меньшей мере 80 аминокислот или больше, по меньшей мере 90 аминокислот или больше, по меньшей мере 100 аминокислот или больше, по меньшей мере 110 аминокислот или больше, по меньшей мере 120 аминокислот или больше, по меньшей мере 130 аминокислот или больше, по меньшей мере 140 аминокислот или больше, по меньшей мере 150 аминокислот или больше, по меньшей мере 160 аминокислот или больше, по меньшей мере 170 аминокислот или больше, по меньшей мере 180 аминокислот или больше последовательности белка, раскрываемой в данном документе.

В контексте данного документа термин «генетическая конструкция» относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодированная последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивида, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. В контексте данного документа термин «экспрессируемая форма» относится к генетическим конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок, так, чтобы в случае наличия в клетке индивида будет экспрессироваться кодирующая последовательность.

Термин «гомология», как используется в данном документе, относится к степени комплементарности. Это может быть частичная гомология или полная гомология (т. е. идентичность). Частично комплементарная последовательность, которая по меньшей мере частично ингибирует гибридизацию полностью комплементарной последовательности с целевой нуклеиновой кислотой, упоминается с использованием функционального термина «по существу гомологичная». При использовании в отношении последовательности двухнитевой нуклеиновой кислоты, такой как кДНК или геномный клон, термин «по существу гомологичный», как используется в данном документе, относится к зонду, который может гибридизоваться с нитью последовательности двухнитевой нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости. При использовании в отношении последовательности однонитевой нуклеиновой кислоты термин «по существу гомологичный», как используется в данном документе, относится к зонду, который может гибридизоваться с (т. е. комплементарен с) матричной последовательностью однонитевой нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости.

В контексте данного документа «идентичный» или «идентичность» в отношении двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей означает, что эти последовательности имеют определенный процент остатков, которые являются одинаковыми на протяжении определенной области. Процент можно рассчитать путем

оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей на протяжении определенной области, определения числа положений, в которых в обеих последовательностях находятся идентичные остатки, для получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в определенной области и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В случаях, когда две последовательности имеют разную длину, или выравнивание приводит к получению одного или более ступенчатых концов, и определенная область сравнения включает только одну последовательность, остатки одной последовательности при расчете включают в знаменатель, но не в числитель. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентичность можно рассчитывать вручную или используя компьютерный алгоритм для последовательностей, такой как BLAST или BLAST 2.0.

Как используется в данном документе, «INO-3107» относится к иммуногенной композиции двух ДНК-плазмид: ДНК-плазида рGX3024, кодирующая антиген ВПЧ, включающий антигены Е6 и Е7 SynCon® как ВПЧ6, так и ВПЧ11, в комбинации с ДНК-плазмидой рGX6010, кодирующей IL-12 человека. Аминокислотная последовательность антигена ВПЧ, включающего антигены Е6 и Е7 SynCon® как ВПЧ6, так и ВПЧ11, представлена в SEQ ID NO: 1. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антиген ВПЧ, включающий антигены Е6 и Е7 SynCon® как ВПЧ6, так и ВПЧ11, представлена в SEQ ID NO: 2. Последовательность нуклеиновой кислоты ДНК-плазмиды рGX3024 показана в SEQ ID NO: 3. Последовательность ДНК-плазмиды рGX6010 показана в SEQ ID NO: 4. «INO-3107» может дополнительно включать солевой буфер с цитратом натрия. «Лекарственный продукт INO-3107» относится к иммуногенной композиции, содержащей 6,25 мг общей плазмиды/мл (6 мг/мл рGX3024, 0,25 мг/мл рGX6010) в 150 мМ хлориде натрия и 15 мМ цитрате натрия, pH 7.

В контексте данного документа «иммунный ответ» означает активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на внесение антигена. Иммунный ответ может иметь форму клеточного или гуморального ответа, или их обоих.

В контексте данного документа «нуклеиновая кислота», или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид» означают по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных вместе. Иллюстрация одной нити также определяет последовательность комплементарной нити. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает комплементарную нить проиллюстрированной одной нити. Многие варианты нуклеиновой кислоты можно использовать с той же целью, что и данную нуклеиновую кислоту. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает по существу идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные последовательности. Одна нить обеспечивает зонд, который может гибридизироваться с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает зонд, который гибридизируется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одонитевыми или двухнитевыми или могут содержать части как двухнитевой, так и одонитевой последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибрид, в котором нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты можно получать способами химического синтеза или рекомбинантными способами.

В контексте данного документа «функционально связанный» означает, что экспрессия гена находится под управлением промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен 5' (выше) или 3' (ниже) гена, находящегося под его управлением. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между промотором и геном, которым он управляет, в гене, из которого промотор получен. Как известно в уровне техники, допускается вариация этого расстояния без утраты функции промотора.

В контексте данного документа «пептид», «белок» или «полипептид» могут означать связанную последовательность аминокислот и могут быть природными, синтетическими или модификацией, или комбинацией природных и синтетических.

В контексте данного документа «промотор» означает синтетическую или встречающуюся в природе молекулу, которая способна обеспечивать, активировать или повышать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических транскрипционных регуляторных последовательностей для дополнительного повышения экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии их. Промотор также может содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть расположены даже на несколько тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включающих вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференциально в отношении клетки, ткани или органа, в которых происходит экспрессия, или в отношении стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие средства. Репрезентативные примеры промоторов включают промотор бактериофага Т7, промотор бактериофага Т3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор BO40, ранний промотор BO40, промотор BCP-LTR, промотор ЦМВ IE, ранний промотор BO40 или поздний промотор SV 40 и промотор ЦМВ IE.

В контексте данного документа «сигнальный пептид» и «лидерная последовательность» используются взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть присоединена на амино-конце приведенного в данном документе белка. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, как правило, управляют локализацией белка. Применяемые в данном документе сигнальные

пептиды/лидерные последовательности могут облегчать секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется. После секреции из клетки сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от оставшейся части белка, часто называемого зрелым белком. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности присоединены на амино-конце (т. е. N-конце) белка.

В контексте данного документа «по существу комплементарная» означает, что первая последовательность является на по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной комплементарной последовательности второй последовательности на протяжении области из 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, 180, 270, 360, 450, 540 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизируются в жестких условиях гибридизации.

В контексте данного документа «по существу идентичная» означает, что первая и вторая последовательности являются на по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными на протяжении области из 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, 180, 270, 360, 450, 540 или более нуклеотидов или аминокислот, или, в отношении нуклеиновых кислот, если первая последовательность является по существу комплементарной по отношению к комплементарной последовательности второй последовательности.

Используемое в данном документе выражение «субъект, нуждающийся в этом» означает человека или отличное от человека млекопитающее, у которого проявляется один или более симптомов или показателей рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП), и/или у которого диагностировали РРП, и которому необходимо лечение от такового. Во многих вариантах реализации изобретения термин «субъект» может использоваться взаимозаменяемо с термином «пациент». Например, у субъекта-человека может быть диагностирован РРП и/или один или более симптомов или показателей, включая без ограничения охриплость, слабый крик, хронический кашель, проблемы с дыханием, одышку, рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей, пневмонию, дисфагию, стридор, отставание в развитии и/или опухоли дыхательных путей. Например, выражение включает субъектов, которым был поставлен новый диагноз. В некоторых вариантах реализации изобретения выражение включает субъектов, для которых лечение в соответствии с раскрываемыми способами является начальным лечением (например, лечение «первой линии», когда пациент не получал предшествующего системного лечения от РРП). В некоторых вариантах реализации изобретения выражение включает субъектов, для которых лечение в соответствии с раскрываемыми способами является лечением «второй линии», при этом пациент ранее получал лечение терапией «стандарта клинической практики», включая без ограничения хирургическое вмешательство, противовирусную терапию и трахеостомию.

Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» или подобные означают облегчение симптомов, устранение причины симптомов на временной или постоянной основе, задержку или подавление роста опухоли, уменьшение нагрузки опухолевых клеток или опухолевой нагрузки, обеспечение регрессии опухоли, обеспечение уменьшения, некроза и/или исчезновения опухоли, предупреждение рецидива опухоли, предупреждение или подавление злокачественной трансформации и/или увеличение продолжительности выживания субъекта.

Как используется в данном документе, если не указано иное, термин «клинически доказанный» (используемый независимо или для модификации терминов «безопасный» и/или «эффективный») означает, что было доказано клиническим испытанием, при этом клиническое испытание соответствовало стандартам одобрения Управления по контролю за продуктами и лекарствами США, ЕМА или соответствующего национального регулирующего органа. Например, доказательством может служить клиническое(ие) испытание(ия), описанное(ые) в примерах, представленных в данном документе.

Термин «клинически доказанная безопасность» применительно к дозе, режиму введения дозы, лечению или способу с антигеном папилломавируса человека (ВПЧ) (например, антиген ВПЧ, вводимый в виде лекарственного продукта рGX3024 или INO-3107 или их биоаналога) относится к благоприятному соотношению риска и пользы с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью вызванных лечением нежелательных явлений (называемых ВЛНЯ), по сравнению со стандартом клинической практики или другим компаратором. Нежелательное явление представляет собой неблагоприятное медицинское явление у пациента, которому вводили медицинский продукт. Одним из показателей безопасности является частота нежелательных явлений (НЯ), классифицируемых Национальным институтом рака (NCI) в соответствии с Общими критериями токсичности для нежелательных явлений CTCAE v5.0.

Используемые в настоящем документе термины «клинически доказанная эффективность» и «с клинически доказанной эффективностью» в контексте дозы, режима введения дозы, лечения или способа относятся к эффективности конкретной дозы, режима введения дозы или лечения. Эффективность может быть измерена на основании изменения течения заболевания в ответ на средство по настоящему изобретению. Например, антиген папилломавируса человека (ВПЧ) (например, антиген ВПЧ, вводимый в виде лекарственного продукта рGX3024 или INO-3107 или их биоаналога) вводят пациенту в количестве и в течение времени, достаточных для того, чтобы вызвать улучшение, предпочтительно устойчивое улучшение, по меньшей мере одного показателя, отражающего тяжесть нарушения, которое лечат. Для определения достаточности количества и времени лечения могут быть оценены различные показатели, отражающие степень болезни, заболевания или состояния субъекта. К таким показателям относятся, например, клинически признанные показатели тяжести заболевания, симптомы или проявления представляющего интерес нарушения. Степень улучшения обычно определяется врачом, который может сделать это на основании признаков, симптомов,

биопсий или результатов других анализов, а также с помощью опросников, которые даются субъекту, например, опросников качества жизни, разработанных для данного заболевания. Об улучшении может свидетельствовать улучшение индекса активности заболевания, облегчение клинических симптомов или любой другой показатель активности заболевания. Например, антиген папилломавируса человека (ВПЧ) (например, антиген ВПЧ вводимый в виде лекарственного продукта рGX3024 или INO-3107 или их биоаналога) может быть введен для достижения улучшения состояния пациента, связанного с уменьшением частоты хирургических вмешательств по поводу РРП, изменением по шкале оценки стадирования РРП, увеличением интервала между хирургическими вмешательствами, выведением ВПЧ или уменьшением бремени заболевания.

В контексте данного документа «вариант» в отношении нуклеиновой кислоты означает (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную последовательность указанной нуклеотидной последовательности или ее часть; (iii) нуклеиновую кислоту, которая является по существу идентичной указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементарной последовательности; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизируется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементарной последовательностью или последовательностями, по существу идентичными ей. Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по существу идентичной на протяжении полной длины полной геновой последовательности или ее фрагмента. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной на протяжении полной длины геновой последовательности или ее фрагмента.

«Вариант» в отношении полипептида представляет собой полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности за счет вставки, делеции или консервативной замены аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность указанного полипептида. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая является по существу идентичной указанному белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной на протяжении полной длины аминокислотной последовательности или ее фрагмента. Аминокислотная последовательность может быть на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной на протяжении полной длины аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

В контексте данного документа «вектор» означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой вирусный вектор, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или

дрожжевую искусственную хромосому. Вектор может представлять собой ДНК- или РНК-вектор. Вектор может быть самореплицирующимся внехромосомным вектором, и в одном варианте реализации изобретения представляет собой плазмиду экспрессии. Вектор может содержать или включать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

Используемая в данном документе фраза «в комбинации с» означает, что антигены ВПЧ6 Е6 и Е7 и антигены ВПЧ11 Е6 и Е7 вводят субъекту одновременно с введением адъюванта, непосредственно перед или сразу после его введения. В некоторых вариантах реализации изобретения антигены ВПЧ6 Е6 и Е7 и антигены ВПЧ11 Е6 и Е7 вводят в виде совместного состава с адъювантом.

Как используется в данном документе, если не указано иное, термин «клинически доказанный» (используемый независимо или для модификации терминов «безопасный» и/или «эффективный») означает, что было доказано клиническим испытанием, при этом клиническое испытание соответствовало стандартам одобрения Управления по контролю за продуктами и лекарствами США, ЕМА или соответствующего национального регулирующего органа. Например, доказательством может служить клиническое испытание, описанное в примерах, представленных в данном документе.

Термин «клинически доказанная безопасность» применительно к дозе, режиму введения дозы, лечению или способу с антигенами ВПЧ6 Е6 и Е7 и антигенами ВПЧ11 Е6 и Е7 (например, вводимыми в виде рGX3024) в комбинации с адъювантом, таким как IL-12 (например, вводимым в виде рGX6010), относится к благоприятному соотношению риска и пользы с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью вызванных лечением нежелательных явлений (называемых НЯ или ВЛНЯ), по сравнению со стандартом клинической практики или другим компаратором. Нежелательное явление представляет собой неблагоприятное медицинское явление у субъекта, которому вводили медицинский продукт.

Используемые в настоящем документе термины «клинически доказанная эффективность» и «с клинически доказанной эффективностью» в контексте дозы, режима введения дозы, лечения или способа относятся к эффективности конкретной дозы, режима введения дозы или лечения. Эффективность может быть измерена на основании изменения течения заболевания в ответ на средство по настоящему изобретению. Например, комбинацию антигенов ВПЧ6 Е6 и Е7 и антигенов ВПЧ11 Е6 и Е7 (например, вводимых в виде рGX3024) с адъювантом, таким как IL-12 (например, вводимым в виде рGX6010), вводят субъекту в количестве и в течение времени, достаточных для того, чтобы вызвать улучшение, предпочтительно устойчивое улучшение, по меньшей мере одного показателя, отражающего тяжесть нарушения, которое лечат. Для определения достаточности количества и времени лечения могут быть оценены различные показатели, отражающие степень болезни, заболевания или состояния субъекта. К таким показателям относятся, например, клинически признанные показатели тяжести заболевания, симптомы или проявления представляющего интерес нарушения. Степень улучшения обычно

определяется врачом, который может сделать это на основании признаков, симптомов, биопсий или результатов других анализов, а также с помощью опросников, которые даются субъекту, например, опросников качества жизни, разработанных для данного заболевания. Например, комбинация антигенов ВПЧ6 Е6 и Е7 и антигенов ВПЧ11 Е6 и Е7 (например, вводимых в виде рGX3024) с адъювантом, такой как IL-12 (например, вводимым в виде рGX6010), может быть введена для достижения улучшения состояния пациента, связанного с РРП. Об улучшении может свидетельствовать улучшение индекса активности заболевания, облегчение клинических симптомов или любой другой показатель активности заболевания.

В данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, белки, иммуногенные композиции, в том числе вакцины, и способы их применения для индуцирования иммунного ответа и/или предупреждения или лечения РРП. Иммуногенные композиции предпочтительно включают антиген папилломавируса человека (ВПЧ), включающий антигенный домен ВПЧ6 Е6, антигенный домен ВПЧ6 Е7, антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7. Раскрытые иммуногенные композиции являются результатом многофазной стратегии, в которой были созданы модифицированные консенсусные последовательности и осуществлены генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобина. Иммуногенные композиции могут быть использованы для защиты от множества штаммов ВПЧ с лечением, предупреждением и/или защитой тем самым от патологий на основе ВПЧ. В частности, иммуногенные композиции могут быть использованы для предупреждения или лечения патологий на основе ВПЧ6 и/или ВПЧ11. Иммуногенные композиции могут в значительной степени индуцировать иммунный ответ субъекта, которому вводится иммуногенная композиция, с защитой тем самым от инфекции ВПЧ6, инфекции ВПЧ11 или обеих и лечением таковых.

Вакцина может представлять собой ДНК-вакцину, пептидную вакцину или комбинацию ДНК-вакцины и пептидной вакцины. ДНК-вакцина может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может также включать дополнительные последовательности, кодирующие линкерные, лидерные или маркерные последовательности, которые связаны с антигеном ВПЧ пептидной связью. Пептидная вакцина может включать антигенный пептид ВПЧ, антигенный белок ВПЧ, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Комбинированная ДНК- и пептидная вакцина может включать описанную выше последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ и антигенный пептид или белок ВПЧ, при этом антигенный пептид или белок ВПЧ и кодированный антиген ВПЧ имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

Вакцина может вызывать гуморальный иммунный ответ у субъекта, которому вводили вакцину. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может быть специфическим для антигенного домена ВПЧ6 Е6, антигенного домена ВПЧ6 Е7, антигенного домена ВПЧ11 Е6, антигенного домена ВПЧ11 Е7 или любой их комбинации. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может реагировать с антигеном ВПЧ6 Е6, антигеном ВПЧ6 Е7, антигеном ВПЧ11 Е6, антигеном ВПЧ11 Е7 или любой их комбинацией. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован у субъекта, которому вводили вакцину, в приблизительно 1,5 раза - приблизительно 16 раз, в приблизительно 2 раза - приблизительно 12 раз или в приблизительно 3 раза - приблизительно 10 раз. Гуморальный иммунный ответ у субъекта, которому вводили вакцину, может быть индуцирован в по меньшей мере приблизительно 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно 4,5 раза, по меньшей мере приблизительно 5,0 раза, по меньшей мере приблизительно 5,5 раза, по меньшей мере приблизительно 6,0 раза, по меньшей мере приблизительно 6,5 раза, по меньшей мере приблизительно 7,0 раза, по меньшей мере приблизительно 7,5 раза, по меньшей мере приблизительно 8,0 раза, по меньшей мере приблизительно 8,5 раза, по меньшей мере приблизительно 9,0 раза, по меньшей мере приблизительно 9,5 раза, по меньшей мере приблизительно 10,0 раза, по меньшей мере приблизительно 10,5 раза, по меньшей мере приблизительно 11,0 раза, по меньшей мере приблизительно 11,5 раза, по меньшей мере приблизительно 12,0 раза, по меньшей мере приблизительно 12,5 раза, по меньшей мере приблизительно 13,0 раза, по меньшей мере приблизительно 13,5 раза, по меньшей мере приблизительно 14,0 раза, по меньшей мере приблизительно 14,5 раза, по меньшей мере приблизительно 15,0 раза, по меньшей мере приблизительно 15,5 раза или по меньшей мере приблизительно 16,0 раза.

Гуморальный иммунный ответ, индуцированный вакциной, может включать повышенный уровень антител IgG, ассоциированный с субъектом, которому вводили вакцину, по сравнению с субъектом, которому не вводили вакцину. Такие антитела IgG могут быть специфическими для антигена ВПЧ6 Е6, антигена ВПЧ6 Е7, антигена ВПЧ11 Е6, антигена ВПЧ11 Е7 или любой их комбинации. Такие антитела IgG могут реагировать с антигеном ВПЧ6 Е6, антигеном ВПЧ6 Е7, антигеном ВПЧ11 Е6, антигеном ВПЧ11 Е7 или любой их комбинацией. Уровень антител IgG, ассоциированных с субъектом, которому вводили вакцину, может быть повышен в приблизительно 1,5 раза - приблизительно 16 раз, в приблизительно 2 раза - приблизительно 12 раз или в приблизительно 3 раза - приблизительно 10 раз по сравнению с субъектом, которому вакцину не вводили. Уровень антител IgG, ассоциированных с субъектом, которому вводили вакцину, может быть повышен в по меньшей мере приблизительно 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно 3,5 раза, по

меньшей мере приблизительно 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно 4,5 раза, по меньшей мере приблизительно 5,0 раза, по меньшей мере приблизительно 5,5 раза, по меньшей мере приблизительно 6,0 раза, по меньшей мере приблизительно 6,5 раза, по меньшей мере приблизительно 7,0 раза, по меньшей мере приблизительно 7,5 раза, по меньшей мере приблизительно 8,0 раза, по меньшей мере приблизительно 8,5 раза, по меньшей мере приблизительно 9,0 раза, по меньшей мере приблизительно 9,5 раза, по меньшей мере приблизительно 10,0 раза, по меньшей мере приблизительно 10,5 раза, по меньшей мере приблизительно 11,0 раза, по меньшей мере приблизительно 11,5 раза, по меньшей мере приблизительно 12,0 раза, по меньшей мере приблизительно 12,5 раза, по меньшей мере приблизительно 13,0 раза, по меньшей мере приблизительно 13,5 раза, по меньшей мере приблизительно 14,0 раза, по меньшей мере приблизительно 14,5 раза, по меньшей мере приблизительно 15,0 раза, по меньшей мере приблизительно 15,5 раза или по меньшей мере приблизительно 16,0 раза по сравнению с субъектом, которому вакцину не вводили.

Вакцина может вызывать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводили вакцину. Индуцированный клеточный иммунный ответ может быть специфическим для антигена ВПЧ6 Е6, антигена ВПЧ6 Е7, антигена ВПЧ11 Е6, антигена ВПЧ11 Е7 или любой их комбинации. Индуцированный клеточный иммунный ответ может быть реактивным в отношении антигена ВПЧ6 Е6, антигена ВПЧ6 Е7, антигена ВПЧ11 Е6, антигена ВПЧ11 Е7 или любой их комбинации. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать индуцирование Т-клеточного ответа. Индуцированный Т-клеточный ответ может быть реактивным в отношении антигена ВПЧ6 Е6, антигена ВПЧ6 Е7, антигена ВПЧ11 Е6, антигена ВПЧ11 Е7 или любой их комбинации. Индуцированный Т-клеточный ответ может быть полифункциональным. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать индуцирование Т-клеточного ответа, при котором Т-клетки продуцируют интерферон-гамма (IFN- γ). Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать повышенный Т-клеточный ответ, ассоциированный с субъектом, которому вводили вакцину, по сравнению с субъектом, которому не вводили вакцину. Т-клеточный ответ, ассоциированный с субъектом, которому вводили вакцину, может быть повышен в приблизительно 2 раза - приблизительно 30 раз, приблизительно 3 раза - приблизительно 25 раз или приблизительно 4 раза - приблизительно 20 раз по сравнению с субъектом, которому вакцину не вводили. Т-клеточный ответ, ассоциированный с субъектом, которому вводили вакцину, может быть повышен в по меньшей мере приблизительно 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно 5,0 раза, по меньшей мере приблизительно 6,0 раза, по меньшей мере приблизительно 6,5 раза, по меньшей мере приблизительно 7,0 раза, по меньшей мере приблизительно 7,5 раза, по меньшей мере приблизительно 8,0 раза, по меньшей мере приблизительно 8,5 раза, по меньшей мере приблизительно 9,0 раза, по меньшей мере приблизительно 9,5 раза, по меньшей мере

мере приблизительно 10,0 раза, по меньшей мере приблизительно 10,5 раза, по меньшей мере приблизительно 11,0 раза, по меньшей мере приблизительно 11,5 раза, по меньшей мере приблизительно 12,0 раза, по меньшей мере приблизительно 12,5 раза, по меньшей мере приблизительно 13,0 раза, по меньшей мере приблизительно 13,5 раза, по меньшей мере приблизительно 14,0 раза, по меньшей мере приблизительно 14,5 раза, по меньшей мере приблизительно 15,0 раза, по меньшей мере приблизительно 16,0 раза, по меньшей мере приблизительно 17,0 раза, по меньшей мере приблизительно 18,0 раза, по меньшей мере приблизительно 19,0 раза, по меньшей мере приблизительно 20,0 раза, по меньшей мере приблизительно 21,0 раза, по меньшей мере приблизительно 22,0 раза, по меньшей мере приблизительно 23,0 раза, по меньшей мере приблизительно 24,0 раза, по меньшей мере приблизительно 25,0 раза, по меньшей мере приблизительно 26,0 раза, по меньшей мере приблизительно 27,0 раза, по меньшей мере приблизительно 28,0 раза, по меньшей мере приблизительно 29,0 раза, или по меньшей мере приблизительно 30,0 раза по сравнению с субъектом, которому вакцину не вводили.

Вакцина по настоящему изобретению может обладать свойствами, необходимыми для эффективных вакцин, такими как безопасность, так что сама вакцина не вызывает болезни или смерти; защита от болезни, возникающей в результате воздействия живых патогенов, таких как вирусы или бактерии; индуцирование антитела для предупреждения создания клеток; индуцирование защитных Т-клеток против внутриклеточных патогенов; а также обеспечение простоты введения, небольшое число побочных эффектов, биологическая стабильность и низкая стоимость дозы.

Вакцина может дополнительно индуцировать иммунный ответ при введении в различные ткани, такие как мышцы или кожа. Вакцина может также индуцировать иммунный ответ при введении с помощью электропорации или инъекции, подкожно или внутримышечно.

Антиген ВПЧ способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против одного или более штаммов ВПЧ. Таким образом, в данном документе раскрываются антигены ВПЧ, включающие антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11. Антигенный домен ВПЧ6 может располагаться N-терминально или C-терминально по отношению к антигенному домену ВПЧ11.

