

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201890527** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2018.07.31

(22) Дата подачи заявки
2016.08.18

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

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ HPV18**

(31) **15181791.3; 16156334.1**

(32) **2015.08.20; 2016.02.18**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2016/069618**

(87) **WO 2017/029360 2017.02.23**

(71) Заявитель:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Бюник Эвлин Маргарета, Кюстерс
Жером Х. Х. В, Шепер Геррит К,
Остерхейс Кун, Эйл Тако Жилль, Кан
Селина (NL)**

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

(57) В настоящем изобретении предусмотрены сконструированные конструкции нуклеиновых кислот и полипептиды, которые можно использовать в качестве терапевтических вакцин против HPV18 и/или HPV16.

201890527
A1

201890527
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-548085EA/042

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ HPV18

Настоящее изобретение относится к области медицины и более конкретно к конструкциям нуклеиновых кислот и полипептидам, которые можно применять в терапевтических вакцинах против вируса папилломы человека 18 типа и/или 16 типа.

Предпосылки изобретения

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

одним из наиболее серьезных инфекционных агентов, вызывающих рак.

Вакцинация против HPV считается оправданной стратегией снижения частоты возникновения или эффектов инфекции, вызываемой HPV (van der Burg and Melief, 2011, *Curr Opin Immunol* 23: 252-257).

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

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

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

Были описаны некоторые попытки решить эту проблему. Например, клинические испытания проводили в отношении различных стратегий вакцинации, таких как слитый белок, состоящий из белка теплового шока (Hsp) из *Mycobacterium bovis* и E7 HPV-16, или состоящий из слитого белка E6, E7 и L2 из HPV-16 и HPV-18, химерные VLP L1-E7, рекомбинантные вирусы осповакцины, экспрессирующие либо E6 и E7 вирусов HPV-16 и HPV-18, либо E2 вируса папилломы крупного рогатого скота, ДНК-вакцины,

экспрессирующие CTL-эпитопы E6 и E7 HPV-16 и HPV-18, живые аттенуированные листерии моноцитогенные (Lm), которые секретируют антиген E7 HPV-16, и синтетические длинные пептиды (SLP), содержащие пептиды E6 и E7 HPV-16. Хотя некоторые из этих подходов демонстрируют некоторую, но ограниченную, клиническую эффективность, большинство из них потерпело неудачу, что свидетельствует о необходимости совершенствования существующих в настоящее время стратегий.

Интеграция генов, кодирующих ранние белки HPV E6 и E7, является необходимой стадией в процессе от инфицирования до рака, и для поддержания опухолевого фенотипа раковых клеток шейки матки необходима непрерывная экспрессия E6 и E7. Поэтому E6 и E7 считаются хорошими мишенями для терапевтической вакцинации. Как уже упоминалось, некоторые исследования показали, что терапевтическая вакцинация женщин, инфицированных HPV высокого риска, может вызывать регрессию существующих поражений. Kenter et al продемонстрировали стойкую и полную регрессию у 47% пациентов с интраэпителиальной неоплазией вульвы (VIN) с помощью SLP, полученных из белков E6 и E7 HPV16, и адъюванта в качестве терапевтической вакцины (Kenter et al., 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47). Аналогичным образом, исследование, в котором вакцину на основе белка (TA-CIN, состоящую из слитого белка HPV16 E6, E7 и L2) комбинировали с местной иммуномодуляцией у 2/3 пациентов с VIN, продемонстрировало полную регрессию у 63% пациентов (Daayana et al., 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36). Возможные недостатки синтетических длинных пептидов в качестве вакцины включают технологичность производства в широком масштабе и связанные с этим затраты, потребность в потенциально высокоактивном адъюванте и связанные с этим неблагоприятные эффекты, связанные с иммунизацией (особенно боль и припухлость). В связи с высоким уровнем дискомфорта маловероятно, что SLP будут использоваться на ранней стадии заболевания, когда самопроизвольный иммунный клиренс все еще высок. Аналогичным образом, в связи с необходимостью местного лечения имиквимодом в случае лечения TA-CIN, переносимость является важным вопросом, так как большинство

женщин испытывают местные и системные побочные эффекты, продолжающиеся на протяжении лечения имиквимодом, что может повлиять на повседневную деятельность.

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

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

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

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

соответствующих эпитопов Е6/Е7 к этим неприродным эпитопам, при этом описанные конструкции могут не иметь оптимальных иммунологических характеристик. Также была описана терапевтическая ДНК-вакцина, экспрессирующая внутриклеточно нацеленный слитый белок со встроенным генетическим адъювантом и ''перетасованными'' фрагментами Е6 и Е7 как HPV16, так и HPV18, а также повышенная с помощью электропорации иммунизация с применением нее вызывает значительный специфичный в отношении Е6/Е7 Т-клеточный ответ у пациентов с CIN3 (Kim et al., 2014).

Другим подходом, который был описан для получения иммуногенных конструкций, является получение так называемых мультиэпитопных конструкций или минигенов (например, US 2007/014810; Mishra et al, 2014; Moise et al, 2011; Moss et al, 2010). Целью этого является образование наименьшего пептида, который охватывает эпитопы, представляющие интерес. Однако в таких подходах потенциальные недостатки заключаются в том, что присутствует только подтип эпитопов природного белка и, кроме того, обычно вводятся спейсерные последовательности, которые в природе не присутствуют в белке, представляющем интерес.

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

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды, содержащие практически все возможные Т-клеточные эпитопы онкобелков Е6 и Е7 HPV16 или HPV18, однако при этом они характеризуются сильно уменьшенной (по сравнению с Е6 и Е7 wt), вплоть до необнаруживаемой, трансформирующей активностью, с помощью включения фрагментов белков Е6 и Е7, которые были переупорядочены, и в то же время содержат минимальное количество нежелательных сильных неоэпитопов. Эти молекулы отличаются от молекул, ранее представленных другими исследователями. В настоящем изобретении предусмотрены молекулы, которые можно применять в терапевтических вакцинах против либо HPV16, либо HPV18. Такие

молекулы можно также комбинировать в терапевтических вакцинах против как HPV16, так и HPV18.

В настоящем изобретении для HPV16 предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1. Для HPV18 в настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20.

Кодируемый полипептид может дополнительно содержать лидерную последовательность.

В определенных вариантах осуществления кодируемый полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп белка E2 вируса папилломы человека (HPV), например белок E2 HPV16 или белок E2 HPV18. Белок E2 может быть инактивированным, например в его трансактивирующем и/или ДНК-связывающем домене, например, с помощью делеции, мутации или посредством структурной перестройки различных частей белка. В определенных вариантах осуществления для HPV16 кодируемый полипептид содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5. В определенных вариантах осуществления для HPV18 кодируемый полипептид содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

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

В определенных вариантах осуществления для HPV16 последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления для HPV18 последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23.

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

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

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

В настоящем изобретении также предусмотрена композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV, в частности HPV16 или HPV18 или HPV16 и HPV18 у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту композиции вакцины в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем изобретении также предусмотрена вакцина в соответствии с настоящим изобретением для применения при индуцировании иммунного ответа в отношении HPV, в частности HPV16 или HPV18, или как HPV16, так и HPV18.

В определенных вариантах осуществления вакцину вводят субъекту более одного раза.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения любого из хронической инфекции, вызванной HPV (в частности хронической инфекции, вызванной HPV16 или HPV18), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки (такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC)), рака ротоглотки, рака полового члена, рака

влагалища или рака анального канала у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту вакцины в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем изобретении также предусмотрена вакцина в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении любого из хронической инфекции, вызванной HPV (в частности хронической инфекции, вызванной HPV16 или HPV18), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки (такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC)), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у субъекта.

В настоящем изобретении для HPV16 также предусмотрен полипептид, содержащий последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5. В настоящем изобретении для HPV18 также предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 22.

В настоящем изобретении также предусмотрены комбинации молекул, описанных выше для HPV16 и HPV18. Такие молекулы можно комбинировать в качестве отдельных молекул в одной композиции (например, одна нуклеиновая кислота для HPV16, т. е. кодирующая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и одна нуклеиновая кислота для HPV18, т. е. кодирующая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20, например каждая из которых находится на отдельном векторе). В качестве альтернативы, такие молекулы можно применять в комбинации посредством введения одному субъекту по меньшей мере двух отдельных композиций (одна для HPV16 и одна для HPV18). В качестве альтернативы, такие молекулы также можно комбинировать с помощью присутствия молекул HPV16 и HPV18 в одной молекуле нуклеиновой кислоты, например одном векторе. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор в соответствии с настоящим изобретением,

содержащий как молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, так и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и дополнительный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV, в частности HPV16 и HPV18, у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения любого из хронической инфекции, вызванной HPV (в частности хронической инфекции, вызванной HPV16 или HPV18), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки (такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC)), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. В определенных аспектах любых из этих вариантов осуществления комбинации HPV16/18 полипептид, который

содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, может содержать последовательность, изложенную под SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO: 5, и необязательно последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, тогда как полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20, может содержать последовательность, изложенную под SEQ ID NO:22, и необязательно последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 23. Любые из признаков в вариантах осуществления, описанных для отдельных нуклеиновых кислот HPV16 или HPV18, векторов, полипептидов, композиций вакцины, применений или способов, описанных выше, можно, разумеется, также применять в отношении комбинаций HPV16 и 18, описанных в данном документе.

Краткое описание графических материалов

фиг. 1. Экспрессия слитых белков E6 и E7 HPV16. Клетки HEK-293T временно трансфицировали ДНК-векторами, экспрессирующими трансгены, указанные на фигуре выше. Через 24 ч. после трансфекции клетки собирали и клеточные экстракты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителом к E7 HPV16 (верхняя секция). Контроль для нанесения, показывающий NF-κB (нижняя секция), подтверждает аналогичное нанесение клеточных лизатов на всех дорожках. Слева показан маркер молекулярного веса. Ожидаемые размеры слитых белков: E6E7SH прим. 38 кДа; E2E6E7SH и E6E7E2SH прим. 75 кДа, LSE2E6E7SH прим. 78 кДа.

фиг. 2. Образование колонии в мягком агаре. А) Схематическое изображение постановки анализа в мягком агаре. В) Иллюстративные микроскопические изображения при 40-х увеличении клеток в агаре через шесть недель после посева. Белые стрелки указывают на колонии, наблюдаемые у трансфицированных E7 wt клеток. С) Определение количества колоний через шесть недель после посева в агар с использованием Gelcount™ и соответствующего программного обеспечения. *: $p < 0,05$ (модель регрессии Пуассона); **: не самая меньшая эффективность (обобщенная линейная модель с пределом не самой меньшей

эффективности, составляющим 5%).

Фиг. 3. E6E7SH HPV16 с утраченными активностями E6 и E7. А) Иллюстративный вестерн-блоттинг, на котором демонстрируется отсутствие разрушения p53 с помощью E6E7SH. Клетки человека NCI-H1299 с нефункциональным p53 совместно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей p53, в комбинации с плазмидой, экспрессирующей E6 HPV16 дикого типа, E6E7SH HPV16 или пустым вектором. Отсутствие TF указывает на нетрансфицированные клетки. Через 24 часа после трансфекции получали клеточные лизаты, и 30 мкг общего белка наносили на гель. Верхняя секция – окрашивание p53, средняя секция – окрашивание E6, нижняя секция – окрашивание NF-κB (контроль для нанесения). (B) Количественная оценка уровней p53 в четырех независимых анализах. Сигнал p53 нормализовали в отношении сигнала NF-κB. С) Вестерн-блоттинг, демонстрирующий отсутствие разрушения pRb с помощью E6E7SH. Клетки Saos-2 с нефункциональным pRb трансфицировали плазмидой, экспрессирующей pRb, в комбинации с плазмидой, экспрессирующей E7 HPV16 дикого типа, E6E7SH HPV16 или пустым вектором. Отсутствие TF указывает на нетрансфицированные клетки. Через 24 часа после трансфекции получали клеточные лизаты, и 10 мкг общего белка наносили на гель. Верхняя секция – окрашивание pRb, средняя секция – окрашивание E7, нижняя секция – окрашивание NF-κB (контроль для нанесения). D) Количественная оценка уровней pRb в четырех независимых анализах. Сигнал pRb нормализовали в отношении сигнала NF-κB. *: $p < 0,05$ (модели ANOVA); **: не самая меньшая эффективность (тестирование основано на доверительном интервале, составляющем 95%, полученном из моделей ANOVA. Предел не самой меньшей эффективности составлял 75%).

Фиг. 4. E6E7SH HPV16 не иммортализирует первичные эпидермальные кератиноциты человека. Первичные эпидермальные кератиноциты человека трансдуцировали лентивирусами, кодирующими любое из открытой рамки считывания E6 и E7 дикого типа из HPV16 (E6E7 wt), последовательности E6E7SH HPV16 или eGFP. Нетрансдуцированные донорные клетки использовали в качестве контроля. Только экспрессия E6E7 wt индуцирует иммортализацию

первичных кератиноцитов, что подтверждается увеличенной продолжительностью жизни и активацией hTERT примерно в 200-й день (не показано). Обозначение в виде крестика указывает, что клетки погибали при старении, и их нельзя было в дальнейшем культивировать. Подробности см. в примере 2. Аналогичные результаты были получены у двух дополнительных доноров (не показаны).

Фиг. 5. Иммунный ответ, индуцированный E6E7SH HPV16 после ДНК-иммунизация - анализ IFN γ ELISPOT. А. Схема иммунизации Мышей СВ6F1 иммунизировали ДНК-плазмидами, экспрессирующими E6E7SH HPV16, или плазмидами, не экспрессирующими трансген (контроль). Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пулами из 15-мерных пептидов, соответствующими E7. В. Специфичные в отношении E7 HPV16 иммунные ответы у отдельных мышей, измеренные с помощью анализов IFN γ ELISPOT, предоставлены как пятнообразующие единицы (SFU) на 10^6 спленоцитов.

Фиг. 6. Иммуногенность E6E7SH HPV16 - анализ IFN γ ELISPOT. (А). Схема иммунизации. Мышей иммунизировали с помощью аденовекторов со вставками, как указано. Специфичные в отношении E7 ответы анализировали с помощью IFN γ ELISPOT в момент времени две недели (В) и в момент времени восемь недель (С) (представлены как пятнообразующие единицы (SFU) на 10^6 спленоцитов). Темные кружки представляют собой мышей, иммунизированных дозой, составляющей $1 \cdot 10^{10}$ вр, а светлые кружки представляют собой мышей, иммунизированных с помощью $5 \cdot 10^9$ вр. Черная полоса представляет собой среднее геометрическое ответов. Пунктирная линия указывает нижний предел обнаружения в анализе ELISPOT. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли на данных с логарифмическим преобразованием. *: $p < 0,05$. Подробности см. в примере 3.

Фиг. 7. Иммуногенность E2E6E7SH HPV16 - окрашивание E7-тетрамера. (А). Схема иммунизации. Мышей СВ6F1 иммунизировали с помощью $1 \cdot 10^{10}$ вр аденовекторов, экспрессирующих трансгены, как указано. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и

выделенные спленоциты анализировали в отношении присутствия клеток CD8+, способных взаимодействовать с тетрамерами E7₄₉₋₅₇-H2-Db (B). Процент положительных по E7-тетрамеру CD8+ Т-клеток указан на оси у. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли на данных с логарифмическим преобразованием, при этом различия между различными вариантами E6E7SH не были статистически значимыми.

Фиг. 8. Иммуногенность E2E6E7SH HPV16 – анализ IFN γ ELISPOT.

(А). Схема иммунизации. Мышей СВ6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов, экспрессирующих трансгены, указанные внизу секций В и С. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пулами из 15-мерных пептидов, соответствующими E2 (B), E6 (не показано) или E7 (C). Ответы представлены как SFU на 10⁶ спленоцитов. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли на данных с логарифмическим преобразованием. Ответ E2, индуцированный аденовекторами, кодирующими только E2, выше, чем ответ, индуцированный полипептидами по настоящему изобретению, которые включают фрагменты E6 и E7. Различия были значимыми для E2 по сравнению с E2E6E7SH и для E2 по сравнению с E6E7E2SH (*: p<0,05). Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли на данных с логарифмическим преобразованием.

Фиг. 9. Устойчивые иммунные ответы в отношении HPV16 у иммунизированных мышей. (А) Схема иммунизации. Мышей СВ6F1 иммунизировали с помощью 1*10¹⁰ vp векторов Ad35, экспрессирующих варианты LSE2E6E7SH HPV16, E2E6E7SH HPV16, E6E7SH HPV16, или с помощью аденовекторов, не экспрессирующих трансген (пустых). Образцы крови брали каждые две недели для определения процента E7-специфичных CD8+ Т-клеток с помощью окрашивания тетрамера. (В) Иммунные ответы через две недели после иммунизации. Вектор, включающий лидерную последовательность, индуцировал более высокий ответ, чем векторы без лидерной последовательности; LSE2E6E7SH по сравнению с E2E6E7SH (*: p<0,05). (С) Кинетика

ответов. Апостериорный статистический анализ ANOVA с поправками Бонферрони выполняли на данных с логарифмическим преобразованием с использованием массива данных за 2 недели. Ответ на E7, индуцируемый молекулами, включающими E2, имеет тенденцию быть более высоким по сравнению с молекулой без E2, хотя результаты не были статистически значимыми.

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

Фиг. 11. Клеточная иммуногенность E2E6E7SH HPV16 у макаков-резус. (А) Схема иммунизации. Макаков-резус иммунизировали в 0-й день. Восемь животных получали Ad26.HPV16-E2E6E7SH и два контрольных животных получали пустой Ad26 с помощью внутримышечной иммунизации (i.m.). Стимулирующую иммунизацию (Ad26.HPV16-E2E6E7SH или пустым Ad26) проводили через 8 недель. Через 16 недель животные получали вторую стимулирующую иммунизацию с помощью векторов Ad35, экспрессирующих тот же E2E6E7SH HPV16, в то время как контрольные животные получали пустой Ad35. Доза аденовекторов составляла 1×10^{11} вр на иммунизацию. Взятие крови выполняли в нескольких моментах времени. (В) Клеточные иммунные ответы в РВМС измеряли с помощью IFN γ ELISPOT. РВМС стимулировали с помощью пептидных пулов, соответствующих E2, E6 или E7 HPV16, и отображали количество пятнообразующих единиц (SFU) в 1×10^6 РВМС. У животных с пустым контролем (n=2) не было выявлено ответа. Подробности см. в

примере 4.

Фиг. 12. Терапевтический эффект аденовекторов, экспрессирующих HPV16-E2E6E7SH. (А) Инъекция TC-1 и схема иммунизации. Мышам СВ6F1 подкожно вводили $1 \cdot 10^5$ TC-1 клеток в 0-й день. Через шесть дней, когда опухоли можно было пальпировать, мышей иммунизировали двумя SLP, предусматривающими иммунодоминантные эпитопы E6 и E7 HPV16 (т. е. E6 HPV16, aa41-65 (KQQLLRREVYDFAFRDLICIVYRDGN; SEQ ID NO: 18) и E7 HPV16, aa 43-77 (GQAEPDRANYNIVTFCKCDSTLRRLCVQSTHVDIR; SEQ ID NO: 19)) в концентрации, составляющей 150 мкг, в конечном объеме, составляющем 200 мкл, 0,9% солевого раствора, дополненного 5 нмоль ODN1826-CpG (В) или Ad26.HPV16-E2E6E7SH (С). Контрольные мыши получали либо только CpG (D), либо пустой Ad26 (E). Всех мышей подвергали стимулирующей иммунизации в 20-й день. Мышей, которые получали векторы Ad26 при примиряющей иммунизации, впоследствии иммунизированы соответствующими векторами Ad35. Другие мыши получали SLP с добавленным CpG в качестве адъюванта или только CpG, как при примиряющих иммунизациях. (В-Е) Измерение опухоли у мышей, которым вводили TC-1. Объем опухоли рассчитывали как $(\text{ширина}^2 \cdot \text{длина})/2$. Мышей умерщвляли, когда объемы опухолей превышали 1000 мм^3 . Двух мышей пришлось умертвить из-за потери веса более 20% (обозначены звездочками). (F-G) Увеличенное изображение секций В и С в первые 35 дней. (H) Выживаемость после инъекции TC-1. Выживаемость мышей, обработанных Ad.HPV16-E2E6E7SH существенно повышалась по сравнению с мышами, иммунизированными SLP и CpG (логарифмический ранговый критерий $p < 0,05$). Три мыши, иммунизированные Ad.HPV16-E2E6E7SH, не имели опухолей в конце эксперимента (в 92-й день).

Фиг. 13. При использовании аденовирусных векторов, несущих трансгены, кодирующие либо HPV Ag, либо LSE2E6E7SH, показаны повышенные выходы вирусов в клетках, способных подавлять экспрессию трансгена. А) Анализ выхода вируса для векторов Ad35. Клетки PER.C6, PER.C6/CymR и PER.C6/TetR инфицировали векторами Ad35, несущими трансгены, кодирующие GFP-Luc или HPVAg. Эти трансгены находятся под управлением промоторов CMV, содержащих либо CuO, либо TetO. Выходы вируса определяли через четыре дня

после инфицирования Ad35 с помощью способа на основе гексон-специфичной qPCR. В) Анализ выхода вируса для векторов Ad26. Клетки PER.C6 и PER.C6/TetR инфицировали векторами Ad26, несущими трансгены, кодирующие GFP-Luc, HPVAg или LSE2E6E7SH, все из которых находятся под управлением промоторов CMV, содержащих TetO. Выходы вируса определяли через три дня после инфицирования Ad26 с помощью способа на основе гексон-специфичной qPCR. Подробности см. в примере 6.

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

фиг. 15. Экспрессия слитых белков E6 и E7 HPV18. Клетки HEK-293T временно трансфицировали ДНК-векторами, экспрессирующими трансгены, указанные на фигуре выше. Через 24 ч. после трансфекции клетки собирали, и клеточные экстракты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителом к E6 HPV18 (верхняя секция). Контроль для нанесения, показывающий NF- κ B (нижняя секция), подтверждает аналогичное нанесение клеточных лизатов на обеих дорожках. Слева показан маркер молекулярного веса, и стрелки указывают слитые белки. Ожидаемые размеры: E6E7SH прим. 38 кДа; E2E6E7SH прим. 75 кДа.

фиг. 16. Отсутствие образования колонии в мягком агаре с помощью сконструированной конструкции E6E7SH HPV18. А) Иллюстративные микроскопические изображения при 40-х увеличении клеток в агаре через шесть недель после посева. Большие колонии наблюдали у трансфицированных E7 wt клеток. В) Определение количества колоний через шесть недель после посева в агар с использованием Gelcount™ и соответствующего программного обеспечения. *: $p < 0,05$ (модель регрессии Пуассона); **: не самая меньшая эффективность (обобщенная линейная модель с пределом не самой меньшей эффективности, составляющим 5%).

фиг. 17. E6E7SH HPV18 утратил способность разрушать p53 и pRb. А) Иллюстративный вестерн-блоттинг, демонстрирующий отсутствие разрушения p53 с помощью E6E7SH HPV18. Клетки человека NCI-H1299 с нефункциональным p53 совместно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей p53, в комбинации с плазмидой, экспрессирующей E6 HPV18 дикого типа, E6E7SH или пустым вектором. Отсутствие TF указывает на нетрансфицированные клетки. Через 24 часа после трансфекции получали клеточные лизаты, и 30 мкг общего белка наносили на гель. Верхняя секция - окрашивание p53, средняя секция - окрашивание E6, нижняя секция - окрашивание NF- κ B (контроль для нанесения). (В) Количественная оценка уровней p53 в четырех независимых анализах. Сигнал p53 нормализовали в отношении сигнала NF- κ B. С) Вестерн-блоттинг, на котором демонстрируется отсутствие разрушения pRb с помощью E6E7SH HPV18. Клетки Saos-2 с нефункциональным pRb

трансфицировали плазмидой, экспрессирующей pRb, в комбинации с плазмидой, экспрессирующей E7 HPV18 дикого типа, E6E7SH или пустым вектором. Отсутствие TF указывает на нетрансфицированные клетки. Через 24 часа после трансфекции получали клеточные лизаты, и 10 мкг общего белка наносили на гель. Верхняя секция - окрашивание pRb, средняя секция - окрашивание E7, нижняя секция - окрашивание NF-κB (контроль для нанесения). D) Количественная оценка уровней pRb в четырех независимых анализах. Сигнал pRb нормализовали в отношении сигнала NF-κB. *: $p < 0,05$ (модели ANOVA); **: не самая меньшая эффективность (тестирование основано на доверительном интервале, составляющем 95%, полученном из моделей ANOVA. Предел не самой меньшей эффективности составлял 75%).

Фиг. 18. E6E7SH HPV18 не иммортализирует первичные генитальные кератиноциты человека. Первичные генитальные кератиноциты человека трансдуцировали лентивирусами, кодирующими любое из открытой рамки считывания E6 и E7 дикого типа из HPV18 (E6E7 wt), последовательности E6E7SH или eGFP. Нетрансдуцированные донорные клетки использовали в качестве контроля. Только экспрессия E6E7 wt HPV18 индуцирует иммортализацию первичных кератиноцитов, что подтверждается увеличенной продолжительностью жизни (и активацией hTERT примерно в 200-й день, данные не показаны). Обозначение в виде крестика указывает, что клетки погибали при старении, и их нельзя было в дальнейшем культивировать. Подробности см. в примере 8. Аналогичные результаты были получены у двух дополнительных доноров (данные не показаны).

Фиг. 19. Имуногенность вариантов E6E7SH HPV18 - окрашивание внутриклеточных цитокинов. Мышей CB6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов, экспрессирующих трансгены, указанные внизу секций. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пулами из 15-мерных пептидов, соответствующими E6 HPV18. Ответы представлены в виде процента IFNγ-положительных CD8+ T-клеток.

Фиг. 20. Иммуногенность комбинированных векторов HPV16 и HPV18 - анализ IFN γ ELISPOT. Мышей СВ6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов (тип 26), экспрессирующих трансгены E2E6E7SH как из HPV16 (кодирующего SEQ ID NO: 3), так и из HPV18 (кодирующего SEQ ID NO: 22). Через четыре недели примиряющей иммунизации мыши получали гетерологичную стимулирующую иммунизацию аденовирусными векторами типа 35 с теми же трансгенами E2E6E7SH. Через две недели после стимулирующей иммунизации мышей умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пулами из 15-мерных пептидов, соответствующими E7 HPV16 (A) или E6 HPV18 (B). Ответы представлены в виде SFU на 10^6 спленоцитов.

Фиг. 21. Клеточная иммуногенность комбинированной вакцины против HPV16 и HPV18 у макаков-резус. Макаков-резус иммунизировали в соответствии со схемой, представленной на фиг. 11, комбинацией сконструированных конструкций HPV16 и HPV18. В день 0: восемь животных получали смесь Ad26.HPV16-E2E6E7SH и Ad26.HPV18-E2E6E7SH с помощью внутримышечной иммунизации (i.m). Стимулирующую иммунизацию теми же векторами проводили через 8 недель. Через 16 недель животные получали вторую стимулирующую иммунизацию с помощью смеси двух векторов Ad35, экспрессирующих те же слитые белки E2E6E7SH HPV16 и HPV18. Доза аденовекторов составляла 1×10^{11} vp на вектор на иммунизацию. Взятие крови выполняли в нескольких моментах времени. Клеточные иммунные ответы в РВМС измеряли с помощью IFN γ ELISPOT. РВМС стимулировали с помощью пептидных пулов, соответствующих E2, E6 или E7 HPV16 и HPV18, и определяли количество пятнообразующих единиц (SFU) в 1×10^6 РВМС. На фигуре показаны суммарные ответы для всех шести тестируемых пептидных пулов через 2 недели после каждой иммунизации. Подробности см. в примере 11.

Фиг. 22. Терапевтический эффект комбинированных аденовекторов, экспрессирующих E2E6E7SH HPV16 и HPV18. Мышам C57BL/6 подкожно вводили 5×10^4 TC-1 клеток в 0-й день. Через шесть дней, когда опухоли можно было пальпировать, мышей иммунизировали с помощью Ad26.HPV16-E2E6E7SH или смеси Ad26.HPV16-E2E6E7SH и Ad26.HPV18-E2E6E7SH. Контрольные мыши

получали пустой Ad26. Все мыши получали стимулирующую иммунизацию в 20-й день с помощью соответствующих векторов Ad35. Объем опухоли рассчитывали как (ширина² * длина)/2. Мышей умерщвляли, когда объемы опухолей превышали 1000 мм³. На графике показана выживаемость после инъекции TC-1. Три мыши, иммунизированные комбинированной вакциной против HPV16+HPV18, не имели опухолей в конце эксперимента. Медиана времени выживаемости мышей, обработанных Ad.HPV16-E2E6E7SH, значительно не отличалась по сравнению с мышами, иммунизированными Ad.HPV16/18-E2E6E7SH.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1. Полипептид представляет собой слитый полипептид, и в данном документе иногда упоминается как полипептид по настоящему изобретению или слитый полипептид по настоящему изобретению. Этот полипептид пригоден для получения иммунного ответа в отношении белка E6 и E7 HPV16, и таким образом молекулу нуклеиновой кислоты можно применять в качестве терапевтической вакцины с целью предупреждения хронической инфекции HPV16 и связанных с ней заболеваний.

Полипептид по настоящему изобретению представляет собой тщательно сконструированную молекулу, которая содержит фактически полные аминокислотные последовательности E6 и E7 HPV16 (отсутствует только одна аминокислота с С-конца нативного белка E6 HPV16) в виде фрагментов, которые переупорядочены и частично перекрываются таким образом, что (практически) присутствуют все Т-клеточные эпитопы белков E6 и E7 HPV16. Другими исследователями ранее были описаны молекулы с некоторым потенциалом в качестве вакцин против HPV (например, Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47; Daayana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36; Smahel *et al.*, 2001, *Virology* 281: 231-38; Yan *et al.*, 2009, *Vaccine* 27: 431-40; Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406; EP1183368, WO 2013/083287), однако каждая из этих молекул имеет один или несколько недостатков. Сконструированные

полипептидные молекулы по настоящему изобретению являются преимущественными по меньшей мере в одном и, как правило, в нескольких аспектах относительно ранее описанных подходов. В частности, преимущества молекул и/или векторов по настоящему изобретению включают следующее: (i) они характеризуются требуемым профилем безопасности, так как нуклеиновая кислота характеризуются сильно уменьшенной (по сравнению с нативными белками E6 и E7), вплоть до необнаруживаемой, трансформирующей активностью; (ii) они представляют собой молекулы с одной нуклеиновой кислотой, которые легко получать в промышленном масштабе экономически осуществимым образом, и не вызывают логистических проблем, в отличие от подходов с многими молекулами; (iii) кодируемые полипептиды содержат практически все Т-клеточные эпитопы нативных белков E6 и E7 HPV16; (iv) конструирование кодируемых полипептидов сводит к минимуму внедрение нежелательных потенциально сильных неэпитопов (т. е. эпитопов, не присутствующих в нативных белках E6 и E7); и (v) в определенных вариантах осуществления они не зависят от высокоактивных адъювантов для повышения требуемого иммунного ответа. Таким образом, молекулы по настоящему изобретению представляют собой большой шаг вперед с помощью объединения различных выгодных характеристик в единую конструкцию и являются превосходными кандидатами, в первую очередь для терапевтической вакцинации против HPV16. Эти молекулы также могут действовать как профилактические вакцины против HPV16, а это означает, что они вероятно способны предупреждать у вакцинированных субъектов хроническую инфекцию, вызываемую HPV16.

Преимущества, описанные в двух предыдущих параграфах для молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированные молекулы HPV16 (содержащие аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1), также вносят необходимые изменения в молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие новые сконструированные молекулы для HPV18 (содержащие аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20), что является целью настоящего изобретения.

Авторы данного изобретения применяли IEDB-AR для

определения возможного образования неприродных сильных эпитопов, которые можно вводить во вновь созданные сочленения между различными фрагментами А6 и Е7. В определенных вариантах осуществления для сконструированной молекулы HPV16 с помощью тщательного конструирования количества неэпитопов с длиной, составляющей девять аминокислот, с прогнозируемой аффинностью связывания, составляющей <50 нМ, в отношении 20 наиболее распространенных HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C аллелей в последовательностях переупорядоченных Е6 и Е7 HPV16 было минимизировано до всего лишь 1. Это является значительным улучшением по сравнению с конструкциями, описанными другими исследователями, которые для одного "перетасованного" белка Е6 HPV16 уже содержали более 30 таких неэпитопов, и такие конструкции, вероятно, будут содержать еще несколько неэпитопов в последовательностях, которые были присоединены к этим конструкциям с целью предупреждения потери эпитопов (Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93). Следовательно, конструкции по настоящему изобретению характеризуются значительно улучшенным иммунологическим профилем, поскольку вероятность измененного иммунного ответа по сравнению с нативными Е6 и Е7 была сведена к минимуму в молекулах по настоящему изобретению по сравнению с подходами, описанными другими исследователями.

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

В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая

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

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

Специалисту будет понятно, что в белке можно производить изменения, например, с помощью замен, делеций, добавлений аминокислот и т. д., например с помощью традиционных методик молекулярной биологии. В целом, консервативные замены

аминокислот можно применять без потери функции или иммуногенности полипептида. Это можно проверять на основании традиционных методик, хорошо известных специалисту.

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

Существуют различные типы HPV (идентифицировано более 120 типов, и они указаны по их номеру), и в целом для каждого типа, который должен быть охвачен вакциной, может быть необходимо включение в вакцину специфичных к данному типу антигенов, несмотря на то, что для определенных антигенов может существовать некоторая перекрестная реактивность. Типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82 являются канцерогенными HPV "высокого риска", передающимися половым путем, и могут приводить к развитию интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN) и/или анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN). HPV в соответствии с настоящим изобретением (т. е. HPV, из которого получают фрагменты E6 и E7 в кодируемом полипептиде) представляет собой

HPV16 (для SEQ ID NO: 1-6), или HPV18 (для SEQ ID NO: 20-23). Его можно применять для субъектов, инфицированных соответственно HPV16 или HPV18. В определенных вариантах осуществления его также можно подходящим образом комбинировать с вакцинами против HPV других типов. В определенных вариантах осуществления такая комбинация представляет собой комбинацию с вышеописанной вакциной против типа HPV высокого риска, например вакцина против HPV16 с вакциной против HPV18. В других вариантах осуществления вакцину по настоящему изобретению комбинируют с вакциной против одного или нескольких из HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 или -82. Такие комбинации можно применять, например, если точный тип инфекции, вызванной HPV, еще не определен, или если требуется иммунный ответ с профилактическим эффектом против более чем одного типа HPV. Также предусмотрены комбинации вакцин по настоящему изобретению с вакцинами против типов HPV, которые вызывают остроконечные бородавки, такие как HPV6 и/или HPV11. Последовательности таких типов HPV и белков, кодируемых ними (например, E6, E7, E2), доступны специалисту из общедоступных баз данных, таких как база данных последовательностей GenBank, представленная Национальным центром биотехнологической информации (NCBI).

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением для HPV16 содержит SEQ ID NO: 1, и в одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением содержит SEQ ID NO: 2. Полипептид в соответствии с настоящим изобретением для HPV18 содержит SEQ ID NO: 20, и в одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением содержит SEQ ID NO: 21.

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

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением содержит эпитопы белков E6 и E7 HPV16 или, в качестве альтернативы, эпитопы белков E6 и E7 HPV18. В определенных вариантах осуществления полипептид в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит (и следовательно нуклеиновая кислота,

кодирующая полипептид, дополнительно кодирует) по меньшей мере один дополнительный антиген или эпитоп(-ы) этого дополнительного антигена. Этот дополнительный антиген предпочтительно представляет собой антиген HPV, предпочтительно такого же типа HPV, как и белки E6 и E7 в полипептиде, т. е. соответственно HPV16 или HPV18. Таким образом, этот дополнительный антиген может представлять собой белок HPV или его иммуногенный фрагмент, и в определенных вариантах осуществления содержит белок E2 или его фрагмент, содержащий по меньшей мере один эпитоп E2 HPV, предпочтительно из HPV16 или HPV18. Эти дополнительные антигены или эпитопы могут быть помещены внутри между двумя фрагментами E6 и/или E7 в полипептиде, содержащем SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20, но предпочтительно слиты на N-конце или C-конце с полипептидом E6/E7, содержащим SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20. В качестве альтернативы или дополнительно, могут присутствовать аминокислотные последовательности, которые стимулируют иммунный ответ. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в данном изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, кодирующие полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20, и при этом полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один другой антиген, например белок E2 HPV или по меньшей мере один его эпитоп, но предпочтительно большее количество эпитопов. Одним преимуществом добавления антигена E2 по настоящему изобретению является то, что E2, как известно, экспрессируется на ранних стадиях инфекции/при низкой степени повреждений, когда экспрессия E6 и E7 все еще очень низкая. В ходе развития рака шейки матки экспрессия E2 утрачивается и в результате возрастают уровни E6 и E7 (Yugawa and Kiyono, 2009, *Rev Med Virol* 19: 97-113). Объединение эпитопов из E2, E6 и E7 в одной вакцине обеспечивает лечение широкой целевой группы пациентов, начиная с пациентов с хронической инфекцией до пациентов с инвазивным раком шейки матки (или другими вызванными HPV16 формами рака). В определенных вариантах осуществления белок E2 представляет собой белок E2 дикого типа. В других определенных вариантах осуществления белок E2 характеризуется

делецией или одной или несколькими мутациями в его ДНК-связывающем домене (по сравнению с белком E2 дикого типа). Последовательность белков E2 HPV16 и HPV18 можно найти в базе данных белков NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) под номерами NP_041328.1 и AAR20597.1, соответственно. Как известно, несколько одиночных аминокислотных замен в E2 HPV16, таких как G293V, K299M или C300R в С-концевой части этого белка, подавляют связывание ДНК. Для E2 HPV18 соответствующими аминокислотными заменами являются G294V, K300M, C301R. Преимущество применения варианта или фрагмента E2, лишённого ДНК-связывающей способности, заключается в том, что он мог бы предотвращать непредсказуемые транскрипционные изменения путем прямого связывания с ДНК клетки-хозяина в клетках, где он экспрессируется. В дополнение или в качестве альтернативы к вышеописанным мутациям в ДНК-связывающем домене, дополнительными подходами для предотвращения активности E2 являются введение мутаций, которые подавляют активность более N-терминально расположенного трансактивирующего домена E2, и/или которые, как сообщается, влияют на структуру полипептида E2. Для E2 HPV16 неограничивающими примерами аминокислотных замен в положениях, которые были описаны ранее (например, Brokaw et al, 1996; Sakai et al, 1996), являются R37A, I73A, W92A, E39A, W33A, P106A и G156A, и при этом E2 HPV16 в соответствии с настоящим изобретением может необязательно содержать одну или несколько из этих мутаций в трансактивирующем домене. Для E2 HPV18 соответствующими аминокислотными заменами являются R41A, I77A, W96A, E43A, W37A, P110A и G161A, и при этом E2 HPV18 в соответствии с настоящим изобретением может, таким образом, необязательно содержать одну или несколько из этих мутаций в трансактивирующем домене. В определенных вариантах осуществления E2 содержит мутации в трансактивирующем домене, в других вариантах осуществления E2 содержит мутации в ДНК-связывающем домене, и в дополнительных вариантах осуществления E2 содержит мутации как в трансактивирующем домене, так и в ДНК-связывающем домене. В еще одном альтернативном варианте осуществления полипептид E2 в соответствии с настоящим изобретением разделен

на фрагменты, которые являются переупорядоченными ('перетасованными'), для подавления активности E2 при сохранении эпитопов E2 для иммуногенности. Такой вариант осуществления можно необязательно комбинировать с одной или несколькими из вышеописанных мутаций, например в ДНК-связывающем домене и/или в трансактивирующем домене. Помимо полипептидов E2 HPV дикого типа, все такие мутанты E2 могут быть использованы в качестве белка E2 или его части или варианта в соответствии с настоящим изобретением.

Белок E2 или его часть или вариант можно добавлять внутрь, но предпочтительно сливать с N-кодом или C-концом полипептида по настоящему изобретению, содержащего SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления для HPV16 молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий SEQ ID NO: 3. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 4. В другом варианте осуществления для HPV16 молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий SEQ ID NO: 5. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления для HPV18 молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий SEQ ID NO: 22. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит SEQ ID NO: 23.

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

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включена в вектор. Термин "вектор", используемый в данном документе, как правило, представляет собой носитель для искусственного переноса чужеродного генетического материала в другую клетку, где он может быть реплицирован и/или экспрессирован, и в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Его можно получать в соответствии с обычными методиками молекулярной биологии, такими как клонирование. Обычно такие векторы можно размножать по меньшей мере в одном типе подходящих хозяев, таких как бактерии, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих и т. п. Четыре основных типа векторов представляют собой плазмиды, вирусные векторы, космиды и искусственные хромосомы. Сам вектор обычно представляет собой последовательность ДНК, которая состоит из вставки (трангена, в данном изобретении нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид по данному изобретению) и последовательности, которая служит в качестве "остова" вектора. Цель вектора, который передает генетическую информацию в другую клетку, как правило, заключается в том, чтобы выделить, размножить или экспрессировать вставку в клетке-мишени. Предпочтительно, последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором в векторе. Подразумевается, что термин "функционально связанный" означает, что нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, связана с промотором таким способом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в клетке-хозяине, в случае если вектор введен в клетку-хозяина). Регуляторные последовательности экспрессии могут быть функционально связаны с трансгеном. В определенных вариантах осуществления векторы сконструированы для экспрессии трансгена в клетке-мишени, и как правило содержат промоторную последовательность, которая управляет экспрессией трансгена. В определенных вариантах осуществления могут присутствовать один или несколько из обычно используемых элементов вектора, таких как последовательности терминатора

транскрипции, хвостовые последовательности полиаденилирования, последовательности Kozak, UTR, точки начала репликации, множественные сайты клонирования, генетические маркеры, устойчивость к антибиотикам и другие последовательности, и при этом специалист может сконструировать вектор таким образом, чтобы он обладал требуемыми свойствами, например для репликации в определенных клетках с целью распространения и размножения вектора и экспрессии трансгена вектора в клетках-мишенях, в которые вводят вектор. Векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый полипептид в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно сконструированные для экспрессии в клетках млекопитающих, пригодны в качестве вакцины в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой плазмиду, космиду, искусственную хромосому дрожжей, бактериальную искусственную хромосому, вирусный вектор или т. п. Специалист в данной области техники осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Некоторые хорошо известные и наиболее часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), такие как предранний (IE) промотор CMV (называемый в данном документе промотором CMV) (например, получаемый из pcDNA, Invitrogen), промоторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40) (например, получаемые из pIRES, № по кат. 631605, BD Sciences) и т. п. Из эукариотических клеток также можно получать подходящие промоторы, такие как промоторы генов металлотионеинов (MT), промотор гена фактора элонгации 1 α (EF-1 α), промотор гена убиквитина С или UB6, промотор гена актина, промотор гена иммуноглобулина, промоторы генов теплового шока и т. п. (см., например, WO 2006/048459). Неограничивающим примером подходящего промотора для получения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (патент США № 5385839), например предранний промотор CMV,

например содержащий нуклеотиды от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV, например промотора CMV, как предусмотрено в данном документе, с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 13. Сигнал полиаденилирования, например сигнал полиА гена бычьего гормона роста (US 5122458), может располагаться позади трансгена (-ов).

Также можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. В данном документе термин "регуляторная последовательность" используют взаимозаменяемо с термином "регуляторный элемент", и он относится к сегменту нуклеиновой кислоты, как правило, но без ограничения ДНК, которая модулирует транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана и таким образом действует как транскрипционный модулятор. Регуляторная последовательность часто содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые являются транскрипционными доменами связывания, которые распознаются доменами связывания нуклеиновых кислот транскрипционных белков и/или факторов транскрипции, энхансерами или репрессорами и т. д. Например, возможно функционально связать репрессорную последовательность с промотором, при этом репрессорная последовательность может быть связана репрессорным белком, который может уменьшать или предотвращать экспрессию трансгена в линии клеток-продуцентов, которая экспрессирует этот репрессорный белок. Это может улучшить генетическую стабильность и/или уровни экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты при пассировании и/или при продуцировании в больших количествах в линии клеток-продуцентов. Такие системы были описаны в уровне техники. Например, регуляторная последовательность может включать одну или несколько последовательностей операторов оперона тетрациклина (*tetO*), так что экспрессия ингибируется в присутствии белка-репрессора оперона тетрациклина (*tetR*). В отсутствие тетрациклина белок *tetR* способен связываться с сайтами *tetO* и подавлять транскрипцию гена, функционально связанного с сайтами *tetO*. Однако в присутствии тетрациклина конформационное изменение белка *tetR* предотвращает его связывание с операторными последовательностями, что обеспечивает

транскрипцию функционально связанных генов. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, например когда она присутствует в рекомбинантном аденовирусном векторе, согласно настоящему изобретению может необязательно включать *tetO*, функционально связанный с промотором, так что экспрессия одного или нескольких трансгенов ингибируется в рекомбинантных аденовирусах, которые продуцируются в линии клеток-продуцентов, в которых экспрессируется белок *tetR*. Впоследствии экспрессия не будет ингибироваться, если рекомбинантный аденовирус вводить субъекту или в клетки, которые не экспрессируют белок *tetR* (например, международная заявка на выдачу патента WO 07/073513). В других определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, например в случае если она присутствует в рекомбинантном аденовирусе, может необязательно включать систему переключения генов с использованием кумата, в которой регуляция экспрессии опосредуется связыванием репрессора (*CymR*) с сайтом оператором (*CuO*), расположенным ниже промотора (например, Mullick et al. *BMC Biotechnol.* 2006 6:43). Используемый в данном документе термин "репрессор" относится к объектам (например, белкам или другим молекулам), обладающим способностью ингибировать, препятствовать, замедлять и/или подавлять продуцирование гетерологичного белкового продукта рекомбинантного вектора экспрессии. Например, с помощью воздействия на сайт связывания в подходящем месте вдоль вектора экспрессии, как например в кассете экспрессии. Примеры репрессоров включают *tetR*, *CymR*, *lac*-репрессор, *trp*-репрессор, *gal*-репрессор, лямбда-репрессор и другие соответствующие репрессоры, известные из уровня техники. В данном документе предусмотрены примеры применения операторной/репрессорной системы *tetO/tetR* и операторной/репрессорной системы *CuO/CymR*. Подавление экспрессии трансгена вектора в ходе размножения вектора может предотвращать трансгенную нестабильность и в ходе продуцирования может увеличить выходы векторов, содержащих трансген по настоящему изобретению. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению содержат промотор, который

может быть подавлен с помощью связывания репрессорного белка, например с помощью обеспечения промотора, который функционально соединен с репрессорной операторной последовательностью (например, в неограничивающих вариантах осуществления последовательностью, содержащей TetO, например последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 11, или последовательностью, содержащей CuO, например последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 12), с которой репрессорный белок (например, белок TetR, например, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, или белок CymR, например, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 17) может связываться.

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

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

В предпочтительных вариантах осуществления вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный аденовирус. Преимущества аденовирусов при применении в качестве вакцин включают легкость манипулирования,

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

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913, и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Chapters 67 and 68, respectively, in *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd.,

New York (1996), а также других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов включает применение стандартных методик молекулярной биологии, таких как описанные, например, в Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992) и Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также других источниках, упомянутых в данном документе.

Особенно предпочтительными серотипами для рекомбинантного аденовируса являются серотип 35 человека или серотип 26 человека. Получение векторов rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink *et al.*, 2007 *Virology* 81: 4654-63. Иллюстративные последовательности генома Ad26 указаны в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO:1 из WO 2007/104792. Получение векторов rAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels *et al.*, 2003, *J Virol* 77: 8263-71. Иллюстративные последовательности генома Ad35 указаны в GenBank под номером доступа AC_000019 и на фиг. 6 из WO 00/70071.

В определенных вариантах осуществления аденовирус является репликативно-дефектным, например потому, что он содержит делецию в области E1 генома. Как известно специалисту, в случае делеций существенно важных областей из генома аденовируса функциональные элементы, кодируемые этими областями, должны быть обеспечены в транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, т. е. если части или целые области E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, например быть встроенными в ее геном или находиться в форме так называемого вспомогательного аденовируса или вспомогательной плазмиды. Аденовирус также может содержать делецию в области E3, которая не является существенной для репликации, и следовательно такую делецию не следует комплементировать.

Клетка-продуцент (также иногда называемая в уровне техники и в данном документе как "пакующая клетка" или

"комплементирующая клетка"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может быть размножен. Например, размножение векторов на основе рекомбинантного аденовируса осуществляют в клетках-продуцентах, которые комплементируют дефекты в аденовирусе. Предпочтительно, такие клетки-продуценты содержат в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса, и таким образом они способны к комплементированию рекомбинантных аденовирусов с делецией в области E1. Можно использовать любую E1-комплементирующую клетку-продуцент, такую как клетки сетчатки глаза человека, иммортализированные с помощью E1, например, клетки 911 или PER.C6 (см. патент США № 5994128), E1-трансформированные амниоциты (см. патент EP № 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (см., например, WO 98/39411, патент США № 5891690), GH329:HeLa (Gao *et al.*, 2000, *Hum Gene Ther* 11: 213-19), 293 и т. п. В определенных вариантах осуществления клетками-продуцентами являются, например, клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и т. п. Производство аденовирусных векторов в клетках-продуцентах описано в (Kovesdi *et al.*, 2010, *Viruses* 2: 1681-703).

В определенных вариантах осуществления E1-дефектный аденовирус содержит кодирующую последовательность E4-orf6 из аденовируса подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных комплементирующих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 из Ad5, таких как клетки 293 или клетки PER.C6 (см., например, Navenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; WO 03/104467, включенные в данный документ во всей своей полноте с помощью ссылки).

'Гетерологичная нуклеиновая кислота' (также называемая в данном документе 'трансгеном') в векторах по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, которая в природных условиях не присутствует в векторе, и в соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота, кодирующая слитый полипептид по настоящему изобретению, считается гетерологичной

нуклеиновой кислотой, в случае если она присутствует в векторе. Ее вводят в вектор с помощью, например, стандартных методик молекулярной биологии. Например, ее можно клонировать в удаленные области E1 или E3 аденовирусного вектора или в область между областью E4 и rITR. Трансген обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. В предпочтительных вариантах осуществления трансген клонируют в область E1 аденовирусного вектора.

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

В определенных аспектах в настоящем изобретении также предусмотрен полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Такой полипептид содержит SEQ ID NO: 1 (для HPV16) или SEQ ID NO: 20 (для HPV18). В определенных вариантах осуществления такой полипептид может содержать SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5 (оба для HPV16), или SEQ ID NO: 22 (для HPV18). Характеристики такого полипептида описаны выше. Например, такой полипептид можно непосредственно применять в качестве вакцины против HPV.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены вакцины, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы или

полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, где варианты осуществления для каждого из этих аспектов могут включать вышеописанные варианты. В предпочтительных вариантах осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления вакцина содержит вектор в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно ДНК-вектор, вектор на основе MVA или рекомбинантный аденовирусный вектор.

В определенных вариантах осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением, которая кодирует сконструированный полипептид HPV16, содержит дополнительные активные ингредиенты, например нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один эпитоп белка E6 и/или E7 по меньшей мере одного типа HPV, отличного от HPV16, например типа HPV высокого риска, такого как HPV18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 или -82. В определенных вариантах осуществления вакцина в соответствии с настоящим изобретением, которая кодирует сконструированный полипептид HPV18, содержит дополнительные активные ингредиенты, например нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один эпитоп белка E6 и/или E7 по меньшей мере одного типа HPV, отличного от HPV18, например типа HPV высокого риска, такого как HPV16, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 или -82.

Особенно предпочтительными являются вакцины, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют сконструированные полипептиды как HPV16, так и HPV18 по настоящему изобретению, т. е. кодирующие полипептид под SEQ ID NO: 1, а также полипептид под SEQ ID NO: 20. В таких вакцинах компоненты HPV16 и HPV18 могут находиться в одной и той же композиции в качестве отдельных молекул, или они могут находиться в одной и той же молекуле, например кодируемой одним и тем же вектором, или они могут быть предусмотрены в качестве набора из частей с отдельным компонентом HPV16 и отдельным компонентом HPV18 для комбинированного применения при вакцинации, например для растворения перед введением или для раздельного, но практически

одновременного введения. Одним преимуществом таких комбинаций является то, что такие вакцины могут действовать терапевтически в субъектах, которые инфицированы либо HPV16, либо HPV18 (два наиболее распространенных типа HPV высокого риска, которые вместе являются причиной большинства форм рака, вызванных HPV), так что такие вакцины характеризуются повышенной применимостью по сравнению с монотипными вакцинами, которые содержат сконструированные молекулы либо HPV16, либо HPV18.