В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ6 включает антигенный домен ВПЧ6 Е6, его фрагмент или его вариант и антигенный домен ВПЧ6 Е7, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антигенный домен ВПЧ6 Е6 может располагаться N-терминально или C-терминально по отношению к антигенному домену ВПЧ6 Е7. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ6 Е6 может включать эпитоп(ы), что делает его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого может быть индуцирован иммунный ответ. Антигенный домен ВПЧ6 Е6 может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из двух или более штаммов ВПЧ6. Антигенный домен ВПЧ6 Е6 может включать консенсусную последовательность и/или модификацию(ии) для улучшения

экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Kozak для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности антигенного домена ВПЧ6 Е6. Консенсусный антигенный домен ВПЧ6 Е6 может включать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, без ограничения сигнальный пептид иммуноглобулина Е (IgE) или иммуноглобулина (IgG). В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антигенный домен ВПЧ6 Е6 может включать гемагглютининовую (НА) метку. Консенсусный антигенный домен ВПЧ6 Е6 может быть сконструирован для индуцирования более сильных и более широких клеточных и/или гуморальных иммунных ответов по сравнению с соответствующим кодон-оптимизированным антигенным доменом ВПЧ6 Е6. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ6 Е7 может включать эпитоп(ы), что делает его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого может быть индуцирован иммунный ответ. Антигенный домен ВПЧ6 Е7 может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из двух или более штаммов ВПЧ6. Антигенный домен ВПЧ6 Е7 может включать консенсусную последовательность и/или модификацию(ии) для улучшения экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Kozak для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности антигенного домена ВПЧ6 Е7. Консенсусный антигенный домен ВПЧ6 Е7 может включать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, без ограничения сигнальный пептид иммуноглобулина Е (IgE) или иммуноглобулина (IgG). В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антигенный домен ВПЧ6 Е7 может включать гемагглютининовую (НА) метку. Консенсусный антигенный домен ВПЧ6 Е7 может быть сконструирован для индуцирования более сильных и более широких клеточных и/или гуморальных иммунных ответов по сравнению с соответствующим кодон-оптимизированным антигенным доменом ВПЧ6 Е7.

В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ1 включает антигенный домен ВПЧ11 Е6, его фрагмент или его вариант и антигенный домен ВПЧ11 Е7, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антигенный домен ВПЧ11 Е6 может располагаться N-терминально или С-терминально по отношению к антигенному домену ВПЧ11 Е7. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ11 Е6 может включать эпитоп(ы), что делает его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого может быть индуцирован иммунный ответ. Антигенный домен ВПЧ11 Е6 может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из двух или более штаммов ВПЧ11. Антигенный домен ВПЧ11 Е6 может включать консенсусную последовательность и/или модификацию(ии) для улучшения экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов,

оптимизацию РНК, добавление последовательности Kozak для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности антигенного домена ВПЧ11 Е6. Консенсусный антигенный домен ВПЧ11 Е6 может включать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, без ограничения сигнальный пептид иммуноглобулина Е (IgE) или иммуноглобулина (IgG). В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антигенный домен ВПЧ11 Е6 может включать гемагглютининовую (НА) метку. Консенсусный антигенный домен ВПЧ11 Е6 может быть сконструирован для индуцирования более сильных и более широких клеточных и/или гуморальных иммунных ответов по сравнению с соответствующим кодон-оптимизированным антигенным доменом ВПЧ11 Е6. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенный домен ВПЧ11 Е7 может включать эпитоп(ы), что делает его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого может быть индуцирован иммунный ответ. Антигенный домен ВПЧ11 Е7 может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из двух или более штаммов ВПЧ11. Антигенный домен ВПЧ11 Е7 может включать консенсусную последовательность и/или модификацию(ии) для улучшения экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Kozak для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности антигенного домена ВПЧ11 Е7. Консенсусный антигенный домен ВПЧ11 Е7 может включать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, без ограничения сигнальный пептид иммуноглобулина Е (IgE) или иммуноглобулина (IgG). В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антигенный домен ВПЧ11 Е7 может включать гемагглютининовую (НА) метку. Консенсусный антигенный домен ВПЧ11 Е7 может быть сконструирован для индуцирования более сильных и более широких клеточных и/или гуморальных иммунных ответов по сравнению с соответствующим кодон-оптимизированным антигенным доменом ВПЧ11 Е7.

В некоторых аспектах антиген ВПЧ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; иммуногенный фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную иммуногенному фрагменту аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

Фрагменты аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 могут составлять 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 полной длины аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11. Фрагменты аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 могут составлять 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 полной длины аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11. Фрагменты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 могут быть на 100% идентичными полноразмерной эталонной 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 таковых. Фрагменты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 могут составлять 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: 1 или SEQ ID NO: 11, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Фрагмент предпочтительно может включать фрагмент SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более гомологичный SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11, и, кроме того, включает N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при расчете процента гомологии. Фрагменты могут дополнительно включать 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 связаны с фрагментом.

В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 могут содержать 100 или более остатков; в некоторых вариантах реализации изобретения 200 или более остатков; в некоторых вариантах реализации изобретения 300 или более остатков; в некоторых вариантах реализации изобретения 400 или более остатков и в некоторых вариантах реализации изобретения 500 или более остатков.

В некоторых аспектах антиген ВПЧ может включать антигенные домены ВПЧ6 и ВПЧ11, отделенные одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт посттрансляционного расщепления располагается между антигенными доменами ВПЧ6 и ВПЧ11, между антигенными доменами ВПЧ6 Е6 и Е7 и/или между антигенными доменами ВПЧ11 Е6 и Е7. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт трансляционного проскока располагается между антигенными доменами ВПЧ6 и ВПЧ11, между антигенными доменами ВПЧ6 Е6 и Е7 и/или между антигенными доменами ВПЧ11 Е6 и Е7. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт посттрансляционного расщепления и сайт трансляционного проскока

располагаются между антигенными доменами ВПЧ6 и ВПЧ11, между антигенными доменами ВПЧ6 Е6 и Е7 и/или между антигенными доменами ВПЧ11 Е6 и Е7. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт посттрансляционного расщепления представляет собой сайт расщепления фурином. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт трансляционного проскока представляет собой сайт Р2А. В некоторых аспектах иммуногенный белок ВПЧ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

В некоторых аспектах антиген ВПЧ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; иммуногенный фрагмент SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную иммуногенному фрагменту SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

Белки по настоящему изобретению могут быть созданы с использованием хорошо известных методик. В некоторых вариантах реализации изобретения, например, молекулы ДНК, которые кодируют белок по настоящему изобретению, могут быть вставлены в коммерчески доступный вектор экспрессии для применения в системе экспрессии. Полученный белок извлекают из культуры либо путем лизиса клеток, либо из культуральной среды, как это уместно и известно специалистам в данной области. Специалист в данной области может, используя хорошо известные методики, выделить белок, полученный с использованием таких систем экспрессии. Способы очистки белка из природных источников с использованием антител, специфически связывающихся с конкретным белком, описанные выше, могут быть в равной степени применены для очистки белка, полученного способом рекомбинантной ДНК. В дополнение к получению белков рекомбинантными методиками, для получения выделенного, преимущественно чистого белка можно также использовать автоматические пептидные синтезаторы.

Антиген ВПЧ может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антиген слияния ВПЧ6-ВПЧ11, раскрываемый в данном документе. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антигенный домен ВПЧ11, может быть расположена 5' или 3' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей антигенный домен ВПЧ6.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ6, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ6 Е6, может быть расположена 5' или 3' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6 Е7.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ11, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ11 Е6, может быть расположена 5' или 3' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ11 Е7.

В некоторых аспектах нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные домены антигена ВПЧ, могут быть отделены нуклеотидными последовательностями, кодирующими один или более сайтов посттрансляционного расщепления, один или более сайтов трансляционного проскока или и те, и другие. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая сайт посттрансляционного расщепления, располагается между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ6 и ВПЧ11, между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ6 Е6 и Е7, между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ11 Е6 и Е7, или любой их комбинацией. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие сайт трансляционного проскока, располагаются между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ6 и ВПЧ11, между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ6 Е6 и Е7, между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ11 Е6 и Е7, или любой их комбинацией. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидные последовательности, кодирующие сайт посттрансляционного расщепления и сайт трансляционного проскока, располагаются между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ6 и ВПЧ11, между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ6 Е6 и Е7, между нуклеотидными последовательностями, кодирующими антигенные домены ВПЧ11 Е6 и Е7, или любой их комбинацией. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт посттрансляционного расщепления представляет собой сайт расщепления фурином. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт трансляционного проскока представляет собой сайт Р2А.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген ВПЧ, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12; нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12; фрагмент нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12; или нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную фрагменту нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12. 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. Кодированная последовательность, кодирующая N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть связана с фрагментом.

Молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают нуклеотидную последовательность, кодирующую иммуноген(ы), может быть функционально связана с регуляторными элементами. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может также включать дополнительные последовательности, кодирующие линкерные или маркерные последовательности, которые связаны с антигеном пептидной связью.

В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген ВПЧ, представляет собой вектор экспрессии. Вектор экспрессии может представлять собой кольцевую плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. Вектор экспрессии способен управлять экспрессией конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующей клетке-субъекте. Вектор экспрессии может иметь промотор, функционально связанный с кодирующей антиген нуклеотидной последовательностью, которая может быть функционально связана с сигналами терминации. Вектор экспрессии может также содержать последовательности, необходимые для правильной трансляции нуклеотидной последовательности. Вектор экспрессии, содержащий представляющую интерес нуклеотидную последовательность, может быть химерным, что означает, что по меньшей мере один из его компонентов является гетерологичным в отношении по меньшей мере одного из других его компонентов. Экспрессия нуклеотидной последовательности в кассете экспрессии может происходить под контролем конститутивного промотора или индуцибельного промотора, который инициирует транскрипцию только тогда, когда клетка-хозяин подвергается воздействию определенного внешнего стимула. В случае многоклеточного организма промотор также может быть специфическим в отношении конкретных тканей, или органа, или стадии развития.

В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК. Соответственно, в одном варианте реализации изобретения в изобретении предложена молекула РНК, кодирующая один или более представляющих интерес полипептидов. РНК может представлять собой «плюс нить». Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения молекула РНК может транслироваться клетками без необходимости в каких-либо промежуточных этапах репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, применяемая в настоящем изобретении, может иметь 5'-кэп (например, 7-метилгуанозин). Этот кэп может повышать *in vivo* трансляцию РНК. 5'-Нуклеотид молекулы РНК, применимой в настоящем изобретении, может иметь 5'-трифосфатную группу. В кэпированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином посредством 5'-к-5' мостика. Молекула РНК может иметь 3' полиА-хвост. Также она может включать последовательность распознавания полиА-полимеразы

(например, AAUAAA) вблизи 3'-конца. Молекула РНК, применяемая в настоящем изобретении, может быть односторонней. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула РНК может представлять собой голую молекулу РНК. В одном варианте реализации изобретения молекула РНК содержится в векторе.

В одном варианте реализации изобретения РНК имеет 5' и 3'-НТО. В одном варианте реализации изобретения длина 5'-НТО составляет от нуля до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5'- и 3'-НТО, добавляемых к кодирующей области, можно менять разными способами, включая без ограничения конструирование праймеров для ПЦР, которые отжигаются с разными областями НТО. Используя этот подход, специалист в данной области техники может модифицировать длину 5'- и 3'-НТО, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибируемой РНК.

5'- и 3'-НТО могут быть встречающимися в природе, эндогенными 5'- и 3'-НТО для представляющего интерес гена. В качестве альтернативы, последовательности НТО, которые не являются эндогенными для представляющего интерес гена, можно добавлять путем включения последовательностей НТО в прямые и обратные праймеры или путем любых других модификаций матрицы. Применение последовательностей НТО, которые не являются эндогенными для представляющего интерес гена, можно использовать для модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что AU-богатые элементы в последовательностях 3'-НТО могут снижать стабильность РНК. Следовательно, 3'-НТО можно выбирать или конструировать так, чтобы повысить стабильность транскрибируемой РНК на основании свойств НТО, которые хорошо известны в уровне техники.

В одном варианте реализации изобретения 5'-НТО может содержать последовательность Kozak эндогенного гена. В качестве альтернативы, когда 5'-НТО, которая не является эндогенной для представляющего интерес гена, добавляют с помощью ПЦР, как описано выше, консенсусную последовательность Kozak можно переконструировать путем добавления последовательности 5'-НТО. Последовательности Kozak могут повышать эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но не являются необходимыми для всех РНК для обеспечения эффективной трансляции. Необходимость последовательностей Kozak для многих РНК известна в уровне техники. В других вариантах реализации изобретения 5'-НТО может быть получена из РНК-вируса, чей РНК-геном стабилен в клетках. В других вариантах реализации изобретения в 3'- или 5'-НТО можно использовать различные нуклеотидные аналоги, чтобы препятствовать экзонуклеазной деградации РНК.

В одном варианте реализации изобретения РНК имеет как кэп на 5'-конце, так и 3'-поли(А) хвост, которые определяют связывание с рибосомой, инициацию трансляции и стабильность РНК в клетке.

В одном варианте реализации изобретения РНК представляет собой РНК с модифицированными нуклеозидами. РНК с модифицированными нуклеозидами имеет

определенные преимущества относительно немодифицированной РНК, включая, например, повышенную стабильность, низкую или отсутствующую природную иммуногенность и повышенную трансляцию.

Вектор экспрессии может представлять собой кольцевую плазмиду, которая может трансформировать целевую клетку путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, плазида с автономной репликацией с точкой начала репликации). Вектор может представлять собой pVAX, pcDNA3.0, pprovaх или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК, кодирующую антиген и позволяющую клетке транслировать последовательность в антиген, распознаваемый иммунной системой.

Также в данном документе представлена иммуногенная композиция линейной нуклеиновой кислоты или линейная кассета экспрессии («ЛЭК»), которая способна эффективно доставляться субъекту с помощью электропорации и экспрессировать один или более желаемых антигенов. ЛЭК может представлять собой любую линейную ДНК, в которой удален фосфатный остов. ДНК может кодировать один или более антигенов. ЛЭК может включать промотор, интрон, стоп-кодон и/или сигнал полиаденилирования. Экспрессия антигена может контролироваться промотором. ЛЭК может не содержать какие-либо гены устойчивости к антибиотикам и/или фосфатный остов. ЛЭК может не содержать другие нуклеотидные последовательности, не связанные с экспрессией необходимого гена антигена. ЛЭК может быть получена из любой плазмиды, способной линейаризоваться. Плазида может быть способна экспрессировать антиген. Плазида может представлять собой pNP (Пуэрто-Рико/34) или pM2 (Новая Каледония/99). Плазида может представлять собой WLV009, pVAX, pcDNA3.0, или pprovaх, или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК, кодирующую антиген и позволяющую клетке транслировать последовательность в антиген, распознаваемый иммунной системой. ЛЭК может представлять собой pscM2. ЛЭК может представлять собой pscNP. pscNP и pscMR могут быть получены из pNP (Пуэрто-Рико/34) и pM2 (Новая Каледония/99), соответственно.

Вектор может включать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую описанные выше антигены, и может дополнительно включать кодон инициации, который может находиться выше последовательности(ей), кодирующей(их) один или более раковых антигенов, и стоп-кодон, который может находиться ниже последовательности(ей), кодирующей(их) описанные выше антигены.

Вектор может иметь промотор. Промотор может быть любым промотором, который способен управлять экспрессией гена и регулировать экспрессию выделенной нуклеиновой кислоты. Такой промотор представляет собой цис-действующий элемент последовательности, необходимый для транскрипции посредством ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая транскрибирует описанную в данном документе последовательность антигена. Выбор промотора, используемого для управления экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты, зависит от конкретного применения. Промотор может быть

расположен приблизительно на таком же расстоянии от начала транскрипции в векторе, как и от сайта начала транскрипции в его естественных условиях. Однако может быть допущена вариация этого расстояния без утраты функции промотора.

Кодон инициации и кодон терминации могут находиться в рамке с кодирующей(ими) последовательностью(ями) описанных выше антигенов. Вектор также может включать промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью(ями) описанных выше антигенов. Промотор, функционально связанный с кодирующей(ими) последовательностью(ями), может представлять собой промотор из вируса обезьян 40 (ВО40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (ВОММ), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор длинного концевой повтора (ДКП) бычьего вируса иммунодефицита (БВИ), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ВЛП), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как немедленно-ранний промотор ЦМВ, промотор вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) или промотор вируса саркомы Рауса (ВСР). Промотор также может представлять собой промотор из гена человека, например, актина человека, миозина человека, гемоглобина человека, мышечного креатинина человека или металлотионеина человека. Промотор также может представлять собой тканеспецифический промотор, такой как промотор, специфический для мышц или кожи, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US20040175727, содержание которой в полном своем объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Вектор также может включать сигнал полиаденилирования, который может находиться ниже последовательности(ей), кодирующей(их) описанные выше антигены и/или антитела. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования ВО40, сигнал полиаденилирования ДКП, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (БГР), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (чГР) или сигнал полиаденилирования человеческого β -глобина. Сигнал полиаденилирования ВО40 может представлять собой сигнал полиаденилирования из вектора pCER4 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния).

Вектор также может включать энхансер описанных выше антигенов. Энхансер может быть необходим для экспрессии. Энхансер может представлять собой энхансер актина человека, миозина человека, гемоглобина человека, мышечного креатинина человека или вирусный энхансер, например, одного из ЦМВ, FMDV, ВСР или ВЭБ.

Вектор может включать энхансер и интрон с функциональными сайтами донора и акцептора сплайсинга. Вектор может содержать область терминации транскрипции ниже структурного гена для обеспечения эффективной терминации. Область терминации может быть получена из того же гена, что и последовательность промотора, или может быть получена из разных генов.

Вектор может также включать элементы или реагенты, которые препятствуют его интеграции в хромосому. Вектор также может содержать точку начала репликации

млекопитающего для внехромосомного поддержания вектора и продуцирования множества копий вектора в клетке. Вектор может представлять собой pVAX1, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (Сан-Диего, Калифорния), которые могут содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, что может обеспечить эписомальную репликацию с большим числом копий без интеграции. Вектор может представлять собой pVAX1 или вариант pVAX1 с изменениями, такими как вариант плазмиды, описанный в данном документе. Вариант плазмиды pVax1 представляет собой вариант плазмиды на осто́ве вектора pVAX1 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) из 2998 пар оснований. Промотор ЦМВ располагается на основаниях 137-724. Промотор/сайт прайминга T7 располагается на основаниях 664-683. Сайты множественного клонирования располагаются на основаниях 696-811. Сигнал полиаденилирования ГР крупного рогатого скота располагается на основаниях 829-1053. Ген устойчивости к канамицину располагается на основаниях 1226-2020. Начало pUC располагается на основаниях 2320-2993.

На основании последовательности pVAX1, доступной в Invitrogen, в последовательности pVAX1 обнаружены следующие мутации:

C>G241 в промоторе ЦМВ;

C>T 1942 осто́ва, ниже сигнала полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (бГР полиА);

A> - 2876 осто́ва, ниже гена устойчивости к канамицину;

C>T 3277 в точке начала репликации pUC (Ori), высококопийная мутация (см. Nucleic. Acid. Research 1985);

G>C 3753 в самом конце Ori pUC выше сайта RNaseH.

Пары оснований 2, 3 и 4 в осто́ве выше промотора ЦМВ заменены с АСТ на СТГ.

Остов вектора может представлять собой pAV0242. Вектор может быть вектором аденовируса типа 5 (Ad5) с дефектом репликации.

Вектор также может включать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии гена в клетке млекопитающего или человека, в которую вводят вектор. Антигенные последовательности, раскрываемые в данном документе, могут включать кодон, который может обеспечивать более эффективную транскрипцию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

Вектор может представлять собой pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), который может быть использован для получения белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Вектор также может представлять собой pYES2 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), который может быть использован для получения белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Вектор также может представлять собой полную бакуловирусную систему экспрессии MAXBAC™ (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которую можно использовать для получения белка в клетках насекомых. Вектор также может представлять собой pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, Сан-Диего, штат Калифорния), который можно использовать для получения белка в клетках млекопитающего, например,

клетках яичника китайского хомячка (CHO). Вектор может относиться к векторам или системам экспрессии для получения белка с помощью общепринятых методик и легкодоступных исходных материалов, включая упомянутые в Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989), включенной в данный документ посредством ссылки в полном своем объеме.

Типичная ДНК-плазида включает SEQ ID NO: 3.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут включать антиген ВПЧ по настоящему изобретению, рекомбинантную вакцину, включающую нуклеотидную последовательность, которая кодирует антиген ВПЧ по настоящему изобретению, живой аттенуированный патоген, который кодирует антиген ВПЧ по настоящему изобретению и/или включает антиген ВПЧ по настоящему изобретению; убитый патоген, включающий антиген ВПЧ по настоящему изобретению; или композицию, такую как липосома или субъединичная вакцина, которая включает антиген ВПЧ по настоящему изобретению. Настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтическим композициям, например, без ограничения к инъекционным фармацевтическим композициям, которые включают раскрываемые иммуногенные композиции.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут быть составлены с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают подходящий перенос, доставку, переносимость и т. п. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой функциональные молекулы, такие как среды-носители, носители или разбавители.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой облегчающее трансфекцию средство, которое может включать поверхностно-активные средства, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию средства.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой адъювант. В некоторых аспектах представлены композиции и вакцины, включающие антиген ВПЧ по настоящему изобретению в комбинации с адъювантом. Адъювант может представлять собой другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде или которые доставляются в виде белков в комбинации с антигеном ВПЧ по настоящему изобретению. Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из α -интерферона (IFN- α), β -интерферона (IFN- β), γ -интерферона, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермального фактора роста (EGF), кожного привлекающего Т-клетки хемокина (STACK), эпителиального экспрессируемого в вилочковой железе хемокина (TECK), мукозального эпителиального

хемокина (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, включая IL-15 с делетированной сигнальной последовательностью и необязательным содержанием сигнального пептида из IgE. Адьювант может представлять собой IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), TNF, TNF, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, PD-1, IL-10, IL-12, IL-18 или их комбинацию.

Другие гены, которые могут быть применимыми в качестве адьювантов, включают гены, кодирующие MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, 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, фактор роста фибробластов, IL-7, IL-22, фактор роста нервов, фактор роста сосудистого эндотелия, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа интерферонов, NFκB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

В некоторых вариантах реализации изобретения адьювант представляет собой интерлейкин-12 (IL-12). IL-12 может быть включен в вакцину в форме своих субъединиц p35 и p40. Адьювант IL-12 можно вводить субъекту в виде его субъединиц p35 и p40. Субъединицы p35 и p40 IL-12 могут кодироваться одним и тем же вектором экспрессии или отдельными векторами экспрессии. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, может быть такой же или отличаться от молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген ВПЧ6, слитый с антигеном ВПЧ11. В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, включает нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 6; нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; фрагмент нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную фрагменту нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, может включать нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 8; нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичную нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; фрагмент

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% гомологична фрагменту нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, может включать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5; нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; фрагмент нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; или нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична фрагменту нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, может включать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7; нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7; фрагмент нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7; или нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична фрагменту нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах реализации описанных иммуногенных композиций композиция включает pGX3024 и pGX6010. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция представляет собой INO-3107.

Как используется в данном документе, «буфер» относится к забуференному раствору, который устойчив к изменениям уровня pH благодаря действию его кислотно-основных сопряженных компонентов. Буфер обычно имеет уровень pH от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,0, например, от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер является солевым буфером с цитратом натрия (SSC). В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых иммуногенная композиция включает вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ, как описано выше, иммуногенная композиция включает 6 мг/мл вектора в буфере, например, без ограничения буфере SSC. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция включает 6 мг/мл ДНК-плазмиды pGX3024 в буфере. В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых иммуногенная композиция дополнительно включает отдельный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе, иммуногенная композиция включает 0,25 мг/мл отдельного вектора в буфере. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция включает 0,25 мг/мл ДНК-плазмиды pGX6010 в буфере в дополнение к вектору,

включающему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ (например, рGX3024).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению составляют согласно используемому способу введения. В случаях, когда фармацевтические композиции являются инъекционными фармацевтическими композициями, они стерильны, не содержат пирогенов и частиц. Предпочтительно используют изотонический состав. В целом, добавки для обеспечения изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. В некоторых случаях предпочтительны изотонические растворы, такие как забуференный фосфатом солевой раствор. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. В некоторых вариантах реализации изобретения в состав добавляют сосудосуживающее средство.

Также в данном документе представлены способы лечения, защиты от и/или предупреждения заболевания у нуждающегося в этом субъекта путем введения субъекту вакцины по настоящему изобретению. Введение вакцины субъекту может вызывать или индуцировать иммунный ответ у субъекта. Таким образом, предоставлены способы индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества антигена ВПЧ по настоящему изобретению с индуцированием тем самым иммунного ответа.

Кроме того, представлены способы профилактической или терапевтической иммунизации субъекта против ВПЧ6, ВПЧ11 или обоих, включающие введение субъекту эффективного количества антигена ВПЧ по настоящему изобретению с индуцированием тем самым иммунного ответа против ВПЧ6, ВПЧ11 или обоих. Также представлены способы лечения или предупреждения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП) у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества антигена ВПЧ по настоящему изобретению с лечением или предупреждением тем самым РРП.

Индукцированный иммунный ответ может быть использован для лечения, предупреждения и/или защиты от заболевания, например, патологий, связанных с инфекцией ВПЧ. В некоторых вариантах реализации изобретения представлены способы лечения, защиты от и/или предупреждения РРП у нуждающегося в этом субъекта путем введения антигена ВПЧ по настоящему изобретению субъекту. Индуцированный иммунный ответ обеспечивает субъекту, которому вводится вакцина, устойчивость к одному или более штаммам ВПЧ. Индуцированный иммунный ответ может включать индуцированный гуморальный иммунный ответ и/или индуцированный клеточный иммунный ответ.

Субъект может быть млекопитающим, таким как человек, лошадь, корова, свинья, овца, кошка, собака, кролик, морская свинка, крыса или мышь.

Доза вакцины может составлять от 1 мкг до 10 мг общей плазмиды на инъекцию, предпочтительно 6,25 мг общей плазмиды на инъекцию. Вакцину можно вводить каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

30 или 31 сутки. Число доз вакцины для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Вакцину можно вводить профилактически или терапевтически. При профилактическом введении вакцины могут вводиться в количестве, достаточном для индуцирования иммунного ответа. При терапевтических применениях вакцины вводят нуждающемуся в этом субъекту в количестве, достаточном для индуцирования терапевтического эффекта. Количество, достаточное для достижения этой цели, определяют как «терапевтически эффективную дозу». Количество, эффективное для такого применения, будет зависеть, например, от конкретной композиции режима вводимой вакцины, пути введения, стадии и тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента, а также от мнения врача, назначающего лечение.