Термин "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, эффективный для индукции у субъекта профилактической и/или терапевтической степени иммунитета в отношении определенного патогена или заболевания, в данном случае терапевтически против HPV. Как правило, вакцина содержит молекулу нуклеиновой кислоты или вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый наполнитель. После введения субъекту полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, будет экспрессироваться в организме субъекта, что приведет к возникновению иммунного ответа в отношении антигенных фрагментов E6 и/или E7, которые присутствуют в полипептиде. Преимущество молекул по настоящему изобретению заключается в том, что присутствуют практически все Т-клеточные эпитопы E6 и E7 HPV16 (для SEQ ID NO: 1-6) или HPV18 (для SEQ ID NO: 20-23), и таким образом с помощью вакцины может быть обеспечен Т-клеточный ответ на любой эпитоп, присутствующий в E6 или E7 дикого типа. Кроме того, вакцина обладает всеми преимуществами безопасности и эффективности, которые описаны выше для молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Для введения людям могут применяться фармацевтические композиции, содержащие вектор и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В настоящем контексте термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в используемых дозах и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или неблагоприятных эффектов у субъектов, которым их вводят. Эти фармацевтически приемлемые наполнители хорошо известны из уровня техники (см. Remington's

Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Novgaard, Eds., Taylor & Francis [2000] и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Как правило, наполнитель представляет собой фармакологически неактивное вещество, составленное с активным ингредиентом лекарственного препарата. Наполнители обычно используют для увеличения объемов составов, которые содержат сильнодействующие активные ингредиенты (которые часто называются "объемообразующими средствами", "заполнителями" или "разбавителями"), чтобы обеспечить удобное и точное распределение лекарственного средства при получении лекарственной формы. Они также могут служить для различных терапевтически-усиливающих целей, таких как облегчение абсорбции лекарственного средства или растворимость или других фармакокинетических факторов. Наполнители могут также быть пригодны в производственном процессе для упрощения обращения с активным веществом, относящегося, например, к обеспечению текучести порошка или обеспечению неадгезионных свойств, в дополнение к поддержанию стабильности *in vitro*, как например для предупреждения денатурации в течение ожидаемого срока хранения. Выбор подходящих наполнителей также зависит от пути введения и лекарственной формы, а также от активного ингредиента и других факторов.

Очищенные молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или полипептид предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно использование лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают с помощью стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных *per se* из уровня техники. Затем растворы лиофилизируют или заполняют ими контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне от pH 3,0 до 9,5, например от pH 5,0 до 7,5. Как правило, молекула нуклеиновой кислоты, или вектор, или полипептид находятся в растворе с подходящим буфером, при этом раствор вектора может также

содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления вакцину можно составлять в виде инъекционного препарата. Эти составы, содержащие эффективные количества молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или полипептида, являются либо стерильными жидкими растворами, жидкими суспензиями, либо лиофилизированными вариантами и необязательно содержат стабилизаторы или наполнители.

Например, рекомбинантный аденовирусный вектор можно хранить в буфере, который также используют для Adenovirus World Standard (Hoganson *et al.*, 2002, *Bioprocessing J* 1: 43-8): 20 мМ Трис, pH 8, 25 мМ NaCl, 2,5% глицерина. Другой пригодный буфер для составления, подходящий для введения людям, представляет собой 20 мМ Трис, 2 мМ MgCl₂, 25 мМ NaCl, сахарозы 10% вес/об., полисорбата-80 0,02% вес/об. Другой буфер для составления, который подходит для рекомбинантного аденовируса, содержит 10-25 мМ цитратного буфера, pH 5,9-6,2, 4-6% (вес/вес) гидроксипропил-бета-циклодекстрина (HBCD), 70-100 мМ NaCl, 0,018-0,035% (вес/вес) полисорбата-80 и необязательно 0,3-0,45% (вес/вес) этанола. Безусловно, можно использовать множество других буферов, при этом известны некоторые примеры подходящих составов для хранения и для фармацевтического введения очищенных векторов.

В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая вектор, дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ на используемую антигенную детерминанту. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используют в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на полипептиды, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот в векторах по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия, и/или фосфат алюминия, и/или фосфат алюминия-калия; композиции,

представляющие собой масляные эмульсии (или композиции типа "масло-в-воде"), в том числе водные эмульсии сквалена, например MF59 (см., например, WO 90/14837); сапониновые составы, например QS21, и комплексы с иммуностимулирующими свойствами (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацетилованный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолабильный энтеротоксин LT *E. coli*, холерный токсин СТ и т. п. Также можно использовать адъювант, кодируемый вектором, например с помощью использования гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации С4-связывающего белка (С4bp) с антигеном, представляющим интерес (например, Solabomi et al., 2008, *Infect Immun* 76: 3817-23), или с помощью использования вектора, кодирующего как трансген, представляющий интерес, так и агонист TLR-3, такой как гетерологичная dsRNA (например, WO 2007/100908), или т. п.

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

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

Введение фармацевтических композиций можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие

варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как инъекция, например, внутривенная, внутримышечная и т. д., или подкожное или чрескожное введение или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное, интравлагинальное, ректальное и т. п. В одном варианте осуществления композицию вводят с помощью внутримышечной инъекции, например в дельтовидную мышцу руки или латеральную широкую мышцу бедра. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой ДНК-вакцину, и ее можно вводить например внутривенно, например с помощью ДНК-татуирования (см., например, Oosterhuis *et al.*, 2012, *Curr Top Microbiol Immunol* 351: 221-50). Этот путь также возможен для аденовирусных векторов. В определенных вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит аденовирусный вектор, и ее вводят с помощью внутримышечной инъекции. Специалисту известны различные возможности введения композиции, такой как вакцина, для индуцирования иммунного ответа в отношении антигена(-ов), присутствующего в вакцине.

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

Вакцины по настоящему изобретению можно применять для лечения пациентов, у которых имеется одна из различных стадий заболеваний, вызванных HPV (в частности 16 типа для вакцин, содержащих или кодирующих любую из SEQ ID NO: 1-6, или 18 типом для вакцин, содержащих или кодирующих любую из SEQ ID NO: 20-23, или обоими типами для вакцин, которые содержат или кодируют сконструированные молекулы как HPV16, так и HPV18, описанные в данном документе), от эпизодической и хронической инфекций, вызванных HPV, как таковых (например, при обнаружении с помощью тестирования на наличие ДНК HPV), таким образом, до формирующихся (пред)раковых поражений, а также интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN, также известной как дисплазия шейки матки и интерстициальная неоплазия шейки матки, которая представляет собой потенциально предопухолевую

трансформацию и аномальный рост (дисплазию) чешуйчатых клеток на поверхности шейки матки) вплоть до, и включая, рака шейки матки (например, плоскоклеточной карциномы шейки матки (SCC)). Кроме того, мишенями могут быть другие HPV-индуцированные неоплазии, такие как интраэпителиальная неоплазия вульвы (VIN), интраэпителиальная неоплазия влагалища (VaIN), интраэпителиальная неоплазия полового члена (PIN), анальная интраэпителиальная неоплазия (AIN), а также более поздние стадии рака ротоглотки (также известный как рак головы и шеи), рака полового члена, вагинального рака, рака вульвы и анального рака. Таким образом, вакцины по настоящему изобретению могут целенаправленно воздействовать на широкий спектр HPV-индуцированных поражений, и вероятно являются наиболее эффективными на предраковых стадиях HPV-индуцированного заболевания, например при (хронической) инфекции и/или стадиях неоплазии, когда экспрессия E2, E6 и/или E7 является наивысшей. Также возможно комбинировать лечение с использованием вакцины по настоящему изобретению с соединениями, которые противодействуют или способны преодолевать механизмы ускользания от иммунологического надзора клеток прогрессирующего рака, например, антителами к PD1/PD-L1, антителами к CTLA-4, такими как ипилимумаб, антителами к LAG-3, антителами к CD25, IDO-ингибиторами, CD40 агонистичными антителами, CD137 агонистичными антителами и т. д. (см., например, Hamid and Carvajal, 2013, *Expert Opinion Biol Ther* 13: 847-861; Mellman et al., 2011, *Nature Rev* 480: 480-89). Способ терапевтической вакцинации в принципе можно также применять для лечения внешних остроконечных бородавок или их предшественников в том случае, если вакцина содержит дополнительно (кодирующие последовательности) E6 и/или E7 типа HPV, вызывающего внешние остроконечные бородавки, и ее вводят субъекту, инфицированному таким типом HPV.

Термин ''лечение'', используемый в данном документе, означает введение вакцины для индукции терапевтического иммунного ответа в отношении клетки, которые экспрессируют (эпитопы) E6 и/или E7 HPV16 или 18 у пациента, что приводит по меньшей мере к снижению уровня и предпочтительно полному

устранению инфекции, вызванной HPV16 или 18, что приводит в результате по меньшей мере к замедлению и предпочтительно к прекращению прогрессирования заболевания, вызванного HPV16 или HPV18, такого как виды неоплазии и/или ее симптомы. Предпочтительно, лечение с помощью вакцины приводит также к ремиссии более поздних стадий HPV-индуцированных форм рака. Предпочтительно вводить вакцину пациентам с развившейся инфекцией, вызванной HPV известного типа, таким образом можно вводить вакцину, которая кодирует полипептид соответствующего типа HPV. При отсутствии скрининга вакцину можно также вводить той части населения, которая вероятно будет инфицирована HPV, т. е. сексуально активным людям. Также возможно вводить вакцину по настоящему изобретению субъектам, которые не были инфицированы HPV16 или 18, например для профилактических целей, возможно в комбинации с вакциной против другого типа HPV, которым был заражен пациент, или, в качестве альтернативы, неинфицированным субъектам. Вакцину по настоящему изобретению можно также вводить субъекту, который подвергается дополнительному лечению другими способами, например хирургическому вмешательству (устранению поражения, вызванного инфекцией, вызванной HPV16 или 18) или лечению имиквимодом (содержащим агонист TLR-7/8, см. например Dayaana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36). Эффект лечения можно оценить либо с помощью цитологического тестирования, либо с помощью тестирования на наличие HPV.

Вакцинация предусматривает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту или пациенту по меньшей мере один раз. Также возможным является обеспечение одного или нескольких стимулирующих введений одной или нескольких дополнительных вакцин. Как правило, при проведении стимулирующей вакцинации эту стимулирующую вакцинацию будут вводить одному и тому же субъекту в период времени от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев, после введения иммуногенной композиции субъекту с тем же антигеном, что и в первый раз (которое в данном случае называется 'примиряющей вакцинацией'). В альтернативных стимулирующих режимах также возможным является введение различных векторов, например одного

или нескольких аденовирусов различных серотипов или других векторов, таких как на основе MVA, или ДНК, или белка субъекту в качестве примиряющей или стимулирующей вакцинации. В определенных вариантах осуществления одну и ту же форму вакцины по настоящему изобретению вводят по меньшей мере дважды одному и тому же пациенту согласно режиму "примирование/стимулирование", например с тем же рекомбинантным аденовирусом (таким как Ad26) в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления вакцину по настоящему изобретению вводят по меньшей мере дважды согласно режиму "примирование/стимулирование", однако вектор в вакцине отличается, например при использовании двух разных серотипов аденовирусных векторов, например, примирование проводят рекомбинантным Ad26, а стимулирование - с помощью рекомбинантного Ad35 или vice versa; или примирование проводят с помощью ДНК, а стимулирование - аденовирусным вектором или vice versa; или примирование проводят аденовирусным вектором, а стимулирование - с помощью вектора на основе MVA или vice versa. Иллюстративные варианты осуществления включают примирование с помощью вектора Ad26, а стимулирование - с помощью вектора Ad35, примирование с помощью вектора Ad26, а стимулирование - с помощью вектора на основе MVA, примирование с помощью вектора Ad35, а стимулирование - с помощью вектора на основе MVA, примирование с помощью вектора Ad35, а стимулирование - с помощью вектора Ad26 и т. д., где в каждом случае вектор для примиряющей и стимулирующей вакцинаций содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированный полипептид по настоящему изобретению, при этом предпочтительно каждый вектор для примиряющей и стимулирующей вакцинаций кодирует тот же сконструированный полипептид по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления вакцину в соответствии с настоящим изобретением вводят по меньшей мере три раза согласно режиму "примирование-стимулирование-стимулирование". В режим могут быть добавлены дополнительные стимулирующие введения. Также возможно одновременно или практически одновременно (например, не более чем 10 минут) вводить аденовирусный вектор и

вектор на основе MVA (который может находится либо в одной композиции, либо в различных композициях), для индукции иммунного ответа (см., например, WO 2010/073043).

Также одним аспектом настоящего изобретения является индуцирование CTL-ответа в отношении HPV16 или HPV18 у субъекта, включающее введение субъекту вакцины в соответствии с настоящим изобретением. Специалисту будет понятно, что вакцины, которые содержат последовательности HPV16 (кодирующие или содержащие любые из SEQ ID NO: 1-6) действуют лучше всего против инфекции, и предназначены для применения против инфекции, вызванной HPV16, тогда как вакцины, которые содержат последовательности HPV18 (кодирующие или содержащие любые из SEQ ID NO: 20-23) действуют лучше всего против инфекции, и предназначены для применения против инфекции, вызванной HPV18.

В настоящем изобретении также предусмотрены следующие неограничивающие варианты осуществления:

1) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1;

2) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 1, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере часть белка E2 HPV;

3) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где по меньшей мере часть белка E2 HPV получена из белка E2 HPV16;

4) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

5) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с C-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

6) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

7) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с С-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

8) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 2, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

9) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

10) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 4, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

11) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 5, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

12) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 6, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

13) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 7, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

14) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с вариантом осуществления 1, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором;

15) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с вариантом осуществления 2, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором;

16) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с вариантом осуществления 3, где последовательность, кодирующая

вариантом осуществления 14 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

66) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 15 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

67) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 16 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

68) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 17 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

69) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 18 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

70) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 19 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

71) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 20 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

72) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 21 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

73) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 22 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

74) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 23 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

75) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 24 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

76) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 25 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

77) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с

вариантом осуществления 26 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

78) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 27 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

79) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 28 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

80) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 29 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

81) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 30 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

82) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 31 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

83) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 32 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

84) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 33 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

85) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 34 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

86) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 35 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

87) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 36 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

88) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 37 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

89) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с

вариантом осуществления 38 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

90) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 39 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

91) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 40 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

92) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 41 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

93) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 42 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

94) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 43 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

95) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 44 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

96) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 45 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

97) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 46 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

98) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 47 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

99) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 48 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

100) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 49 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

101) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с

вариантом осуществления 50 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

102) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 51 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

103) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 52 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

104) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 53 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

105) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 54 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

106) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 55 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

107) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 56 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

108) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 57 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

109) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 58 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

110) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 59 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

111) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 60 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

112) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 61 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

113) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с

вариантом осуществления 62 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

114) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 63 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

115) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 64 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

116) способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115;

117) способ лечения хронической инфекции, вызванной HPV (16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает хронической инфекцией, вызванной HPV;

118) способ лечения интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает VIN;

119) способ лечения рака вульвы (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает от рака вульвы;

120) способ лечения интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает CIN;

121) способ лечения рака шейки матки (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает от рака шейки матки;

122) способ лечения рака ротоглотки (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает от рака ротоглотки;

123) способ лечения интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает PIN;

124) способ лечения рака полового члена (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает от рака полового члена;

125) способ лечения интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает VaIN;

126) способ лечения рака влагалища (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает от рака влагалища;

127) способ лечения анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает AIN;

128) способ лечения рака анального канала (на фоне инфекции, вызванной HPV 16 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 65-115 субъекту, который страдает от рака анального канала;

129) полипептид, содержащий SEQ ID NO: 1;

130) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 129, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере часть белка E2 HPV;

131) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка E2 HPV получена из белка E2 HPV16;

132) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

133) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с C-

концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

134) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 131, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

135) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 131, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с C-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 1;

136) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 130, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

137) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 131, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

138) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 132, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

139) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 133, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

140) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 134, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

141) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 135, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

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

143) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 3, кодирующая полипептид в соответствии с SEQ ID

NO: 5;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

156) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с

вариантом осуществления 148 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

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

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

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

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

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

162) способ лечения рака вульвы, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает от рака вульвы;

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

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

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

166) способ лечения интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN), предусматривающий введение вакцины в соответствии с

любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает PIN;

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

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

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

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

171) способ лечения рака анального канала, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 152-159 субъекту, который страдает от рака анального канала;

172) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий SEQ ID NO: 20;

173) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 172, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере часть белка E2 HPV;

174) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 173, где по меньшей мере часть белка E2 HPV получена из белка E2 HPV18;

175) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 173, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

176) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 173, где полипептид содержит по меньшей мере часть

белка E2, слитую с С-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

177) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 174, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

178) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 174, где полипептид содержит по меньшей мере часть белка E2, слитую с С-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

179) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 173, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

180) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 174, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

181) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 175, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

182) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 176, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

183) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 177, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

184) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 178, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

185) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с вариантом осуществления 172, где последовательность,

кодирующая полипептид, функционально связана с промотором;

198) вектор в соответствии с вариантом осуществления 185, где вектор представляет собой аденовирус;

199) вектор в соответствии с вариантом осуществления 186, где вектор представляет собой аденовирус;

200) вектор в соответствии с вариантом осуществления 187, где вектор представляет собой аденовирус;

201) вектор в соответствии с вариантом осуществления 188, где вектор представляет собой аденовирус;

202) вектор в соответствии с вариантом осуществления 189, где вектор представляет собой аденовирус;

203) вектор в соответствии с вариантом осуществления 190, где вектор представляет собой аденовирус;

204) вектор в соответствии с вариантом осуществления 191, где вектор представляет собой аденовирус;

205) вектор в соответствии с вариантом осуществления 192, где вектор представляет собой аденовирус;

206) вектор в соответствии с вариантом осуществления 193, где вектор представляет собой аденовирус;

207) вектор в соответствии с вариантом осуществления 194, где вектор представляет собой аденовирус;

208) вектор в соответствии с вариантом осуществления 195, где вектор представляет собой аденовирус;

209) вектор в соответствии с вариантом осуществления 196, где вектор представляет собой аденовирус;

210) вектор в соответствии с вариантом осуществления 197, где вектор представляет собой аденовирус;

211) вектор в соответствии с вариантом осуществления 198, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

212) вектор в соответствии с вариантом осуществления 199, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

213) вектор в соответствии с вариантом осуществления 200, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

214) вектор в соответствии с вариантом осуществления 201, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

215) вектор в соответствии с вариантом осуществления 202, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

216) вектор в соответствии с вариантом осуществления 203, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

217) вектор в соответствии с вариантом осуществления 204, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

218) вектор в соответствии с вариантом осуществления 205, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

219) вектор в соответствии с вариантом осуществления 206, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

220) вектор в соответствии с вариантом осуществления 207, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

221) вектор в соответствии с вариантом осуществления 208, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

222) вектор в соответствии с вариантом осуществления 209, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

223) вектор в соответствии с вариантом осуществления 210, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

224) вектор в соответствии с вариантом осуществления 198, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

225) вектор в соответствии с вариантом осуществления 199, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

226) вектор в соответствии с вариантом осуществления 200, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

227) вектор в соответствии с вариантом осуществления 201, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

228) вектор в соответствии с вариантом осуществления 202, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

229) вектор в соответствии с вариантом осуществления 203, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

230) вектор в соответствии с вариантом осуществления 204, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

231) вектор в соответствии с вариантом осуществления 205, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

232) вектор в соответствии с вариантом осуществления 206, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

233) вектор в соответствии с вариантом осуществления 207, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

234) вектор в соответствии с вариантом осуществления 208, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

235) вектор в соответствии с вариантом осуществления 209, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

236) вектор в соответствии с вариантом осуществления 210, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

237) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 185 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

250) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 198 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

251) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 199 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

252) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 200 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

253) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 201 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

254) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 202 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

255) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 203 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

256) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 204 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

257) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 205 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

258) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 206 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

259) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 207 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

260) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 208 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

261) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 209 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

286) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 234 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

287) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 235 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

288) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 236 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

289) способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288;

290) способ лечения хронической инфекции, вызванной HPV (18 типом), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает хронической инфекцией, вызванной HPV;

291) способ лечения интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает VIN;

292) способ лечения рака вульвы (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает от рака вульвы;

293) способ лечения интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает CIN;

294) способ лечения рака шейки матки (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает от рака шейки матки;

295) способ лечения рака ротоглотки (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288

субъекту, который страдает от рака ротоглотки;

296) способ лечения интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает PIN;

297) способ лечения рака полового члена (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает от рака полового члена;

298) способ лечения интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает VaIN;

299) способ лечения рака влагалища (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает от рака влагалища;

300) способ лечения анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN) (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает AIN;

301) способ лечения рака анального канала (на фоне инфекции, вызванной HPV 18 типа), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 237-288 субъекту, который страдает от рака анального канала;

302) полипептид, содержащий SEQ ID NO: 20;

303) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 302, где полипептид дополнительно содержит по меньшей мере часть белка E2 HPV;

304) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 303, где по меньшей мере часть белка E2 HPV получена из белка E2 HPV18;

305) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 303, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

306) полипептид в соответствии с вариантом осуществления

303, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с С-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

307) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 304, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с N-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

308) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 304, где по меньшей мере часть белка E2 является слитой с С-концевой стороной полипептида под SEQ ID NO: 20;

309) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 303, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

310) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 304, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

311) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 305, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

312) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 306, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

313) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 307, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

314) полипептид в соответствии с вариантом осуществления 308, где по меньшей мере часть белка E2 содержит вариант белка E2 с мутацией, которая подавляет способность связывания ДНК у E2;

315) нуклеиновая кислота в соответствии с вариантом осуществления 174, кодирующая полипептид в соответствии с SEQ ID NO: 22;

316) вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту в соответствии

с вариантом осуществления 315, где последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с промотором;

317) вектор в соответствии с вариантом осуществления 316, где вектор представляет собой аденовирус;

318) вектор в соответствии с вариантом осуществления 317, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26;

319) вектор в соответствии с вариантом осуществления 317, где аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 35;

320) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 316 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

321) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 317 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

322) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 318 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

323) композиция вакцины, содержащая вектор в соответствии с вариантом осуществления 319 и фармацевтически приемлемый наполнитель;

324) способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324;

325) способ лечения интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает VIN;

326) способ лечения рака вульвы, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает от рака вульвы;

327) способ лечения интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324

субъекту, который страдает CIN;

328) способ лечения рака шейки матки, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает от рака шейки матки;

329) способ лечения рака ротоглотки, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает от рака ротоглотки;

330) способ лечения интраэпителиальной неоплазии полового члена (PIN), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает PIN;

331) способ лечения рака полового члена, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает от рака полового члена;

332) способ лечения интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает VaIN;

333) способ лечения рака влагалища, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает от рака влагалища;

334) способ лечения анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает AIN;

335) способ лечения рака анального канала, предусматривающий введение вакцины в соответствии с любым из вариантов осуществления 320-324 субъекту, который страдает от рака анального канала;

336) композиция, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 20;

337) композиция в соответствии с вариантом осуществления 336, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 3, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 22;

338) способ индуцирования иммунного ответа у субъекта в отношении HPV, предусматривающий введение субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1, и нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 20;

339) способ в соответствии с вариантом осуществления 338, предусматривающий введение субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 3, и нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 22;

340) набор из частей, содержащий (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 1, и (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 20;

341) композиция вакцины, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 1, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 20, и фармацевтически приемлемый наполнитель;

342) способ лечения хронической инфекции, вызванной HPV, интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки (такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC)), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1, и нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 20.

При осуществлении на практике данного изобретения будут применяться, если не указано иное, общепринятые методики иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантной ДНК, которые находятся в компетенции специалистов в данной области техники. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al., eds, 1987; the series *Methods in Enzymology*

(Academic Press, Inc.); PCR2: A Practical Approach, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds, 1988.

Настоящее изобретение дополнительно объясняется в нижеприведенных примерах. Примеры не ограничивают данное изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для объяснения данного изобретения.

Примеры

Пример 1. Конструкция сконструированного полипептида, содержащего практически все СТЛ-эпитопы Е6 и Е7 HPV16

Авторы данного изобретения сконструировали новый, неонкогенный полипептид (и кодирующую его нуклеиновую кислоту), который содержит практически все СТЛ-эпитопы белков Е6 и Е7 HPV16 и характеризуется минимальным количеством ожидаемых/прогнозируемых сильных неозэпитопов (неозэпитопы в значении эпитопов, отсутствующих в белках дикого типа Е6 и Е7 HPV16). Полипептид по настоящему изобретению (также иногда называемый в данном документе ''Е6Е7SH'') для HPV16 содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1. Кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая этот полипептид, представлена под SEQ ID NO: 2.

Молекулы по настоящему изобретению представляют собой отдельные молекулы, что обеспечивает преимущества в получении по сравнению со стратегиями, в которых применяется много молекул. Кроме того, полипептид по настоящему изобретению содержит практически все предполагаемые СТЛ-эпитопы, которые присутствуют в Е6 и Е7 дикого типа HPV16 и в то же время содержат минимальное количество ожидаемых/прогнозируемых сильных неозэпитопов, которые могут быть потенциально иммунодоминантными и, таким образом, перенаправляют иммунный ответ от соответствующих СТЛ-эпитопов дикого типа. Таким образом, конструкции по настоящему изобретению являются иммунологически более благоприятными, чем молекулы, описанные другими исследователями, которые либо не содержат возможных СТЛ-эпитопов, и/или содержат большее количество неозэпитопов, или более сильные неозэпитопы.

Например, конструкция под EQ ID NO: 1 содержит только один

неоэпитоп с длиной, составляющей девять аминокислот, с прогнозируемой аффинностью связывания, составляющей <50 нМ, в отношении 20 наиболее распространенных HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C аллелей (HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*29:02, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:01, HLA-A*33:03, HLA-A*34:01, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02, HLA-B*07:04, HLA-B*08:01, HLA-B*13:01, HLA-B*15:01, HLA-B*18:01, HLA-B*35:01, HLA-B*37:01, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*40:02, HLA-B*40:06, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*46:01, HLA-B*48:01, HLA-B*51:01, HLA-B*52:01, HLA-B*53:01, HLA-B*58:01, HLA-C*07:02, HLA-C*04:01, HLA-C*03:04, HLA-C*01:02, HLA-C*07:01, HLA-C*06:02, HLA-C*03:03, HLA-C*08:01, HLA-C*15:02, HLA-C*12:02, HLA-C*02:02, HLA-C*05:01, HLA-C*14:02, HLA-C*03:02, HLA-C*16:01, HLA-C*08:02, HLA-C*12:03, HLA-C*04:03, HLA-C*17:01, HLA-C*14:03), как определено с помощью способов ANN (Lundegaard *et al.*, 2008, *Nucl Acids Res* 36: W509-12) и SMM (Peters *et al.*, 2003, *Bioinformatics* 19: 1765-72) для HLA-A и HLA-B, а также способа NetMHCspan (Hoof *et al.*, 2009, *Immunogenetics* 61: 1-13) для HLA-C инструмента прогнозирования для ''пептидного связывания с молекулами МНС I класса'' на веб-сайте IEDB (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html, версия 2009-09-01B). В Zhang *et al* (2008) описан источник анализа IEDB.

В качестве неограничивающего примера, при использовании инструмента прогнозирования SMM на веб-сайте IEDB, ''перетасованные'' последовательности E6 и E7, описанные в Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406 и Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93, в основной части содержат девять потенциальных сильных уникальных неоэпитопов (ANN или SMM IC50 <50 нМ) для 20 наиболее распространенных HLA-A и -B. Это даже исключает добавления, используемые в данном подходе (в котором добавления будут также приводить к дополнительным неоэпитопам и могут упустить более нативные эпитопы МНС II из-за ограниченной длины "перекрывания"). Действительно, по имеющимся

сведениям улучшенная молекула, содержащая вариант с "перетасованными" белками E6 и E7, которые описаны в WO 2013/083287, содержит 22 уникальных неопитопа длиной девять аминокислот с прогнозируемой IC₅₀<50 нМ (ANN, SMM или NetMHCpan) для 20 наиболее распространенных HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C аллелей.

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

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

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

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

Последовательность слитого белка E6E7SH HPV16 можно комбинировать с последовательностями других ранних белков HPV16 для целенаправленного воздействия на организмы индивидуумов с хронической инфекцией и для расширения иммунного репертуара у

иммунизированного индивидуума. Предполагается, что иммунные ответы в отношении E2 играют важную роль в устранении инфекций, вызванных HPV16 (de Jong *et al.*, 2002, *Cancer Res* 62: 472-479). Слияние E2 с E6E7SH даст компонент вакцины, который несет антигены против стадий HPV-ассоциированного рака от хронической инфекции до инвазивного рака или рецидивирующего/рефрактерного заболевания после операции LEEP. Таким образом, в качестве неограничивающего примера таких вариантов осуществления авторы данного изобретения получали последовательность, кодирующую слитый белок E6E7SH с E2 на его N-конце. В последовательности E2 можно выполнять модификации для подавления активности связывания ДНК, которая может влиять на экспрессию генов в клетках, экспрессирующих слитый белок. Авторы данного изобретения подвергали мутации глицин в положении 293, лизин в положении 299 и цистеин в положении 300 белка E2 wt HPV16 соответственно на валин, метионин и аргинин. Каждая из этих мутаций сама по себе уже полностью подавляет связывание E2 с последовательностями ДНК, которые несут E2-связывающие домены (Prakash *et al.*, 1992, *Genes Dev* 6: 105-16).

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

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

Для целей контроля авторы данного изобретения также сконструировали последовательности, кодирующие полипептид, который содержит последовательности дикого типа для полноразмерных E6 и E7 HPV16 в качестве слитого белка (E6 от aa 1 до 158, непосредственно слитый с E7 от aa 1 до 98, обозначенный в данном документе E6E7 wt).

Авторы данного изобретения также исследовали влияние

добавления лидерных последовательностей к полипептиду. В качестве неограничивающего примера, последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE (см., например, US 6733994) [последовательность лидерного пептида представлена под SEQ ID NO: 7], сливали с N-концом некоторых конструкций, например в конструкции E6E7 wt, которая представлена LSE6E7 wt, и в конструкции E2E6E7SH, которая представлена LSE2E6E7SH. Под их влиянием существенно ($p < 0,05$) увеличивалась иммуногенность по сравнению с таким же антигеном без последовательности LS, что измеряли с помощью анализа E7-тетрамера у иммунизированных мышей (как можно видеть, например, на фиг. 9).

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

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

Гены, кодирующие контроль, представляющий собой E6E7 wt HPV16, или вышеописанные сконструированные последовательности HPV16 подвергали генной оптимизации для экспрессии у человека и синтезировали согласно Geneart. Последовательность Kozak (5' GCCACC 3') включали непосредственно перед стартовым кодоном ATG, и при этом два стоп-кодона (5' TGA TAA 3') добавляли в конце соответствующей кодирующей последовательности. Гены вставляли в плазмиду pAdApt35BSU и в плазмиду pAdApt26 (Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87, 2135-43) посредством сайтов HindIII и XbaI.

Все аденовирусы выращивали в клетках PER.C6 с помощью

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

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

Ad35.NPV16-E6E7 wt и Ad35.NPV16-E6E7SH являются векторами на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 35 (Ad35), содержащими кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности для экспрессии соответственно слитого белка белков E6 и E7 дикого типа NPV16 (E6E7 wt) и вышеописанного сконструированного слитого белка, (E6E7SH, с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1). Комбинированные последовательности E6 и E7 помещали под контроль промотора CMV в область E1 генома аденовируса с удаленными E1, E3. Ad26.NPV16-E6E7 wt и Ad26.NPV16-E6E7SH являются

эквивалентными векторами на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 26.

Аналогичным образом были получены рекомбинантные аденовирусные векторы на основе Ad26 и Ad35, которые кодируют вариант E2E6E7SH HPV16 (SEQ ID NO: 3). Аналогично были получены Ad26 и Ad35, кодирующие вариант E6E7E2SH HPV16 (SEQ ID NO: 5). Также был получен вектор Ad35, кодирующий слитый белок E2E6E7SH с лидерной последовательностью IgE на N-конце, названный Ad35.HPV16-LSE2E6E7SH. Также был получен контрольный аденовирус с E6E7 wt, слитый с лидерной последовательностью IgE на N-конце.

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

Дополнительные примеры конструкций, которые были связаны с репрессорными системами, представлены в следующем ниже примере.

Пример 2. Отсутствие трансформирующей активности у сконструированных конструкций HPV16

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

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

Для оценки потери онкогенных свойств, авторы изобретения оценивали способность конструкций E6E7SH по настоящему изобретению придавать клеткам NIH 3T3 способность расти в мягком агаре (как описано, например, в Massimi and Banks, 2005, *Methods*

Mol Med 119: 381-395). Трансфекция клеток NIH3T3 с помощью плазмиды, экспрессирующей E7 дикого типа HPV16, неизменно приводила к колониеобразованию. В этих анализах экспрессия только E6 дикого типа HPV16 не вызывала колониеобразование выше фонового уровня. Это соответствует опубликованным наблюдениям, что в таком анализе E7 wt намного эффективнее, чем E6 wt (Sedman *et al.*, 1991, *J Virol* 65: 4860-66). Трансфекция с помощью конструкции E6E7SH по настоящему изобретению не приводила к росту колоний клеток в мягком агаре (фиг. 2) в четырех независимых экспериментах, что продемонстрировало то, что нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид по настоящему изобретению, E6E7SH, утратили трансформирующую способность, которая связана с E7.

Онкогенный потенциал E6 и E7 связан с их способностью снижать уровни клеточных белков p53 и pRb, соответственно. Анализы разрушения p53 и pRb проведены для демонстрации того, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по настоящему изобретению, конструкцию E6E7SH, не обладает биологической активностью, связанной с E6 и E7 дикого типа на молекулярном уровне. Вкратце, E6 wt HPV16 и конструкция E6E7SH по настоящему изобретению экспрессировались в клетках NCI-H1299, у которых отсутствовал эндогенный p53, для анализа разрушения p53. Для анализа разрушения pRb, E7 wt HPV16 и конструкцию E6E7SH экспрессировали в клетках Saos-2 с нефункциональным pRb. Как можно видеть на фиг. 3, коэкспрессия p53 с E6 wt, но не с E6E7SH, приводила к снижению уровней p53 (секции A и B). Аналогично, на секциях 3C и 3D показано, что коэкспрессия pRb с E7 wt, но не с E6E7SH, приводила к снижению уровней pRb. Эти данные демонстрируют, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по настоящему изобретению, не обладает способностью колониеобразования в мягком агаре и не ограничивает биологические активности полипептидов E6 и E7 дикого типа, а именно, инактивацию p53 и pRb, соответственно.

Для дополнительной демонстрации безопасности конструкций нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид по настоящему изобретению, авторы изобретения использовали первичные

кератиноциты крайней плоти человека, которые являются естественными клетками-мишенями для HPV-опосредованной трансформации. Для иммортализации первичных кератиноцитов человека необходимо действие как E6, так и E7 дикого типа (Munger *et al.*, 1989, *J Virol* 63: 4417-21). Данный анализ вероятно является физиологически наиболее важным анализом *in vitro* для демонстрации безопасности конструкций по настоящему изобретению (Massimi and Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Клетки, трансдуцированные лентивирусами, экспрессирующими E6 и E7 дикого типа HPV16 (E6E7 wt), индуцируют иммортализацию первичных кератиноцитов, что подтверждается увеличением их продолжительности жизни по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками (фиг. 4) и активацией hTERT, каталитической субъединицы теломеразы (данные не показаны). Экспрессия полипептида по настоящему изобретению (E6E7SH) не способна продлить продолжительность жизни по сравнению с GFP-трансдуцированными или нетрансдуцированными кератиноцитами. Аналогичные результаты были получены у двух дополнительных независимых доноров (данные не показаны). Все эти данные указывают на то, что конструкции по настоящему изобретению утратили способность индуцировать иммортализацию первичных кератиноцитов человека, которые считаются в значительной степени физиологической моделью.

Другая конструкция, в которой сравнимые фрагменты E6 и E7 HPV16 рекомбинировали в другом порядке, также была неспособна к иммортализации первичных кератиноцитов крайней плоти человека. Однако для этой конструкции наблюдалась продолжительность жизни, увеличенная до примерно 120-150 дней. Это указывает на некоторую непредсказуемость в данной области и показывает превосходство выбранных сконструированных молекул в соответствии с настоящим изобретением в данном аспекте, связанном с безопасностью.

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

конструкциями E6 и E7 HPV16.

Пример 3. Иммунные ответы на сконструированные конструкции E6E7SH HPV16

Авторы данного изобретения получали ДНК-векторы и аденовирусные векторы, описанные в примере 1.

Авторы данного изобретения использовали линию мышей СВ6F1 для оценки иммунных ответов, основываясь на первоначальных экспериментах, в которых мышью иммунизировали ДНК-плазмидами, кодирующими E2, или E6, или E7 дикого типа, и иммунизация антигенами E2, E6 и E7 HPV16 индуцировала более широкий клеточный иммунный ответ у СВ6F1, чем у мышей линии С57BL/6 или мышей линии Balb/c. В отдельном эксперименте мышью иммунизировали ДНК-векторами, кодирующими молекулы по настоящему изобретению, и оценивали клеточные иммунные ответы. Специфичные в отношении E7 HPV16 иммунные ответы можно оценивать у мышей, иммунизированных ДНК-плазмидами, экспрессирующими E6E7SH (фиг. 5).

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

Для оценки иммуногенности, индуцированной вакциной, мышью СВ6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов (Ad35), экспрессирующих E6E7 wt HPV16, LSE6E7 wt, E6E7SH, и аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых). Тестировали две дозы для введения мышам: 5×10^9 вирусных частиц (vp) и 1×10^{10} vp. Через две и восемь недель после иммунизации мышью умерщвляли, и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пулами из 15-мерных пептидов E7 HPV16. E7-специфичные ответы через две недели и через восемь недель анализировали с помощью IFN γ ELISPOT. Данные представлены на фиг. 6.

Результаты показывают, что иммунизация мышью с помощью Ad35.HPV16-E6E7SH индуцировала E7-специфичные иммунные ответы, которые измерены с помощью анализа ELISPOT. Кроме того, результаты на фиг. 6 демонстрируют возможность усиления иммунного ответа в отношении экспрессируемого аденовирусного

трансгена с помощью добавления к трансгену N-концевой лидерной последовательности.

Затем исследовали эффект в отношении иммуногенности от добавления E2 HPV16 к полипептиду E6E7SH HPV16. Векторы Ad35 кодировали полипептиды, которые характеризовались наличием E2, слитого либо с N-концом (E2E6E7SH), либо с C-концом (E6E7E2SH). Мышей СВ6F1 иммунизировали дозой, составляющей 1×10^{10} вр. На фиг. 7 (окрашивание E7-тетрамера) и фиг. 8 (секция C, IFN γ ELISPOT) показаны иммунные ответы в отношении E7, которые для сконструированных конструкций, включающих E2, имели тенденцию к повышению по сравнению с конструкцией без E2, хотя различия не были статистически значимыми. Ответ в отношении E2 был выше для аденовирусных векторов, кодирующих только E2, по сравнению с ответом на аденовирусные векторы, у которых E2 слит со сконструированным полипептидом E6E7SH (фиг. 8B), причем различия значимы между E2 и E2E6E7SH и между E2 и E6E7E2SH (p-значение: $<0,05$).

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

Было показано, что добавление лидерной последовательности приводит к более высоким E7-специфичным ответам при слиянии с N-концом слитого белка E6 и E7 дикого типа (фиг. 6C). Аналогичным образом определяли влияние лидерной последовательности на иммуногенность слитого белка E2E6E7SH. Таким образом, для иммунизации мышей использовали векторы Ad35, кодирующие сконструированный полипептид HPV16, с N-концевым E2 или без него, и вектор Ad35, кодирующий LSE2E6E7SH, и при этом образцы крови брали с двухнедельными интервалами для оценки E7-специфичных иммунных ответов (фиг. 9) Как показано на фиг. 7 и фиг. 8, присутствие E2, слитого с E6E7SH либо на N-конце, либо на C-конце, приводило к усилению иммунных ответов. Добавление

лидерной последовательности IgE дополнительно усиливало E7-специфичный ответ (фиг. 9B). С течением времени устойчивые иммунные ответы наблюдали для всех трех аденовирусных векторов, которые кодировали сконструированные молекулы в соответствии с настоящим изобретением, и самый высокий ответ после иммунизации соответствовал самым высоким ответам в течение всего эксперимента.

Можно сделать вывод о том, что ответы, индуцируемые сконструированной конструкцией, которая дополнительно включает N-концевой E2, могут быть усилены с помощью добавления определенных последовательностей, например лидерной последовательности IgE, которые нацеливают кодируемый белок на конкретные клеточные компартменты.

Клеточный иммунный ответ в отношении пептид по настоящему изобретению можно индуцировать различными типами аденовирусных векторов. В предыдущем эксперименте авторы данного изобретения использовали векторы Ad35, тогда как в эксперименте на фиг. 10 мышей иммунизировали аденовирусным вектором Ad26, экспрессирующим E2E6E7SH HPV16. Данные показывают, что иммунизация с помощью вакцины на основе Ad26 также индуцировала E7-специфичные Т-клетки. Кроме того, результаты показывают, что вторая иммунизация с помощью аденовирусного вектора Ad35, экспрессирующего E2E6E7SH HPV16, дополнительно стимулировала клеточные иммунные ответы (фиг. 10).

Пример 4. Иммуногенность сконструированных конструкций HPV16 у макаков-резус.

Для оценки способности аденовирусных векторов, экспрессирующих сконструированную последовательность по настоящему изобретению, индуцировать иммунные ответы у приматов, отличных от человека, макаков-резус иммунизировали с помощью внутримышечной инъекции аденовекторов (Ad26), экспрессирующих E2E6E7SH HPV16, или аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых), с дозой, составляющей $1 \cdot 10^{11}$ вр. Через восемь недель после иммунизации иммунные ответы стимулировали с помощью иммунизации векторами Ad26, экспрессирующими тот же антиген. На 16 неделе животные получали еще одну инъекцию, содержащую

векторы Ad35, экспрессирующие тот же антиген. Образцы крови брали в нескольких моментах времени, и выделенные белые клетки крови стимулировали в течение ночи пулами пептидов, соответствующими E2, E6 или E7 HPV16. Специфичные ответы оценивали с помощью IFN γ ELISPOT. Данные представлены на фиг. 11. Кроме того, на 10 неделе и 18 неделе после примиряющей иммунизации оценивали клеточный иммунный ответ, специфичный в отношении пептидов, охватывающих новые сочетания в настоящем изобретении. Индукция ответа IFN γ у всех животных была ниже предела обнаружения, составляющего <50 SFU на 1×10^6 РВМС (данные не показаны).

Данные показывают, что иммунизация отличных от человека приматов с помощью Ad26.HPV16-E2E6E7SH приводила к клеточным иммунным ответам в отношении всех трех белков HPV16, которые присутствуют в кодируемом трангене, но не в отношении новых сочетаний. Ответы могли быть усилены за счет дополнительной иммунизации с помощью Ad26.HPV16-E2E6E7SH, и дополнительная стимулирующая доза на 16 неделе с соответствующим вектором Ad35 дополнительно усиливала иммунные ответы, специфичные в отношении E2, E6 и E7 HPV16.

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

Пример 5. Терапевтическая эффективность на мышинной модели опухоли.

Полипептид по настоящему изобретению для HPV16 (содержащий SEQ ID NO: 1) способен индуцировать HPV16-специфичный клеточный иммунный ответ у животных, который может оказывать терапевтический эффект в отношении клеток, экспрессирующих E6 и/или E7 HPV16. Терапевтическую иммунизацию, т. е. иммунизацию

после начала роста опухоли, можно применять для демонстрации эффективности кандидата терапевтической вакцины против HPV. Терапевтический эффект векторов Ad26 и Ad35 исследовали на мышцах, которым инъецировали клетки TC-1 (клетки мыши, экспрессирующие E6 и E7 HPV16) (Lin et al., 1996, *Cancer Res* 56: 21-6). Клетки TC-1 образовывали солидную опухоль в течение от нескольких дней до недель после подкожной инъекции мышам. Без вакцины опухоли быстро росли и достигали predetermined размера, составляющего 1000 мм³, в течение 30 дней (секции D и E). После достижения данного размера мышей умерщвляли из соображений этики.

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

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

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

Ранее сообщалось о том, что трансгены, вставленные в аденовирусные векторы под контролем сильных конститутивно

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

Обнаружили, что у некоторых из аденовирусных векторов, описанных в данном документе, а также у некоторых других аденовирусных векторов, кодирующих определенные варианты антигенов HPV, проявлялись некоторые из затруднений в отношении продуктивности векторов, зависящей вышеописанных от трансгенов, и таким образом их возможно можно дополнительно улучшить в данном отношении. Таким образом, авторам данного изобретения хотелось изучить, может ли применение систем для репрессии экспрессии трансгенов векторов улучшить характеристики продукции Ad-векторов, экспрессирующих антигены, полученные из HPV, как те, что описаны в данном документе. С данной целью авторы настоящего изобретения внедряли две существующие системы репрессора-оператора, т. е. TetR/TetO (Yao & Eriksson, 1999, *Hum Gene Ther* 10:419-22, EP0990041B1) и CymR/CuO (Mullick *et al.*,

2006, *BMC Biotechnol* 6:43), в платформу аденовирусного вектора по настоящему изобретению. Как систему TetR/TetO, так и систему CymR/CuO ранее применяли другие исследователи для улучшения продуктивности аденовирусных векторов посредством сайленсинга трансенов векторов во время репликации векторов (Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham *et al.*, 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert *et al.*, 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). Внедрение этих двух систем включало выработку аденовирусных векторов, экспрессирующих гены, представляющие интерес, под контролем промоторов CMV, содержащих последовательность либо TetO, либо CuO. Более того, внедрение предусматривало получение линий клеток, стабильно экспрессирующих соответствующие родственные репрессорные белки (т. е. TetR или CymR).

Получали несколько векторов на основе Ad26 и Ad35 с удаленным E1, в которых последовательности, кодирующие гетерологичные полипептиды, были функционально связаны с промотором CMV, содержащим последовательности либо оператора TetO, либо оператора CuO. Вначале, определенные последовательности, содержащие либо TetO, либо CuO (SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно) вставляли возле сайта инициации транскрипции (TSS) промотора CMV (SEQ ID NO: 13) плазмид pAdapt26 и pAdapt35.Bsu (Abbink *et al.*, 2007, *J Virol* 81:4654-63; Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87:2135-43). Последовательности, содержащие оператор, вставляли точно в те же положения промотора CMV, как было ранее описано для двух систем (Yao & Eriksson, 1999, *Human Gene Ther* 10:419-22; EP 0990041 B1; Mullick *et al.*, 2006, *BMC Biotechnol* 6:43; EP 1385946 B1). В частности, родственные с TSS последовательности (как первоначально установлено; Stenberg *et al.* 1984, *J Virol* 49:190-9), содержащие TetO и CuO, вставляли непосредственно ниже положений -20 и +7, соответственно. В SEQ ID NO: 13 эти два положения соответствуют положениям 716 и 742, соответственно. Полученные промоторы CMV, содержащие операторы, назвали соответственно CMVTetO и CMVCuO. Далее, различные трансены включали ниже (модифицированных) промоторов CMV полученных

конструкций с использованием сайтов рестрикции HindIII и XbaI. Эти трансгены включали гены, кодирующие слитый белок зеленого флуоресцентного белка и люциферазы (GFP-Luc), LSE2E6E7SH HPV16, описанный выше в примере 1, и другой полипептид с некоторым сходством с LSE2E6E7SH HPV16 (конструкция, называемая в данном примере 'HPVAg'). HPVAg содержит ту же лидерную последовательность, что и присутствующая в LSE2E6E7SH, а также последовательности E2, E6 и E7 HPV16. С применением способов, описанных в данном документе, полученные модифицированные плазмиды pAdapt26 и pAdapt35.Bsu использовали для получения аденовирусных векторов, экспрессирующих вышеупомянутые репортер и трансгены HPV под контролем промотора либо CMVTetO, либо CMVCuO.

Линии клеток, экспрессирующих либо TetR, либо CymR, получали с помощью стабильной трансфекции клеток PER.C6® с использованием соответственно плазмиды pcDNA™6/TR (LifeTechnologies, V1025-20) и производного pcDNA™6/TR, у которых последовательность, кодирующая TetR (SEQ ID NO: 14, которая кодирует полипептид SEQ ID NO: 15) заменена на кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую CymR (SEQ ID NO: 16, которая кодирует полипептид SEQ ID NO: 17). Получение стабильных линий клеток выполняли в основном как описано у поставщика pcDNA™6/TR с использованием анализа, основанного на временной трансфекции, для скрининга в отношении клонов клеток, способных репрессировать экспрессию генов, которые находятся под управлением CMVTetO или CMVCuO. Полученные линии клеток PER.C6/TetR и PER.C6/CymR анализировали в отношении их способности репрессировать экспрессию трансгена во время репликации векторов в этих клетках. Эксперименты, проводимые с векторами, экспрессирующими GFP-Luc под контролем промоторов CMV, содержащих операторы, показывают по меньшей мере 10-кратное снижение экспрессии гена люциферазы на протяжении полного цикла репликации вируса в линиях клеток, экспрессирующих репрессор, соответствующий соответственным последовательностям оператора (данные не показаны). Это подтверждает то, что линии клеток

PER.C6/TetR и PER.C6/CymR были способны репрессировать экспрессию трансгена вектора в случае репликации аденовирусных векторов.

Эффект опосредованной TetR и CymR репрессии экспрессии трансгена аденовектора в отношении выходов векторов изучали для векторов на основе Ad35, экспрессирующих HPVAg (фиг. 13А). С данной целью линии клеток PER.C6, PER.C6/TetR и PER.C6/CymR, высеянные при $3 \cdot 10^5$ клеток на лунку в лунки 24-луночного планшета, подвергали инфицированию в четырех параллельных анализах - по 1000 вирусных частиц на клетку и на протяжении трех часов - с помощью векторов, экспрессирующих HPVAg из промотора CMVTet0 либо промотора CMVCu0. В качестве контролей, проводили параллельные инфицирования соответствующими векторами, экспрессирующими GFP-Luc вместо HPVAg. Через четыре дня после инфицирования неочищенные вирусные лизаты получали, подвергая содержимое лунок (т. е. инфицированные клетки и среду) двум циклам замораживания-размораживания. Титры аденовекторов последовательно определяли с помощью протокола, основанного на количественной ПЦР, специфичной к последовательности гексонов Ad35, при котором используется очищенный вектор Ad35 с известным титром вирусных частиц в качестве стандарта. Результаты показывают, что векторы Ad35, кодирующие HPVAg, которые содержат как Tet0, так и Cu0, по сравнению с контрольными векторами, экспрессирующими GFP-Luc, проявляли сниженные выходы векторов для нормальных клеток PER.C6. Для сравнения, при получении в клетках, экспрессирующих их родственные репрессоры (т. е. соответственно TetR и CymR), те же векторы давали выходы столь же высокие, как и те, что получены с контрольными векторами. Эти данные показывают, что репрессия экспрессии трансгена во время продукции векторов в клетках-продуцентах может быть выгодной для продуктивности векторов Ad35, переносящих HPVAg в качестве трансгена.

Эффект в отношении того, что репрессия экспрессии трансгена аденовектора может влиять на выходы векторов, также изучали для векторов, полученных из аденовируса серотипа 26 (Ad26) (фиг. 13В). В анализе, выполненном практически как описано выше для

векторов Ad35, векторы Ad26, несущие трансгены, контролируемые промотором CMVTetO, кодирующие либо GFP-Luc, HPVAg либо LSE2E6E7SH, использовали для инфицирования клеток PER.C6 и PER.C6/TetR при 1500 вирусных частицах на клетку. Через три дня области инфицирования собирали и титры вирусных частиц определяли с помощью способа, основанного на количественной ПЦР, специфичной к последовательности гексонов Ad26. Результаты показывают, что для клеток PER.C6 выходы векторов, кодирующих HPVAg и LSE2E6E7SH, являются более низкими, чем наблюдаемые для контрольных векторов, кодирующих GFP-Luc. В противоположность этому, для клеток PER.C6/TetR оба эти вектора продемонстрировали титры, которые являлись столь же высокими, как и те, что получали для контрольного вектора. Вместе с результатами выше (для векторов Ad35), данные продемонстрировали, что подавление экспрессии трансгена во время продукции аденовектора повышала выходы векторов, экспрессирующих HPVAg и LSE2E6E7SH.

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

Авторы данного изобретения полагали, что использование репрессорной системы экспрессии трансгена, как например одной из двух вышеописанных, может предотвратить затруднения в отношении генетической стабильности, связанные с трансгенами, такими как HPVAg, которые являются ингибиторными для роста векторов. Чтобы изучить это, векторы на основе Ad35 с экспрессией HPVAg, управляемой промотором CMVCuO, оценивали в отношении стабильности кассеты трансгена при росте вектора либо в клетках PER.C6, либо в клетках PER.C6/СумR (фиг. 14). Коротко, ДНК вектора трансфицировали в две различные линии клеток и полученным вирусным бляшкам обеспечивали возможность роста под агарозным слоем. Для каждой из двух трансфекций выделяли пять

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

Пример 7. Конструкция сконструированного полипептида, содержащего практически все STL-эпитопы E6 и E7 HPV18

Подобно конструкции для E6 и E7 HPV16 по настоящему изобретению, авторы данного изобретения сконструировали новый, неонкогенный полипептид (и кодирующую его нуклеиновую кислоту), который содержит практически все CTL-эпитопы белков E6 и E7 HPV18 и характеризуется минимальным количеством ожидаемых/прогнозируемых сильных неэпитопов (неэпитопы в значении эпитопов, отсутствующих в белках дикого типа E6 и E7 HPV18). Полипептид по настоящему изобретению для HPV18 (также иногда называемый в данном документе 'E6E7SH' HPV18) содержал аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20. Кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая этот полипептид, представлена под SEQ ID NO: 21.

Молекулы по настоящему изобретению для HPV18 обладали теми же преимуществами, как описано в примере 1 для HPV16. Они представляют собой отдельные молекулы, что обеспечивает преимущества в получении по сравнению со стратегиями, в которых применяется много молекул. Кроме того, полипептид по настоящему изобретению содержит практически все предполагаемые CTL-эпитопы, которые присутствуют в E6 и E7 дикого типа HPV18, и в то же время содержит минимальное количество ожидаемых/прогнозируемых сильных неэпитопов, которые могут быть потенциально иммунодоминантными и, таким образом, перенаправляют иммунный ответ от соответствующих CTL-эпитопов дикого типа. Таким образом, конструкции по настоящему изобретению являются иммунологически более благоприятными, чем молекулы, описанные другими исследователями, которые не содержат каких-либо возможных CTL-эпитопов, и/или содержат большее количество неэпитопов, или более сильные неэпитопы.