Вакцина может быть введена способами, хорошо известными в уровне техники, как описано у Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner et al. (патент США № 5580859, выданный 3 декабря 1996 года); Felgner (патент США № 5703055, выданный 30 декабря 1997 года); и Carson et al. (патент США № 5679647, выданный 21 октября 1997 года), все содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном своем объеме. ДНК в вакцине может образовывать комплекс с частицами или гранулами, которые могут быть введены индивиду, например, с использованием вакцинного пистолета. Специалисту в данной области известно, что выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого соединения, зависит, например, от пути введения вектора экспрессии.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанных способов субъекту вводят pGX3024 и pGX6010. В некоторых вариантах реализации изобретения pGX3024 и pGX6010 вводят субъекту в виде INO-3107. В некоторых вариантах реализации изобретения pGX3024 и pGX6010 вводят субъекту в виде лекарственного продукта INO-3107, содержащего 6,25 мг общей плазмиды/мл (6 мг/мл pGX3024, 0,25 мг/мл pGX6010) в 150 mM хлориде натрия и 15 mM цитрате натрия, pH 7.

Вакцина может быть доставлена различными путями. Типичные пути доставки включают парентеральное введение, например, внутривенную, внутримышечную или подкожную доставку. Другие пути включают пероральное введение, интраназальный и интравагинальный пути. Что касается ДНК в вакцине, в частности, вакцина может быть доставлена в интерстициальные пространства тканей человека (Felgner et al., патенты США №№ 5580859 и 5703055, все содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном своем объеме). Вакцина также может быть введена в мышцу, или может быть введена посредством внутривенных или подкожных инъекций, или трансдермально, например, путем ионтофореза. Также может применяться эпидермальное введение вакцины. Эпидермальное введение может включать механическое или химическое раздражение наружного слоя эпидермиса для стимулирования иммунного ответа на раздражитель (Carson et al., патент США №

5679647, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном своем объеме).

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения вакцину доставляют индивиду для модулирования активности иммунной системы индивида и, таким образом, усиления иммунного ответа против ВПЧ для лечения РРП. Когда молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген ВПЧ по настоящему изобретению, поглощается клетками индивида, нуклеотидная последовательность экспрессируется в клетках, и таким образом белок доставляется индивиду. Представлены способы доставки кодирующих последовательностей белка на молекуле нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид, как части рекомбинантных вакцин и как части аттенуированных вакцин, в виде выделенных белков или белков, входящих в состав вектора.

Способы включают введение субъекту антигена ВПЧ по настоящему изобретению. В некоторых аспектах способы включают стадию введения представленных молекул нуклеиновой кислоты с последующей электропорацией.

Раскрытые методы могут включать введение множества копий одной молекулы нуклеиновой кислоты, например, одной плазмиды, или множества копий двух или более различных молекул нуклеиновой кислоты, например, двух или более различных плазмид. Например, способы могут включать введение двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более различных молекул нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения раскрытые способы индуцирования иммунного ответа или способы предупреждения или лечения РРП дополнительно включают введение субъекту адъюванта. В некоторых вариантах реализации изобретения адъювант представляет собой IL-12. IL-12 может быть включен в вакцину в форме своих субъединиц p35 и p40. Адъювант IL-12 можно вводить субъекту в виде его субъединиц p35 и p40. Субъединицы p35 и p40 IL-12 могут кодироваться одним и тем же вектором экспрессии или отдельными векторами экспрессии. В одном варианте реализации изобретения кодирующая последовательность p35 IL-12 показана в SEQ ID NO: 5. В одном варианте реализации изобретения субъединица p35 IL-12 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6. В одном варианте реализации изобретения кодирующая последовательность p40 IL-12 показана в SEQ ID NO: 7. В одном варианте реализации изобретения субъединица p40 IL-12 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор экспрессии представляет собой pGX6012 или pGX6010. В некоторых вариантах реализации изобретения способы обладают клинически доказанной безопасностью, клинически доказанной эффективностью или и той, и другой.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает одновременное введение (a) иммуногенной композиции, включающей антиген ВПЧ, как раскрывается в данном документе, и (b) композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более субъединиц IL-12 (например, p35 и/или p40), раскрываемых в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает

введение композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более субъединиц IL-12 (например, p35 и/или p40), раскрываемых в данном документе, после предварительного введения композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ, раскрываемый в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает введение композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ, раскрываемый в данном документе, после предварительного введения композиции, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более субъединиц IL-12 (например, p35 и/или p40), раскрываемых в данном документе.

Пути введения включают без ограничения внутримышечный, интраназальный, внутрибрюшинный, внутрикожный, подкожный, внутривенный, внутриартериальный, внутриглазной и пероральный, а также местный, трансдермальный, ингаляционный или с помощью суппозитория или в слизистую ткань, например, путем промывания вагинальной, ректальной, уретральной, буккальной и подъязычной ткани. Предпочтительные пути введения включают внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрикожную и подкожную инъекцию. Генетические конструкции могут вводиться с помощью средств, включая без ограничения способы и устройства электропорации, традиционные шприцы, устройства для безыгольных инъекций или «устройства для бомбардировки микрочастицами».

Вакцина может быть введена посредством электропорации, например, способом, описанным в патенте США № 7664545, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Электропорацию можно осуществлять способом и/или аппаратом, описанным в патентах США №№ 6302874; 5676646; 6241701; 6233482; 6216034; 6208893; 6192270; 6181964; 6150148; 6120493; 6096020; 6068650 и 5702359, содержания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном своем объеме. Электропорация может осуществляться с помощью минимально инвазивного устройства.

Минимально инвазивное устройство для электропорации («МИУ») может представлять собой аппарат для инъектирования описанной выше вакцины и ассоциированной жидкости в ткань организма. Устройство может включать полую иглу, кассету с ДНК и средства доставки жидкости, при этом устройство приспособлено для приведения в действие средств доставки жидкости при применении таким образом, чтобы одновременно (например, автоматически) инъектировать ДНК в ткань организма во время введения иглы в указанную ткань организма. Преимущество этого способа заключается в том, что возможность постепенного инъектирования ДНК и ассоциированной жидкости во время введения иглы приводит к более равномерному распределению жидкости по ткани организма. Боль, испытываемая во время инъекции, может быть уменьшена за счет распределения ДНК, инъектируемой на большую площадь.

МИУ может инъектировать вакцину в ткань без применения иглы. МИУ может инъектировать вакцину в виде небольшого потока или струи с такой силой, что вакцина

пробивает поверхность ткани и проникает в нижележащие ткань и/или мышцу. Сила, создающая небольшой поток или струю, может быть обеспечена расширением сжатого газа, например, углекислого газа, через микроотверстие в течение доли секунды. Примеры минимально инвазивных устройств для электропорации и способы их применения описаны в опубликованной заявке на патент США № 20080234655; в патентах США №№ 6520950; 7171264; 6208893; 6009347; 6120493; 7245963; 7328064 и 6763264, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

МИУ может включать инжектор, создающий высокоскоростную струю жидкости, которая безболезненно прокалывает ткань. Такие безыгольные инжекторы являются коммерчески доступными. Примеры безыгольных инжекторов, которые могут быть использованы в данном случае, включают инжекторы, описанные в патентах США №№ 3805783; 4447223; 5505697 и 4342310, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Желаемая вакцина в форме, подходящей для прямого или непрямого электропереноса, может быть введена (например, инъецирована) с помощью безыгольного инжектора в ткань, подлежащую лечению, обычно путем контакта поверхности ткани с инжектором таким образом, чтобы инициировать подачу струи средства с силой, достаточной для проникновения вакцины в ткань. Например, если подлежащая лечению ткань является слизистой, кожей или мышцей, средство направляют на поверхность слизистой или кожи с силой, достаточной для проникновения средства через роговой слой и в дермальные слои или в нижележащие ткань и мышцы, соответственно.

Безыгольные инжекторы хорошо подходят для доставки вакцин во все типы тканей, особенно в кожу и слизистую. В некоторых вариантах реализации изобретения безыгольный инжектор может быть использован для подачи жидкости, содержащей вакцину, на поверхность и в кожу или слизистую субъекта. Репрезентативные примеры различных типов тканей, которые можно лечить с помощью способов по настоящему изобретению, включают поджелудочную железу, гортань, носоглотку, гипотаринкс, ротоглотку, губу, горло, легкое, сердце, почку, мышцу, молочную железу, толстую кишку, предстательную железу, тимус, яичко, кожу, слизистую ткань, яичник, кровеносные сосуды или любую их комбинацию.

МИУ может иметь игольчатые электроды, которые электропорируют ткань. Генерирование импульсов между несколькими парами электродов в матрице электродов, например, расположенных в прямоугольных или квадратных конфигурациях, обеспечивает улучшенные результаты по сравнению с генерированием импульсов между парой электродов. Например, в патенте США № 5702359 под названием «Игольчатые электроды для опосредованной доставки лекарственных средств и генов» представлена матрица игл, в котором множество пар игл могут возбуждаться импульсами во время терапевтического лечения. В этой заявке, которая включена в данный документ посредством ссылки как полностью изложенная, иглы расположены в круговой матрице, но имеют соединители и коммутационное устройство, позволяющее генерировать

импульсы между противоположными парами игольчатых электродов. Можно использовать пару игольчатых электродов для доставки рекомбинантных векторов экспрессии в клетки. Такие устройство и система описаны в патенте США № 6763264, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы можно использовать одноигольное устройство, которое обеспечивает инъекцию ДНК и электропорацию с помощью одной иглы, напоминающей обычную иглу для инъекций, и подавать импульсы более низкого напряжения, чем те, которые подаются используемыми в настоящее время устройствами, что уменьшает ощущения электричества, испытываемые пациентом.

МИУ может включать одну или несколько электродных матриц. Матрицы могут включать две или более игл одинакового или разного диаметра. Иглы могут быть равномерно или неравномерно разнесены друг от друга. Иглы могут быть от 0,005 дюйма до 0,03 дюйма, от 0,01 дюйма до 0,025 дюйма или от 0,015 дюйма до 0,020 дюйма. Диаметр иглы может составлять 0,0175 дюйма. Иглы могут быть расположены на расстоянии 0,5 мм, 1,0 мм, 1,5 мм, 2,0 мм, 2,5 мм, 3,0 мм, 3,5 мм, 4,0 мм или более.

МИУ может состоять из генератора импульсов и двух или более игольчатых инъекторов вакцины, которые доставляют вакцину и импульсы электропорации за один шаг. Генератор импульсов может обеспечивать гибкое программирование параметров импульсов и инъекций с помощью персонального компьютера с флэш-картой, а также полную запись и хранение данных об электропорации и пациенте. Генератор импульсов может подавать различные вольтовые импульсы в течение коротких периодов времени. Например, генератор импульсов может подавать три импульса по 15 вольт длительностью 100 мс. Примером такого МИУ является система Elgen 1000 компании Inovio Biomedical Corporation, которая описана в патенте США № 7 328 064, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

МИУ может представлять собой устройство и систему CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Блю-Белл, Пенсильвания), которая является модульной электродной системой, облегчающей введение макромолекулы, такой как ДНК, в клетки выбранной ткани организма или растения. Модульная система электродов может содержать некоторое количество игольчатых электродов; гиподермическую иглу; электрический соединитель, который обеспечивает проводящее соединение программируемого импульсного контроллера постоянного тока со множеством игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может брать некоторое количество игольчатых электродов, которые находятся на опорной конструкции, и плотно вставлять их в выбранную ткань в организме или растении. Затем макромолекулы доставляют в выбранную ткань через гиподермическую иглу. Программируемый импульсный контроллер постоянного тока активируется, и электрический импульс постоянного тока подается на некоторое количество игольчатых электродов. Подаваемый электрический импульс постоянного тока облегчает внесение макромолекулы в клетку между некоторым количеством электродов. Гибель клеток вследствие перегрева клеток сводится к минимуму путем

ограничения рассеяния мощности в ткани за счет импульсов постоянного тока. Устройство и система CELLECTRA описаны в патенте США № 7245963, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Устройство CELLECTRA® может представлять собой устройство CELLECTRA 2000® или устройство CELLECTRA® 3PSP. Устройство CELLECTRA® 2000 сконфигурировано производителем для поддержки либо ID (внутрикожного), либо IM (внутримышечного) введения. CELLECTRA™ 2000 включает генератор импульсов CELLECTRA™, соответствующий аппликатор, одноразовую стерильную матрицу и одноразовую оболочку (только для ID). ДНК-плазмиду доставляют отдельно посредством инъекции иглой и шприцем в область, очерченную электродами, непосредственно перед процедурой электропорации.

МИУ может представлять собой систему Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals). Система Elgen 1000 может включать устройство, обеспечивающее полую иглу; и средства доставки жидкости, при этом аппарат приспособлен для приведения в действие средств доставки жидкости при использовании таким образом, чтобы одновременно (например, автоматически) инъектировать жидкость, описанную в данном документе вакцину, в ткань организма во время введения иглы в указанную ткань организма. Преимущество заключается в возможности постепенного инъектирования жидкости во время введения иглы, что приводит к более равномерному распределению жидкости по ткани организма. Также считается, что боль, испытываемая во время инъекции, уменьшается благодаря распределению объема инъектируемой жидкости по большей площади.

Кроме того, автоматическая инъекция жидкости облегчает автоматический контроль и регистрацию фактической дозы инъектированной жидкости. При желании эти данные могут быть сохранены блоком управления для целей документирования.

Следует понимать, что скорость инъекции может быть либо линейной, либо нелинейной, и что инъекцию можно осуществлять после того, как иглы были введены через кожу субъекта, подлежащего лечению, и во время их дальнейшего введения в ткань организма. Подходящие ткани, в которые жидкость может быть инъектирована аппаратом по настоящему изобретению, включают опухолевую ткань, кожу или мышечную ткань.

Аппарат также включает средства введения иглы для направления введения иглы в ткань организма. Скорость инъекции жидкости контролируется скоростью введения иглы. Преимущество этого заключается в том, что и введение иглы, и инъекцию жидкости можно контролировать таким образом, чтобы при необходимости скорость введения соответствовала скорости инъекции. Это также облегчает работу пользователя с аппаратом. При необходимости можно предусмотреть средства для автоматического введения иглы в ткани организма.

Пользователь может выбрать момент начала инъекции жидкости. В идеале, однако, инъекция начинается, когда кончик иглы достигает мышечной ткани, и аппарат может включать средства для определения того, когда игла была введена на достаточную глубину для начала инъекции жидкости. Это означает, что инъекция жидкости может быть запрограммирована на начало автоматически, когда игла достигнет желаемой

глубины (обычно это глубина, на которой начинается мышечная ткань). Глубина, на которой начинается мышечная ткань, может быть, например, принята за заданную глубину введения иглы, например, значение 4 мм, что считается достаточным для прохождения иглы через слой кожи.

Средства определения могут включать в себя ультразвуковой зонд. Средства определения могут включать в себя средства для определения изменения импеданса или сопротивления. В этом случае средство может не регистрировать глубину погружения иглы в ткани организма, а быть приспособленным для определения изменения импеданса или сопротивления по мере продвижения иглы из другого типа тканей организма в мышцы. Любая из этих альтернатив обеспечивает относительно точное и простое в эксплуатации средство определения того, что можно начинать инъекцию. При необходимости глубина введения иглы может быть записана и может быть использована для контроля инъекции жидкости, например, объем инъецируемой жидкости определяется в процессе записи глубины введения иглы.

Аппарат может дополнительно включать основание для поддержки иглы и корпус для размещения в нем основания, при этом основание выполнено с возможностью перемещения относительно корпуса, так что игла втянута внутрь корпуса, когда основание находится в первом заднем положении относительно корпуса, и игла выходит из корпуса, когда основание находится во втором переднем положении внутри корпуса. Это выгодно для пользователя, поскольку корпус может быть расположен на коже пациента, а затем иглы могут быть введены в кожу пациента путем перемещения корпуса относительно основания.

Как указано выше, желательно достичь контролируемой скорости инъекции жидкости, чтобы жидкость равномерно распределялась по длине иглы при введении ее в кожу. Средства подачи жидкости могут включать средства привода поршня, приспособленные для впрыска жидкости с контролируемой скоростью. Средства привода поршня могут, например, приводиться в действие сервоприводом. Однако средства привода поршня могут приводиться в действие при перемещении основания в осевом направлении относительно корпуса. Следует понимать, что для подачи жидкости могут быть предусмотрены альтернативные средства. Так, например, вместо системы шприца и поршня может быть обеспечен закрытый контейнер, который можно сжимать для подачи жидкости с контролируемой или неконтролируемой скоростью.

Описанный выше аппарат может быть использован для любого типа инъекций. Однако предполагается, что он будет особенно применим в области электропорации, поэтому он может дополнительно включать средства для подачи напряжения на иглу. Это позволяет использовать иглу не только для инъекций, но и в качестве электрода во время электропорации. Это особенно выгодно, так как означает, что электрическое поле прикладывается к той же области, что и вводимая жидкость. Традиционно при электропорации существует проблема, заключающаяся в том, что очень трудно точно совместить электрод с ранее инъецированной жидкостью, поэтому пользователи склонны

инъектировать больший объем жидкости, чем требуется, на большую площадь и прикладывать электрическое поле на большую площадь, чтобы попытаться гарантировать перекрытие между инъектируемым веществом и электрическим полем. С использованием настоящего изобретения можно уменьшить как объем инъектируемой жидкости, так и величину приложенного электрического поля при достижении хорошего соответствия между электрическим полем и жидкостью.

Далее в данном документе представлены наборы, которые могут быть использованы для лечения субъекта с использованием описанных выше способов вакцинации. Наборы могут включать вакцину. Наборы также могут включать инструкции по проведению описанного выше способа вакцинации и/или по использованию набора. Инструкции, включенные в наборы, могут быть прикреплены к упаковочному материалу или могут быть включены в виде листка-вкладыша в упаковке. Хотя инструкции обычно представляют собой письменные или печатные материалы, они не ограничиваются ими. Настоящее изобретение предусматривает любой носитель, способный хранить и передавать их конечному пользователю. К таким носителям относятся без ограничения электронные носители информации (например, магнитные диски, пленки, картриджи), оптические носители (например, CD-ROM) и т. п. В контексте данного документа термин «инструкции» может включать адрес интернет-сайта, в котором представлены инструкции.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вариант реализации изобретения 1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген папилломавируса человека (ВПЧ), при этом антиген ВПЧ включает антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11.

Вариант реализации изобретения 2. Молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту реализации изобретения 1, где антигенный домен ВПЧ6 представляет собой антиген слияния ВПЧ6 Е6-Е7.

Вариант реализации изобретения 3. Молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту реализации изобретения 1 или 2, где антигенный домен ВПЧ11 представляет собой антиген слияния ВПЧ11 Е6-Е7.

Вариант реализации изобретения 4. Молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, где антиген ВПЧ включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; или аминокислотную последовательности, на по меньшей мере 95% гомологичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

Вариант реализации изобретения 5. Молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, включающая

нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 95% гомологичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12;

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2; или

нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

Вариант реализации изобретения 6. Молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ11, располагается 5' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6.

Вариант реализации изобретения 7. Молекула нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, где антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

Вариант реализации изобретения 8. Молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту реализации изобретения 2, где антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

Вариант реализации изобретения 9. Молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту реализации изобретения 4, где антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

Вариант реализации изобретения 10. Вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из предыдущих вариантов реализации изобретения.

Вариант реализации изобретения 11. Вектор экспрессии согласно варианту реализации изобретения 10, включающий ДНК-плазмиду.

Вариант реализации изобретения 12. Вектор экспрессии согласно варианту реализации изобретения 10, включающий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

Вариант реализации изобретения 13. Иммуногенный белок, включающий антигенный домен папилломавируса человека (ВПЧ) 6 и антигенный домен ВПЧ11.

Вариант реализации изобретения 14. Иммуногенный белок согласно варианту реализации изобретения 14, где антигенный домен ВПЧ6 включает антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7.

Вариант реализации изобретения 15. Иммуногенный белок согласно варианту реализации изобретения 13 или 14, где антигенный домен ВПЧ11 включает антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7.

Вариант реализации изобретения 16. Иммуногенный белок согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-15, включающий

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; или

аминокислотную последовательности, на по меньшей мере 95% гомологичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

Вариант реализации изобретения 17. Иммуногенный белок согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-16, где антигенный домен ВПЧ11 располагается N-терминально по отношению к антигену ВПЧ6.

Вариант реализации изобретения 18. Иммуногенный белок согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-17, где антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

Вариант реализации изобретения 19. Иммуногенный белок согласно варианту реализации изобретения 14, где антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

Вариант реализации изобретения 20. Иммуногенный белок согласно варианту реализации изобретения 15, где антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

Вариант реализации изобретения 21. Вакцина, включающая молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9 или вектор экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Вариант реализации изобретения 22. Фармацевтическая композиция, включающая молекулу нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9 или вектор экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Вариант реализации изобретения 23. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 22, включающая адъювант.

Вариант реализации изобретения 24. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 23, где адъювант включает интерлейкин-12 (IL-12).

Вариант реализации изобретения 25. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 24, где IL-12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты.

Вариант реализации изобретения 26. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 25, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, представляет собой вектор экспрессии.

Вариант реализации изобретения 27. Вакцина, включающая иммуногенный белок согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20.

Вариант реализации изобретения 28. Фармацевтическая композиция, включающая иммуногенный белок согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Вариант реализации изобретения 29. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 28, включающая адъювант.

Вариант реализации изобретения 30. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 29, где адъювант включает интерлейкин-12 (IL-12).

Вариант реализации изобретения 31. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 23 или 29, где адъювант включает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе.

Вариант реализации изобретения 32. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 31, где нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р35 IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

Вариант реализации изобретения 33. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 31 или 32, где нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р40 IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8.

Вариант реализации изобретения 34. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов реализации изобретения 31, 32 или 33, где нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 4.

Вариант реализации изобретения 35. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов реализации изобретения 31-34, где молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе, представляет собой вектор экспрессии.

Вариант реализации изобретения 36. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 35, где вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе, является тем же вектором экспрессии или вектором экспрессии, отличающимся от вектора экспрессии, включающего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ.

Вариант реализации изобретения 37. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов реализации изобретения 22-26 или 28-36, где фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество включает буфер, необязательно солевой буфер с

цитратом натрия, необязательно буфер, включающий 150 мМ хлорид натрия и 15 мМ цитрат натрия, уровень pH 7.

Вариант реализации изобретения 38. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 37, где композиция включает 6 мг вектора, кодирующего антиген ВПЧ, на миллилитр солевого буфера с цитратом натрия и 0,25 мг вектора, кодирующего субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-1 или обе, на миллилитр буфера.

Вариант реализации изобретения 39. Фармацевтическая композиция согласно варианту реализации изобретения 38, где композиция включает 6 мг рGX3024 на миллилитр солевого буфера с цитратом натрия и 0,25 мг рGX6010 на миллилитр буфера.

Вариант реализации изобретения 40. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12, иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20, вакцины согласно варианту реализации изобретения 21 или варианту реализации изобретения 27 или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации изобретения 22-26 или 28-39 с индуцированием тем самым иммунного ответа.

Вариант реализации изобретения 41. Способ профилактической или терапевтической иммунизации субъекта против ВПЧ6 и/или ВПЧ11, включающий введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12, иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20, вакцины согласно варианту реализации изобретения 21 или варианту реализации изобретения 27 или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации изобретения 22-26 или 28-39 с индуцированием тем самым иммунного ответа против ВПЧ6, ВПЧ11 или обоих.

Вариант реализации изобретения 42. Способ лечения или предупреждения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12, иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20, вакцины согласно варианту реализации изобретения 21 или варианту реализации изобретения 27 или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации изобретения 22-26 или 28-39 с лечением или предупреждением тем самым РРП.

Вариант реализации изобретения 43. Способ согласно варианту реализации изобретения 42, где РРП представляет собой ювенильный РРП или РРП взрослых.

Вариант реализации изобретения 44. Способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 40-43, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12.

Вариант реализации изобретения 45. Способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 40-44, дополнительно включающий введение адъюванта субъекту.

Вариант реализации изобретения 46. Способ согласно варианту реализации изобретения 45, где адъювант представляет собой интерлейкин-12 (IL12).

Вариант реализации изобретения 47. Способ согласно варианту реализации изобретения 46, где IL12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты.

Вариант реализации изобретения 48. Способ согласно варианту реализации изобретения 45, где адъювант включает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе.

Вариант реализации изобретения 49. Способ согласно варианту реализации изобретения 48, где нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р35 IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

Вариант реализации изобретения 50. Способ согласно варианту реализации изобретения 48 или 49, где нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р40 IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8.

Вариант реализации изобретения 51. Способ согласно варианту реализации изобретения 47, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 4.

Вариант реализации изобретения 52. Способ согласно варианту реализации изобретения 47, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, представляет собой вектор экспрессии, необязательно плазмиду.

Вариант реализации изобретения 53. Способ согласно варианту реализации изобретения 52, где плазида представляет собой рGX6010.

Вариант реализации изобретения 54. Способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 40-53, где субъект представляет собой человека.

Вариант реализации изобретения 55. Способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 40-54, где введение включает внутривенную или внутримышечную инъекцию.

Вариант реализации изобретения 56. Способ согласно варианту реализации изобретения 55, где введение дополнительно включает электропорацию.

Вариант реализации изобретения 57. Применение эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12 или иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20 в изготовлении профилактического или лекарственного препарата.

Вариант реализации изобретения 58. Применение эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12 или иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20 в изготовлении профилактического или лекарственного препарата для предупреждения или лечения инфекции вируса папилломы человека (ВПЧ) 6 или ВПЧ11.

Вариант реализации изобретения 59. Применение эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12, иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20, вакцины согласно варианту реализации изобретения 21 или варианту реализации изобретения 27 или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации изобретения 22-26 или 28-39 для предупреждения или лечения инфекции вируса папилломы человека (ВПЧ) 6 или ВПЧ11.

Вариант реализации изобретения 60. Применение эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9, вектора экспрессии согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12, иммуногенного белка согласно любому из вариантов реализации изобретения 13-20, вакцины согласно варианту реализации изобретения 21 или варианту реализации изобретения 27 или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации изобретения 22-26 или 28-39 для предупреждения или лечения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП).

Вариант реализации изобретения 61. Применение согласно варианту реализации изобретения 60, где РРП представляет собой ювенильный РРП или РРП взрослых.

Вариант реализации изобретения 62. Применение согласно любому из вариантов реализации изобретения 57-61, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12.

Вариант реализации изобретения 63. Применение согласно любому из вариантов реализации изобретения 57-62 в комбинации с адъювантом.