Например, сконструированная конструкция HPV18 под SEQ ID NO: 20 содержит только пять неэпитопов с длиной, составляющей девять аминокислот, с прогнозируемой аффинностью связывания, составляющей <50 нМ для 20 наиболее распространенных аллелей HLA-A, 20 наиболее распространенных HLA-B и 20 наиболее распространенных HLA-C, как описано в примере 1 для сконструированной конструкции HPV16 (содержащей SEQ ID NO: 1).

Синтезировали нуклеиновую кислоту, кодирующую

сконструированную таким образом авторами данного изобретения молекулу E6E7SH HPV18 (т. е. полипептид, характеризующийся аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO:20), последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую SEQ ID NO: 21, и фланкированную сайтом HindIII и последовательностью Kozak на 5'-конце и сайтом XbaI на 3'-конце (синтез под заказ и стандартное молекулярное клонирование в Invitrogen Life technologies, Германия).

Синтезированные фрагменты клонировали с использованием HindIII и XbaI в стандартный вектор экспрессии pCDNA2004.Neo, несущий как бактериальный маркер устойчивости (к ампициллину), так и маркер устойчивости млекопитающих (к неомизину), для получения плазмидных векторов, кодирующих сконструированную молекулу HPV18 по настоящему изобретению, т. е. для экспериментов на основе (временных) трансфекций.

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

Последовательность слитого белка E6E7SH HPV18 можно комбинировать с последовательностями других ранних белков HPV18 для целенаправленного воздействия на организмы индивидуумов с хронической инфекцией и для расширения иммунного репертуара у иммунизированного индивидуума. В качестве неограничивающего примера таких вариантов осуществления авторы данного изобретения получали последовательность, кодирующую слитый белок E6E7SH с E2 на его N-конце. Авторы данного изобретения подвергали мутации глицин в положении 294, лизин в положении 300 и цистеин в положении 301 белка E2 wt HPV18 (Genbank: AAP20597.1) соответственно на валин, метионин и аргинин для подавления активности связывания ДНК. Каждая из этих мутаций сама по себе уже полностью подавляла связывание E2 с последовательностями ДНК, которые несут E2-связывающие домены (Prakash et al., 1992, *Genes Dev* 6: 105-16).

Полученный полипептид обозначали как E2E6E7SH HPV18, и он содержал SEQ ID NO: 22. Получали кодон-оптимизированную

последовательность, кодирующую этот полипептид, и она представлена под SEQ ID NO: 23.

Последовательности, которые кодируют полипептиды E6E7SH HPV18 по настоящему изобретению, с E2 или без него, могут экспрессироваться, например, с ДНК-конструкций, с РНК или с вирусных векторов. На фиг. 15 показана экспрессия в клетках HEK-293T при временной трансфекции ДНК-векторами, экспрессирующими вышеописанные трансгены. После трансфекции клетки собирали, и клеточные экстракты анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга с антителом, которое распознает E6 HPV18. Данный эксперимент демонстрирует экспрессию ожидаемых слитых белков соответствующего размера после трансфекции векторов экспрессии.

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

Гены, кодирующие вышеописанные сконструированные последовательности HPV18, подвергали генной оптимизации для экспрессии у человека и синтезировали согласно Geneart. Последовательность Kozak (5' GCCACC 3') включали непосредственно перед стартовым кодоном ATG, и при этом два стоп-кодона (5' TGA TAA 3') добавляли в конце соответствующей кодирующей последовательности. Гены вставляли в плазмиду pAdApt35BSU и в плазмиду pAdApt26 (Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87, 2135-43) по сайтам HindIII и XbaI.

Ad35.HPV18-E6E7SH являлся вектором на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 35 (Ad35), содержащим кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности для экспрессии вышеописанного сконструированного варианта слитого белка HPV18 (E6E7SH HPV18, с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 20). Комбинированные последовательности E6 и E7 помещали под контроль промотора CMV в область E1 генома аденовируса с удаленными E1, E3. Ad26.HPV18-E6E7SH являлся эквивалентным вектором на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 26.

Аналогичным образом были получены рекомбинантные

аденовирусные векторы на основе Ad26 и Ad35, которые кодируют вариант E2E6E7SH HPV18 (SEQ ID NO: 22).

Все аденовирусы выращивали, получали, очищали и хранили как описано в примере 1 выше.

Пример 8. Отсутствие трансформирующей активности у сконструированных конструкций HPV18

Белки E6 и E7 HPV18 обладали онкогенным потенциалом, который проявлялся как трансформирующая активность в определенных анализах, как например колониеобразование при анализе с мягким агаром (Massimi and Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Полипептид E6E7SH, описанный в примере 7, содержал фрагменты белков E6 и E7 в переупорядоченном виде. Предполагают, что это приводило к устранению онкогенного потенциала, что может быть определено, например, по отсутствию трансформирующей активности по сравнению с любым из белков E6 и E7 wt в таких анализах.

Другие исследователи сообщали, что "генно-перетасованные" варианты E6 и E7 HPV16 действительно теряли свой онкогенный потенциал (Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Henken *et al.*, 2012, *Vaccine* 30: 4259-66), что демонстрировало то, что "перетасовка генов" нейтрализовала функции белков E6 и E7 HPV16 дикого типа. В примере 2 авторы данного изобретения показали, что сконструированная конструкция для HPV16 по настоящему изобретению утратила свои активности E6 и E7.

Для оценки потери онкогенных свойств авторы данного изобретения оценивали способность конструкции E6E7SH HPV18 по настоящему изобретению придавать способность клеткам NIN 3T3 расти в мягком агаре (как описано, например, в Massimi and Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Трансфекция клеток NIN3T3 с помощью плазмиды, экспрессирующей E7 дикого типа HPV18, неизменно приводила к колониеобразованию. Подобно результатам, полученным с помощью E6 HPV16, экспрессия только E6 дикого типа HPV18 не вызывала колониеобразование выше фонового уровня. Трансфекция с помощью конструкции E6E7SH HPV18 по настоящему изобретению не приводила к росту колоний клеток в мягком агаре (фиг. 16) в четырех независимых экспериментах, что

продемонстрировало то, что нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид по настоящему изобретению, E6E7SH HPV18, утратили трансформирующую способность, которая связана с E7.

Онкогенный потенциал E6 и E7 связан с их способностью снижать уровни клеточных белков p53 и pRb, соответственно. Анализы разрушения p53 и pRb проводили для демонстрации того, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по настоящему изобретению, E6E7SH HPV18, не обладала биологической активностью на молекулярном уровне, связанной с E6 и E7 дикого типа. Вкратце, для анализа разрушения p53, E6 wt HPV18 и конструкцию E6E7SH HPV18 по настоящему изобретению экспрессировали в клетках NCI-H1299, у которых отсутствовал эндогенный p53. Для анализа разрушения pRb E7 wt HPV18 и конструкцию E6E7SH HPV18 экспрессировали в клетках Saos-2 с нефункциональным pRb. Как можно видеть на фиг. 17, коэкспрессия p53 с E6 wt HPV18, но не с E6E7SH HPV18, приводила к снижению уровней p53 (секции A и B). Аналогично, на секциях 17C,D показано, что коэкспрессия pRb с E7 wt HPV18, но не с E6E7SH HPV18, приводила к снижению уровней pRb. Эти данные продемонстрировали, что нуклеиновая кислота, кодирующая сконструированный полипептид HPV18 по настоящему изобретению, не обладает способностью колониеобразования в мягком агаре и не ограничивает основные биологические активности полипептидов E6 и E7 дикого типа HPV18, а именно, инактивацию p53 и pRb, соответственно.

Для дополнительной демонстрации безопасности конструкций нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид по настоящему изобретению, авторы данного изобретения использовали первичные генитальные кератиноциты человека, полученные из неонатальной крайней плоти (клетки HEKn), которые очень напоминают естественные клетки-мишени для HPV-опосредованной трансформации. Для иммортализации первичных кератиноцитов человека необходимо действие как E6, так и E7 дикого типа (Munger *et al.*, 1989, *J Virol* 63: 4417-21). Вероятно, этот анализ является физиологически наиболее важным анализом *in vitro* для демонстрации безопасности конструкций по настоящему изобретению (Massimi and Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Клетки,

трансдуцированные лентивирусами, экспрессирующими E6 и E7 дикого типа HPV18 (E6E7 wt), индуцировали immortalization первичных кератиноцитов, что подтверждается увеличением их продолжительности жизни по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками (фиг. 18) и активацией hTERT, каталитической субъединицы теломеразы (данные не показаны). Экспрессия сконструированного полипептида HPV18 по настоящему изобретению (E6E7SH HPV18) не способна продлить продолжительность жизни по сравнению с GFP-трансдуцированными или нетрансдуцированными кератиноцитами. Аналогичные результаты были получены у двух дополнительных независимых доноров (данные не показаны). Все эти данные указывают на то, что конструкции по настоящему изобретению утратили способность индуцировать immortalization первичных кератиноцитов человека, которые считаются в значительной степени физиологической моделью.

Все вместе эксперименты в данном примере предоставляют убедительные доказательства отсутствия трансформирующей активности нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, и таким образом значительно улучшенной безопасности по сравнению с конструкциями E6 и E7 HPV18.

Сравнительный пример 8A. Конструкции по настоящему изобретению обладают уникальными свойствами

Получали дополнительную сконструированную конструкцию HPV18 (упоминается в данном документе как 'HPV18DC2'; аминокислотная последовательность этой конструкции представлена под SEQ ID NO: 24). HPV18DC2 имеет следующие общие черты с конструкцией E6E7SH HPV18 (SEQ ID NO: 20) по настоящему изобретению: (a) она также содержит фактически полные аминокислотные последовательности E6 и E7 HPV18, (b) в виде того же количества переупорядоченных фрагментов, (c) фрагменты которой частично перекрываются таким образом, что присутствуют практически все Т-клеточные эпитопы E6 и E7 HPV18, и (d) она была сконструирована для сведения к минимуму введения нежелательных сильных неэпитопов. Таким образом, сконструированная конструкция по настоящему изобретению и HPV18DC2 структурно отличаются только точной аминокислотной

последовательностью.

Однако это приводит по меньшей мере к одному биологическому различию, которое демонстрирует, что такие молекулы нельзя рассматривать как всего лишь альтернативы, которые могут быть заменены друг на друга.

В частности, молекула по настоящему изобретению была полностью лишена измеримой функциональной активности в продлении продолжительность жизни первичных кератиноцитов крайней плоти, как показано выше (пример 8). В противоположность этому, HPV18DC2 индуцируют увеличенную продолжительность жизни первичных кератиноцитов. Например, в соответствии с экспериментом, описанным в примере 8, клетки донора, экспрессирующего конструкцию E6E7SH HPV18 по настоящему изобретению, характеризовались продолжительностью жизни, составляющей 81 день, в течение которой у них было 7 дупликаций пассажа, тогда как, в сравнении, клетки с HPV18DC2 характеризовались большей продолжительностью жизни, составляющей 120 дней, в течение которой у них было 67 дупликаций пассажа. Схожие различия были обнаружены в независимых анализах кератиноцитов от различных доноров (в среднем от 3 доноров, при этом клетки с конструкцией по настоящему изобретению характеризовались продолжительностью жизни, составляющей 62 дня, с 9 дупликациями пассажа, тогда как клетки с HPV18DC2 характеризовались намного большей продолжительностью жизни, составляющей 156 дней, с 62 дупликациями пассажа), показывающих различия, полученные в результате различий между конструкциями. В соответствии с этим наблюдением в отношении того, что продолжительность жизни была увеличена с помощью HPV18DC2, клетки, трансдуцированные с помощью HPV18DC2, проявляли некоторую остаточную активность E7 (т. е. разрушение pRb/повышенная регуляция p16), в отличие от клеток, трансдуцированных с помощью молекул E6E7SH HPV18 по настоящему изобретению, у которых в этих анализах отсутствовала выявляемая активность (пример 8).

Схожие наблюдения осуществляли с альтернативной сконструированной конструкцией HPV16 при сравнении со

сконструированной конструкцией HPV16 по настоящему изобретению (упомянутой в примере 2).

Наблюдаемые различия между казалось бы очень схожими молекулами в системе биологической модели демонстрируют, что такие молекулы нельзя рассматривать как всего лишь альтернативы, которые могут быть заменены друг на друга. Это подчеркивает уникальность сконструированных молекул по настоящему изобретению и непредсказуемость в данной области.

Важно отметить, что можно сделать заключение из экспериментов в примерах 2 и 8 о том, что в используемых модельных системах сконструированные молекулы по настоящему изобретению утратили онкогенные активности белков E6 и E7 дикого типа HPV16/18.

Пример 9. Иммунные ответы в отношении сконструированных конструкций HPV18 E6E7SH

Авторы данного изобретения получали ДНК-векторы и аденовирусные векторы, описанные в примере 7. Для оценки иммуногенности, индуцированной вакциной, мышей СВ6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов (Ad35), экспрессирующих E6E7SH или E2E6E7SH HPV18, или аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых) в качестве контролей. Через две недели после примиряющей иммунизации мышей умерщвляли и выделенные спленоциты стимулировали в течение ночи пулами из 15-мерных пептидов E6 HPV18. E6-специфичные иммунные ответы анализировали с помощью окрашивания внутриклеточных цитокинов. В отдельном эксперименте мышей СВ6F1 иммунизировали с помощью аденовекторов (Ad35 или Ad26), экспрессирующих E2E6E7SH HPV18, или аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых) в качестве контроля.

На фиг. 19А показано, что иммунизация мышей с помощью Ad35.HPV18-E6E7SH индуцирует E6-специфичные иммунные ответы, которые измерены с помощью анализа ICS. Кроме того, результаты на фиг. 19А демонстрируют, что слияние E2 с N-концом сконструированной конструкции снижает иммуногенность, несмотря на более низкую экспрессию этого варианта E2E6E7, что наблюдалось при трансфекции (фиг. 15). На фиг. 19В показано, что иммунизация мышей с помощью Ad35.HPV18-E6E7SH или Ad26.HPV18-

E2E6E7SH индуцирует сравнимый процент IFN γ -продуцирующих HPV18-E6-специфичных CD8 T-клеток.

Клеточный иммунный ответ в отношении пептид по настоящему изобретению можно индуцировать различными типами аденовирусных векторов. В эксперименте, представленном на фиг. 19B, мышей иммунизировали с помощью аденовирусных векторов либо Ad26, либо Ad35, экспрессирующих E2E6E7SH HPV18. Данные показывают, что эти аденовирусные векторы индуцировали HPV18 E6-специфичные T-клетки до схожих уровней.

Пример 10. Комбинирование аденовирусных векторов, экспрессирующих сконструированные конструкции HPV16 и HPV18

Комбинирование сконструированных конструкций для различных типов HPV предоставляет возможность получения лечебной вакцины для различных типов HPV. Для оценки способности аденовирусных векторов, экспрессирующих различные сконструированные последовательности, индуцировать иммунные ответы, мышей иммунизировали с помощью внутримышечной инъекции аденовекторов (Ad26), экспрессирующих E2E6E7SH HPV16 (кодирующий белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3), и с помощью Ad26, экспрессирующего E2E6E7SH HPV18 (кодирующий белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22), с дозой, составляющей 1×10^{10} vp для каждого вектора или аденовекторов, не кодирующих трансген (пустой). Через четыре недели после иммунизации иммунные ответы стимулировали с помощью иммунизации векторами Ad35, экспрессирующими те же антигены. Иммунные ответы измеряли через две недели после стимулирующей иммунизации. Клетки стимулировали в течение ночи с помощью пептидных пулов, соответствующих E6 HPV18 или E7 HPV16, и ответы измеряли с помощью IFN γ ELISPOT. Данные представлены на фиг. 20.

Данные показывают, что иммунизация мышей с помощью векторов Ad26/35, экспрессирующих E2E6E7SH HPV16 и E2E6E7SH HPV18, приводила в результате к клеточным иммунным ответам в отношении обоих сконструированных белков (т. е. HPV16 и HPV18).

В независимом эксперименте со схожей схемой иммунизации

(Ad26 - примирующая и Ad35 - стимулирующая) авторы данного изобретения сравнивали иммунный ответ, индуцированный с помощью совместно Ad, экспрессирующего E2E6E7SH HPV16 и Ad, экспрессирующего E2E6E7SH HPV18, с ответом, индуцированным у мышей, иммунизированных с помощью только Ad, экспрессирующего E2E6E7SH HPV16 или только Ad, экспрессирующего E2E6E7SH HPV18. Иммунные ответы измеряли через две недели после стимулирующей иммунизации и клетки стимулировали в течение ночи с помощью пептидных пулов, соответствующих E2, E6 или E7 HPV16 и HPV18, и ответы измеряли посредством IFN γ ELISPOT, а также окрашивания внутриклеточных цитокинов. Хотя совместное введение в одной композиции Ad, экспрессирующего E2E6E7SH HPV16, и Ad, экспрессирующего E2E6E7SH HPV18, приводило в результате в целом к более низкой величине ответов CD4 и CD8 по сравнению с животными, которых иммунизировали только отдельными компонентами вакцины, совместное введение индуцировало схожий спектр иммунных ответов (данные не показаны).

Таким образом, с помощью совместного введения E2E6E7SH HPV16 и E2E6E7SH HPV18, экспрессирующих конструкции в соответствии с настоящим изобретением, можно индуцировать клеточные иммунные ответы в отношении как HPV16, так и HPV18.

Пример 11. Иммуногенность комбинированных сконструированных конструкций у макаков-резус

Для оценки способности аденовирусных векторов, экспрессирующих сконструированные последовательности по настоящему изобретению, индуцировать иммунные ответы у приматов, отличных от человека, макаков-резус иммунизировали с помощью внутримышечной инъекции со смесью двух отдельных аденовекторов как в предыдущем примере, т. е. векторов Ad26, совместно экспрессирующих HPV16 и HPV18 E2E6E7SH, в дозе 1×10^{10} vp для каждого вектора, или аденовекторов, не кодирующих трансген (пустых). Через восемь недель после иммунизации животные получали стимулирующую иммунизацию векторами Ad26, экспрессирующими те же антигены. На 16 неделе животные получали еще одну инъекцию, содержащую векторы Ad35, экспрессирующие те

же антигены. Образцы крови брали в нескольких моментах времени, и выделенные белые клетки крови стимулировали в течение ночи пулами пептидов, соответствующими E2, E6 или E7 обоих HPV16 и HPV18. Специфичные ответы оценивали с помощью IFN γ ELISPOT. Данные представлены на фиг. 21. Кроме того, на 10 неделе и 18 неделе после примиряющей иммунизации оценивали клеточный иммунный ответ, специфичный в отношении пептидов, охватывающих новые сочетания в сконструированных молекулах HPV18 по настоящему изобретению. Индукция ответа IFN γ в отношении этих соединительных пептидов у всех животных была ниже предела обнаружения, составляющего <50 SFU на $1 \cdot 10^6$ РВМС (данные не показаны).

Данные показывают, что иммунизация приматов, отличных от человека, комбинацией векторов Ad26, совместно экспрессирующих E2E6E7SH HPV16 и E2E6E7SH HPV18, приводила в результате к клеточным иммунным ответам в отношении нескольких из белков HPV, которые присутствуют в кодируемых транскриптах. Ответы могли быть стимулированы с помощью дополнительной иммунизации векторами Ad26. Дополнительная стимулирующая иммунизация на 16 неделе соответствующим вектором Ad35 дополнительно усиливала иммунные ответы.

Пример 12. Терапевтическая эффективность комбинированных конструкций на мышинной модели опухоли

Полипептид по настоящему изобретению, соответствующий E6 и E7 HPV16, способен индуцировать клеточные иммунные ответы у мышей, что приводило к терапевтическому эффекту в модели ТС-1 (как показано в примере 5). Терапевтический эффект комбинации аденовирусных векторов, совместно экспрессирующих сконструированные белки как HPV16, так и HPV18, исследовали в этой же модели. Без вакцины опухоли быстро росли и достигали predeterminedного размера, составляющего 1000 мм^3 , в течение 30 дней, после чего мышей умерщвляли по этическим соображениям.

В этом эксперименте примиряющие/стимулирующие иммунизации с помощью аденовирусных векторов, экспрессирующих E2E6E7SH HPV16, значительно продлевали выживание мышей (фиг. 22). С комбинацией

аденовирусных векторов, совместно экспрессирующих как E2E6E7SH HPV16, так и E2E6E7SH HPV18, наблюдали схожее среднее время выживания. В группе мышей, которые получали комбинированную вакцину, трое животных не имели опухолей в конце периода наблюдения, составляющего 90 дней. В заключение, иммунизация с помощью комбинации аденовирусных векторов, совместно экспрессирующих HPV16- и HPV18-специфичные сконструированные полипептиды по настоящему изобретению, значительно снижала рост опухолей или полностью устраняла развившиеся опухоли в общепринятой модели контрольного заражения для рака, индуцированного HPV16.

ССЫЛКИ

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

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

Brokaw JL, Blanco M, McBride AA (1996) Amino Acids Critical for the Functions of the Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Transactivator. *J Virol* 70: 23-29

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

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

de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, van Meijgaarden KE, Drijfhout JW, Kenter G, Vermeij P, Melief CJ, Offringa R (2002) Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper

immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 62:472-479

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

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

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9:1909-1917

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

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

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

Gennaro AR (1990) Remington's pharmaceutical sciences. Mack
Gilbert R, Guilbault C, Gagnon D, Bernier A, Bourget L, Elahi SM, Kamen A, Massie B (2014) Establishment and validation of new complementing cells for production of E1-deleted adenovirus vectors in serum-free suspension culture. *J Virol Methods* 208:177-188

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

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

Havenga M, Vogels R, Zuijdsgeest D, Radosevic K, Mueller S, Sieuwerts M, Weichold F, Damen I, Kaspers J, Lemckert A, van

Meerendonk M, van der Vlugt R, Holterman L, Hone D, Skeiky Y, Mintardjo R, Gillissen G, Barouch D, Sadoff J, Goudsmit J (2006) Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells. *J Gen Virol* 87:2135-2143

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

Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, Schiller JT, Gonzalez P, Dubin G, Porras C, Jimenez SE, Lowy DR (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298:743-753

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

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

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

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

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

Kim TJ, Jin HT, Hur SY, Yang HG, Seo YB, Hong SR, Lee CW, Kim S, Woo JW, Park KS, Hwang YY, Park J, Lee IH, Lim KT, Lee KH, Jeong MS, Surh CD, Suh YS, Park JS, Sung YC (2014) Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. *Nat Commun* 5:5317 (doi: 10.1038/ncomms6317)

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

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

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

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

Matthews DA, Cummings D, Eveleigh C, Graham FL, Prevec L (1999) Development and use of a 293 cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):345-353

McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) *PCR 2: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-489

Mishra S, Lavelle BJ, Desrosiers J, Ardito MT, Terry F, Martin WD, De Groot AS, Gregory SH (2014) Dendritic cell-mediated, DNA-based vaccination against Hepatitis C induces the multi-epitope-specific response of humanized, HLA transgenic mice. *Plos One* 9 (8): e104606. DOI: 10.1371/journal.pone.0104606

Moise L, Buller RM, Schriewer J, Lee J, Frey SE, Weiner DB, Martin W, De Groot AS (2011) VennVax, a DNA-prime, peptide-boost multi-T-cell epitope poxvirus vaccine, induces protective immunity against vaccinia infection by T cell response alone. *Vaccine* 29: 501-511

Moss SF, Moise L, Lee DS, Kim W, Zhang S, Lee J, Rogers AB, Martin W, De Groot AS (2011). *HelicoVax: epitope-based*

therapeutic *Helicobacter pylori* vaccination in a mouse model. Vaccine 29: 2085-2091

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

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

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

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

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

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

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

Prakash SS, Grossman SR, Pepinsky RB, Laimins LA, Androphy EJ (1992) Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 trans-activator. Genes Dev 6:105-116

Rubinchik S, Ding R, Qiu AJ, Zhang F, Dong J (2000) Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein

regulated by the tet-inducible expression system. *Gene Ther* 7:875-885

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

Sakai H, Yasugi T, Benson JD, Dowhanick JJ, Howley PM (1996) Targeted Mutagenesis of the Human Papillomavirus Type 16 E2 Transactivation Domain Reveals Separable Transcriptional Activation and DNA Replication Functions. *J Virol* 70: 1602-1611

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

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

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

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

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

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

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

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

Yoshida Y, Hamada H (1997) Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator

with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-430

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

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

Таблица I. Последовательности

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

MHQKRTAMFQ	DPQERPRKLP	QLCTELQTTI	HDIILECVYC	KQOLEDEIDG
PAGQAEPDRA	HYNIVTFCK	CDSTLRRCVQ	STHVDIRTLE	DLLMGTLGIV
CPICSQKPGT	TLEQQYNKPL	CDLLIRCINC	QKPLCPPEEKQ	RHLDDKKQRFH
NIRGRWTGRC	MSCCRSSRTR	RETQMHGDTP	TLHEYMLDLQ	PETTDLYCYE
QLNDSSEED	EIDGPAGQAE	PDRAHYNIVT	FCCQLCTELQ	TTIHDIILEC
VYCKQQLLR	EVYDFAFRDL	CIVYRDGNPY	AVCDKCLKFY	SKISEYRHYC
YSLYGTTLQ	QYNKPLCDLL	IRCINCQK		

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

ATGCACCAGA	AACGGACCGC	CATGTTCCAG	GACCCCCAGG	AACGGCCCAG
AAAGCTGCCC	CAGCTGTGCA	CCGAGCTGCA	GACCACCATC	CACGACATCA
TCCTGGAATG	CGTGTACTGC	AAGCAGCAGC	TGGAAGATGA	GATCGACGGC
CCTGCTGGCC	AGGCCGAACC	CGACAGAGCC	CACTACAATA	TCGTGACCTT
CTGCTGCAAG	TGCGACAGCA	CCCTGCGGCT	GTGCGTGCAG	AGCACCCACG
TGGACATCCG	GACCCCTGGAA	GATCTGCTGA	TGGGCACCCT	GGGCATCGTG
TGCCCCATCT	GCAGCCAGAA	GCCCCGGACC	ACCCTGGAAC	AGCAGTACAA
CAAGCCCCTG	TGCGACCTGC	TGATCCGGTG	CATCAACTGC	CAGAAACCCC
TGTGCCCCGA	GGAAAAGCAG	CGGCACCTGG	ACAAGAAGCA	GCGGTTCCAC
AACATCCGGG	GCAGATGGAC	AGGCAGATGC	ATGAGCTGCT	GCAGAAGCAG
CCGGACCAGA	CGGGAAACCC	AGATGCACGG	CGACACCCCC	ACCCTGCACG
AGTACATGCT	GGACCTGCAG	CCCGAGACAA	CCGACCTGTA	CTGCTACGAG
CAGCTGAACG	ACAGCAGCGA	GGAAGAGGAC	GAGATTGACG	GACCCGCTGG