Вариант реализации изобретения 64. Применение согласно варианту реализации изобретения 63, где адъювант представляет собой интерлейкин-12 (IL-12).

Вариант реализации изобретения 65. Применение согласно варианту реализации изобретения 64, где IL-12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты.

Вариант реализации изобретения 66. Применение согласно варианту реализации изобретения 65, где адъювант включает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе.

Вариант реализации изобретения 67. Применение согласно варианту реализации изобретения 66, где нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р35 IL-12 включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

Вариант реализации изобретения 68. Применение согласно варианту реализации изобретения 66 или 67, где нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р40 IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8.

Вариант реализации изобретения 69. Применение согласно варианту реализации изобретения 65, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; или нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 4.

Вариант реализации изобретения 70. Применение согласно варианту реализации изобретения 65, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, представляет собой вектор экспрессии, необязательно плазмиду.

Вариант реализации изобретения 71. Применение согласно варианту реализации изобретения 70, где плазида представляет собой рGX6010.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, хотя в них и указаны варианты реализации изобретения, приведены исключительно в иллюстративных целях. Из приведенного выше обсуждения и этих примеров специалист в данной области техники может установить важные характеристики настоящего изобретения и, не выходя за рамки его сути и объема, может осуществлять различные изменения и модификации настоящего изобретения, чтобы адаптировать его под различные потребности и условия. Таким образом, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к проиллюстрированным и

описанным в данном документе станут очевидны для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания. Такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Каждые из патентов США, заявок на патенты США и ссылочных материалов, цитируемых в настоящем раскрытии, тем самым включены в него посредством ссылки в полном своем объеме.

ПРИМЕРЫ

Создание конструкций ДНК иммуногена слияния на основе консенсусных последовательностей ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6/Е7

Консенсусные последовательности ВПЧ6 Е6/Е7 и ВПЧ11 Е6/Е7 создавали с использованием последовательностей, полученных из GenBank. Две точечные мутации вводили в белки ВПЧ6 Е6 и ВПЧ11 Е6 для ингибирования способности связывать и разрушать р53. Одну точечную мутацию вводили в белок ВПЧ6 Е7 и ВПЧ11 Е7 для отмены связывания р130. Последовательности оптимизировали с использованием запатентованного компанией Inovio алгоритма оптимизации генов. На **фигуре 1А** показана схема антигенов, кодируемых в различных плаزمиде ВПЧ6 и/или ВПЧ11. Отдельные антигены разделены сайтом расщепления Р2А для трансляционного проскока и сайтом расщепления фурином для посттрансляционного расщепления последовательности Р2А. ДНК-плазида рGX3024 кодирует консенсусные антигены Е6 и Е7 SynCon® как ВПЧ6, так и ВПЧ11. На **фигуре 1В** представлена карта плазмиды рGX3024.

In vitro трансфекция и анализы вестерн-блоттинга

Экспрессия рGX3024 in vitro. Опосредованную рGX3024 экспрессию антигенов ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6 и Е7 подтверждали с помощью анализа вестерн-блоттинга после трансфекции in vitro клеток НЕК-293Т плазмидой рGX3024. Клетки, трансфицированные плазмидами, кодирующими антигены ВПЧ6 или ВПЧ11 Е6 и Е7 (рGX3021 и рGX3022, соответственно), служили положительными контролями, а клетки, трансфицированные пустым плазмидным остовом (рGX0001), служили отрицательным контролем.

За день до трансфекции клетки НЕК-293Т высевали при 80% конфлюентности в 6-луночные чашки для культуры ткани. На следующий день клетки трансфицировали в соответствии с рекомендациями производителя с помощью 3 мкг плазмидной ДНК с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific). Через сорок восемь часов после трансфекции собирали лизаты клеток и определяли концентрацию белка с помощью анализа с BCA (Quick Start™ Bradford Protein Assay, BioRad). Тридцать микрограмм (30 мкг) клеточных лизатов загружали на 12% акриламидный гель Bis-Tris (Thermo Scientific) и переносили на ПВДФ мембрану. В качестве эталона молекулярной массы загружали Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards (BioRad, № по каталогу 1610377). После переноса блоты промывали в 1х ЗФСР/0,05% Tween-20 и блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре в 1х ЗФСР/0,05% Tween-20/5% Milk, затем зондировали на протяжении ночи

разбавленным антителом против ВПЧ11 Е7 (Genetex) при комнатной температуре на протяжении ночи. На следующий день блоты промывали, затем инкубировали с антителом против IgG мыши с HRP (Bethyl Laboratories) 1:10000 в течение 1 часа при комнатной температуре, затем снова промывали. Для выявления блоты инкубировали в течение 5 минут с субстратом для вестерн-блоттинга ECL Prime (GE Lifesciences/Amersham, № по каталогу RPN2232/89168-782). Блоты визуализировали на Protein Simple FluorChem® с помощью хемилюминесценции. После выявления блоты отделяли путем добавления реагента Restore (ThermoFisher, № по каталогу 21059) в течение 15 минут, затем промывали и зондировали антителом против 2А (EMD Millipore) или антителом против β -актина (Santa Cruz Biotech) и проявляли, как и ранее.

Как показано на **фигуре 2**, белки Е6 и Е7 выявляли в клетках, трансфицированных плазмидой рGX3024 и контрольными плазмидами рGX3021 и рGX3022, но не плазмидой рGX0001 отрицательного контроля. Экспрессию белка Е7 выявляли с использованием коммерчески доступного антитела против ВПЧ11 Е7 (**фигура 2**, левая панель). Белки Е6 выявляли в клетках, трансфицированных рGX3024, но не плазмидой рGX0001 отрицательного контроля. Антиген Е7 выявляли в клетках, трансфицированных плазмидой только антигена ВПЧ6 (рGX3021), а также плазмидой только антигена ВПЧ11 (рGX3022), что указывает на перекрестную реактивность антитела против ВПЧ11 Е7 в отношении антигенов и ВПЧ6, и ВПЧ11 Е7 и позволяет предположить, что полосы, обнаруженные в клетках, трансфицированных рGX3024, представляют экспрессию белков и ВПЧ6, и ВПЧ11 Е7.

После оценки нескольких коммерчески доступных реагентов не удалось идентифицировать антитело, специфически распознающее белки ВПЧ6 или ВПЧ11 Е6. Однако с использованием зонда против ВПЧ11 Е7 выявили две специфические полосы с предсказанной молекулярной массой ~10,7 кДа и ~13 кДа для Е7 и Е7-фурина/Р2А, соответственно, что указывает на частичное расщепление фурином последовательности Р2А в этой системе *in vitro* (**фигура 2**, левая панель). Поэтому экспрессию антигенов Е6 и Е7 можно было выявить с использованием зонда антитела против 2А против частично расщепленных белковых продуктов (**фигура 2**, средняя панель). Полосу, представляющую ~20 кДа Е6-фурина/Р2А, выявляли в рGX3024, но не в трансфицированных контрольной рGX0001 клетках после зондирования антителом против 2А. Кроме того, полосу Е7-фурина/Р2А ~15 кДа выявляли в клетках трансфицированных рGX3024, но не контрольной рGX0001, что совпадает с тем, что было выявлено при использовании зонда антитела против ВПЧ11 Е7.

ELISpot IFN- γ мыши

рGX3024 оценивали на иммуногенность на двух моделях мышей (**фигуры 3-6**). Индуцированные ДНК-вакциной рGX3024 клеточные и гуморальные иммунные ответы характеризовали на модели мышей C57BL/6 в двух независимых исследованиях. Самки мышей C57BL/6 (*n* равняется 5 или 10 на группу в исследовании 1 или исследовании 2, соответственно) получали две иммунизации с интервалом в две недели путем

внутримышечной электропорации (ИМ-ЭП) 20 мкг вакцины рGX3024 или контрольной ДНК-вакцины. Т-клеточные ответы измеряли через одну неделю после второй иммунизации с помощью ELISpot IFN- γ после стимуляции спленоцитов пептидами ВПЧ6/ВПЧ11 Е6 или Е7. После эвтаназии селезенки мышей выделяли и помещали в пробирку, содержащую 5 мл среды R10 (RPMI 1640, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,001% 2-меркаптоэтанола). Спленоциты выделяли путем механического разрушения селезенки с использованием диссоциатора GentleMACS (Miltenyi Biotech), затем фильтровали с использованием 40-мкм клеточного сита (BD Falcon). После центрифугирования ресуспендированный клеточный осадок обрабатывали буфером для лизиса АСК (Lonza) в течение 5 минут для лизиса эритроцитов. Спленоциты промывали в 3ФСР, центрифугировали, ресуспендировали в среде R10 и подсчитывали с использованием Vi-cell (Beckman Coulter). Для оценки антигенспецифических ответов приобретали наборы для ELISpot IFN- γ в компании MabTech (MabTech, № 3321-4APW-10). Предварительно покрытые 96-луночные планшеты промывали в 3ФСР в соответствии с протоколом производителя и блокировали средой R10 в течение 2 часов при комнатной температуре. Выделенные спленоциты ресуспендировали в среде R10 и высевали в трех повторностях по 2×10^5 клеток на лунку. Синтезировали перекрывающиеся 15-мерные пептиды для белков ВПЧ6 Е6 и Е7, а также белков ВПЧ11 Е6 и Е7. Эти пептиды ресуспендировали в ДМСО (Sigma) и объединяли при концентрации ~ 2 мкг/мл на пептид в два пула пептидов на каждый антиген (ВПЧ6 Е6, ВПЧ6 Е7, ВПЧ11 Е6 и ВПЧ11 Е7) для стимуляции клеток. В качестве положительного контроля использовали Concanavalin A (Sigma) при 5 мкг/мл, а в качестве отрицательного контроля использовали полную среду с ДМСО. Планшеты инкубировали в течение минимум 18 часов при 37°C с 5% CO₂. Для проявления планшеты сначала промывали в 3ФСР, затем инкубировали с биотинилированным идентифицирующим антителом против IFN- γ мыши (R4-6A2-биотин) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем после промывки планшеты инкубировали со стрептавидином-ALP (MabTech, № 3321-4APW-10) в течение 1 часа при комнатной температуре. Пятна выявляли с использованием фильтрованного раствора субстрата (BCIP/NBT-plus) в соответствии с инструкцией производителя (MabTech). После высыхания планшетов пятна подсчитывали с использованием автоматического устройства для считывания ELISpot (Cellular Technology). Среднюю единицу формирования пятен (ЕФП) корректировали на 1×10^6 спленоцитов, а антигенспецифические ответы представляли как количество ЕФП IFN- γ на 1×10^6 спленоцитов, превышающее контроль ДМСО.

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические Т-клеточные ответы выявляли у мышей после иммунизации плазмидой рGX3024, но не рGX0001 отрицательного контроля (**фигура 3**). Не наблюдали значительных различий в Т-клеточных ответах у мышей, иммунизированных рGX3024, по сравнению с мышами, иммунизированными рGX3021 и/или рGX3022, как определяли однофакторным ANOVA, апостериорным критерием Тьюки (**фигура 3**). Иммунизация рGX3024 индуцировала Т-клеточные ответы против

антигенов ВПЧ6 Е7, ВПЧ11 Е6 и ВПЧ11 Е7, но не против антигена ВПЧ6 Е6 в этой модели. Инбредные мыши C57BL/6 имеют единственный гаплотип ГКГ (H2b), что может объяснить отсутствие клеточных ответов на ВПЧ6 Е6 в этой модели. Т-клеточные ответы были высоко воспроизводимы в двух независимых исследованиях.

Антитела против антигенов ВПЧ6 и ВПЧ11 Е7 измеряли с помощью ELISA связывания IgG в образцах сыворотки, собранных до иммунизации (неделя 0) и после первой (неделя 2) и второй (неделя 3) иммунизации либо рGX3024, либо плазмидой отрицательного контроля (рGX0001).

ELISA связывания антигена IgG

96-луночные планшеты Nunc™ (Thermo Scientific) с высокой степенью связывания покрывали 0,5 мкг/мл каждого белка (ВПЧ6 Е7 и ВПЧ11 Е7 - Tulip BioLabs) в 1х ЗФСРД (Thermo Scientific) на протяжении ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывали 1х ЗФСР+0,05% Tween-20 и блокировали 3% БСА в ЗФСР+Tween-20 в течение 2 часов при 37°C. Затем планшеты промывали, как и раньше, добавляли серийно разбавленные образцы сывороток и планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Планшеты промывали и инкубировали с разбавлением 1:10000 вторичного антитела против IgG мыши или кролика с HRP (Bethyl Laboratories, Inc) в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли в них 100 мкл/лунка субстрата SureBlue TMP (KPL 5120-0077). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунка TMB Stop Solution (KPL 5150-0021) после 6-минутной инкубации и планшеты считывали на устройстве для считывания планшетов Biotek Synergy при длине волны 450 нм.

ВПЧ6 Е7-связывающие антитела выявляли у мышей, иммунизированных рGX3024, но не в рGX0001, после первой и второй иммунизации (**фигура 4**, левая панель). В целом, ВПЧ11 Е7-связывающие антитела были снижены по сравнению с ВПЧ6 Е7-связывающими антителами у иммунизированных мышей; однако ВПЧ11 Е7-связывающие антитела были выше после двух иммунизаций (неделя 3) у мышей, иммунизированных рGX3024, по сравнению с рGX0001 (**фигура 4**, правая панель).

Иммуногенность рGX3024 у мышей BALB/c. Как упоминалось ранее, мыши C57BL/6 имеют один гаплотип ГКГ (H2b), что может объяснить отсутствие клеточного ответа на ВПЧ6 Е6 в этой модели. Поэтому клеточные ответы, индуцированные вакциной рGX3024, исследовали на модели мышей BALB/c с другим гаплотипом ГКГ (H2d). Также исследовали влияние дозы рGX3024 и комбинации с плазмидой, кодирующей адъювант мышинового IL-12 (рGX6012). Самки мышей BALB/c (n равняется 6 на группу) получали две иммунизации с интервалом в две недели путем внутримышечной электропорации (ИМ-ЭП), доставляющей 1 мкг, 5 мкг, 10 мкг или 20 мкг ДНК-вакцины рGX3024 отдельно или 5 мкг рGX3024, адъювантированной 2 мкг или 11 мкг плазмиды рGX6012 мышинового IL-12. Мыши, иммунизированные 40 мкг пустой плазмиды рGX0001, служили отрицательными контролями. Т-клеточные ответы измеряли через одну неделю после второй иммунизации с помощью ELISpot IFN-γ после стимуляции спленоцитов пептидами

ВПЧ6/ВПЧ11 Е6 или Е7, как показано на **фигуре 5**. ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические Т-клеточные ответы выявляли у мышей после иммунизации всеми уровнями дозы плазмиды рGX3024, но не рGX0001, в зависимости от дозы. Общие клеточные ответы на ВПЧ6 и ВПЧ11 увеличивались с увеличением дозы рGX3024. В отличие от модели C57BL/6 у иммунизированных рGX3024 мышей BALB/c наблюдали Т-клеточные ответы против антигена ВПЧ6 Е6, а также антигенов ВПЧ6 Е7, ВПЧ11 Е6 и ВПЧ11 Е7. Не наблюдали значительных различий в Т-клеточных ответах у мышей, иммунизированных 5 мкг рGX3024 с любым уровнем дозы рGX6012 или без него, как определяли однофакторным ANOVA, апостериорным критерием Тьюки.

Антитела против антигенов ВПЧ6 и ВПЧ11 Е7 измеряли с помощью ELISA связывания IgG в образцах сыворотки, собранных до иммунизации (неделя 0) и после первой (неделя 2) и второй (неделя 3) иммунизации либо 5 мкг, 10 мкг или 20 мкг ДНК-вакцины рGX3024 отдельно, либо 5 мкг рGX3024, адъювантированной 2 мкг плазмиды мышинового IL-12 (рGX6012). Сыворотки мышей, иммунизированных 40 мкг пустой плазмиды рGX0001, служили отрицательными контролями. Уровни антител, связывающих ВПЧ6 Е7 и ВПЧ11 Е7, значительно повышались на неделе 3 по сравнению с неделями 0 у мышей BALB/c, иммунизированных рGX3024, независимо от дозы или наличия плазмиды IL-12, но не у обработанных рGX0001 мышей (**фигура 6**). Уровни антител также значительно повышались после однократной иммунизации (неделя 2) 20 мкг рGX3024 или 5 мкг рGX3024, адъювантированной 2 мкг плазмиды мышинового IL-12. Наблюдали тенденцию к увеличению связывания антител против обоих антигенов при добавлении мышинового IL-12 к 5 мкг рGX3024, особенно в момент времени недели 2.

Исследование иммуногенности на кроликах

INO-3107 (рGX3024 с рGX6010) оценивали на иммуногенность и безопасность на модели кролика.

Новозеландские белые (NZW) кролики (n равняется 5 на группу) получали четыре иммунизации с интервалом в три недели INO-3107 (6 мг рGX3024 и 0,25 мг рGX6010, совместно составленных в 1 мл 1X SSC) или 1 мл 1X SSC (отрицательный контроль) путем внутримышечной (IM) инъекции в четырехглавую мышцу с последующей электропорацией (ЭП) с использованием устройства для электропорации CELLECTRA® 2000. Клеточный и гуморальный иммунные ответы оценивали с помощью ELISpot IFN- γ и ELISA связывания IgG, соответственно, до иммунизации (неделя 0) и через две недели после каждой иммунизации (недели 2, 5, 8 и 11). Физиологические параметры, включая массы тела, гематологию, химический анализ сыворотки крови и общий внешний вид, отслеживали на протяжении всего исследования как показатели безопасности вакцины и здоровья животных.

Клеточные ответы у кроликов оценивали с помощью анализа ELISpot IFN- γ после стимуляции с помощью МКПК с пептидами ВПЧ6/ВПЧ11 Е6 и Е7. Пробирки SepMate-15 мл заполняли 3,5 мл градиента Ficoll-Paque и обеспечивали их уравнивание при комнатной температуре. Цельную кровь собирали в пробирки с К2ЭДТА, затем несколько

раз переворачивали для перемешивания. Кровь разбавляли сбалансированным солевым раствором Хэнка (CCPX) и медленно наслаивали поверх градиента Ficoll-Paque в пробирках SepMate. Пробирки центрифугировали, собирали светлые слои кровяного сгустка и помещали в свежую 15-мл пробирку. Клетки промывали, разбавляя средой R10 (RPMI 1640, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,001% 2-меркаптоэтанола). Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса ACK (Lonza) для лизиса эритроцитов и инкубировали при комнатной температуре в течение 4 минут. МКПК промывали, центрифугировали и ресуспендировали в среде R10 и подсчитывали с использованием Vi-cell (Beckman Coulter). Для оценки антигенспецифических ответов использовали наборы для ELISpot IFN- γ кролика (MabTech (MabTech, № 3110-4HPW-10)). Планшеты готовили в соответствии с протоколом производителя и кроличьи МКПК высевали в трех повторностях по 2×10^5 клеток на лунку. Для стимуляции клеток использовали перекрывающиеся 15-мерные пептиды для белков Е6 и Е7 из ВПЧ6 и ВПЧ11. Форбол-12-миристат-13-ацетат и иономицин (PMA/I) (Sigma) и среда, содержащая ДМСО, служили положительным и отрицательным контролем, соответственно. Планшеты инкубировали в течение минимум 18 часов при 37°C с 5% CO₂. На следующий день планшеты проявляли в соответствии с протоколом производителя и после высыхания планшетов подсчитывали пятна с использованием автоматического устройства для считывания ELISpot (Cellular Technology). Среднюю единицу формирования пятен (ЕФП) корректировали на 1×10^6 спленоцитов, а антигенспецифические ответы представляли как количество ЕФП IFN- γ на 1×10^6 спленоцитов, превышающее контроль ДМСО.

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические Т-клеточные ответы выше исходного уровня выявляли у всех кроликов после иммунизации INO-3107, но не у кроликов, обработанных 1X SSC. Т-клеточные ответы на ВПЧ6 и ВПЧ11 были усиленными, поскольку они повышались после каждой последующей иммунизации (**фигура 7**). Иммунизация INO-3107 вызывала Т-клеточные ответы против антигенов ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6, но не против антигенов ВПЧ6 или ВПЧ11 Е7 в этой модели (**фигура 8**).

Гуморальные ответы против антигенов ВПЧ6 и ВПЧ11 Е7 измеряли с помощью ELISA связывания IgG в образцах сывороток, собранных до и через две недели после каждой иммунизации. Временная динамика уровней антител показана на **фигуре 9**. Связывающие ВПЧ6 или ВПЧ11 Е7 антитела выявляли у 4 из 5 кроликов, иммунизированных INO-3107, но не у кроликов, которым вводили 1X SSC. В целом, связывающие ВПЧ6 Е7 антитела были снижены по сравнению со связывающими ВПЧ11 Е7 антителами у иммунизированных кроликов. Данные ELISpot и ELISA вместе взятые подтверждают иммуногенность всех антигенов, кодируемых INO-3107, в модели кролика.

В дополнение к INO-3107-опосредованным иммунным ответам физиологические параметры, включая массы тела, гематологию, химический анализ сыворотки крови и общий внешний вид, отслеживали на протяжении всего исследования как показатели безопасности вакцины и здоровья животных. У кроликов, которым вводили INO-3107, не

наблюдали значительных различий в массах тела или изменений массы тела с течением времени (**фигура 10**). Также в ходе исследования не обнаруживали никаких изменений при мониторинге общего внешнего вида (нос, глаза, шерсть, движения) ни у одной из получавших лечение групп. Образцы для гематологического и клинико-химического анализов сыворотки крови собирали до иммунизации и на неделе 5, неделе 8 и неделе 11 после иммунизации, а результаты представляли для независимой экспертизы клиническому ветеринарному патологоанатому (IDEXX BioAnalytics). По сравнению с исходными значениями введение INO-3107 привело к умеренному увеличению количеств лимфоцитов на неделе 5 (но не на неделе 8 и неделе 11) у кроликов NZW. Других гематологических или клинико-химических показателей сыворотки крови при введении INO-3107, указывающих на биологически значимый эффект, не выявляли.

Оценка внутрикожной (ID) доставки у кролика

Для оценки клеточных иммунных ответов выполняли исследование внутрикожной (ID) инъекции у кроликов NZW. Кроликов NZW (n равняется 5) иммунизировали три раза с интервалами в три недели с помощью INO-3107, составленным с 1 мг pGX3024 в 0,1 мл 1X SSC, путем ID доставки. ELISpots IFN- γ кролика, описанный ранее, выполняли до первой вакцинации и на неделях 2, 5 и 8. Комбинированный иммунный ответ на оба антигена, ВПЧ6 и ВПЧ11, повышался после каждой иммунизации, при этом Т-клеточные ответы были более специфичными в отношении ВПЧ6 Е6 и ВПЧ11 Е6 (**фигура 13**).

Оценка внутрикожной (ID) доставки на модели морской свинки

Морские свинки Hartley (n равняется 5) с интервалом в две недели получали три иммунизации pGX3024 (0,1 мг, составленном в 0,1 мл 1X SSC) внутрикожной (ID) инъекцией с последующей электропорацией (EP) с использованием устройства для электропорации CELLECTRA® 2000. Не получавшие лечение морские свинки служили отрицательным контролем (n равняется 2). Клеточный и гуморальный иммунные ответы оценивали с помощью ELISpot IFN- γ и ELISA связывания IgG, соответственно, до иммунизации (неделя 0) и через две недели после каждой иммунизации (недели 2, 4 и 6).

Содержание животных, иммунизацию и сбор образцов проводили в Acculab Life Sciences (Сан-Диего, Калифорния) по одобренному IACUC протоколу в соответствии с Законом о благополучии животных, политикой PHS, руководством AAALACi, USDA и другими федеральными законами и правилами, касающимися животных и экспериментов с их участием. Все анализы образцов проводили в компании Inovio (Сан-Диего, Калифорния). pGX3024 составляли в 1X SSC для конечного количества 0,1 мг в 0,1 мл дозирующего раствора и хранился при 2-8°C до применения. Самок морских свинок Хартли в возрасте 8 недель рандомизировали на 2 группы по 5 или 2 животных в каждой в соответствии с таблицей 1. Каждую процедуру обработки проводили путем внутрикожной (ID) инъекции Манту 100 мкл дозируемого раствора в кожу с последующей электропорацией с использованием устройства CELLECTRA 2000® Adaptive Constant Current Electroporation с решеткой 3P (Inovio Pharmaceuticals) в соответствии с протоколом производителя.

Таблица 1. План исследования

Номер группы (n)	Плазмида	Число участков инъекции (s)/расположение/Тх	Устройство для ЭП и способ инъекции	Объем инъекции (мкл)	Доза ДНК/плазмида (мкг)
1 (5)	pGX3024	1/ID	CELLECTRA 3P	100	100
2 (2)	Ранее не получавшие лечение	-	-	-	-

Животные группы 1 получили в общей сложности три иммунизации с интервалом в две недели. Образцы сыворотки крови собирали у всех животных для оцениваний гуморальной иммуногенности на неделе 0, неделе 2, неделе 4 и неделе 6. Образцы цельной крови собирали у всех животных для оцениваний клеточной иммуногенности на неделе 2, неделе 4 и неделе 6.

ELISpot IFN- γ у морских свинок. ELISpot IFN- γ у морских свинок проводили в соответствии со способами, описанными в Schultheis, et al., J Vis Exp. 2019;(143):10.3791/58595, опубликованной 20 января 2019 года, doi:10.3791/58595. Периферическую кровь брали из яремной вены каждого анестезированного животного и сразу же переносили в пробирки для сбора крови с ЭДТА. Кровь разбавляли 1:1 забуференным фосфатом солевым раствором. Разбавленную кровь наслаивали на Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences) в пробирках SepMate™ (Stemcell) и центрифугировали (1200 g, 10 минут, 24°C). МКПК ресуспендировали в среде R10 при 1×10^6 клеток/мл и высевали по 100 мкл/лунка в 96-луночные планшеты Millipore IP (Millipore), предварительно покрытые 5 мкг/мл первичного антитела V-E4 против IFN- γ (предоставленного д-ром Шафером, Институт Роберта Коха, Берлин, Германия), блокированного средой R10. В клетки добавляли по 100 мкл пулов пептидов ВПЧ6 Е6, ВПЧ6 Е7, ВПЧ11 Е6 или ВПЧ11 Е7 или стимуляторов форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА)/лономицина. Образцы анализировали в трех повторностях. После инкубации в увлажненном 5% CO₂ при 37°C в течение 18 часов клетки удаляли путем промывки и добавляли по 100 мкл на лунку 2 мкг/мл биотинилированного вторичного антитела N-G3 против IFN- γ , разбавленного блокирующим буфером. После 2-часовой инкубации и промывки добавляли конъюгированный со щелочной фосфатазой стрептавидин (MabTech) в количестве 100 мкл на лунку на 1 час при комнатной температуре. После промывок лунки инкубировали в течение 6-12 минут при комнатной температуре со 100 мкл на лунку субстрата реагента для выявления нитросинего тетразолия/5-бromo-4-хлор-3'-индолифосфата (БХИФ/НСТ) (MabTech). Положительные пятна интерферона-гамма визуализировали, анализировали и подсчитывали с помощью устройства для считывания планшетов CTL-Immunospot® S6 ELISPOT и программного обеспечения CTL-Immunospot®. Антиген-специфические ответы определяли путем вычитания количества пятен в лунках, обработанных ДМСО, из числа обработанных пептидами.

Результаты показаны в виде единиц формирования пятен (ЕФП)/10⁶ МКПК отдельных животных, полученных из лунок в трех повторностях. ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические Т-клеточные ответы выше исходного уровня выявляли у морских свинок после иммунизации рGX3024, но не у морских свинок, ранее не получавших лечение (**фигура 11**). Иммунизация рGX3024 вызывала Т-клеточные ответы против антигенов ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6 и Е7 в этой модели (**фигура 11**).

ELISA связывания антигена. 96-луночные планшеты Nunc™ (Thermo Scientific) с высокой степенью связывания покрывали 1 мкг/мл рекомбинантных белков ВПЧ6 Е7 или ВПЧ11 Е7 в 1х забуференном фосфатом солевом растворе Дульбекко (ЗФСРД) (Thermo Scientific) на ночь при 4°C. На следующий день планшеты промывали 1х ЗФСР+0,05% Tween®-20 и блокировали 3% БСА в ЗФСР+0,05% Tween®-20 в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем планшеты промывали, как и раньше, добавляли серийно разбавленные образцы сывороток крови и инкубировали планшеты в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали и инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) вторичным антителом против IgG морской свинки (Sigma) в разбавлении 1:10000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли в них 100 мкл/лунка субстрата SureBlue™ TMB (KPL 5120-0077). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунка TMB Stop Solution (KPL 5150-0021) после 6 инкубации и планшеты считывали на устройстве для считывания планшетов Biotek Synergy при длине волны 450 нм.

Гуморальные ответы против антигенов ВПЧ6 Е7 и ВПЧ11 Е7 измеряли с помощью ELISA связывания IgG в образцах сывороток, собранных до иммунизации и через две недели после каждой иммунизации. Временная динамика уровней антител показана на **фигуре 12**. ВПЧ6 Е7- и ВПЧ11 Е7-связывающие антитела выявляли у морских свинок после иммунизации рGX3024.

Клиническое испытание фазы 1/2. INO-3107 с электропорацией (ЭП) у субъектов с ВПЧ6- и/или ВПЧ11-ассоциированным рецидивирующим респираторным папилломатозом (РРП) [идентификатор согласно ClinicalTrials.gov: NCT04398433]

Это открытое многоцентровое испытание 1/2 фазы для оценки безопасности, переносимости, иммуногенности и эффективности лекарственного продукта INO-3107 у субъектов с ВПЧ6- и/или ВПЧ11-ассоциированным рецидивирующим респираторным папилломатозом (РРП). Лекарственный продукт INO-3107 будут вводить ИМ с последующей ЭП у субъектов в день 0, недели 3, 6 и 9.

В исследование будут включены около 20 взрослых (≥ 18 лет), у которых диагностирован либо ювенильный РРП (J-О РРП), определяемый по возрасту при первом диагнозе < 12 лет, либо РРП взрослых (А-О РРП), определяемый по возрасту при первом диагнозе ≥ 12 лет. Испытуемая популяция разделена на две когорты. Когорта А: участники с диагнозом ювенильного РРП, определяемым по возрасту при первом диагнозе РРП < 12 лет. Когорта В: участники с диагнозом РРП взрослых, определяемым по возрасту при первом диагнозе РРП ≥ 12 лет.

В данном исследовании будет предусмотрен вводный период для оценки безопасности с участием до шести человек с периодом ожидания в одну неделю между каждым включенным участником. Безопасность и переносимость будут оценивать на протяжении всего исследования после установления переносимости. Переносимость будут определять по частоте возникновения ограничивающей дозу токсичности (ОДТ), которая определяется как:

- связанная с лечением негематологическая токсичность ≥ 3 степени по Общим терминологическим критериям нежелательных явлений NCI (СТСАЕ, версия 5.0), которая не отвечает на поддерживающую терапию и продолжается более 48 часов, или

- связанная с лечением гематологическая токсичность ≥ 3 степени по NCI СТСАЕ v5.0, которая не отвечает на поддерживающую терапию и продолжается более 48 часов.

Субъекты пройдут обычную хирургическую процедуру по удалению папилломы(папиллом) в период скрининга в течение 14 дней до введения дозы в день 0 (удаление папилломы и введение дозы в день 0 могут быть проведены в один день, если соблюдены другие критерии соответствия). Биопсийную ткань будут собирать и оценивать для вторичных и исследовательских конечных точек. Будут проводить мониторинг состояния заболевания во время испытания.

Когорта А (участники с ювенильным РПП) получит одну внутримышечную (ИМ) инъекцию 6,25 мг лекарственного продукта INO-3107 с последующей электропорацией (ЭП) с использованием CELLECTRA® 2000 в день 0, неделю 3, неделю 6 и неделю 9. Когорта В (участники с РПП взрослых) получит одну внутримышечную (ИМ) инъекцию 6,25 мг лекарственного продукта INO-3107 с последующей ЭП с использованием CELLECTRA® 2000 в день 0, неделю 3, неделю 6 и неделю 9.

Первичная цель исследования заключается в оценивании безопасности и переносимости лекарственного продукта INO-3107 у субъектов с ВПЧ6- и/или ВПЧ11-ассоциированным РПП. Первичной конечной точкой является безопасность и переносимость, оцениваемые по зарегистрированным нежелательным явлениям (НЯ) и тяжелым нежелательным явлениям (ТНЯ). Первичный показатель результата представляет собой процент участников с нежелательными явлениями (НЯ) и тяжелыми нежелательными явлениями (ТНЯ) [временные рамки: скрининг до недели 52 (до приблизительно 1 года)]. Нежелательное явление (НЯ) представляет собой любое нежелательное явление медицинского характера у участника или участника клинического исследования, которому вводят фармацевтический продукт, и которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с данным лечением. К НЯ может относиться любой неблагоприятный и нежелательный признак (включая аномальные лабораторные результаты), симптом или заболевание, временно связанное с применением лекарственного (исследуемого) продукта, независимо от того, связано это с лекарственным (исследуемым) продуктом или нет. Тяжелое нежелательное явление (ТНЯ) представляет собой любое нежелательное медицинское явление, которое при любой дозе: 1. приводит к смерти; 2. представляет опасное для жизни явление; однако сюда не входит

явление, которое, если бы оно произошло в более тяжелой форме, могло бы привести к смерти; 3. требует госпитализации в стационар или продления текущей госпитализации; 4. приводит к стойкой или значительной инвалидности/нетрудоспособности; 5. приводит к врожденной аномалии или дефекту развития.

Вторичными целями исследования являются:

1. оценивание эффективности лекарственного продукта INO-3107, определяемой по частоте хирургических вмешательств по поводу РРП в течение года после первой дозы исследуемого продукта по сравнению с частотой в течение года до дня 0;
2. оценивание эффективности лекарственного продукта INO-3107 по изменениям в оценке стадирования РРП с течением времени;
3. оценивание клеточного иммунного ответа на лекарственный продукт INO-3107 при введении ИМ с последующей ЭП;
4. оценивание иммуногенности лекарственного продукта INO-3107 по провоспалительным и иммуносупрессивным элементам в резецированной опухолевой ткани на момент начала исследования и, при наличии, при последующих резекциях ткани;
5. оценивание любой потенциальной ассоциации профиля микроРНК (миРНК) с уменьшением частоты хирургического вмешательства по поводу РРП.

Вторичными конечными точками являются:

1. количество хирургических вмешательств по поводу РРП за 52 недели после дня 0 по сравнению с количеством хирургических вмешательств по поводу РРП за год до введения дозы в день 0 [временные рамки: скрининг до недели 52 (до приблизительно 1 года)];
2. изменение в баллах оценки стадирования РРП с течением времени [временные рамки: скрининг, день 0, недели 6, 11, 26, 52 (до приблизительно 1 года)]; балл оценки стадирования РРП будет определяться с использованием модифицированного инструмента стадирования Derka; он включает как субъективную функциональную оценку клинических параметров, так и анатомическую оценку распространения заболевания; анатомическая оценка может затем использоваться в комбинации с функциональной оценкой для измерения клинического течения и ответа на терапию отдельного пациента с течением времени;
3. изменение по сравнению с исходным уровнем величины ответа в твердофазном иммуноферментном анализе интерферона-гамма (ELISpot IFN- γ) для секретирующих IFN- γ клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) [временные рамки: исходный уровень, недели 6, 9, 11, 26, 52];
4. изменение по сравнению с исходным уровнем величины ответа проточной цитометрии для фенотипа Т-клеток и литического потенциала в МКПК [временные рамки: исходный уровень, недели 6, 9, 11, 26, 52];
5. изменение по сравнению с исходным уровнем величины ответа резецированной опухолевой ткани на провоспалительные и иммуносупрессивные элементы [временные

рамки: исходный уровень и при последующих резекциях ткани, до недели 52 (до приблизительно 1 года)];

6. изменение по сравнению с исходным уровнем экспрессии микроРНК (миРНК), связанное с уменьшением частоты хирургического вмешательства по поводу РРП [временные рамки: исходный уровень и неделя 6].

Исследовательскими целями испытания являются:

1. описание вирусологического выведения ВПЧ6 и/или 11 в резецированной ткани, при наличии;
2. оценивание гуморального иммунного ответа на лекарственный продукт INO-3107 при введении ИМ с последующей ЭП;
3. оценивание иммуногенности лекарственного продукта INO-3107 по провоспалительным и иммуносупрессивным элементам в периферической крови;
4. оценивание циркулирующей свободной ДНК ВПЧ (цсДНК ВПЧ) 6/11 в качестве коррелята бремени заболевания и клинических исходов у пациентов с РРП, получавших лечение лекарственным продуктом INO-3107.

Исследовательскими конечными точками являются:

1. выведение ВПЧ6/11 в резецированной ткани по сравнению с исходным уровнем;
2. антиген-специфические гуморальные иммунные ответы, оцениваемые с помощью ELISA;
3. оценивание провоспалительных и иммуносупрессивных элементов в периферической крови и
4. количество цсДНК ВПЧ 6/11 до и после введения лекарственного продукта INO-3107 в качестве коррелята бремени заболевания и клинических исходов у пациентов с РРП, получавших лечение лекарственным продуктом INO-3107.

Оценка эффективности. Для каждого субъекта будет собран подробный анамнез, включающий документальное подтверждение связанного с ВПЧ-6 и/или ВПЧ-11 РРП, перечень хирургических вмешательств и видов терапий по поводу РРП, проведенных в течение 3 лет до скрининга, и любые периоды ремиссии. Для участия в исследовании субъекты должны будут пройти по меньшей мере два хирургических (включая лазерные) вмешательства по поводу РРП в течение года до дня 0 включительно. Субъекты должны нуждаться во вмешательстве по поводу ППР на момент вступления в исследование и пройти хирургическое удаление у них папилломы(папиллом) во время скрининга, в течение 14 дней до введения дозы в день 0 для максимальной стандартизации исходного стадирования субъектов. Оценка эффективности будет основана на количестве хирургических вмешательств по поводу ППР в течение 52 недель после дня 0 по сравнению с количеством хирургических вмешательств по поводу ППР в течение года до введения дозы в день 0. Хирургические вмешательства по поводу РРП включают лазерную терапию. В качестве вторичной конечной точки в испытании также будут оценивать изменения в оценке стадирования ППР с течением времени.

Оценка безопасности. Субъекты будут находиться под наблюдением с момента подписания информированного согласия до недели 52 или последнего визита субъекта. Безопасность лекарственного продукта INO-3107 будут измерять и оценивать в соответствии с СТСАЕ v5.0. Будут оценивать клинически значимые изменения лабораторных параметров и жизненно важных показателей по сравнению с исходными оценками.

Нежелательное явление представляет собой любое нежелательное явление медицинского характера у пациента или субъекта клинического исследования, которому вводят фармацевтический продукт, и которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с данным лечением. Поэтому НЯ может представлять собой любой неблагоприятный и нежелательный признак (включая аномальные лабораторные результаты, например), симптом или заболевание, временно связанное с применением лекарственного продукта, независимо от того, считается ли оно связанным с лекарственным продуктом или нет. Нежелательные явления (НЯ) включают следующие: осложнения до или после лечения, возникшие в результате предусмотренной протоколом процедуры во время или после скрининга (до введения лекарственного средства клинического испытания); любое ранее существовавшее состояние, за исключением состояния, исследуемого в данном исследовании, тяжесть которого усиливается или характер которого изменяется во время или вследствие фазы введения лекарственного средства клинического испытания; осложнения беременности. К нежелательным явлениям (НЯ) не относятся следующие: проведенные медицинские или хирургические процедуры (например, хирургическое вмешательство, эндоскопия, удаление зуба, переливание крови), однако состояние, которое привело к проведению процедуры, является НЯ; ранее имеющиеся заболевания или состояния или лабораторные отклонения, имеющиеся или выявленные до скринингового визита, которые не ухудшились; рецидивы РРП; ситуации, в которых не произошло неблагоприятного медицинского события (например, госпитализация для планового хирургического вмешательства, социальная госпитализация и/или госпитализация ради удобства); передозировка без клинических последствий; любое медицинское состояние или клинически значимое лабораторное отклонение с датой начала до получения информированного согласия не является НЯ; неосложненная беременность; искусственный плановый аборт для прерывания беременности без медицинских показаний.

Нежелательные реакции на лекарственные средства (НРЛ) включают все вредные и нежелательные ответы на лекарственный продукт, связанные с любой дозой. Это означает, что причинно-следственная связь между лекарственным продуктом и нежелательным явлением является по меньшей мере обоснованной возможностью (т. е. связь нельзя исключить).

Тяжелое нежелательное явление (ТНЯ) представляет собой любое нежелательное медицинское явление, которое при любой дозе приводит к смерти; угрожает жизни; требует госпитализации в стационар или продления текущей госпитализации; приводит к

стойкой или значительной инвалидности/недееспособности; приводит к врожденной аномалии или дефекту развития и/или является важным медицинским явлением.

Неожиданная нежелательная реакция на лекарственное средство представляет собой нежелательную реакцию, характер или тяжесть которой не соответствуют информации о применяемом продукте. Неожиданное (тяжелое) нежелательное воздействие изделия (ННВИ) представляет собой любое серьезное нежелательное воздействие на здоровье или безопасность или любую угрожающую жизни проблему или смерть, вызванные изделием или связанные с ним, если это воздействие, проблема или смерть не были ранее определены по характеру, тяжести или степени распространенности в плане или заявке на исследование (включая дополнительные план или заявку), или любую другую непредвиденную тяжелую проблему, связанную с изделием, которая относится к правам, безопасности или благополучию субъектов.

Оценка иммуногенности. В ходе исследования будут изучены гуморальные и опосредованные клетками иммунные ответы в образцах крови, взятых на исходном визите (т. е. при скрининге и в день 0 до введения дозы) и на неделях 6, 9, 11, 26 и 52. Образцы тканей будут собраны на исходном уровне и при наличии клинических показаний в ходе исследования. Тестирование может включать без ограничения ELISA, ELISpot, проточную цитометрию, иммуногистохимию (ИГХ), Nanostring на образцах периферической крови и/или резецированной ткани (начало исследования и рецидив, при наличии).

Профилирование миРНК может проводиться с использованием ткани, полученной при скрининге, в день 0 и при рецидиве. Оценка образцов, взятых в день 0 и при скрининге, позволит изучить алгоритмы прогнозирования ответа на лечение с помощью INO-3107. Образцы, оцениваемые при рецидиве, позволят описать, как изменения в профилях миРНК могут быть связаны с вероятностью рецидива.

Вирусологическая оценка. В ходе испытания будут оценивать наличие ДНК ВПЧ6/11 в образцах тканей и периферической крови до и после исследуемого лечения, как описано.

Основные критерии включения

- Гистологически подтвержденная ВПЧ6- или ВПЧ11-положительная респираторная папиллома или подтверждение положительного ВПЧ низкой степени риска с использованием одобренного спонсором типоспецифического анализа на ВПЧ6/11.
- Требование частого вмешательства по поводу РРП для удаления или резекции респираторной папилломы, что определяется как по меньшей мере 2 хирургических (включая лазерные) вмешательства по поводу РРП в течение года до дня 0 включительно.
- Должен быть подходящим кандидатом для предстоящего хирургического вмешательства по мнению исследователя и по шкале оценки стадирования РРП.
- Адекватная функция костного мозга, печени и почек, определяемая по АКН (абсолютному количеству нейтрофилов) ≥ 1000 клеток/мм³, тромбоцитам ≥ 50000 /мм³, гемоглобину ≥ 9 г/дл; концентрациям общего билирубина в сыворотке крови в пределах

1,5 x верхняя граница нормы (ВГН), АСТ и АЛТ в пределах 1,5 x ВГН, креатинину сыворотки крови $\leq 1,5$ x ВГН.

- Участники должны соответствовать одному из следующих требований:

- о не иметь детородного потенциала (≥ 12 месяцев неиндуцированной терапией аменореи, подтвержденной фолликулостимулирующим гормоном [ФСГ], если не проводится заместительная гормональная терапия);

- о быть хирургически стерильными (вазэктомия у мужчин или отсутствие яичников и/или матки у женщин);

- о согласны применять один высокоэффективный или комбинированный способ контрацепции, частота неудач которого составляет $< 1\%$ в год, в течение периода лечения и по меньшей мере до недели 12 после последней дозы; или

- о согласны воздерживаться от полового акта.

Основные критерии исключения

- Реципиент терапии, направленной на лечение заболевания РРП (кроме хирургического вмешательства или абляции), включающей без ограничения противовирусные препараты (включая цидофовир), радиацию, химиотерапию, антиангиогенную терапию (включая бевацизумаб), профилактическую вакцинацию против ВПЧ (включая гардасил) в качестве терапевтического вмешательства или терапию экспериментальным средством в течение 3 месяцев до дня 0.

- Текущие или недавние (в течение 1 года) признаки аутоиммунного заболевания, которое требовало лечения системными иммуносупрессивными средствами лечения, за исключением витилиго, детской астмы, которая разрешилась, диабета 1 типа, остаточного гипотиреоза, который требует только гормонозаместительной терапии, или псориаза, который не требует системного лечения.

- Диагноз иммунодефицита или лечение системной иммуносупрессивной терапией в течение 28 дней до первой дозы испытываемого лечения, включая системные кортикостероиды.

- Высокий риск кровотечения или необходимость применения антикоагулянтов для контроля известного геморрагического диатеза.

- Реципиент любой содержащей живой вирус вакцины в течение 4 недель до первой дозы испытываемого лечения или любой содержащей неживой вирус вакцины в течение двух недель до первой дозы испытываемого лечения.

- История клинически значимого, нестабильного в медицинском отношении заболевания, которое, по мнению исследователя, может поставить под угрозу безопасность участника, помешать оценке испытания или оцениванию конечной точки, или иным образом повлиять на достоверность результатов испытания (это может включать хроническую почечную недостаточность; ишемию или инфаркт миокарда; сердечное заболевание III/IV класса Нью-Йоркской ассоциации сердца (NYHA)); любые синдромы предвозбуждения сердца (такие как синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта; кардиомиопатия или клинически значимые аритмии); текущее злокачественное

новообразование, за исключением пролеченного базального и плоскоклеточного рака кожи, рака предстательной железы или карциномы шейки матки *in situ*; ВИЧ, который может повлиять на способность к формированию иммунного ответа на терапию исследования; наркотическая или алкогольная зависимость).

- Менее двух приемлемых участков для ИМ инъекции, включая дельтовидную и переднелатеральную четырехглавую мышцы [неприемлемыми участками являются следующие: татуировки, келоиды или гипертрофические рубцы, расположенные в пределах 2 см от предполагаемого участка лечения; кардиовертер-дефибриллятор или кардиостимулятор (для предотвращения угрожающей жизни аритмии), расположенный ипсилатерально к участку инъекции в дельтовидную мышцу (если только кардиолог не сочтет это приемлемым); металлические имплантаты или имплантируемое медицинское устройство в предполагаемом участке лечения].

- Беременность или текущее кормление грудью.

Лечение в рамках клинического испытания. Лекарственный продукт INO-3107 представляет собой исследуемый продукт, который будет использоваться в данном исследовании. Лекарственный продукт INO-3107 содержит ДНК-плазмиду для экспрессии белков E6 и E7 генов ВПЧ11 и ВПЧ6 (pGX3024) и плазмиду экспрессии, экспрессирующую субъединицы человеческого IL-12 (pGX6010). Лекарственный продукт INO-3107 представляет собой прозрачный бесцветный раствор, содержащий 6,25 мг общей плазмиды/мл (6 мг/мл pGX3024, 0,25 мг/мл pGX6010) в 150 мМ хлориде натрия и 15 мМ цитрате натрия, pH 7. Минимальным объемом 1 мл будут заполнены 2-мл прозрачные стеклянные флаконы для внутримышечной инъекции.

Субъектам будут вводить одну инъекцию 6,25 мг лекарственного продукта INO-3107 внутримышечно с последующей ЭП с использованием устройства для ЭП CELLECTRA® 2000 в день 0, неделю 3, неделю 6 и неделю 9.

Анализируемые популяции будут следующими:

- популяция назначенного лечения (НЛ) включает всех субъектов, соответствующих критериям включения;
- популяция модифицированного назначенного лечения (мНЛ) включает всех субъектов, получающих по меньшей мере одну дозу лекарственного продукта INO-3107;
- популяция по протоколу (ПП) включает субъектов, получающих все дозы лекарственного продукта INO-3107 и не имеющих нарушений протокола; субъекты, исключенные из популяции ПП, будут идентифицированы и задокументированы до блокировки базы данных испытания;
- набор для анализа безопасности включает всех субъектов, получающих по меньшей мере одну дозу лекарственного продукта INO-3107.

Оценки иммуногенности периферической крови. Образцы цельной крови и сыворотки крови будут получены на исходном визите (при скрининге и в день 0 до введения дозы) и на неделях 6, 9, 11, 26 и 52. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) будут выделены из образцов цельной крови. Оценка клеточной иммунной

активности может проводиться с помощью анализов применения экспрессии генов, твердофазного иммуноферментного анализа интерферона- γ (ELISpot IFN- γ), а также проточной цитометрии. Дополнительная оценка клеточной иммунной активности может проводиться путем применения проточной цитометрии с целью проведения анализа загрузки литических гранул. В анализе загрузки литических гранул можно исследовать следующие внешние клеточные маркеры: CD3, CD4, CD8 (идентификация Т-клеток), Ki67, CD137, CD38 и CD69 (маркеры активации Т-клеток), а также PD-1 (маркер истощения/активации), Tim-3 и Lag-3. В анализе загрузки литических гранул можно дополнительно анализировать следующие внутриклеточные маркеры: гранзим А, гранзим В, гранулизин и перфорин (белки, участвующие в литической дегрануляции и цитотоксическом потенциале).

Профилирование миРНК будет проводиться с использованием плазмы, полученной при скрининге, в день 0 и на неделе 6. Оценка образцов, взятых в день 0 и при скрининге, позволит изучить алгоритмы прогнозирования ответа на лечение с помощью INO-3107. Образцы, оцениваемые на неделе 6, позволят описать, как изменения в профилях миРНК могут ассоциироваться с окончательным успехом или неудачей лечения.

Стандартный ELISA связывания может быть проведен для измерения ответа антител против HPV6/11, индуцированного лекарственным продуктом INO-3107.

Тестирование на ВПЧ6/11. Цельную кровь будут собирать до введения дозы в день 0, а также на неделях 6, 11, 26 и 52 для измерения цсДНК ВПЧ6/11.

Описание статистических способов

Первичные анализы. Первичными анализами для данного испытания являются анализ безопасности, включающий анализ вызванных лечением нежелательных явлений (ВЛНЯ) и клинически значимых изменений лабораторных параметров безопасности по сравнению с исходным уровнем. В данном испытании под ВЛНЯ понимают любые НЯ, возникшие после дня 0 после введения исследуемого лекарственного средства ((ИМ+ЭП) до 30 дней после последней дозы. Все ВЛНЯ будут суммированы по частоте в популяции анализа безопасности. Эти частоты будут представлены в целом, по классам систем органов и предпочтительно по проценту пораженных субъектов. Дополнительные частоты будут представлены с учетом максимальной тяжести и наиболее тесной связи с лечением исследования. Многократные случаи одного и того же НЯ будут учитываться только один раз в соответствии с подходом наихудшего случая в отношении тяжести и связи с лечением исследования. Основное краткое описание данных по безопасности будет основано на ВЛНЯ. Для этого краткого описания будет рассчитана частота явлений предпочтительной терминологии вместе с 95% доверительными интервалами с использованием точного способа Клоппера-Пирсона. Отдельные краткие описания будут основаны на явлениях, происходящих в течение 7 дней после приема любой дозы и независимо от того, когда они произошли. НЯ и ТНЯ, которые не являются ВЛНЯ или тяжелыми ВЛНЯ, будут представлены в виде перечней.

Для данных о НЯ частичные даты начала будут отнесены к дате начала лечения, чтобы консервативно представить явление как вызванное лечением, если часть даты соответствует дате начала лечения исследования. В противном случае это будет отнесено к самой ранней дате, соответствующей частичной дате. Полностью отсутствующая дата начала будет считаться днем начала лечения. Частичные даты прекращения будут приниматься за самый последний возможный день, соответствующий частичной дате.

Продолжительность НЯ будут рассчитывать как (дата прекращения - дата начала) + 1.