ACAGGCCGAG CCTGACCGGG CTCACTATAA CATCGTGACA TTTTGCTGTC
 AGCTCTGTAC TGAACTCCAG ACAACAATTC ACGATATTAT TCTCGAATGT
 GTGTATTGTA AACAGCAGCT CCTGCGGAGA GAGGTGTACG ACTTCGCCTT
 CCGGGACCTC TGCATCGTGT ATCGGGACGG CAACCCCTAC GCCGTGTGCG
 ACAAGTGCCT GAAGTTCTAC AGCAAGATCA GCGAGTACCG GCACTACTGC
 TACAGCCTGT ACGGAACAAC ACTCGAACAG CAGTATAACA AACCACCTCTG
 TGATCTGCTG ATTCGCTGTA TCAATTGTCA GAAGTGATAA

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

METLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGFKHINHQVV
 PTLAVSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLQDVSLEVYLTAPTGCICKHGYTVEVQFDG
 DICNTMHYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYGLYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNKVWEVH
 AGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRSEPDTGNPC
 HTTKLLHRDSVDSAPILTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFKKHCTLYTAV
 SSTWHWTGHNVKHKSIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTI TVSTGFMSIMHQKRTAMFQDPQE
 RPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQOLEDEIDGPAGQAE PDRAHYNIVTFCCCKDSTLRLC
 VQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPIC SQKPGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRH
 LDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSS
 EEEDEIDGPAGQAE PDRAHYNIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREYDFAFRDL
 CIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQK

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

ATGGAAACCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGACCCACTACGA
 GAACGACAGCACCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGAAGCACATGCGGCTGGAATGCGCC
 ATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGCTTCAAGCACATCAACCACCAGGTGGTGGCCACCCTGG
 CCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCAGCTGACCCTGGAAACCATCTACAA
 CAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCTGCAGGACGTGTCCCTGGAAGTGTACCTGACCGCT
 CCCACCGGCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGTGGAAGTGCAGTTCGACGGCGACATCTGCA
 ACACCATGCACTACACCAACTGGACCCACATCTACATCTGCGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGT
 GGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGTACTACGTGCACGAGGGCATCCGGACCTACTTCGTG
 CAGTTC AAGGACGACGCCGAGAAGTACAGCAAGAACAAGTGTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCC
 AGGTCATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCCCGAGATCATCCG
 GCAGCACCTGGCCAATCACCTGCCGCCACCCACACAAAGGCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAA
 ACCCAGACCACCATCCAGCGGCCCGAGAAGCGAGCCCGACACCGCAATCCCTGCCACACCACCA

AGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCCTATCCTGACCGCCTTCAACAGCAGCCACAA
 GGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTGCACCTGAAGGTGGACGCCAACACC
 CTGATGCGGGTGCGGTACAGATCAAGAAGCACTGCACCCTGTACACCGCCGTGTCCTCCACCT
 GGCCTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGCGCCATCGTGCACCCTGACCTACGACAGCGA
 GTGGCAGCGGGACCAGTTCCTGAGCCAGGTCAAAATCCCCAAGACCATCACCGTGTCCACCGGC
 TTCATGAGCATCATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCCAGAA
 AGCTGCCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAATGCGTGTA
 CTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATCGACGGCCCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGAGCC
 CACTACAATATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGCGACAGCACCCCTGCGGGTGTGCGTGCAGAGCA
 CCCACGTGGACATCCGGACCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGCCCAT
 CTGCAGCCAGAAGCCCGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTGCTG
 ATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGA
 AGCAGCGGTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAG
 CCGGACCAGACGGGAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGAC
 CTGCAGCCCGAGACAACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAAGAGG
 ACGAGATTGACGGACCCGCTGGACAGGCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATT
 TTGCTGTCAGCTCTGTACTGAACTCCAGACAACAATCACGATATTATTCTCGAATGTGTGTAT
 TGTAACAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACCTCTGCATCGTGT
 ATCGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGA
 GTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTC
 TGTGATCTGCTGATTCGCTGTATCAATTGTCAGAAGTGATAA

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

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLEDEIDGPAGQAEPRD
 AHYNIIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGLGIVCPICSQKPGTTLEQQYNKPLCDL
 LIRCINCQKPLCPEEKQRHLDDKQRFHNIIRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQMHGDTPTLHEYML
 DLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECV
 YCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKP
 LCDLLIRCINCQKMETLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGF
 KHINHQVVPTLAVSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLDVSLLEVYLTAPTGCIIKHHGY
 TVEVQFDGDI CNMHTYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYYGLYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYS
 KNKVVEVHAGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRS
 EPDTGNPCHTTKLLHRDSVDSAPILTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFFK
 HCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKSIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTIITVSTGFMSI

SEQ ID NO: 6 (E6E7E2SH HPV16, нуклеотидная

**последовательность, кодирующая сконструированный полипептид
Е6/Е7/Е2 HPV16)**

ATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCCAGAAAGCTGCC
 CCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAATGCGTGTACTGCAAG
 CAGCAGCTGGAAGATGAGATCGACGGCCCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGAGCCCАCTACA
 ATATCGTGACCTTCTGCTGCAAGTGCAGACAGCACCCCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGT
 GGACATCCGGACCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGCCCCATCTGCAGC
 CAGAAGCCCGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCCTGTGCGACCTGCTGATCCGGT
 GCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGAAGCAGCG
 GTTCCACAACATCCGGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAGCCGGACC
 AGACGGGAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGC
 CCGAGACAACCGACCTGTAАCTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAAGAGGACGAGAT
 TGACGGACCCGCTGGACAGGCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATTTTGTGT
 CAGCTCTGTAАCTGAACTCCAGACAACAATTCACGATATTATTCTCGAATGTGTGTATTGTAAC
 AGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACCTCTGCATCGTGTATCGGGA
 CGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGG
 CACTACTGCTACAGCCTGTACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAACCACTCTGTGATC
 TGCTGATTCGCTGTATCAATTGTCAGAAGATGGAAACCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCA
 GGACAAGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGCACCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGG
 AAGCACATGCGGCTGGAATGCGCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGCTTCAAGCACATCA
 ACCACCAGGTGGTGCCACCCCTGGCCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCA
 GCTGACCCTGGAAACCATCTACAACAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCTGCAGGACGTG
 TCCCTGGAAGTGTACCTGACCGCTCCCACCGGCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGTGGAAG
 TGCAGTTCGACGGCGACATCTGCAACACCATGCACTACACCAACTGGACCCACATCTACATCTG
 CGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGTGGAAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGTAАCTACGTGCAC
 GAGGGCATCCGGACCTACTTCGTGCAGTTCAAGGACGACGCCGAGAAGTACAGCAAGAACAAG
 TGTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTCATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGA
 GGTGTCCAGCCCCGAGATCATCCGGCAGCACCTGGCCAATCACCTGCCGCCACCCACACAAAG
 GCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAAACCCAGACCACCATCCAGCGGCCCAGAAGCGAGCCCCGACA
 CCGGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCCTATCCT
 GACCGCCTTCAACAGCAGCCACAAGGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTG
 CACCTGAAGGTGGACGCCAACACCCTGATGCGGCTGCGGTACAGATTCAAGAAGCACTGCACCC
 TGTACACCGCCGTGTCTCCACCTGGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGCGCCAT
 CGTGACCCTGACCTACGACAGCGAGTGGCAGCGGGACCAGTTCCTGAGCCAGGTCAAAATCCCC
 AAGACCATCACCGTGTCCACCGGCTTCATGAGCATCTGATAA

SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность лидерного

пептида IgE)

MDWTWILFLVAAATRVHS

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

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCTGCCGCAACCCGGGTGCACAGC

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

MACPGFLWALVISTCLEFSMA

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

ATGGCCTGCCCCGGCTTTCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAATTCAGCAT
GGCC

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

GAGCTCTCCSTATCAGTGATAGAGATCTCCSTATCAGTGATAGAGATCGTCGAC

SEQ ID NO: 12 (CuO-содержащая последовательность)

AACAAACAGACAATCTGGTCTGTTTGT

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

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCT
ATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAAC
ATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA
GTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA
GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC
TATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGG
GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGG
ACTTTCCAAAATGTTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG
GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGC
TGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTG
GA

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

ATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGT

CGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTG
TATTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTAGATAGGC
ACCATACTCACTTTTGCCTTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAA
AAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCT
ACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCAC
TAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGA
TCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTA
TTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTG
AATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCCGCGTACAGCGGATC
CCGGGAATTCAGATCTTATTAA

SEQ ID NO: 15 (TetR, аминокислотная последовательность полипептида TetR, экспрессируемого рсDNA™6/TR)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEM
LDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQ
GFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEP AFL
FGLELIICGLEKQLKCESGSAYS SRSREFRSY

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

ATGTCTCCCAAACGACGGACTCAAGCGGAAAGGGCAATGGAAACTCAGGGTAAGCTGAT
TGCCGCGGCTCTGGGAGTGCTGCGAGAGAAAGGGTATGCCGGGTTTCGCATAGCCGACGTTCCCT
GGAGCTGCAGGCGTAAGCAGAGGAGCCCAATCTCATCACTTTCCGACCAAGCTGGAGCTTTTGC
TGGCTACCTTCGAATGGCTGTACGAGCAGATCACGGAAAGGAGTCGTGCTAGGCTGGCCAAGCT
GAAACCCGAGGATGATGTCATTCAGCAGATGCTGGACGATGCAGCCGAGTTCTTCTGGACGAC
GACTTCAGCATCAGTCTCGACCTCATCGTAGCCGCAGATCGCGATCCAGCTTTGCGCGAGGGCA
TACAGAGAACAGTCGAGCGGAATCGGTTTGTGGTGGAGGACATGTGGCTTGGTGTCTGGTGAG
CAGAGGCCTCTCACGGGATGATGCCGAGGACATCCTGTGGCTGATCTTTAACTCCGTCAGAGGG
TTGGCAGTGAGGTCCCTTTGGCAGAAGGACAAAGAACGGTTTGAACGTGTGCGAAACTCAACAC
TCGAGATTGCTAGGGAACGCTACGCCAAGTTCAAGAGATGA

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

MSPKRRTQAERAMETQGKLI AAALGVLREKGYAGFRIADVPGAAGVSRGAQSHHFPTKL
ELLLATFEWLYEQITERSRARLAKLKPEDDVIQQMLDDAAEFFLDDDFSISLDLIVAADRPAL
REGIQR TVERNR FVVEDMWLGVLVSRGLSRDDAEDILWLI FNSVRGLAVRS LWQKDKERFERVR
NSTLEIARERYAKFKR

SEQ ID NO: 18 (E6 HPV16, aa 41-65)

KQQLLRREVYDFAFRDL CIVYRDGN

SEQ ID NO: 19 (E7 HPV16, aa 43-77)

GQAE PDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR

SEQ ID NO: 20 (аминокислотные последовательности сконструированной последовательности HPV18-E6E7SH)

MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLDLLCHEQLSDSEEENDEIDG
 VNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQFLNNTLSFVCPWCASQHYS
 DSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRAR
 QERLQRRRETMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNPDLC TELNT
 SLQDIEITCVYCKTVLELTFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYG
 DTLEKLTNTGLYNLLI

SEQ ID NO: 21 (нуклеотидные последовательности сконструированной последовательности HPV18-E6E7SH)

ATGGCCAGATTTCGAGGACCCACCAGACGGCCCTACAAGCTGCCCGACCTGTGCACCGA
 GCTGAACACATCTCTGCAGGACATCGAGATCACATGCGTGTACTGCAAGACCGTGCTGGACCTG
 CTGTGCCACGAGCAGCTGTCCGACTCCGAGGAAGAAAACGACGAGATCGACGGCGTGAACCATC
 AGCATCTGCCCGCCAGACGGGCCGAGCCCCAGAGACACACCATGCTGTGCATGTGCTGCAAGTG
 CGAGGCCCGGATTGAGCTGGTGGTGGAAAGCAGCGCCGACGACCTGCGGGCCTTCCAGCAGCTC
 TTTCTGAATACCCTGAGCTTCGTGTGCCCTTGGTGCGCCAGCCAGCACTACAGCGACTCCGTGT
 ACGGCGATACCCTGGAAAAGCTGACCAATACCGGCCTGTATAACCTGCTGATCCGGTGCCTGCG
 GTGCCAGAAGCCCCTGAATCCCGCCGAGAACTGAGACACCTGAACGAGAAGCGGCGGTTCAC
 AATATCGCCGGCCACTACAGAGGCCAGTGCCACAGCTGCTGCAACCGGGCCAGACAGGAACGGC
 TGCAGCGGAGGCGGGAAACCATGCACGGACCCAAGGCCACCCTCCAGGACATTGTCCTGCACCT
 GGAACCCAGAACGAGATCCCCGTCGATCTGCTGTGTCATGAACAGCTCAGCGACAGCGAAGAG
 GAAAATGACGAAATTGACGGGGTCAACCCTGACCTCTGTACCGAACTCAATACCAGTCTCCAGG
 ATATCGAAATTACCTGTGTCTACTGTAAAACCGTCCTCGAGCTGACCGAGGTGTTTCGAGTTCGC
 CTCAAGGACCTGTTTGTGGTGTACAGAGACAGCATCCCCACGCCGCTGCCACAAGTGCATC
 GACTTCTACAGCCGGATCAGAGAGCTGCGGCCACTACTCCGATTCTGTGTATGGCGACACACTCG
 AGAAGCTCACAAACACAGGACTGTACAATCTGCTCATCTGATAA

SEQ ID NO: 22 (аминокислотные последовательности сконструированной последовательности HPV18-E2E6E7SH)

MQTPKETLSERLSALQDKIIDHYENDSKDIDSQIQYWQLIRWENAIFFAAREHGIQTLN
 HQVVPAYNISKSKANKAIELQMALQGLAQSAKYKTEDWTLQDTCEELWNTEPTHCFKKGQTVQV
 YFDGNKDNCMTYVAWDSVYYMTDAGTWDKTATCVSHRGLYYVKEGYNTFYIEFKSECEKYGNTG
 TWEVHFGNNVIDCNDSMCSTSDDTVSATQLVKQLQHTPSPYSSTVSVGTAKTYGQTSAAATRP
 GH
 CGLAEKQHC GPVNPLLGAATPTGNNKRRKLC SGNTTPIIHLKVDNRNSLMRLRYRLRKHS
 DHYRD
 ISSWHTWGAGNEKTGILTVTYHSETQRTKFLNTVAIPDSVQILVGYMTMMARFEDPTRRPYK

PDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTML
 CMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQHYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNL
 LIRCLRCQKPLNPAEKLRLHLEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRRARQERLQRRRETMHGPKATLQ
 DIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNPDLC TELNTSLQDIEITCVYCKTVLELT
 EVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYS DSVYGDITLEKLTNTGLYNLLI*

**SEQ ID NO: 23 (нуклеотидные последовательности
 сконструированной последовательности HPV18-E2E6E7SH)**

ATGCAGACCCCCAAAGAGACACTGAGCGAGCGGCTGAGCGCCCTGCAGGACAAGATCAT
 CGACCACTACGAGAACGACAGCAAGGACATCGACAGCCAGATCCAGTACTGGCAGCTGATCAGA
 TGGGAGAACGCCATCTTCTTCGCCGCCAGAGAGCACGGCATCCAGACCCTGAACCACCAGGTGG
 TGCCCGCCTACAACATCAGCAAGAGCAAGGCCACAAGGCTATCGAGCTGCAGATGGCCCTGCA
 GGGACTGGCCCAGAGCGCCTACAAGACCGAGGACTGGACCCTGCAGGATACCTGCGAGGAACTG
 TGGAACACCGAGCCCACCCACTGCTTCAAGAAAGGCGGCCAGACCCTGCAGGTGTACTTCGACG
 GCAACAAGGACAACCTGCATGACCTACGTGGCCTGGGACAGCGTGTACTACATGACCGACGCCGG
 CACCTGGGACAAGACCGCCACCTGTGTGTCCCACCGGGCCTGTACTACGTGAAAGAGGGCTAC
 AACACCTTCTACATCGAGTTCAAGAGCGAGTGCGAGAAGTACGGCAACACCGGCACATGGGAGG
 TGCACTTCGGCAACAACGTGATCGACTGCAACGACAGCATGTGCAGCACCAGCGACGACACCGT
 GTCCGCCACCCAGCTGGTGAACAGCTGCAGCACACCCCCAGCCCCCTACAGCAGCACCGTGTCT
 GTGGGCACCGCCAAGACCTACGGCCAGACCAGCGCCGCCACCAGACCTGGACACTGTGGCCTGG
 CCGAGAAGCAGCACTGCGGCCCTGTGAACCCTCTGCTGGGAGCCGCCACCCCCACCGGCAACAA
 CAAGCGGAGAAAGCTGTGCAGCGGCAACACCACCCCCATCATCCACCTGAAGGTGGACCGGAAC
 AGCCTGATGCGGCTGCGGTACAGACTGCGGAAGCACAGCGACCACTACCGGGACATCAGCAGCA
 CCTGGCACTGGACCGGCGCTGGCAACGAGAAAACCGGCATCCTGACCCTGACCTACCACAGCGA
 AACCCAGCGGACCAAGTTCTTGAACACCGTGGCCATCCCCGACAGCGTGCAGATCCTGGTGGGA
 TATATGACCATGATGGCCAGATTCGAGGACCCACCAGACGGCCCTACAAGCTGCCCCACCTGT
 GCACCGAGCTGAACACATCTCTGCAGGACATCGAGATCACATGCGTGTACTGCAAGACCGTGTCT
 GGACCTGCTGTGCCACGAGCAGCTGTCCGACTCCGAGGAAGAAAACGACGAGATCGACGGCGTG
 AACCATCAGCATCTGCCCCCAGACGGGCCGAGCCCCAGAGACACACCATGCTGTGCATGTGCT
 GCAAGTGCGAGGCCCGGATTGAGCTGGTGGTGGAAAGCAGCGCCGACGACCTGCGGGCCTTCCA
 GCAGCTCTTTCTGAATACCCTGAGCTTCGTGTGCCCTTGGTGCGCCAGCCAGCACTACAGCGAC
 TCCGTGTACGGCGATAACCCTGGAAAAGCTGACCAATACCGGCCTGTATAACCTGCTGATCCGGT
 GCCTGCGGTGCCAGAAGCCCCTGAATCCCCGCCGAGAACTGAGACACCTGAACGAGAAGCGGCG
 GTTCCACAATATCGCCGGCCACTACAGAGGCCAGTGCCACAGCTGCTGCAACCGGGCCAGACAG
 GAACGGCTGCAGCGGAGGCGGGAAACCATGCACGGACCCAAGGCCACCCTCCAGGACATTTGTCC
 TGCACCTGGAACCCCAGAACGAGATCCCCGTCGATCTGCTGTGTGCATGAACAGCTCAGCGACAG
 CGAAGAGGAAAATGACGAAATTGACGGGGTCAACCCTGACCTCTGTACCGAACTCAATACCAGT

CTCCAGGATATCGAAATTACCTGTGTCTACTGTAAAACCGTCCTCGAGCTGACCGAGGTGTTTCG
AGTTCGCCTTCAAGGACCTGTTTGTGGTGTACAGAGACAGCATCCCCACGCCGCCTGCCACAA
GTGCATCGACTTCTACAGCCGGATCAGAGAGCTGCGGCACTACTCCGATTCTGTGTATGGCGAC
ACACTCGAGAAGCTCACAAACACAGGACTGTACAATCTGCTCATCTGATAA

**SEQ ID NO: 24 (аминокислотная последовательность
'HPV18DC2')**

MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRH
TSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVY
GDTLEKLTNTGLYNLLIRCLQRFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVF
EFADSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNT
LSFVCPWCASQSDSVYGDTLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRHLNEKRRFHNIAGHY
RGQCHSCCNRARQERLQRRRETQ

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Janssen Vaccines & Prevention B.V.
 Bunnik, Evelien Margaretha
 Custers, Jerome Hubertina Henricus Victor
 Scheper, Gerrit Christiaan
 Oosterhuis, Koen
 Uil, Taco Gilles
 Khan, Selina

<120> Терапевтические вакцины против HPV18

<130> 0260 WO 00 ORD

<150> EP15181791

<151> 2015-08-20

<150> EP16156334

<151> 2016-02-18

<160> 24

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 328

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Оригинальный полипептид HPV16-E6E7SH

<400> 1

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
 20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile
 35 40 45

Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
 50 55 60

Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
 65 70 75 80

Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
 85 90 95

Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile
 115 120 125

Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp
130 135 140

Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys
145 150 155 160

Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His
165 170 175

Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
180 185 190

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu
195 200 205

Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
210 215 220

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln
225 230 235 240

Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln
245 250 255

Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile
260 265 270

Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
275 280 285

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
290 295 300

Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
305 310 315 320

Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys
325

<210> 2

<211> 990

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая оригинальный полипептид
HPV16-E6E7SH

<400> 2

atgcaccaga aacggaccgc catgttccag gacccccagg aacggcccag aaagctgccc 60
cagctgtgca ccgagctgca gaccaccatc cacgacatca tcttggaatg cgtgtactgc 120
aagcagcagc tggaagatga gatcgacggc cctgctggcc aggccgaacc cgacagagcc 180
cactacaata tcgtgacctt ctgctgcaag tgcgacagca ccctgctggct gtgctgtcag 240
agcaccacag tggacatccg gaccctggaa gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 300
tgccccatct gcagccagaa gcccggcacc accctggaac agcagtacaa caagcccctg 360
tgcgacctgc tgatccggtg catcaactgc cagaaacccc tgtgccccga ggaaaagcag 420
cggcacctgg acaagaagca gcggttccac aacatccggg gcagatggac aggcagatgc 480
atgagctgct gcagaagcag ccggaccaga cgggaaaccc agatgcacgg cgacaccccc 540
accctgcagc agtacatgct ggacctgcag cccgagacaa ccgacctgta ctgctacgag 600
cagctgaacg acagcagcga ggaagaggac gagattgacg gacccgctgg acaggccgag 660
cctgaccggg ctactataa catcgtgaca ttttgctgtc agctctgtac tgaactccag 720
acaacaattc acgatattat tctcgaatgt gtgtattgta aacagcagct cctgctggaga 780
gagggtgtacg acttcgcctt ccgggacctc tgcacgtgtg atcgggacgg caaccctac 840
gccgtgtgcg acaagtgcct gaagttctac agcaagatca gcgagtaccg gcaactactgc 900
tacagcctgt acggaacaac actcgaacag cagtataaca aaccactctg tgatctgctg 960
attcgtgta tcaattgtca gaagtataa 990

<210> 3
<211> 693
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Оригинальный полипептид E2E6E7SH HPV16

<400> 3

Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu
1 5 10 15

Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr
20 25 30

Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu
35 40 45

Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val
50 55 60

Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu
65 70 75 80

Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp
 85 90 95

Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys
 100 105 110

His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr
 115 120 125

Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser
 130 135 140

Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val
 145 150 155 160

His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu
 165 170 175

Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val
 180 185 190

Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro
 195 200 205

Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr
 210 215 220

Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
 225 230 235 240

Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
 245 250 255

Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
 260 265 270

Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
 275 280 285

Val His Leu Lys Val Asp Ala Asn Thr Leu Met Arg Leu Arg Tyr Arg
 290 295 300

Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
 305 310 315 320

Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
 325 330 335

Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
 340 345 350

Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile Met His Gln
 355 360 365

Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu
 370 375 380

Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu
 385 390 395 400

Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro
 405 410 415

Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 420 425 430

Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His
 435 440 445

Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile
 450 455 460

Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln
 465 470 475 480

Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln
 485 490 495

Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln
 500 505 510

Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys
 515 520 525

Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His Gly Asp Thr
 530 535 540

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp
 545 550 555 560

Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu
 565 570 575

Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
 580 585 590

Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile
595 600 605

His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg
610 615 620

Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg
625 630 635 640

Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser
645 650 655

Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr
660 665 670

Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys
675 680 685

Ile Asn Cys Gln Lys
690

<210> 4
<211> 2085
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая оригинальный полипептид
E2E6E7SH HPV16

<400> 4
atggaacc tgtgccagcg gctgaacgtg tgccaggaca agatcctgac ccactacgag 60
aacgacagca ccgacctgcg ggaccacatc gactactgga agcacatgcg gctggaatgc 120
gccatctact acaaggccag agagatgggc ttcaagcaca tcaaccacca ggtggtgccc 180
accctggccg tgtccaagaa caaggccctg caggccatcg agctgcagct gaccctggaa 240
accatctaca acagccagta cagcaacgag aagtggacct tgcaggacgt gtccttgaa 300
gtgtacctga ccgctccac cggctgcatc aagaacacg gctacaccgt ggaagtgcag 360
ttcgacggcg acatctgcaa caccatgcac tacaccaact ggaccacat ctacatctgc 420
gaagaggcca gcgtgaccgt ggtggaaggc cagggtgact actacggcct gtactacgtg 480
cacgagggca tccggaccta cttcgtgcag ttcaaggacg acgccgagaa gtacagcaag 540
aacaagtgt gggaggtgca cgctggcggc caggatcatc tgtgccccac cagcgtgttc 600
agcagcaacg aggtgtccag ccccagatc atccggcagc acctggccea tcacctgcc 660
gccaccaca caaaggccgt ggccctgggc accgaggaaa cccagaccac catccagcgg 720
cccagaagcg agcccacac cggcaatccc tgccacacca ccaagctgct gcaccgggac 780

agcgtggaca gcgcccctat cctgaccgcc ttcaacagca gccacaaggg cgggatcaac 840
 tgcaacagca acaccacccc catcgtgcac ctgaaggtgg acgccaacac cctgatgcgg 900
 ctgcggtaca gattcaagaa gcaactgcacc ctgtacaccg ccgtgtcctc cacctggcac 960
 tggaccggcc acaacgtgaa gcacaagagc gccatcgtga ccctgaccta cgacagcgag 1020
 tggcagcggg accagttcct gagccaggtc aaaatcccca agaccatcac cgtgtccacc 1080
 ggcttcatga gcatcatgca ccagaaacgg accgccatgt tccaggaccc ccaggaacgg 1140
 cccagaaagc tgccccagct gtgcaccgag ctgcagacca ccatccacga catcatcctg 1200
 gaatgcgtgt actgcaagca gcagctggaa gatgagatcg acggccctgc tggccaggcc 1260
 gaacccgaca gagcccacta caatatcgtg accttctgct gcaagtgcga cagcacccctg 1320
 cggctgtgcg tgcagagcac ccacgtggac atccggaccc tggaagatct gctgatgggc 1380
 accctgggca tcgtgtgccc catctgcagc cagaagcccg gcaccaccct ggaacagcag 1440
 tacaacaagc ccctgtgcga cctgctgatc cgggtgatca actgccagaa acccctgtgc 1500
 cccgaggaaa agcagcggca cctggacaag aagcagcggg tccacaacat ccggggcaga 1560
 tggacaggca gatgcatgag ctgctgcaga agcagccgga ccagacggga aaccagatg 1620
 cacggcgaca cccccacct gcacgagtac atgctggacc tgcagcccga gacaaccgac 1680
 ctgtactgct acgagcagct gaacgacagc agcgaggaag aggacgagat tgacggaccc 1740
 gctggacagg ccgagcctga ccgggctcac tataacatcg tgacattttg ctgtcagctc 1800
 tgtactgaac tccagacaac aattcacgat attattctcg aatgtgtgta ttgtaaacag 1860
 cagctcctgc ggagagaggt gtacgacttc gccttccggg acctctgcat cgtgtatcgg 1920
 gacggcaacc cctacgccgt gtgcgacaag tgctgaagt tctacagcaa gatcagcgag 1980
 taccggcact actgctacag cctgtacgga acaacactcg aacagcagta taacaaacca 2040
 ctctgtgatc tgctgattcg ctgtatcaat tgtcagaagt gataa 2085