Лабораторные переменные ответа будут дескриптивно обобщены по временным точкам и как изменения по сравнению с исходным уровнем, включая 95% доверительные интервалы. Также будут представлены сдвиги от исходного уровня в соответствии с СТАЕ. Лабораторные значения, считающиеся клинически значимыми, будут представлены в виде перечней.

Все анализы безопасности будут проведены на субъектах набора анализов безопасности.

Анализы будут обобщены и представлены по числу предшествующих хирургических вмешательств (≤ 2 , 3-5 и ≥ 6) и в целом.

Вторичные анализы

Эффективность. Частота хирургических вмешательств по поводу РРП в течение года после первой дозы лекарственного продукта INO-3107 по сравнению с частотой в течение года до введения дозы в день 0 будет дескриптивно обобщена с использованием среднего изменения кратности и 95% ДИ на основе t-распределения. Будут проанализированы изменения в баллах оценки стадирования РРП от исходного уровня до введения дозы до каждой оценки после введения дозы. Будут рассчитаны медианы изменений и соответствующие 95% доверительные интервалы.

Будет изучена взаимосвязь между конечной точкой эффективности и результатами мРНК. Взаимосвязь будут изучать с использованием регрессионных моделей, которые моделируют конечный результат по сравнению с результатами мРНК в качестве переменных регрессора.

Также будут обобщены интервалы между хирургическими вмешательствами. Анализы будут обобщены и представлены по числу предшествующих хирургических вмешательств (≤ 2 , 3-5 и ≥ 6) и в целом. Будет проведен анализ эффективности с использованием популяции мНЛ. Для вспомогательного анализа также будет использована популяция по протоколу.

Иммуногенность. Будут обобщены данные об увеличении по сравнению с исходным уровнем величин ответа в ELISpot интерферона- γ и проточной цитометрии. Будут рассчитаны медианы увеличений и соответствующие 95% доверительные интервалы. Будут обобщены изменения по сравнению с исходным уровнем величин ответа опухолевой ткани. Будут рассчитаны средние увеличения и соответствующие 95% доверительные интервалы на основании t-распределения. Действительными образцами

для целей статистического анализа будут считаться образцы, собранные в течение 7 дней после указанного визита. Исходный уровень определяют как последнее измерение перед первым введением лечения. Для анализа иммуногенности будут использовать популяцию мНЛ. Анализы будут обобщены и представлены по числу предшествующих хирургических вмешательств (≤ 2 , 3-5 и ≥ 6) и в целом.

Исследовательские анализы

Эффективность. Выведение ВПЧ будет обобщено; будет рассчитан процент субъектов, у которых в резецированной опухолевой ткани элиминирован ВПЧ6/11 по сравнению с исходным уровнем. С использованием регрессионных моделей будет изучена взаимосвязь между цсДНК ВПЧ6/11 6/11 до и после введения продукта INO-3107 как коррелята бремени заболевания и клинических исходов у пациентов с РПП. Анализ будет обобщен и представлен по числу предшествующих хирургических вмешательств (≤ 2 , 3-5 и ≥ 6) и в целом.

Иммуногенность. Титры ELISA после исходного уровня будут проанализированы со средними геометрическими. Будут обобщены изменения экспрессии генов в периферической крови по сравнению с исходным уровнем. Анализ будет обобщен и представлен по числу предшествующих хирургических вмешательств (≤ 2 , 3-5 и ≥ 6) и в целом.

Последовательности и идентификаторы последовательностей

>pGX3024 вставка только аминокислотной последовательности без лидерной последовательности IgE <SEQ ID NO: 1>

ESKDASTSATSIDQLCKTFNLSLHTLQIQCVFCRNALTTAEIYAYAYKNLKVVWR
DNFPFAACACCLELQGKINQYRHFNYAAYAPTVEEETNEDILKVLIRCYLCHKPQCEIEK
LKHILGKARFIKLNNQRKGRCLHCWTTMEDLLPRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPHGRLVTLKDIVLDLQPPDPVGLHAYEQLEDSSSEDEVDKVDKQDSQPLTQHYQIL
TCCCGCDSNVRLVVECTDGDRLQDQLLLGTLNIVCPICAPKPRGRKRRSGSGATNFSLL
KQAGDVEENPGPESANASTSATTIDQLCKTFNLSMHTLQINCVFCKNALTTAEIYSYAY
KQLKVLFRGGYPYAAACACCLEFHGKINQYRHFYAGYATTVEEETKQDILDVLRICYLC
HKPQCEVEKVKHILTKARFIKLNCTRKGRCLHCWTTMEDMLPRGRKRRSGSGATNFS
LLKQAGDVEENPGPHGRHVTLKDIVLDLQPPDPVGLHAYEQLVDSSSEDEVDEVDGQDS
QPLKQHYQIVTCCCGCDSNVRLVVQCTETDIREVQQLLLGTNLNIVCPICAPKT

>pGX3024_вставка только без лидерной последовательности IgE <SEQ ID NO: 2>

GAGAGCAAGGATGCCAGCACAAAGCGCCACCAGCATCGACCAGCTTTGCAAG
ACCTTTAACCTGAGCCTGCACACACTTCAGATCCAGTGTGTCTTCTGCCGAAATGCT
CTGACAACAGCAGAAATCTACGCCTACGCCTACAAAAACCTGAAGGTGGTGTGGAG
AGACAACCTTTCCTTTCGCTGCCTGCGCTTGCTGCCTGGAGCTGCAGGGCAAGATCAA
TCAGTACCGGCACTTCAACTACGCTGCCTACGCCCTACAGTGGAGGAGGAAACAA
ACGAAGACATCCTGAAGGTGCTGATCAGATGCTACCTCTGCCACAAGCCACAGTGT
GAAATCGAGAAGCTGAAGCACATTCTGGGCAAGGCCAGATTTATCAAGCTGAACAA
CCAGAGAAAGGGAAGATGTCTGCACTGTTGGACAACCTGCATGGAGGACCTGCTGC

CCAGAGGCAGAAAGAGAAGATCTGGCAGCGGAGCTACCAACTTCTCTCTGCTGAAG
 CAGGCTGGAGATGTTGAGGAGAACCCAGGCCCTCACGGCCGGCTGGTCACCCTGAA
 GGATATCGTGCTGGATCTGCAGCCCCCTGATCCTGTGGGCCTTCACGCCTACGAACA
 GCTGGAGGACAGCTCTGAAGACGAAGTGGACAAGGTGGACAAGCAGGACTCTCAG
 CCTCTGACACAGCACTATCAGATCCTGACCTGCTGCTGCGGCTGTGACTCTAACGTG
 AGACTGGTGGTGGAGTGCACCGATGGAGACATCAGACAGCTGCAGGACCTGCTGCT
 GGGTACCCTGAACATTGTGTGTCTTATCTGTGCTCCAAAGCCAAGAGGCAGGAAAA
 GAAGATCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTCTCCCTGCTGAAGCAAGCTGGAGATGTG
 GAGGAGAACCCTGGCCCTGAGAGCGCCAACGCCAGCACATCCGCCACCACCATCGA
 CCAGCTGTGCAAGACCTTCAACCTGAGCATGCACACACTGCAGATCAACTGTGTCTT
 CTGCAAGAATGCCCTGACCACAGCAGAGATCTACAGCTACGCCTACAAGCAGCTGA
 AGGTGCTGTTTACAGAGGCGGCTACCCTTATGCTGCCTGTGCCTGCTGCCTGGAGTTC
 ACGGCAAGATCAACCAGTACAGACACTTCGACTACGCTGGCTACGCCACCACAGTG
 GAAGAGGAAACAAAGCAGGACATCCTGGACGTGCTGATCCGATGCTACCTGTGCCA
 CAAGCCTCAGTGTGAAGTGGAAAAAGTGAAGCACATCCTGACCAAGGCCAGATTCA
 TCAAGCTGAACTGCACCAGAAAAAGGCAGATGCCTGCACTGCTGGACCACCTGCATG
 GAAGACATGCTGCCTAGAGGCAGAAAAAGAAGAAGCGGCTCTGGAGCCACCAACTT
 TTCCCTGCTGAAACAAGCTGGAGACGTGGAGGAAAACCCTGGCCCTCACGGCAGAC
 ACGTGACACTGAAGGACATCGTGCTGGACCTGCAGCCTCCTGACCCTGTGGGCCTGC
 ACGCCTACGAGCAGCTGGTGGACAGCAGCGAGGACGAAGTGGACGAAGTGGATGG
 CCAGGACAGCCAGCCTCTGAAGCAGCACTACCAGATCGTCACCTGCTGCTGTGGCTG
 TGATAGCAATGTGAGGCTGGTGGTGCAGTGCACAGAAACAGACATCAGAGAAGTGC
 AGCAACTGCTGCTGGGCACCCTGAACATCGTGTGTCCCATCTGTGCTCCCAAGACAT
 GATAA

>pGX3024_полная последовательность <SEQ ID NO: 3>

gctgcttcgcgatgtacgggccagatatacgcttgacattgattattgactagtattaatagtaatacaattacggggtcattagttc
 atagcccatatatggagttccgcttacataacttacggttaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaata
 atgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagttttacggttaactgccacttggcagtacatc
 aagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggttaaatggcccgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactt
 tctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatcggttttggcagtacatcaatggcggtggatagcggtttgactc
 acggggatttccaagtctccacccctattgacgtcaatgggagttttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactcc
 gccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttact
 ggcttatcgaaattaatacgactcactataggagagaccaagctggctagcggttaacttaagcttggtagcagctcggtatccgccaccat
 ggattggacctggattctctttctcgttgcgctgctactcgcgttcattagttagagcaaggatgccagcacaagcgccaccagcatcgacc
 agctttgcaagacctttaacctgagcctgcacacacttcagatccagtggtcttctgccgaaatgctctgacaacagcagaaatctacgccta
 cgcctacaaaaacctgaaggtgggtgtggagagacaactttctttcgtgcctgcgcttgcctggagctgcaggggcaagatcaatcagt
 accggcacttcaactacgtgcctacgccccctacagtggaggaggaaacaaacgaagacatcctgaagtgctgatcagatgctacctctg
 ccacaagccacagtgtgaaatcgagaagctgaagcacattctgggcaaggccagatttatcaagctgaacaaccagagaaaagggaagat
 gtctgcactgttgacaacctgcatggaggacctgctgccagaggcagaaagagaagatctggcagcggagctaccaacttctctctgct
 gaagcaggctggagatgttgaggagaaccaggccctcacggccgctggtcacctgaaggatactgtctggatctgcagccccctg

atcctgtgggccttcacgcctacgaacagctggaggacagctctgaagacgaagtggacaaggtggacaagcaggactctcagcctctga
cacagcactatcagatcctgacctgctgctgctgctgctgactctaacgtgagactgggtggaggagtgaccgatggagacatcagacagct
gcaggacctgctgctgggtacctgaacattgtgtgctctatctgtgctccaaagccaagaggcaggaaaaagaagatccggcagcggagc
caccaatttctccctgctgaagcaagctggagatgtggaggagaaccctggccctgagagcgccaacgccagcacatccgccaccacca
tcgaccagctgtgcaagacctcaacctgagcatgcacacactgcagatcaactgtgtcttctgcaagaatgccctgaccacagcagagatc
tacagctacgcctacaagcagctgaaggtgctgttcagaggcggctacccttatgctgacctgtgctgctgaggttccacggcaagat
caaccagtacagacacttcgactacgctggctacgccaccacagtgggaaggaaacaaagcaggacatcctggacgtgctgatccgat
gctacctgtgccacaagcctcagtggtgaagtggaaaaagtgaagcacatcctgaccaaggccagattcatcaagctgaactgcaccagaa
aaggcagatgcctgcactgctggaccacctgcatggaagacatgctgctagaggcagaaaaagaagaagcggtctggagccacca
cttttccctgctgaacaagctggagacgtggaggaacccctggccctcacggcagacacgtgacactgaaggacatcgtgctggacct
gcagcctctgacctgtgggcctgcacgcctacgagcagctgggtggacagcagcaggacgaagtggacgaagtggatggccagga
cagccagcctctgaagcagcactaccagatcgtcacctgctgctggtgtgatagcaatgtgaggctgggtgctgacgacagaaaca
gacatcagagaagtgcagcaactgctgctgggcacctgaacatcgtgtgtccatctgtgtcccaagacatgataactcagctctagag
ggccccgttaaacccgctgatcagcctcactgtgcttctagtgtccagccatctgtgtttgccccctccccctgcttcttctgacctggaa
gggtccactcccactgtcttctcctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggc
aggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcgggtgggtctatggcttctactgggcgggtttatggac
agcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggaaggttgggaagccctgcaaagtaaacctggatggcttcttccgccaag
gatctgatggcgaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgttctgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctc
cggccgcttgggtggagaggctattcgctatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatgccgctgttccggctgtcagcgca
ggggcgccccgttcttttgaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgaagacgaggcagcgcggtatcgtggctggccac
gacggggcttcttgcgcagctgtgctgcaggtgtcactgaagcgggaagggaactggctgctattgggcgaagtggcgggcaggatct
cctgtcatctcacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgttgcgggtacctgcccattc
gaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggtggaagccggtcttgcgatcaggatgatctggacgaagagcatca
ggggctcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccagcgcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgct
tgccgaatatcatggtgaaaaatggccgcttcttggattcatcagctgtggccggtgggtgtggcgggaccgctatcaggacatagcgttg
gctacctgtgatattgctgaagagcttggcgcgcaatgggtgaccttctctgcttctacggtatcgccgctcccattcgcagcgcatc
gccttctatcgcttcttgcagagttcttgaatttaaacgttacaatttctgatcggtatttctcttctacgcatctgtgcggtatttcacacc
gcatcaggtggcacttttggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataac
cctgataaatgcttaataatagcagctgtaaaacttatttttaatttaaaaggatctaggatgaagatccttttggataatctatgacaaaatc
ccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaattctgctgct
tgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggttgttggccgatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagag
cgagataccaaatactgttcttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaac
ctgttaccagtggctgctgccagtggtgataagctgtgtcttaccgggtggactcaagacgatagtaccggataaggcgacgcggctggg
gctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagc
gccacgcttcccgaaggggagaaaggcggacaggtatccggtaaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggggagcttccagg
gggaaacgctggtatctttatagctctgctgggttccgacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggggcgaggccta
tggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttctggccttttctgctgaccttttctcacatgttctt

SEQ ID NO: 4 - Полноразмерная последовательность рGX6010 и примечание:

Элементы:	Пары оснований:
Устойчивость к канамицину:	298-1059
pUC Ori:	1227-1900

БГР полиА:	2290-2528
Сайт XhoI:	2551-2556
Кодирующая последовательность huIL-12 p35:	2557-3216 (Примечание: субъединица p35 кодируется на противоположной нити)
Сайт PmeI:	3217-3224
Промотор оЦМВ:	3209-3711
Промотор чЦМВ:	4200-5024
Сайт SalI:	5030-5035
huIL-12 p40:	5036-6022
Сайт MluI:	6023-6028
ВО40 полиА:	6024-6229

aaatgggggc gctgaggtct gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga 60
 atcgcccat catccagcca gaaagtgagg gagccacggg tgatgagagc ttgtgttag 120
 gtggaccagt tgggtatttt gaacttttgc ttgccacgg aacgggtctgc gttgtcggga 180
 agatgcgtga tctgacctt caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgccgt 240
 cccgtcaagt cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgcgttca 300
 aaatgggatg cgttttgaca catccactat atatccgtgt cgttctgtcc actcctgaat 360
 cccattccag aaattctcta gcgattccag aagtttctca gagtcggaaa gttgaccaga 420
 cattacgaac tggcacagat ggtcataacc tgaaggaaga tctgattgct taactgttcc 480
 agttaagacc gacgcgtcg tctgataaca gatgcgatga tgcagaccaa tcaacatggc 540
 acctgccatt gctacctgta cagtcaagga tggtagaaat gttgtcggtc cttgcacacg 600
 aatattacgc catttgccctg catattcaaa cagctcttct acgataaggg cacaaatcgc 660
 atcgtggaac gtttgggctt ctaccgattt agcagtttga tacactttct ctaagtatcc 720
 acctgaatca taaatcgga aaatagagaa aaattgacca tgtgtaagcg gccaatctga 780
 ttccacctga gatgcataat ctagtagaat ctcttcgcta tcaaaattca ctccacett 840
 ccaactcacc gttgtccatt catggctgaa ctctgcttcc tctgttgaca tgacacacat 900
 catctcaata tccgaatacg gaccatcagt ctgacgacca agagagccat aaacaccaat 960
 agccttaaca tcatcccat atttatecaa tctcgttcc ttaatttcat gaacaattt 1020
 catttttct tctctagta ttattattgg tccgttcata acaccccttg tattactgtt 1080
 tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatataatt ttatcttctg caatgtaaca 1140
 tcagagattt tgagacacaa cgtggcttcc cccggcccat gacaaaaac ccttaacgtg 1200
 agttttcgtt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 1260
 cttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg 1320
 ttgtttgcc ggtacaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 1380
 cgcagatacc aaatactgtt ctctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact 1440
 ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagt 1500
 gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 1560
 ggtcgggctg aacggggggg tctgacacac agccagctt ggagcgaacg acctacaccg 1620
 aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gttcccgaa gggagaaagg 1680
 cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 1740
 ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg tgggtttcgc ccacctctga cttgagcgtc 1800
 gattttgtg atgctctca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 1860
 tttacgggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctacat gtttttct gcgttacc 1920

ctgattctgt ggataaccgt attaccgct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc 1980
 gaacgaccga ggcagcgag tcagttagcg aggaagcgga agagcgctg atgcggtatt 2040
 ttctccttac gcattctgtc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct 2100
 gctctgatgc cgcatagtta agccagtatc tgcctcctgc ttgtgtgttg gaggtcgctg 2160
 agtagtgcg gagcaaaatt taagctacaa caaggcaagg ctgaccgac aattgcatga 2220
 agaattcgtc tagggtagg cgttttgcgc tgcctcgca gtacgggcc agatagacc 2280
 gcggcatcga tgataattcg gcttatttaa attccccagc atgcctgcta ttgtctccc 2340
 aatctcccc ctgtctgc tgcctcccc cccccccag aatagaatga cactactca 2400
 gacaatgca tgcaatttc tcatcttatt aggaaggac agtgggagtg gcacctcca 2460
 gggtaagga aggcacgggg gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta gaaggcacag 2520
 tcgaggctga tcagcgagct cggcgcgct ctcgagtag gaagcgtca ggtatgacat 2580
 gaccgatca atagtacag cccgaatccg aaaggcatgc agcagaatgc acagcttgat 2640
 tttgtctta taaagtcgg gtctctcag actagacttc tgtgggacgg ttctgctatt 2700
 gaagttcagg gctgcatca gctcgtcaat cactgccagc atattctgat ccagaaagat 2760
 ctgtcgtta gggccatca gcagcttagc gtcatggtt ttgaattcca cctgatacat 2820
 cttcagatcc tcgtagatgg agtcaggca cagtccatc atgaagctgg tcttgcgact 2880
 agccaggcaa gaccgttg tgatgaagga agtctcctg ctattcagac atgattcgtt 2940
 cttggtcagc tccagtggca ggcaggcttc gactgtggag gttttgcct tagtaatac 3000
 ctcgtggtc atttctcag aagtacaagg gtaaaactcc agtgtctgc tagctttctg 3060
 cagcatattg gacacggccc gcagcaggtt ctggtatgg tgcaggcagg ggaacatgcc 3120
 aggatcgggg gtagcgacag gcagattcg agccagtac aggtgatcca gcaggaccag 3180
 ggtagcgacc agcagcagg accgagcggg gcacatgtt aaacgtcct ccgacgtccc 3240
 caggcagaat ggcggtccc taaacgagca ttgttatat agacctcca ttaggcagc 3300
 ctaccgccc ttactgcaa tggaaagccc atttgcgtca ttgccccctc ccattgacgt 3360
 caatggggat gtacttgca gccatcgcg gccatttacc gccattgacg tcaatgggag 3420
 tactgccaat gtacctggc gtacttcaa tagtaatga ctgccaagt tactattaat 3480
 agatattgat gtactgcaa gtgggccatt taccgtcatt gacgtcaata gggggcgtga 3540
 gaacggatat gaatgggcaa tgagccatcc cattgacgtc aatggtgggt ggtcctattg 3600
 acgtcaatgg gcattgagcc agcggggcca ttaccgtaa ttgacgtcaa tgggggaggc 3660
 gccatatacg tcaataggac cccccatag acgtcaatag gaaagaccat gtaagccga 3720
 attatcgcg ctatctgagg ggactagggt gtgtttaggc gaaaagcggg gcttcggtg 3780
 tacgcggtta ggagtccct caggatatag tagtttcgt ttgcatagg gagggggaaa 3840
 tgtagtctta tgcaatactc ttgtagtctt gcaacatggt aacgatgagt tagcaacatg 3900
 cctacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgattggt ggaagtaagg tggtagcatc 3960
 gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat tggacgaacc actgaattcc 4020
 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacgcc atttgaccat 4080
 tcaccacatt ggtgtgcacc tccaagcttc gaccaattct catgtttgac agcttatcat 4140
 cgcagatccg ggcaacgtt ttgccattgc tgcaggcgca gaactggtag gtatggaaga 4200
 tctatacatt gaatcaatat tggcaattag ccatattagt cattgggtat atagcataaa 4260
 tcaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata 4320

ttggetcatg tccaatatga ccgcatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 4380
 aatcaattac ggggtcatta gtccatagcc catatatgga gtccgcgtt acataactta 4440
 cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcccacgacccccg cccattgacg tcaataatga 4500
 cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga cttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 4560
 tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta 4620
 ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccccgct ggcatatgc ccagtacatg accttacggg 4680
 actttctac ttggcagtac atctacgtat tagtcacgc tattaccatg gtgatgcgt 4740
 ttggcagta calcaatggg cgtggatagc ggttgactc acggggattt ccaagtctcc 4800
 acccattga cgtcaatggg agttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac ttccaaaat 4860
 gtcgtaacaa ctccgcccac ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct 4920
 atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatgcctg gagacgcat ccacgtgtt 4980
 ttgacctca tagaagacac cgggaccgat ccagcctcg cgggcgcgcg tcgacatgtg 5040
 ccatcagcag ctggctatct cttggtttag tctggtgtt ctggttctc cactggtcgc 5100
 tatctgggaa ctgaaaaagg atgtgtacgt ggtcgagctg gactggtatc cagatgcacc 5160
 cggagaaatg gtgtctctga cctgcgacac acccgaggaa gatggcatca cttggaccct 5220
 ggaccagagc tccgaggtgc tgggatctgg caagacactg actattcagg tcaagaatt 5280
 cggggatgcc ggacagtaca catgtcaciaa gggcggggag gtgtgagtc actcactgt 5340
 gctgtgcat aagaaagaag acggcatctg gtctactgac attctgaagg atcagaaaga 5400
 gcctaagaac aaaaccttc tgagatgca agctaagaat tatagtggga ggtttactg 5460
 ttgtggctg accacaatct caactgacct gacctttagc gtgaaatca gtgggggtc 5520
 aagcgateca caggagtgta cctgcggagc agctactg agcgcggagc ggtgagagg 5580
 agacaacaag gactacgaat atagtgtcga gtgccaggaa gattcagcct gtccgcagc 5640
 cgaggaatcc ctgctatcg aagtgtgtt ggacgtgtg cacaagctga aatacgaata 5700
 ctacacatcc tctttctta ttccgacat cattaagcca gatcccccta aaaacctgca 5760
 gctgaagccc ctgaaaaatt cccgacaggt ggaggtctct tgggaatacc ctgatacatg 5820
 gagcactcca cattctatt tcagtctgac ttttgcgtg caggtccagg gcaagagcaa 5880
 aagggagaag aaagaccgcg tttcaccga taagacatcc gctactgtca tctgtcga 5940
 aaacgcaagc atttccgtc gggcacagga taggtattat tccagcagtt ggtctgagt 6000
 ggttccgct cttgtagt gtacgcgtaa aaagatccag acatgataag atacattgat 6060
 gagtttgac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaat gctttattg tgaaattgt 6120
 gatgctattg ctttattgt aaccattata agctgaata aacaagttaa caacaacaat 6180
 tgcattcatt ttatgttca ggttcagggg gaggtgtggg aggttttt 6229

SEQ ID NO: 5 - Последовательность ДНК p35:

ATGTGTCCAGCGCGCAGCCTCCTCCTTGTGGCTACCCTGGTCCTCCTGGACCA
 CCTCAGTTTGGCCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATG
 CCTTCACCACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCA
 GACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACCTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCA
 CAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAAT
 GAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCC
 TCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTG

AAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAA
 GAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAGGC
 CCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTT
 TTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGT
 GACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCCTAA

SEQ ID NO: 6 - Аминокислотная последовательность p35:

MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQK
 ARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT
 SFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNS
 ETVPPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*

SEQ ID NO: 7 - Последовательность ДНК p40:

ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCT
 CCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGATTGG
 TATCCGGATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGAT
 GGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCCT
 GACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAG
 GCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGT
 CCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAAGATGC
 GAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACT
 GATTTGACATTCAGTGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGAC
 GTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATG
 AGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTG
 CCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTACAAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAG
 CAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAA
 GCCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGA
 GTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCA
 AGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGC
 CGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTG
 GAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTAG

SEQ ID NO: 8 Аминокислотная последовательность p40:

MCHQQLVISWFLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTP
 EEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIW
 STDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTITSTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
 ATLSAERVVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI
 IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTDTPHYSYSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT
 DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS*

SEQ ID NO:9 Лидерная последовательность ДНК IgE

atggactgga cctggatcct gttcctggtg gccgctgcca cacgggtgca cagc

SEQ ID NO: 10 Лидерная последовательность белка IgE

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

Val His Ser

>pGX3024 вставка аминокислотной последовательности с лидерной последовательностью IgE <SEQ ID NO: 11>