<210> 5
 <211> 693
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Оригинальный полипептид E6E7E2SH HPV16

 <400> 5

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
 20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile
 35 40 45

Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
 50 55 60

Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
 65 70 75 80

Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
 85 90 95

Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile
 115 120 125

Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp
 130 135 140

Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys
 145 150 155 160

Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His
 165 170 175

Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 180 185 190

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu
 195 200 205

Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
 210 215 220

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln
 225 230 235 240

Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln
 245 250 255

Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile
 260 265 270

Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
 275 280 285

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
 290 295 300

Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
 305 310 315 320

Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu
 325 330 335

Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr
 340 345 350

Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys
 355 360 365

Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu Met Gly Phe Lys His Ile Asn His
 370 375 380

Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala
 385 390 395 400

Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser
 405 410 415

Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr
 420 425 430

Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln
 435 440 445

Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His
 450 455 460

Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val
 465 470 475 480

Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe
 485 490 495

Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp
 500 505 510

Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe
 515 520 525

Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala
 530 535 540

Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu
545 550 555 560

Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly
565 570 575

Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser
580 585 590

Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn
595 600 605

Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Val Asp Ala Asn
610 615 620

Thr Leu Met Arg Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr
625 630 635 640

Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His
645 650 655

Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp
660 665 670

Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr
675 680 685

Gly Phe Met Ser Ile
690

<210> 6

<211> 2085

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая оригинальный полипептид
E6E7E2SH HPV16

<400> 6

atgcaccaga aacggaccgc catgttccag gacccccagg aacggcccag aaagctgccc 60

cagctgtgca ccgagctgca gaccaccatc cacgacatca tcctggaatg cgtgtactgc 120

aagcagcagc tggaagatga gatcgacggc cctgctggcc aggccgaacc cgacagagcc 180

cactacaata tcgtgacctt ctgctgcaag tgcgacagca ccctgctggct gtgcgtgacg 240

agcaccacg tggacatccg gaccctggaa gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 300

tgccccatct gcagccagaa gcccggcacc accctggaac agcagtacaa caagcccctg 360

tgcgacctgc tgatccggtg catcaactgc cagaaacccc tgtgccccga ggaaaagcag 420

cggcacctgg acaagaagca gcggttccac aacatccggg gcagatggac aggcagatgc 480
atgagctgct gcagaagcag ccggaccaga cgggaaaccc agatgcacgg cgacaccccc 540
accctgcacg agtacatgct ggacctgcag cccgagacaa ccgacctgta ctgctacgag 600
cagctgaacg acagcagcga ggaagaggac gagattgacg gacccgctgg acaggccgag 660
cctgaccggg ctactataa catcgtgaca ttttgctgtc agctctgtac tgaactccag 720
acaacaattc acgatattat tctcgaatgt gtgtattgta aacagcagct cctgcccgaga 780
gaggtgtacg acttcgcctt cccggacctc tgcacgtgt atcgggacgg caaccctac 840
gccgtgtgcg acaagtgcct gaagttctac agcaagatca gcgagtaccg gcactactgc 900
tacagcctgt acggaacaac actcgaacag cagtataaca aaccactctg tgatctgctg 960
attcgtgta tcaattgtca gaagatggaa accctgtgcc agcggctgaa cgtgtgccag 1020
gacaagatcc tgaccacta cgagaacgac agcaccgacc tgcgggacca catcgactac 1080
tggaagcaca tgcggctgga atgcgccatc tactacaagg ccagagagat gggcttcaag 1140
cacatcaacc accaggtggt gccaccctg gccgtgtcca agaacaaggc cctgcaggcc 1200
atcgagctgc agctgaccct ggaaaccatc tacaacagcc agtacagcaa cgagaagtgg 1260
accctgcagg acgtgtccct ggaagtgtac ctgaccgctc ccaccggctg catcaagaaa 1320
cacggctaca ccgtggaagt gcagttcgac ggcgacatct gcaacacat gcactacacc 1380
aactggacc acatctacat ctgcgaagag gccagcgtga ccgtggtgga aggccaggtg 1440
gactactacg gcctgtacta cgtgcacgag ggcacccgga cctacttcgt gcagttcaag 1500
gacgacgccg agaagtacag caagaacaaa gtgtgggagg tgcacgctgg cggccaggtc 1560
atcctgtgcc ccaccagcgt gttcagcagc aacgaggtgt ccagccccga gatcatccgg 1620
cagcacctgg ccaatcacc tgccgccacc cacacaaagg ccgtggccct gggcaccgag 1680
gaaaccaga ccaccatcca gcggcccaga agcgagcccg acaccggcaa tccttgccac 1740
accaccaagc tgctgcaccg ggacagcgtg gacagcgcce ctactctgac cgccttcaac 1800
agcagccaca agggccggat caactgcaac agcaacacca ccccatcgt gcacctgaag 1860
gtggacgcca acaccctgat gcggctgcgg tacagattca agaagcactg caccctgtac 1920
accgccgtgt cctccacctg gcactggacc ggccacaacg tgaagcaca gagcgcctc 1980
gtgacctga cctacgacag cgagtggcag cgggaccagt tcctgagcca ggtcaaaatc 2040
cccaagacca tcaccgtgtc caccggcttc atgagcatct gataa 2085

<210> 7

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Лидерный пептид IgE

<400> 7

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

His Ser

<210> 8

<211> 54

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид IgE

<400> 8

atggactgga cctggatcct gttcctggtg gctgccgcaa cccgggtgca cagc 54

<210> 9

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Лидерный пептид HAVT20

<400> 9

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala
20

<210> 10

<211> 63

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид HAVT20

<400> 10

atggcctgcc ccggctttct gtgggcctg gtcacagca cctgtctgga attcagcatg 60

gcc 63

<210> 11

<211> 54

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 2xTetO-содержащая последовательность

<400> 11

gagctctccc tatcagtgat agagatctcc ctatcagtga tagagatcgt cgac 54

<210> 12
<211> 28
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2xCuO-содержащая последовательность

<400> 12
aacaacaga caatctgggc tgtttgta 28

<210> 13
<211> 829
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Промотор CMV

<400> 13
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aacattaccg ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac ccccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttccctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660
cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcctggag acgcatcca cgctgttttg acctccatag 780
aagacaccgg gaccgatcca gcctccgcgg ccgggaacgg tgcattgga 829

<210> 14
<211> 657
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид TetR

<400> 14
atgtctagat tagataaaag taaagtgatt aacagcgcac tagagctgct taatgaggtc 60

ggaatcgaag gtttaacaac ccgtaaactc gcccagaagc taggtgtaga gcagcctaca 120
 ttgtattggc atgtaaaaaa taagcgggct ttgctcgacg ccttagccat tgagatgtta 180
 gataggcacc atactcactt ttgcccttta gaaggggaaa gctggcaaga ttttttacgt 240
 aataacgcta aaagtttttag atgtgcttta ctaagtcatc gcgatggagc aaaagtacat 300
 ttaggtacac ggcctacaga aaaacagtat gaaactctcg aaaatcaatt agccttttta 360
 tgccaacaag gtttttctact agagaatgca ttatatgcac tcagcgctgt ggggcatttt 420
 actttagggt gcgtattgga agatcaagag catcaagtcg ctaaagaaga aagggaaaca 480
 cctactactg atagtatgcc gccattatta cgacaagcta tcgaattatt tgatcaccaa 540
 ggtgcagagc cagccttctt attcggcctt gaattgatca tatgcggatt agaaaaacaa 600
 cttaaattgt aaagtgggtc cgcgtacagc ggatcccggg aattcagatc ttattaa 657

<210> 15
 <211> 218
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полипептид TetR

<400> 15

Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln
 20 25 30

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

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His
 50 55 60

Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg
 65 70 75 80

Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly
 85 90 95

Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr
 100 105 110

Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu
 115 120 125

Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys

130

135

140

Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr
145 150 155 160

Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu
165 170 175

Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu
180 185 190

Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser Ala
195 200 205

Tyr Ser Gly Ser Arg Glu Phe Arg Ser Tyr
210 215

<210> 16
<211> 612
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид СумR

<400> 16
atgtctccca aacgacggac tcaagcggaa agggcaatgg aaactcaggg taagctgatt 60
gccgcggctc tgggagtgct gcgagagaaa gggatgccg ggtttcgcac agccgacggt 120
cctggagctg caggcgtaag cagaggagcc caatctcacc actttccgac caagctggag 180
cttttgctgg ctaccttcga atggctgtac gagcagatca cggaaaggag tcgtgctagg 240
ctggccaagc tgaaacccga ggatgatgtc attcagcaga tgctggacga tgcagccgag 300
ttcttctcgg acgacgactt cagcatcagt ctcgacctca tcgtagccgc agatcgcgat 360
ccagctttgc gcgagggcat acagagaaca gtcgagcggg atcggtttgt ggtggaggac 420
atgtggcttg gtgttctggt gagcagaggg ctctcacggg atgatgccga ggacatcctg 480
tggctgatct ttaactccgt cagaggggtt gcagtgaggt ccctttggca gaaggacaaa 540
gaacggtttg aacgtgtgcg aaactcaaca ctcgagattg ctagggaacg ctacgccaaag 600
ttcaagagat ga 612

<210> 17
<211> 203
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полипептид СумR

<400> 17

Met Ser Pro Lys Arg Arg Thr Gln Ala Glu Arg Ala Met Glu Thr Gln
1 5 10 15

Gly Lys Leu Ile Ala Ala Ala Leu Gly Val Leu Arg Glu Lys Gly Tyr
20 25 30

Ala Gly Phe Arg Ile Ala Asp Val Pro Gly Ala Ala Gly Val Ser Arg
35 40 45

Gly Ala Gln Ser His His Phe Pro Thr Lys Leu Glu Leu Leu Leu Ala
50 55 60

Thr Phe Glu Trp Leu Tyr Glu Gln Ile Thr Glu Arg Ser Arg Ala Arg
65 70 75 80

Leu Ala Lys Leu Lys Pro Glu Asp Asp Val Ile Gln Gln Met Leu Asp
85 90 95

Asp Ala Ala Glu Phe Phe Leu Asp Asp Asp Phe Ser Ile Ser Leu Asp
100 105 110

Leu Ile Val Ala Ala Asp Arg Asp Pro Ala Leu Arg Glu Gly Ile Gln
115 120 125

Arg Thr Val Glu Arg Asn Arg Phe Val Val Glu Asp Met Trp Leu Gly
130 135 140

Val Leu Val Ser Arg Gly Leu Ser Arg Asp Asp Ala Glu Asp Ile Leu
145 150 155 160

Trp Leu Ile Phe Asn Ser Val Arg Gly Leu Ala Val Arg Ser Leu Trp
165 170 175

Gln Lys Asp Lys Glu Arg Phe Glu Arg Val Arg Asn Ser Thr Leu Glu
180 185 190

Ile Ala Arg Glu Arg Tyr Ala Lys Phe Lys Arg
195 200

<210> 18

<211> 25

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> E6, HPV16, а. к. 41-65

<400> 18

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp

1 5 10 15

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
20 25

<210> 19
<211> 35
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> HPV16 E7 aa43-77

<400> 19

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
1 5 10 15

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
20 25 30

Asp Ile Arg
35

<210> 20
<211> 331
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Оригинальный полипептид HPV18-E6E7SH

<400> 20

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
35 40 45

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
50 55 60

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
65 70 75 80

Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
85 90 95

Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe

<220>

<223> Последовательность nt сконструированной последовательности HPV18-E6E7SH

<400> 21

atggccagat tcgaggaccc caccagacgg ccctacaagc tgcccgacct gtgcaccgag 60
ctgaacacat ctctgcagga catcgagatc acatgcgtgt actgcaagac cgtgctggac 120
ctgctgtgcc acgagcagct gtccgactcc gaggaagaaa acgacgagat cgacggcgtg 180
aaccatcagc atctgcccgc cagacggggc gagccccaga gacacacat gctgtgcatg 240
tgctgcaagt gcgaggcccc gattgagctg gtgggtggaaa gcagcgccga cgacctgagg 300
gccttcagc agctctttct gaatacctg agcttcgtgt gcccttggtg cgccagccag 360
cactacagcg actccgtgta cggcgatacc ctggaaaagc tgaccaatac cggcctgtat 420
aacctgctga tccgggtgctt gcggtgccag aagcccctga atcccgccga gaaactgaga 480
cacctgaacg agaagcggcg gttccacaat atcgccggcc actacagagg ccagtgccac 540
agctgctgca accggggccag acaggaacgg ctgcagcggg ggcgggaaac catgcacgga 600
ccaaggcca ccctccagga cattgtcctg cacctggaac ccagaaacga gatccccgtc 660
gatctgctgt gtcataaaca gctcagcagc agcgaagagg aaaatgacga aattgacggg 720
gtcaaccctg acctctgtac cgaactcaat accagtctcc aggatatcga aattacctgt 780
gtctactgta aaaccgtcct cgagctgacc gaggtgttcg agttcgcctt caaggacctg 840
tttgtggtgt acagagacag catccccac gccgcctgcc acaagtgcac cgacttctac 900
agccgatca gagagctgcg gcactactcc gattctgtgt atggcgacac actcgagaag 960
ctcacaaca caggactgta caatctgctc atctgataa 999

<210> 22

<211> 696

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Сконструированная последовательность HPV18-E2E6E7SH

<400> 22

Met Gln Thr Pro Lys Glu Thr Leu Ser Glu Arg Leu Ser Ala Leu Gln
1 5 10 15

Asp Lys Ile Ile Asp His Tyr Glu Asn Asp Ser Lys Asp Ile Asp Ser
20 25 30

Gln Ile Gln Tyr Trp Gln Leu Ile Arg Trp Glu Asn Ala Ile Phe Phe
35 40 45

Ala Ala Arg Glu His Gly Ile Gln Thr Leu Asn His Gln Val Val Pro
50 55 60

Ala Tyr Asn Ile Ser Lys Ser Lys Ala His Lys Ala Ile Glu Leu Gln
65 70 75 80

Met Ala Leu Gln Gly Leu Ala Gln Ser Ala Tyr Lys Thr Glu Asp Trp
85 90 95

Thr Leu Gln Asp Thr Cys Glu Glu Leu Trp Asn Thr Glu Pro Thr His
100 105 110

Cys Phe Lys Lys Gly Gly Gln Thr Val Gln Val Tyr Phe Asp Gly Asn
115 120 125

Lys Asp Asn Cys Met Thr Tyr Val Ala Trp Asp Ser Val Tyr Tyr Met
130 135 140

Thr Asp Ala Gly Thr Trp Asp Lys Thr Ala Thr Cys Val Ser His Arg
145 150 155 160

Gly Leu Tyr Tyr Val Lys Glu Gly Tyr Asn Thr Phe Tyr Ile Glu Phe
165 170 175

Lys Ser Glu Cys Glu Lys Tyr Gly Asn Thr Gly Thr Trp Glu Val His
180 185 190

Phe Gly Asn Asn Val Ile Asp Cys Asn Asp Ser Met Cys Ser Thr Ser
195 200 205

Asp Asp Thr Val Ser Ala Thr Gln Leu Val Lys Gln Leu Gln His Thr
210 215 220

Pro Ser Pro Tyr Ser Ser Thr Val Ser Val Gly Thr Ala Lys Thr Tyr
225 230 235 240

Gly Gln Thr Ser Ala Ala Thr Arg Pro Gly His Cys Gly Leu Ala Glu
245 250 255

Lys Gln His Cys Gly Pro Val Asn Pro Leu Leu Gly Ala Ala Thr Pro
260 265 270

Thr Gly Asn Asn Lys Arg Arg Lys Leu Cys Ser Gly Asn Thr Thr Pro
275 280 285

Ile Ile His Leu Lys Val Asp Arg Asn Ser Leu Met Arg Leu Arg Tyr
290 295 300

Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg Asp Ile Ser Ser Thr Trp
305 310 315 320

His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr Val Thr
 325 330 335

Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe Leu Asn Thr Val Ala Ile
 340 345 350

Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr Met Thr Met Met Ala Arg
 355 360 365

Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr
 370 375 380

Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys
 385 390 395 400

Lys Thr Val Leu Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu
 405 410 415

Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala
 420 425 430

Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys
 435 440 445

Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu
 450 455 460

Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro
 465 470 475 480

Trp Cys Ala Ser Gln His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu
 485 490 495

Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu
 500 505 510

Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn
 515 520 525

Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys
 530 535 540

His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg
 545 550 555 560

Glu Thr Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His
 565 570 575

Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln
580 585 590

Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn Pro
595 600 605

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

Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe
625 630 635 640

Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala
645 650 655

Ala Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg
660 665 670

His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn
675 680 685

Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile
690 695

<210> 23

<211> 2094

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность nt сконструированной последовательности HPV18-E2E6E7SH

<400> 23

atgcagacc ccaaagagac actgagcgag cggctgagcg ccctgcagga caagatcatc 60

gaccactacg agaacgacag caaggacatc gacagccaga tccagtactg gcagctgate 120

agatgggaga acgccatctt cttcgccgcc agagagcagc gcatccagac cctgaaccac 180

caggtggtgc cgcctataa catcagcaag agcaaggccc acaaggctat cgagctgcag 240

atggccctgc agggactggc ccagagcgcc tacaagaccg aggactggac cctgcaggat 300

acctgcgagg aactgtggaa caccgagccc acccactgct tcaagaaagg cggccagacc 360

gtgcaggtgt acttcgacgg caacaaggac aactgcatga cctacgtggc ctgggacagc 420

gtgtactaca tgaccgacgc cggcacctgg gacaagaccg ccacctgtgt gtcccaccgg 480

ggcctgtact acgtgaaaga gggctacaac accttctaca tcgagttcaa gagcgagtgc 540

gagaagtacg gcaacaccgg cacatgggag gtgcacttcg gcaacaacgt gatcgactgc 600

aacgacagca tgtgcagcac cagcgacgac accgtgtccg ccaccagct ggtgaaacag 660

ctgcagcaca cccccagccc ctacagcagc accgtgtctg tgggcaccgc caagacctac 720
ggccagacca gcgcccggcc cagacctgga cactgtggcc tggccgagaa gcagcactgc 780
ggcctgtga accctctgct gggagccgcc acccccaccg gcaacaacaa gcggagaaag 840
ctgtgcagcg gcaacaccac ccccatcatc cacctgaagg tggaccggaa cagcctgatg 900
cggctgcggt acagactgcg gaagcacagc gaccactacc gggacatcag cagcacctgg 960
cactggaccg gcgctggcaa cgagaaaacc ggcacacctga ccgtgacctc ccacagcgaa 1020
accagcgga ccaagttcct gaacaccgtg gccatccccg acagcgtgca gatcctgggtg 1080
ggatatatga ccatgatggc cagattcgag gacccacca gacggcccta caagctgccc 1140
gacctgtgca ccgagctgaa cacatctctg caggacatcg agatcacatg cgtgtactgc 1200
aagaccgtgc tggacctgct gtgccacgag cagctgtccg actccgagga agaaaacgac 1260
gagatcgacg gcgtgaacca tcagcatctg cccgccagac gggccgagcc ccagagacac 1320
accatgctgt gcatgtgctg caagtgcgag gcccgattg agctggtggt ggaaagcagc 1380
gccgacgacc tgcgggcctt ccagcagctc tttctgaata ccctgagctt cgtgtgcctt 1440
tgggtgcgcca gccagacta cagcgactcc gtgtacggcg ataccctgga aaagctgacc 1500
aataccggcc tgtataacct gctgatccgg tgcttgcggt gccagaagcc cctgaatccc 1560
gccgagaaac tgagacacct gaacgagaag cggcggttcc acaatatcgc cggccactac 1620
agaggccagt gccacagctg ctgcaaccgg gccagacagg aacggctgca gcggagggcg 1680
gaaacctatg acggaccaa ggccaccctc caggacattg tcctgcacct ggaaccccag 1740
aacgagatcc ccgtcgatct gctgtgtcat gaacagctca gcgacagcga agaggaaaat 1800
gacgaaattg acgggggtcaa ccctgacctc tgtaccgaac tcaataccag tctccaggat 1860
atcgaaatta cctgtgtcta ctgtaaaacc gtcctcgagc tgaccgaggt gttcgagttc 1920
gccttcaagg acctgtttgt ggtgtacaga gacagcatcc cccacgccgc ctgccacaag 1980
tgcatcgact tctacagccg gatcagagag ctgcggcact actccgatte tgtgtatggc 2040
gacacactcg agaagctcac aaacacagga ctgtacaatc tgctcatctg ataa 2094

<210> 24
<211> 338
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотная последовательность HPV18DS2

<400> 24

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser

20

25

30

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Ser Leu Gln Asp
50 55 60

Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu
65 70 75 80

Val Phe Glu Phe Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser
85 90 95

Ile Pro His Ala Ala Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile
100 105 110

Arg Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu
115 120 125

Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Gln
130 135 140

Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys
145 150 155 160

Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr
165 170 175

Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala Asp Ser
180 185 190

Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro
195 200 205

Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys
210 215 220

Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp
225 230 235 240

Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys
245 250 255

Pro Trp Cys Ala Ser Gln Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu
260 265 270

Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg

275

280

285

Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu
290 295 300

Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His
305 310 315 320

Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu
325 330 335

Thr Gln

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где первый полипептид дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп белка E2 вируса папилломы человека (HPV).

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 2, где первый полипептид содержит белок E2 HPV18, который характеризуется делецией или мутацией в его ДНК-связывающем домене и/или мутацией в его трансактивирующем домене.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 3, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая SEQ ID NO: 21.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая SEQ ID NO: 23.

7. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где последовательность, кодирующая первый полипептид, функционально связана с промотором.

8. Вектор по п. 7, где вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус.

9. Вектор по п. 7 или п. 8, где промотор функционально соединен с репрессорной операторной последовательностью, с которой репрессорный белок может связываться для подавления экспрессии промотора в присутствии указанного репрессорного белка.

10. Вектор по любому из пп. 7-9, который дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, функционально связанный с промотором, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1.

11. Вектор по п. 10, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

12. Вектор по п. 11, где первый полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и второй полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

13. Композиция вакцины, содержащая вектор по любому из пп. 7-12 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

14. Композиция вакцины, содержащая:

(a) первый вектор по любому из пп. 7-9;

(b) второй вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, функционально связанный с промотором, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1; и

(c) фармацевтически приемлемый наполнитель.

15. Композиция вакцины по п. 14, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

16. Композиция вакцины по п. 15, где первый полипептид, кодируемый первым вектором, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и второй полипептид, кодируемый вторым вектором, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

17. Способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции вакцины по любому из пп. 13-16.

18. Способ индуцирования иммунного ответа в отношении HPV у субъекта, предусматривающий введение субъекту:

(a) первой композиции вакцины, содержащей вектор по любому из пп. 7-9 и фармацевтически приемлемый наполнитель; и

(b) второй композиции вакцины, содержащей вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, функционально связанный с промотором, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1.

19. Способ по п. 18, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

20. Способ по п. 19, где первый полипептид, кодируемый в первой композиции вакцины, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и второй полипептид, кодируемый во второй композиции вакцины, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

21. Способ по любому из пп. 17-20, предусматривающий

(i) введение композиции вакцины по любому из пп. 13-16 субъекту более одного раза или

(ii) введение первой и второй композиций вакцины по любому из пп. 17-20 субъекту более одного раза.

22. Способ лечения хронической инфекции, вызванной HPV, интраэпителиальной неоплазии вульвы (VIN), интраэпителиальной цервикальной неоплазии (CIN), интраэпителиальной неоплазии влагалища (VaIN), анальной интраэпителиальной неоплазии (AIN), рака шейки матки (такого как плоскоклеточная карцинома шейки матки (SCC)), рака ротоглотки, рака полового члена, рака влагалища или рака анального канала у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту композиции вакцины по любому из пп. 13-16.

23. Набор из частей, содержащий:

(a) первую композицию вакцины, содержащую вектор по любому из пп. 7-9 и фармацевтически приемлемый наполнитель; и

(b) вторую композицию вакцины, содержащую вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, функционально связанный с промотором, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1.