MDWTWILFLVAAATRVHSESKDASTSATSIDQLCKTFNLSLHTLQIQCVFCRNAL
TTAEIYAYAYKNLKVWRDNFPFAACACCLELQGKINQYRHFNYAAYAPTVEEETNED
ILKVLIRCYLCHKPQCEIEKLKHILGKARFIKLNNQRKGRCLHCWTTMEDLLPRGRKRR
SGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPHGRLVTLKDIVLDLQPPDPVGLHAYEQLEDSSSEDEV
DKVDKQDSQPLTQHYQILTCCCGCDSNVRLVVECTDGDIRQLQDLLLGTNLNIVCPICAP
KPRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPESANASTSATTIDQLCKTFNLSMHTLQIN
CVFCKNALTTAEIYSYAYKQLKVLFRGGYPYAAACACCLEFHGKINQYRHFYAGYATT
VEEETKQDILDVLRICYLCHKPQCEVEKVKHILTKARFIKLNCTRKGRCCLHCWTTMED
MLPRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPHGRHVTLKDIVLDLQPPDPVGLHAYE
QLVDSSEDEVDEVDGQDSQPLKQHYQIVTCCCGCDSNVRLVVQCTETDIREVQQLLLGT
LNIVCPICAPKT

>pGX3024_вставка только с лидерной последовательностью IgE <SEQ ID NO: 12>

ATGGATTGGACCTGGATTCTCTTTCTCGTTGCCGCTGCTACTCGCGTTCATAG
TGAGAGCAAGGATGCCAGCACAAGCGCCACCAGCATCGACCAGCTTTGCAAGACCT
TTAACCTGAGCCTGCACACACTTCAGATCCAGTGTGTCTTCTGCCGAAATGCTCTGA
CAACAGCAGAAATCTACGCCTACGCCTACAAAAACCTGAAGGTGGTGTGGAGAGAC
AACTTTCCTTTTCGCTGCCTGCGCTTGCTGCCTGGAGCTGCAGGGCAAGATCAATCAG
TACCGGCACTTCAACTACGCTGCCTACGCCCTACAGTGGAGGAGGAAACAAACGA
AGACATCCTGAAGGTGCTGATCAGATGCTACCTCTGCCACAAGCCACAGTGTGAAA
TCGAGAAGCTGAAGCACATTCTGGGCAAGGCCAGATTTATCAAGCTGAACAACCAG
AGAAAGGGAAGATGTCTGCACTGTTGGACAACCTGCATGGAGGACCTGCTGCCCAG
AGGCAGAAAGAGAAGATCTGGCAGCGGAGCTACCAACTTCTCTCTGCTGAAGCAGG
CTGGAGATGTTGAGGAGAACCCAGGCCCTCACGGCCGGCTGGTCACCCTGAAGGAT
ATCGTGCTGGATCTGCAGCCCCCTGATCCTGTGGGCCTTCACGCCTACGAACAGCTG
GAGGACAGCTCTGAAGACGAAGTGGACAAGGTGGACAAGCAGGACTCTCAGCCTCT
GACACAGCACTATCAGATCCTGACCTGCTGCTGCGGCTGTGACTCTAACGTGAGACT
GGTGGTGGAGTGCACCGATGGAGACATCAGACAGCTGCAGGACCTGCTGCTGGGTA
CCCTGAACATTGTGTGTCCTATCTGTGCTCCAAAGCCAAGAGGCAGGAAAAGAAGA
TCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTCTCCCTGCTGAAGCAAGCTGGAGATGTGGAGGA
GAACCCTGGCCCTGAGAGCGCCAACGCCAGCACATCCGCCACCACCATCGACCAGC
TGTGCAAGACCTTCAACCTGAGCATGCACACACTGCAGATCAACTGTGTCTTCTGCA
AGAATGCCCTGACCACAGCAGAGATCTACAGCTACGCCTACAAGCAGCTGAAGGTG
CTGTTTCAAGAGCGGCTACCCTTATGCTGCCTGTGCCTGCTGCCTGGAGTTCCACGGC
AAGATCAACCAGTACAGACACTTCGACTACGCTGGCTACGCCACCACAGTGGAAGA
GGAAACAAAGCAGGACATCCTGGACGTGCTGATCCGATGCTACCTGTGCCACAAGC
CTCAGTGTGAAGTGGAAAAAGTGAAGCACATCCTGACCAAGGCCAGATTCATCAAG
CTGAACTGCACCAGAAAAGGCAGATGCCTGCACTGCTGGACCACCTGCATGGAAGA

CATGCTGCCTAGAGGCAGAAAAAGAAGAAGCGGCTCTGGAGCCACCAACTTTTCCC
TGCTGAAACAAGCTGGAGACGTGGAGGAAAACCCTGGCCCTCACGGCAGACACGTG
ACACTGAAGGACATCGTGCTGGACCTGCAGCCTCCTGACCCTGTGGGCCTGCACGCC
TACGAGCAGCTGGTGGACAGCAGCGAGGACGAAGTGGACGAAGTGGATGGCCAGG
ACAGCCAGCCTCTGAAGCAGCACTACCAGATCGTCACCTGCTGCTGTGGCTGTGATA
GCAATGTGAGGCTGGTGGTGCAGTGCACAGAAACAGACATCAGAGAAGTGCAGCA
ACTGCTGCTGGGCACCCTGAACATCGTGTGTCCCATCTGTGCTCCCAAGACATGATA
A

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген папилломавируса человека (ВПЧ), при этом антиген ВПЧ включает антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что антигенный домен ВПЧ6 представляет собой антиген слияния ВПЧ6 Е6-Е7.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что антигенный домен ВПЧ11 представляет собой антиген слияния ВПЧ11 Е6-Е7.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что антиген ВПЧ включает

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; или

аминокислотную последовательности, на по меньшей мере 95% гомологичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, содержащая

нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 95% гомологичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 12;

нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или

нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный домен ВПЧ11, располагается 5' по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный домен ВПЧ6.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 2, отличающаяся тем, что антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 3, отличающаяся тем, что антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

10. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов.

11. Вектор экспрессии по п. 10, содержащий ДНК-плазмиду.

12. Вектор экспрессии по п. 10, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

13. Иммуногенный белок, содержащий антигенный домен папилломавируса человека (ВПЧ) 6 и антигенный домен ВПЧ11.

14. Иммуногенный белок по п. 13, отличающийся тем, что антигенный домен ВПЧ6 содержит антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7.

15. Иммуногенный белок по п. 13 или 14, отличающийся тем, что антигенный домен ВПЧ11 содержит антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7.

16. Иммуногенный белок по п. 13 или 15, содержащий:
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11; или
аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% гомологичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11.

17. Иммуногенный белок по любому из пп. 13-16, отличающийся тем, что антигенный домен ВПЧ11 располагается N-терминально по отношению к антигену ВПЧ6.

18. Иммуногенный белок по любому из пп. 13-17, отличающийся тем, что антигенный домен ВПЧ6 и антигенный домен ВПЧ11 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

19. Иммуногенный белок по п. 14, отличающийся тем, что антигенный домен ВПЧ6 Е6 и антигенный домен ВПЧ6 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

20. Иммуногенный белок по п. 15, отличающийся тем, что антигенный домен ВПЧ11 Е6 и антигенный домен ВПЧ11 Е7 отделяются одним или более сайтами посттрансляционного расщепления, одним или более сайтами трансляционного проскока или и теми, и другими.

21. Вакцина, содержащая вектор экспрессии по любому из пп. 10-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор экспрессии по любому из пп. 10-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

23. Фармацевтическая композиция по п. 22, содержащая адъювант.

24. Фармацевтическая композиция по п. 23, отличающаяся тем, что адъювант содержит интерлейкин-12 (IL-12).

25. Фармацевтическая композиция по п. 24, отличающаяся тем, что IL-12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты.

26. Фармацевтическая композиция по п. 25, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, представляет собой вектор экспрессии.

27. Вакцина, содержащая иммуногенный белок по любому из пп. 13-20 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуногенный белок по любому из пп. 13-20 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

29. Фармацевтическая композиция по п. 28, содержащая адъювант.

30. Фармацевтическая композиция по п. 29, отличающаяся тем, что адъювант содержит интерлейкин-12 (IL-12).

31. Фармацевтическая композиция по пп. 23-29, отличающаяся тем, что адъювант содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу p35 IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

33. Фармацевтическая композиция по п. 31 или 32, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу p40 IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8.

34. Фармацевтическая композиция по п. 31, 32 или 33, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 4.

35. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 31-34, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе, представляет собой вектор экспрессии.

36. Фармацевтическая композиция по п. 35, отличающаяся тем, что вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-12 или обе, представляет собой тот же вектор экспрессии или вектор экспрессии, отличающийся от вектора экспрессии, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген ВПЧ.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 22-26 или 28-36, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество содержит буфер, необязательно солевой буфер с цитратом натрия, необязательно буфер, содержащий 150 мМ хлорид натрия и 15 мМ цитрат натрия, уровень pH 7.

38. Фармацевтическая композиция по п. 37, отличающаяся тем, что композиция содержит 6 мг вектора, кодирующего антиген ВПЧ, на миллилитр буфера и 0,25 мг вектора, кодирующего субъединицу p35 IL-12, субъединицу p40 IL-1 или обе, на

миллилитр буфера.

39. Фармацевтическая композиция по п. 38, отличающаяся тем, что композиция содержит 6 мг рGX3024 на миллилитр буфера и 0,25 мг рGX6010 на миллилитр буфера.

40. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 22-26 или 28-39 с индуцированием тем самым иммунного ответа.

41. Способ профилактической или терапевтической иммунизации субъекта против ВПЧ6 и/или ВПЧ11, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 22-26 или 28-39 с индуцированием тем самым иммунного ответа против ВПЧ6, ВПЧ11 или обоих.

42. Способ лечения или предупреждения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 22-26 или 28-39 с лечением или предупреждением тем самым РРП.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что РРП представляет собой ювенильный РРП или РРП взрослых.

44. Способ по любому из пп. 40-43, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12.

45. Способ по любому из пп. 40-44, дополнительно включающий введение адъюванта субъекту.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что адъювант представляет собой интерлейкин-12 (IL-12).

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что IL-12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты.

48. Способ по п. 45, отличающийся тем, что адъювант содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р35 IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

50. Способ по п. 48 или 49, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р40 IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8.

51. Способ по п. 47, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 4.

52. Способ по п. 47, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, представляет собой вектор экспрессии, необязательно плазмиду.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что плазида представляет собой pGX6010.

54. Способ по любому из пп. 40-53, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

55. Способ по любому из пп. 40-54, отличающийся тем, что введение включает внутрикожную или внутримышечную инъекцию.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что введение дополнительно включает электропорацию.

57. Применение эффективного количества вектора экспрессии любому из пп. 10-12 или иммуногенного белка по любому из пп. 13-20 в изготовлении профилактического или лекарственного препарата.

58. Применение эффективного количества вектора экспрессии любому из пп. 10-12 или иммуногенного белка по любому из пп. 13-20 в изготовлении профилактического или лекарственного препарата для предупреждения или лечения инфекции вируса папилломы человека (ВПЧ) 6 или ВПЧ11.

59. Применение эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 22-26 или 28-39 для предупреждения или лечения инфекции вируса папилломы человека (ВПЧ) 6 или ВПЧ11.

60. Применение эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 22-26 или 28-39 для предупреждения или лечения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП).

61. Применение по п. 60, отличающееся тем, что РРП представляет собой ювенильный РРП или РРП взрослых.

62. Применение по любому из пп. 57-61, отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12.

63. Применение по любому из пп. 57-62 в комбинации с адъювантом.

64. Применение по п. 63, отличающееся тем, что адъювант представляет собой интерлейкин-12 (IL-12).

65. Применение по п. 64, отличающееся тем, что IL-12 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты.

66. Применение по п. 65, отличающееся тем, что адъювант содержит молекулу

нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу р35 IL-12, субъединицу р40 IL-12 или обе.

67. Применение по п. 66, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р35 IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

68. Применение по п. 66 или 67, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу р40 IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична нуклеотидной последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 8.

69. Применение по п. 65, отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4; или

нуклеотидной последовательности, которая на по меньшей мере 95% гомологична SEQ ID NO: 4.

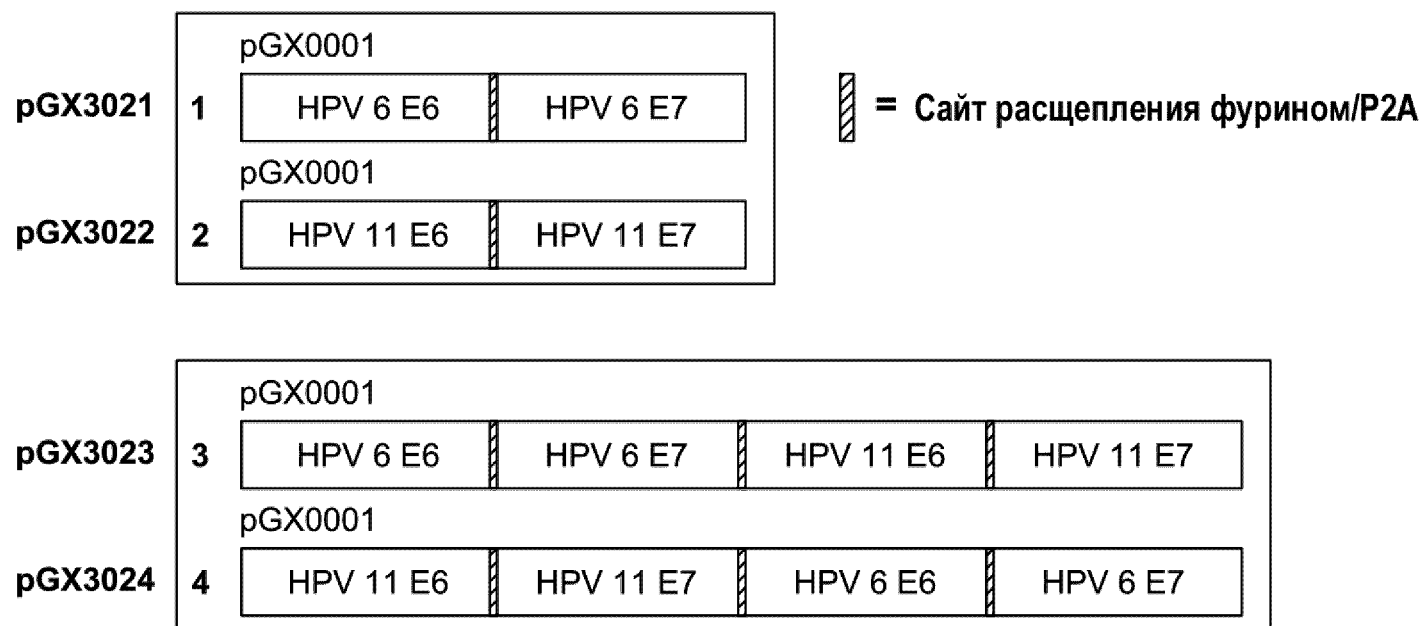
70. Применение по п. 65, отличающееся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12, представляет собой вектор экспрессии, необязательно плазмиду.

71. Применение по п. 70, отличающееся тем, что плаزمид представляет собой рGX6010.

По доверенности

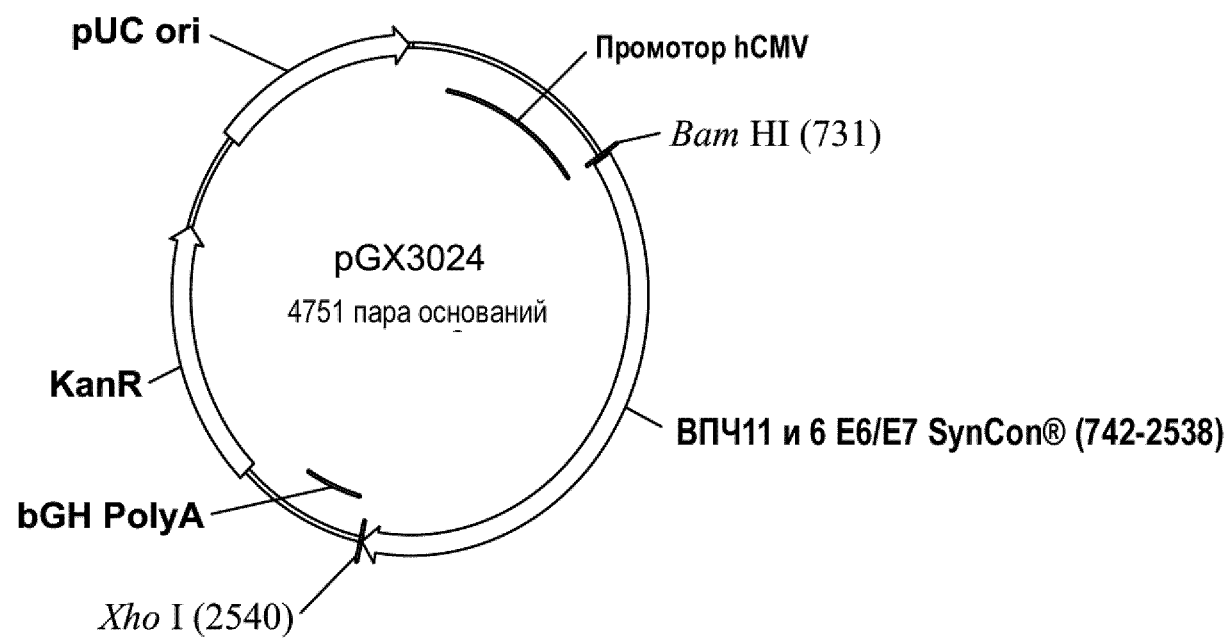
Фиг. 1А

Плазмиды, кодирующие антигены ВПЧ6 и ВПЧ11 Е6 и Е7



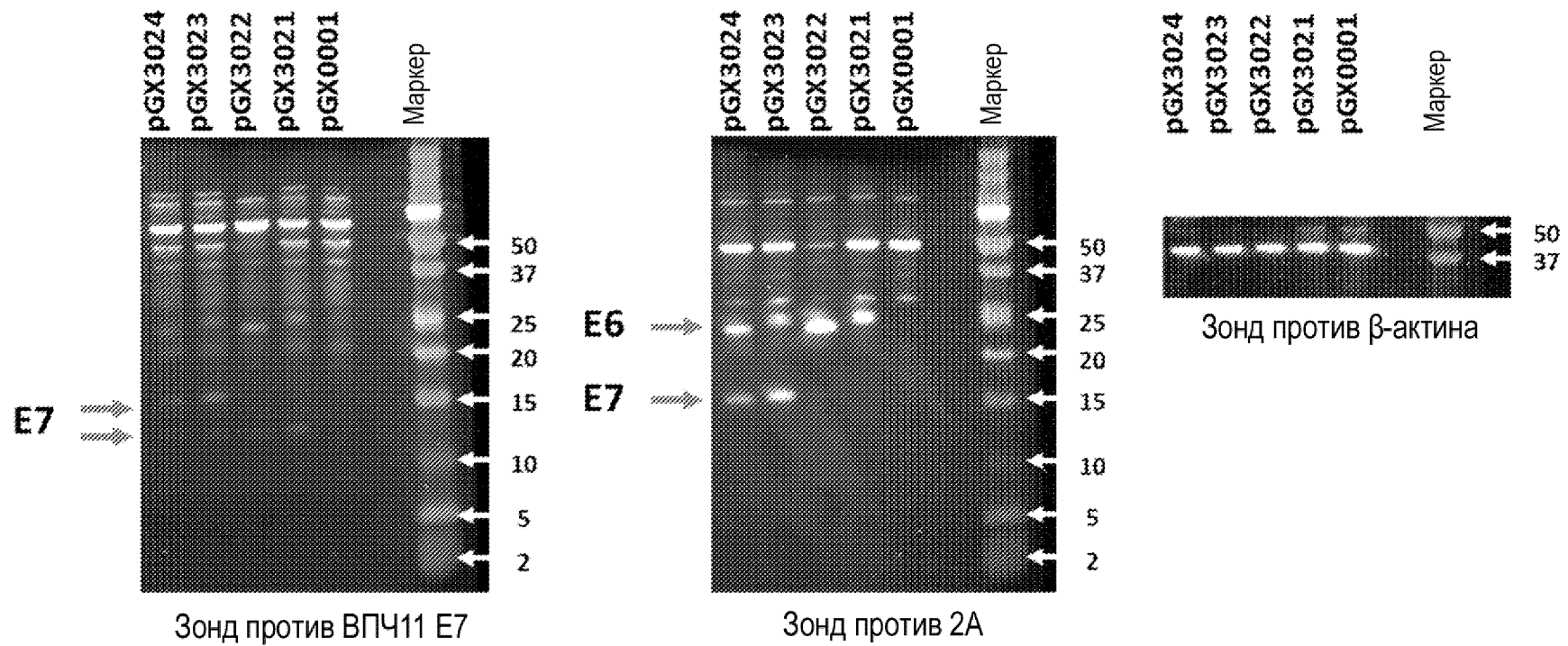
Фиг. 1В

Карта плазмиды pGX3024



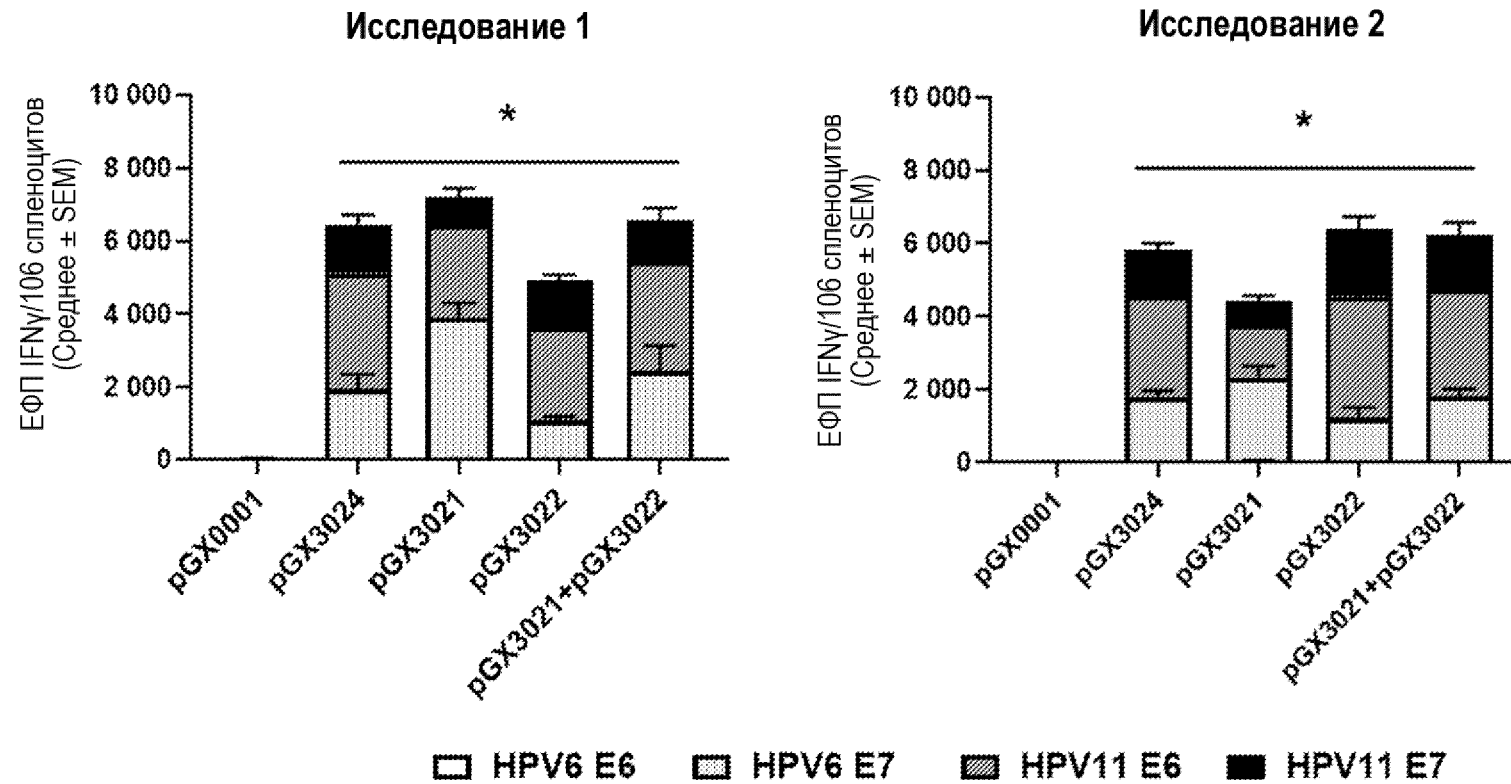
Фиг. 2

Экспрессия антигенов белков E6 и E7 после pGX3024 in vitro



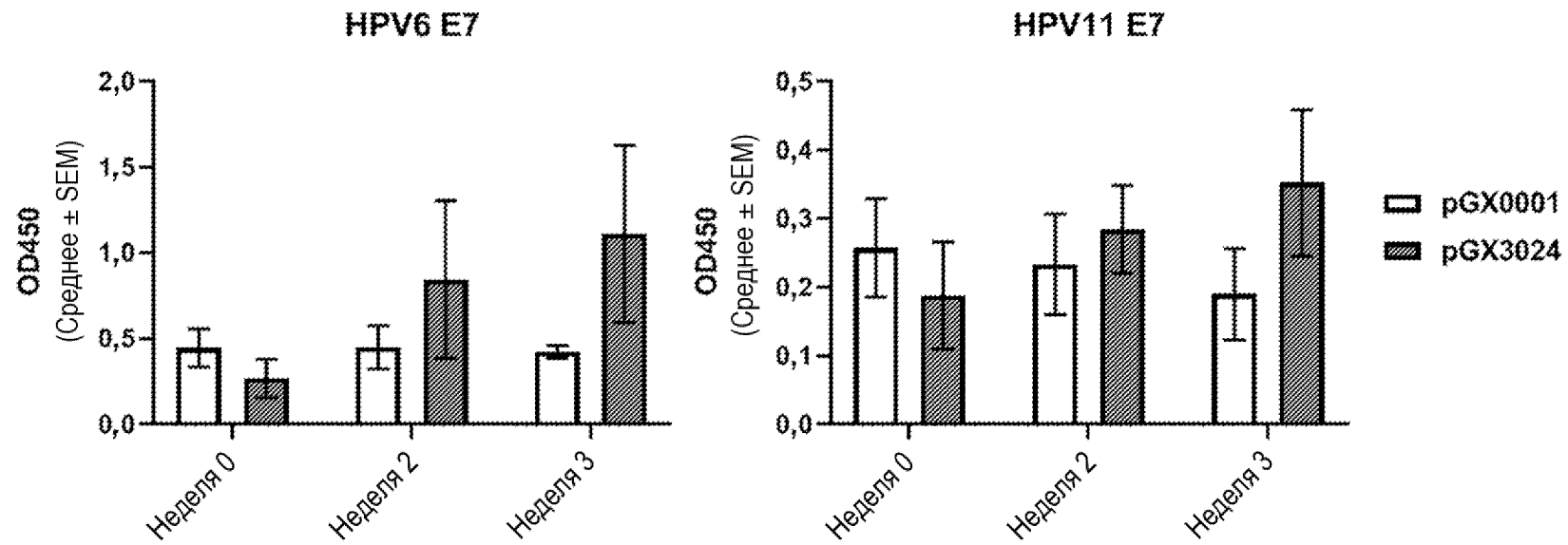
Фиг. 3

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после иммунизации с помощью рGX3024 мышей C57BL/6



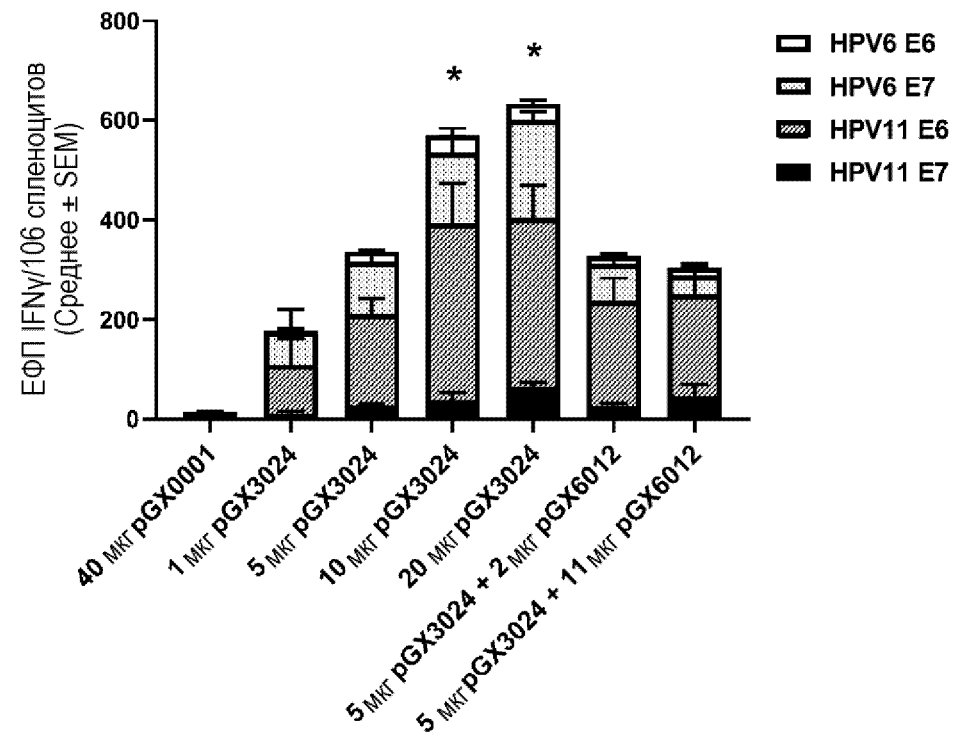
Фиг. 4

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические гуморальные ответы после иммунизации с помощью рGX3024 мышей C57BL/6



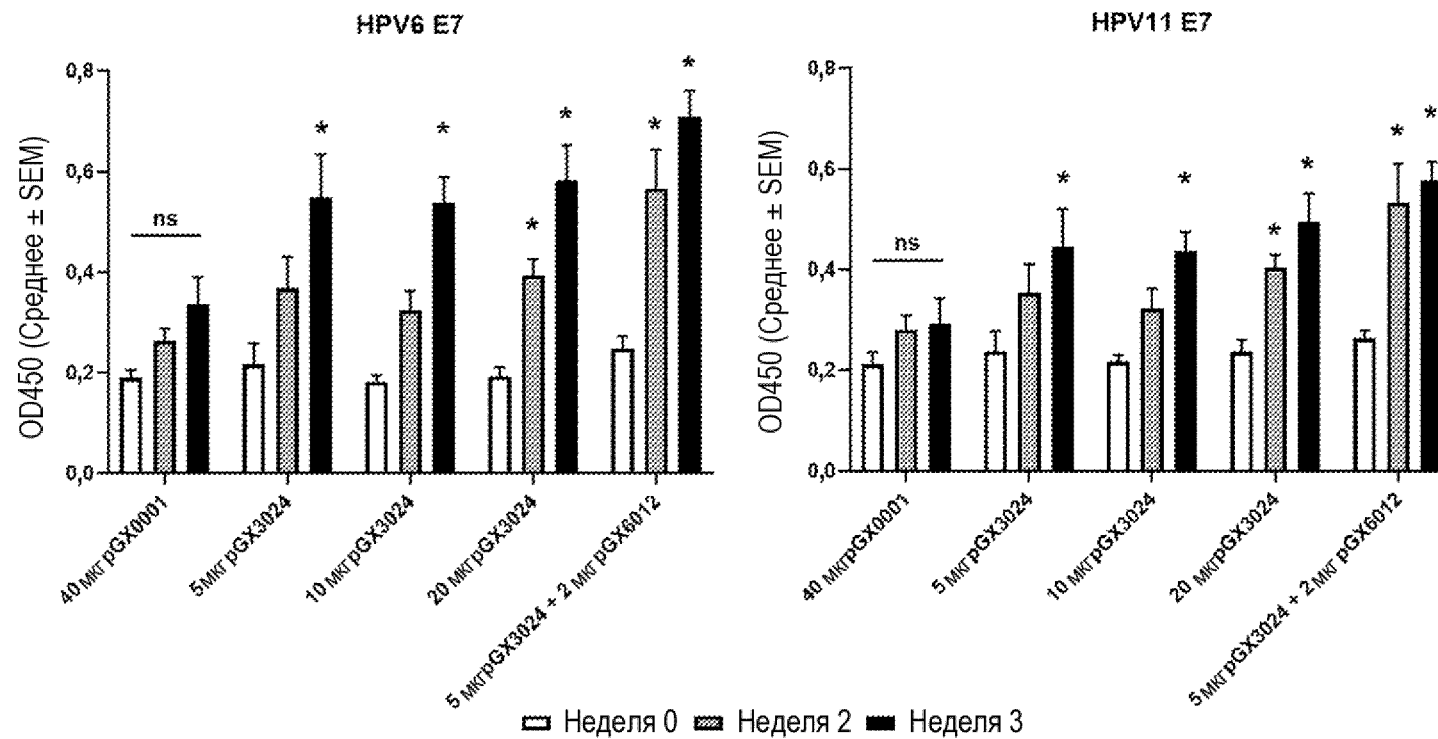
Фиг. 5

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после иммунизации с помощью рGX3024 мышей BALB/c



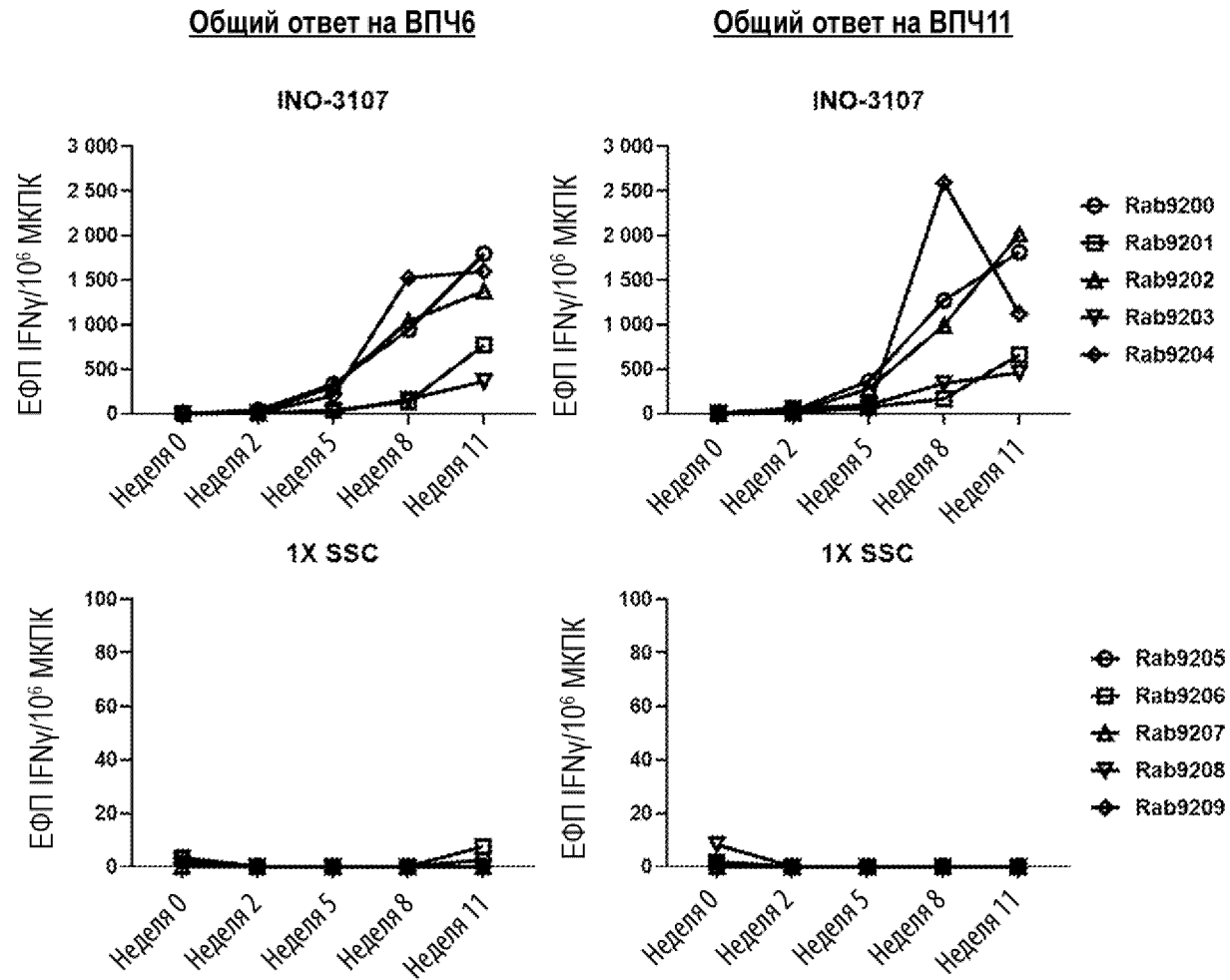
Фиг. 6

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические гуморальные ответы после иммунизации с помощью рGX3024 мышей BALB/c



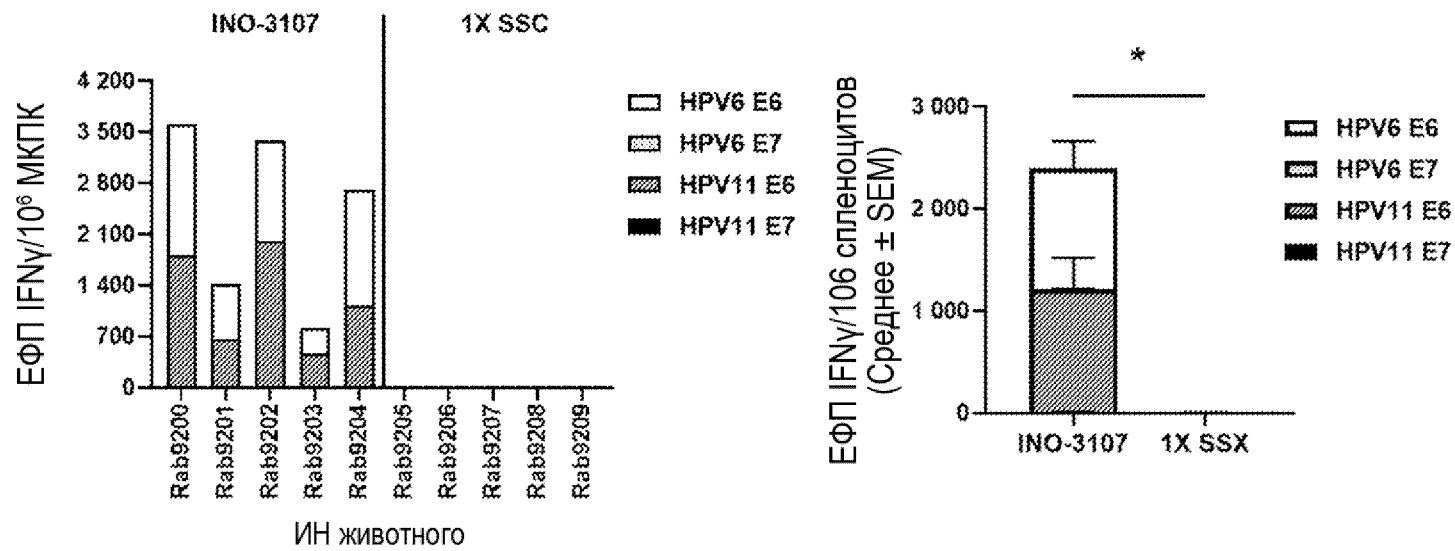
Фиг. 7

Временная динамика ВПЧ6- и ВПЧ11-специфических клеточных ответов после иммунизации с помощью INO-3107 кроликов NZW



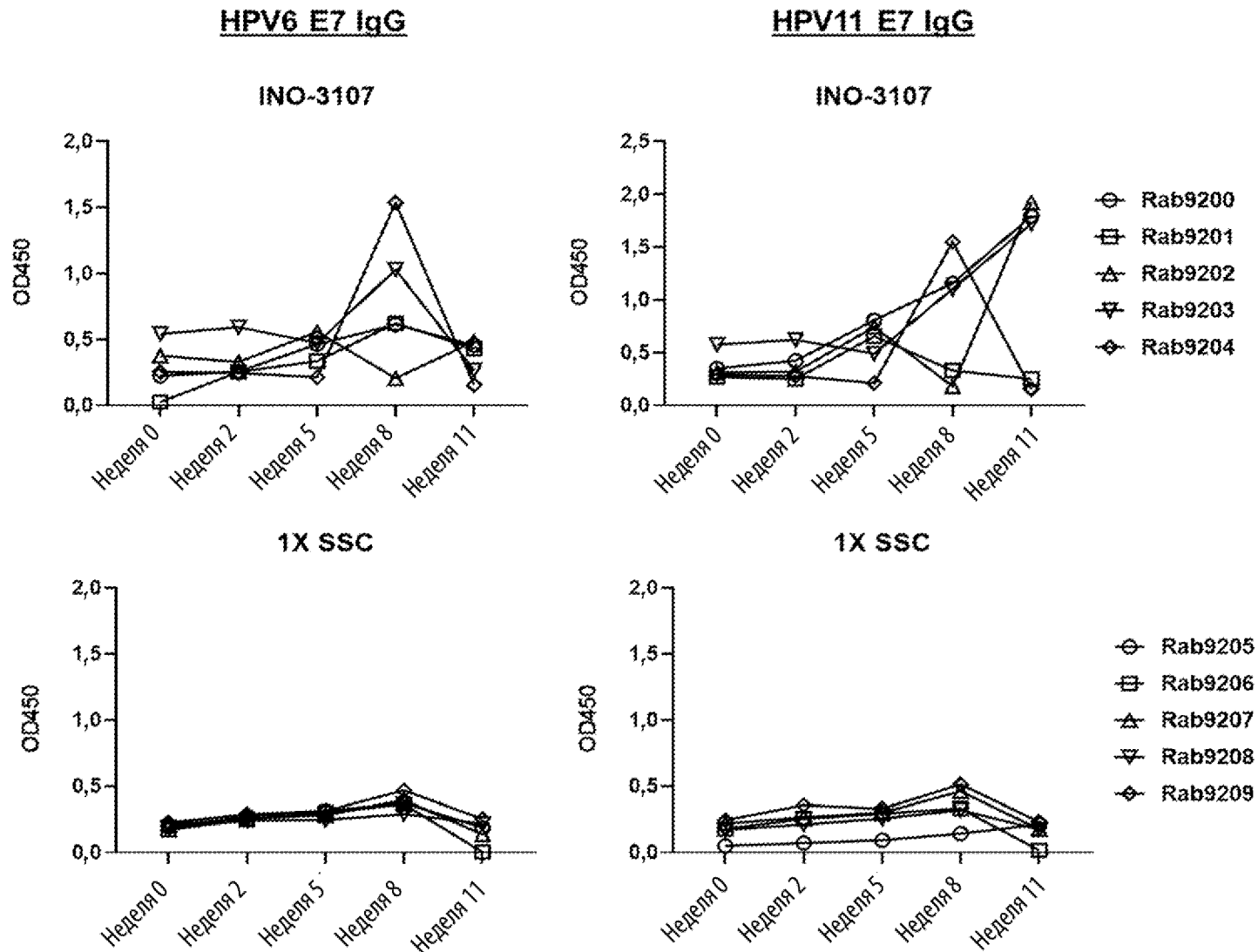
Фиг. 8

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после иммунизации с помощью INO-3107 кроликов NZW



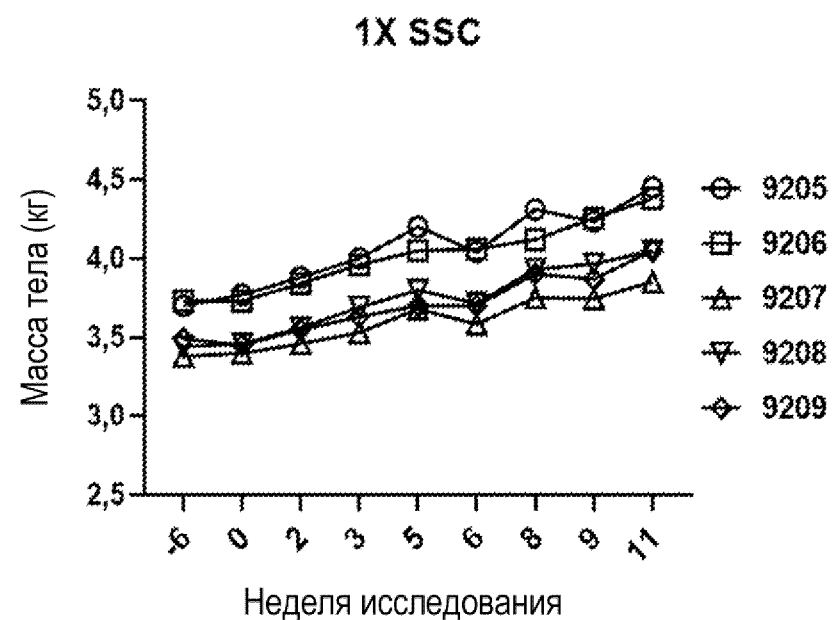
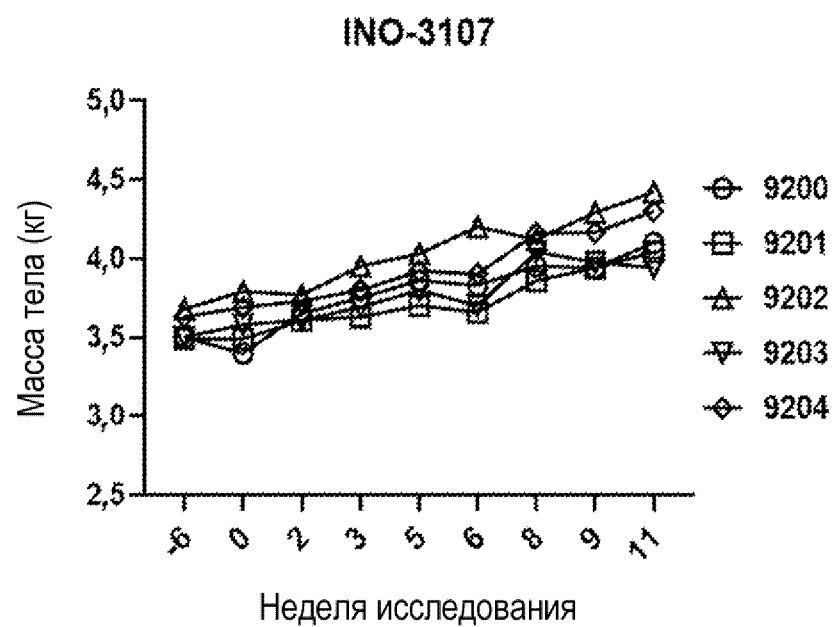
Фиг. 9

Временная динамика ВПЧ6- и ВПЧ11-гуморальных клеточных ответов после иммунизации с помощью INO-3107 кроликов NZW



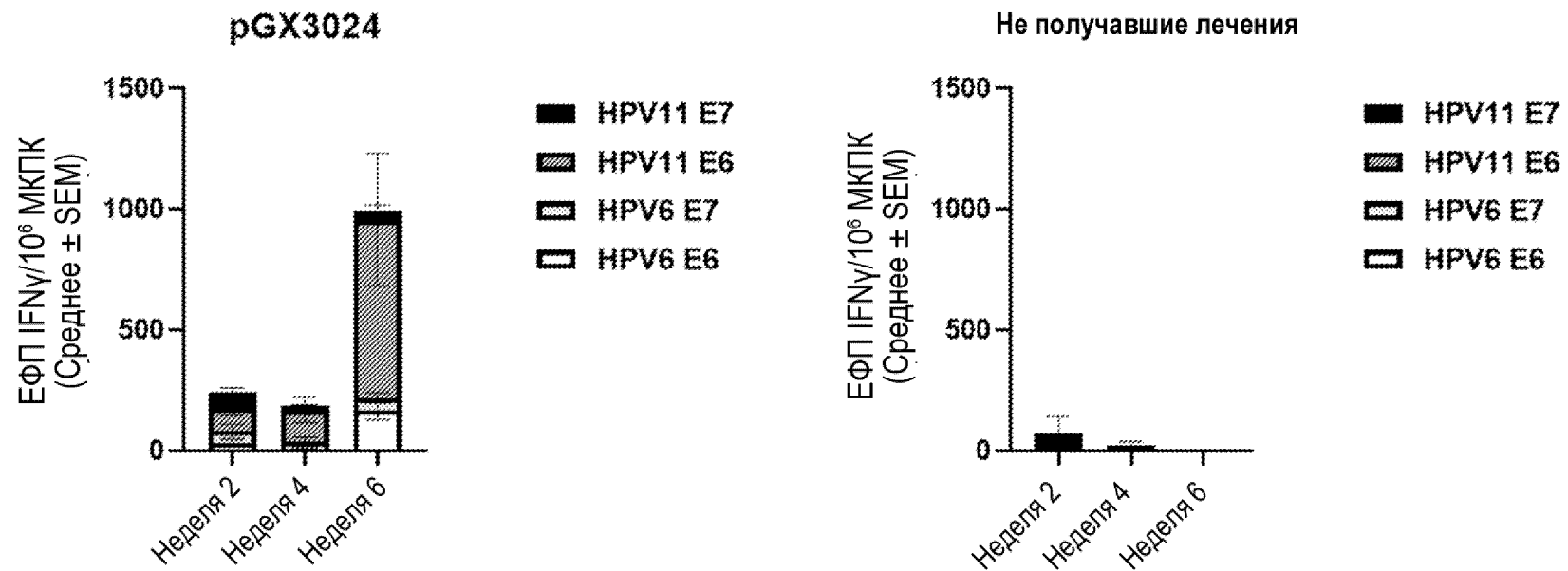
Фиг. 10

Массы тела кроликов NZW после иммунизации с помощью INO-3107



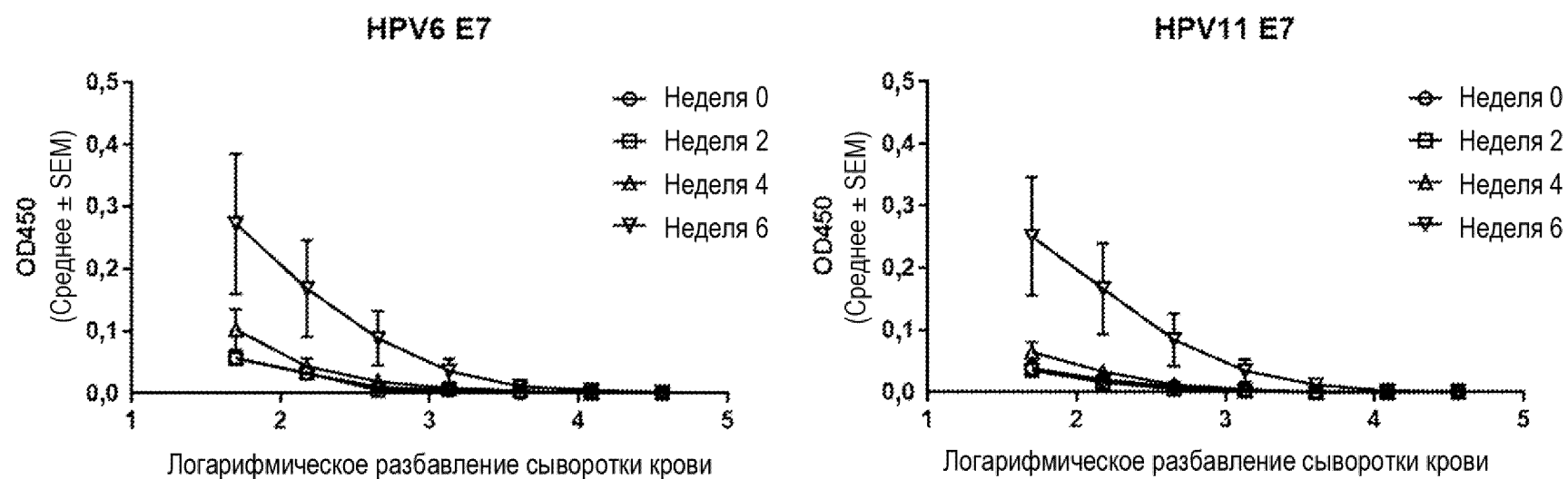
Фиг. 11

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические клеточные ответы после внутрикожной иммунизации с помощью рGX3024 морских свинок



Фиг. 12

ВПЧ6- и ВПЧ11-специфические гуморальные ответы после внутрикожной иммунизации с помощью рGX3024 морских свинок



Фиг. 13

Иммунные ответы, индуцированные после внутрикожной доставки INO-3107