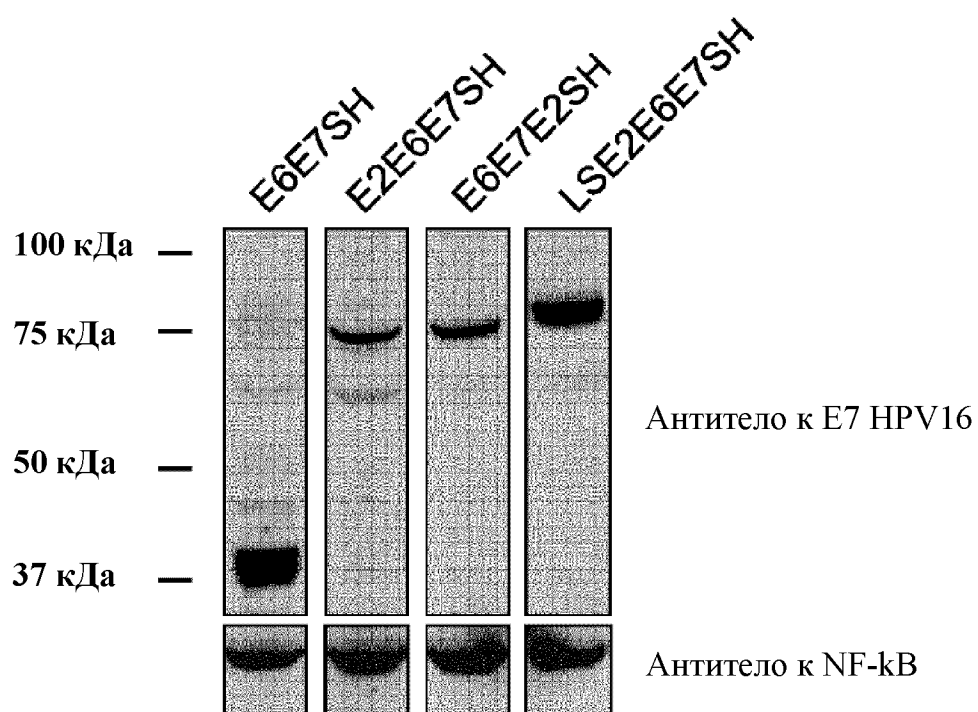
24. Набор из частей по п. 23, где второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

25. Набор из частей по п. 24, где первый полипептид, кодируемый в первой композиции вакцины, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и второй полипептид, кодируемый во второй композиции вакцины, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

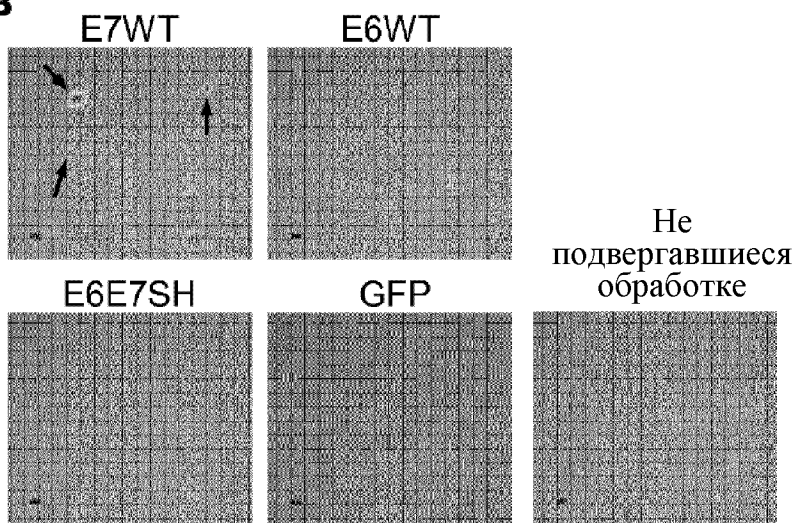
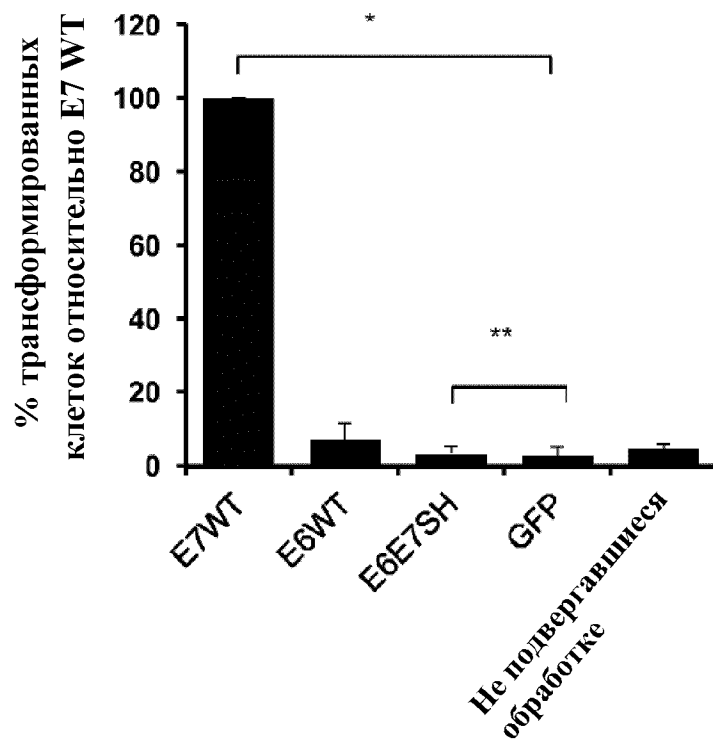
26. Полипептид, содержащий SEQ ID NO: 20.

27. Полипептид по п. 26, содержащий SEQ ID NO: 22.

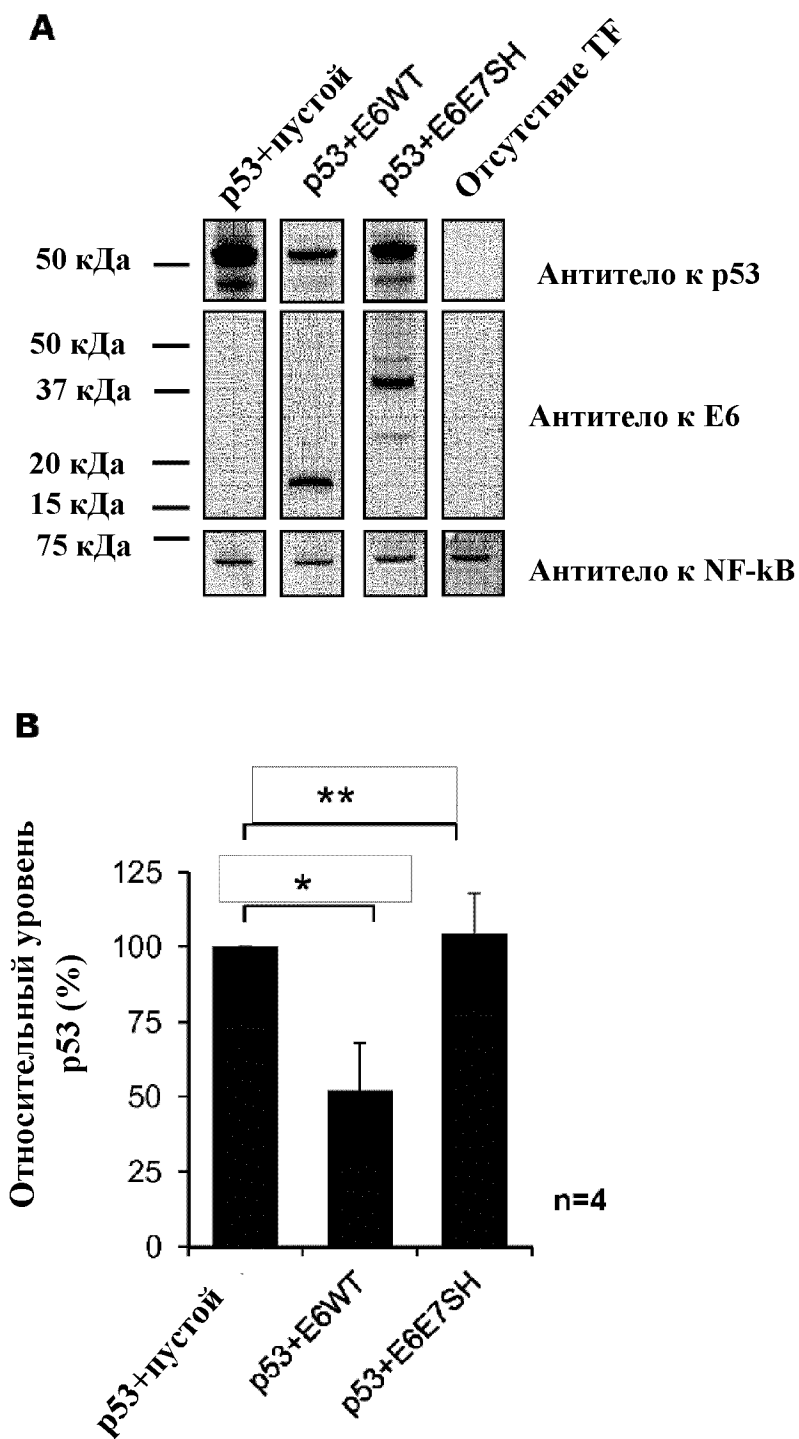
По доверенности



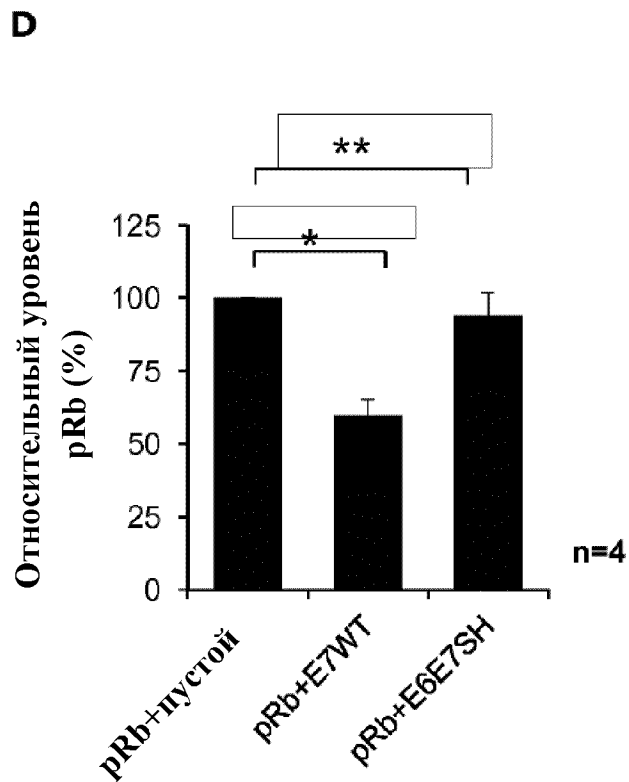
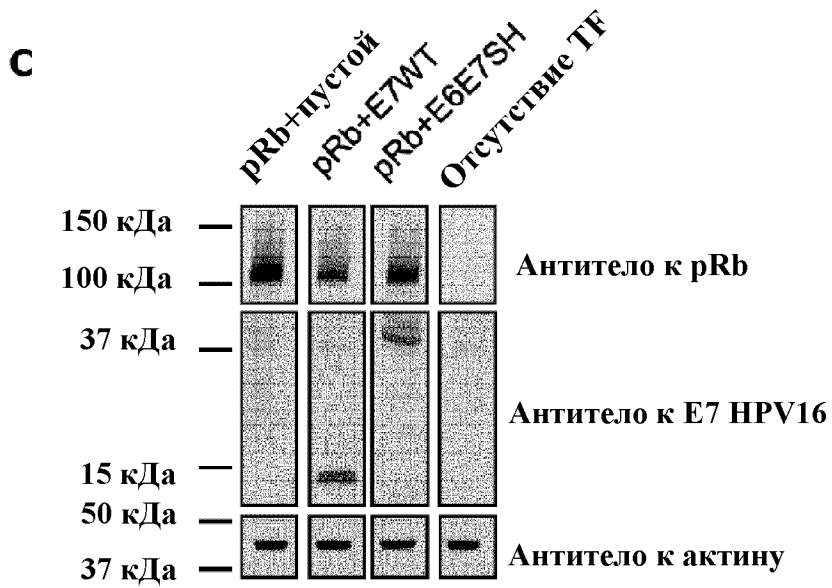
Фиг. 1

A**B****C**

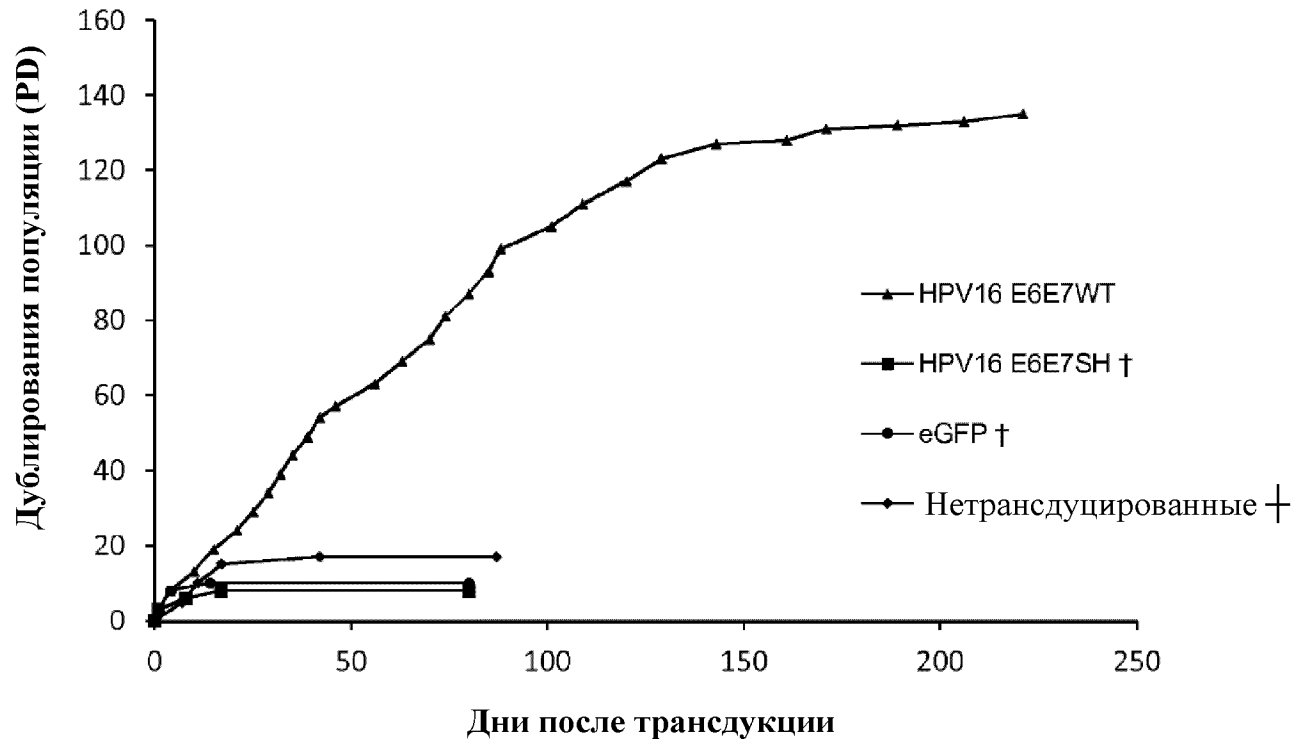
Фиг. 2



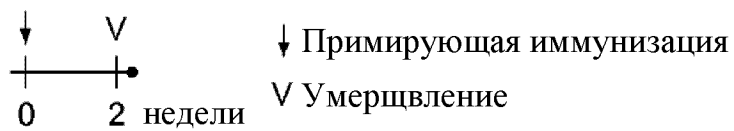
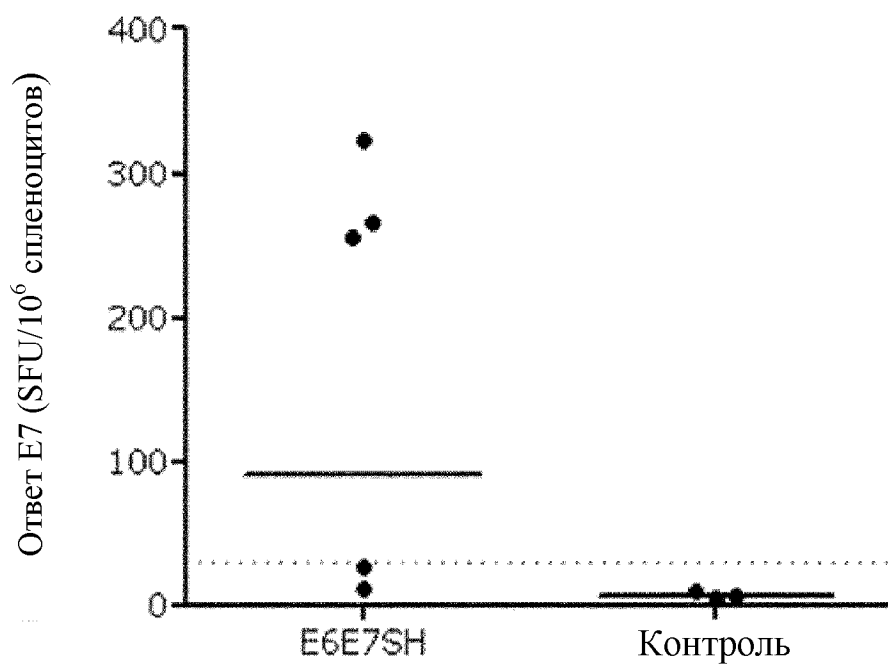
Фиг. 3

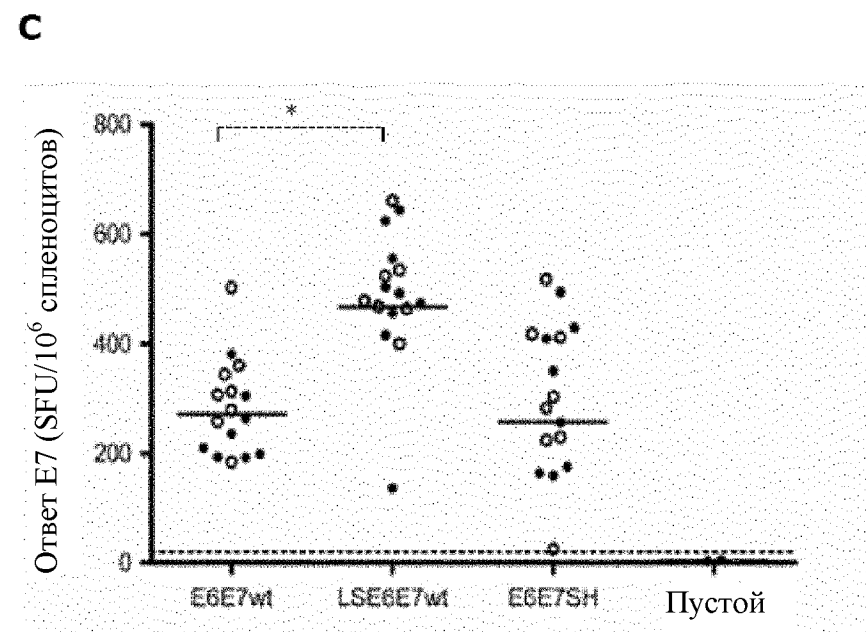
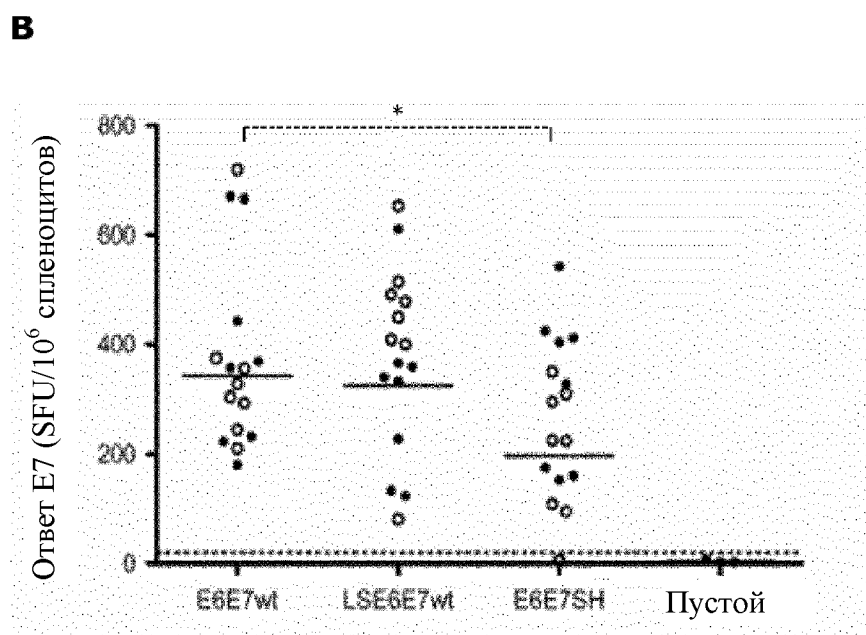


Фиг. 3 – продолжение

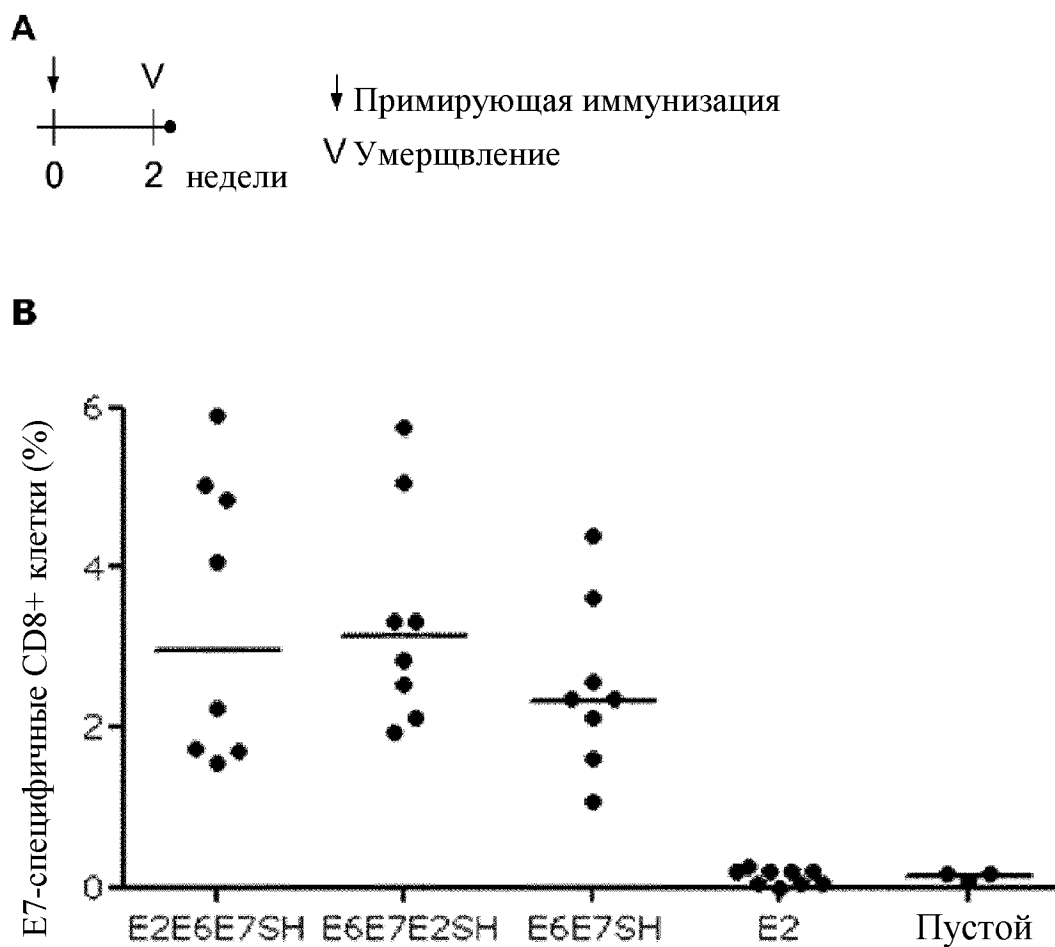


Фиг. 4

A**B****Фиг. 5**

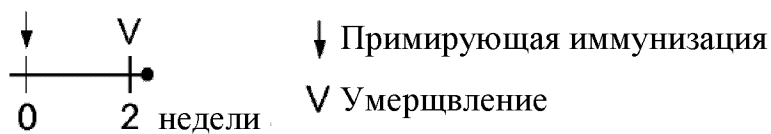


Фиг. 6

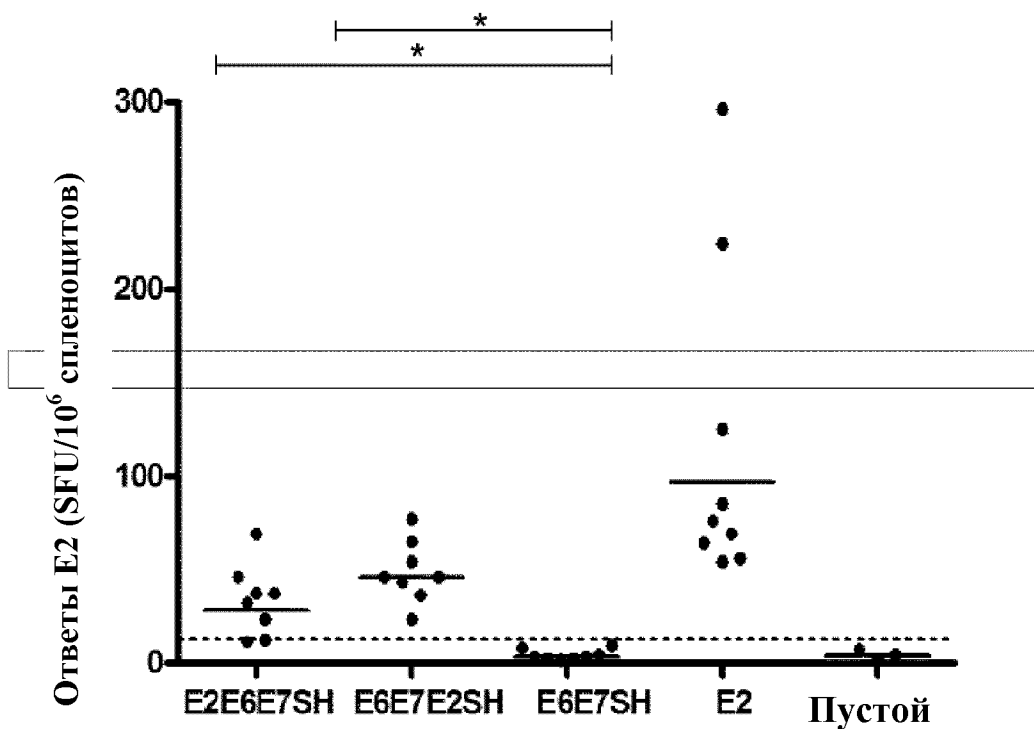


Фиг. 7

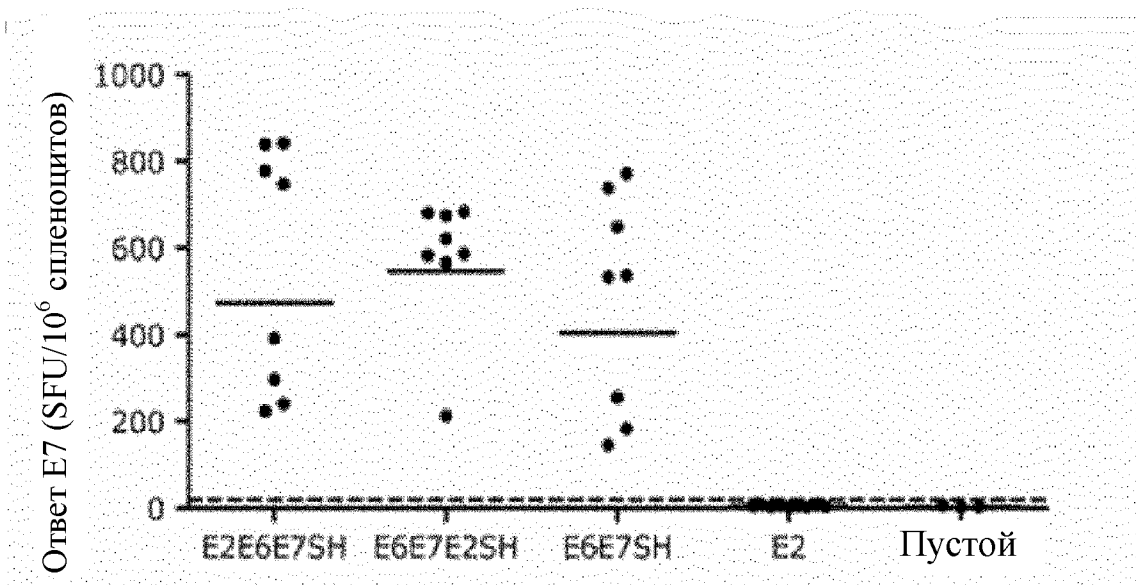
A



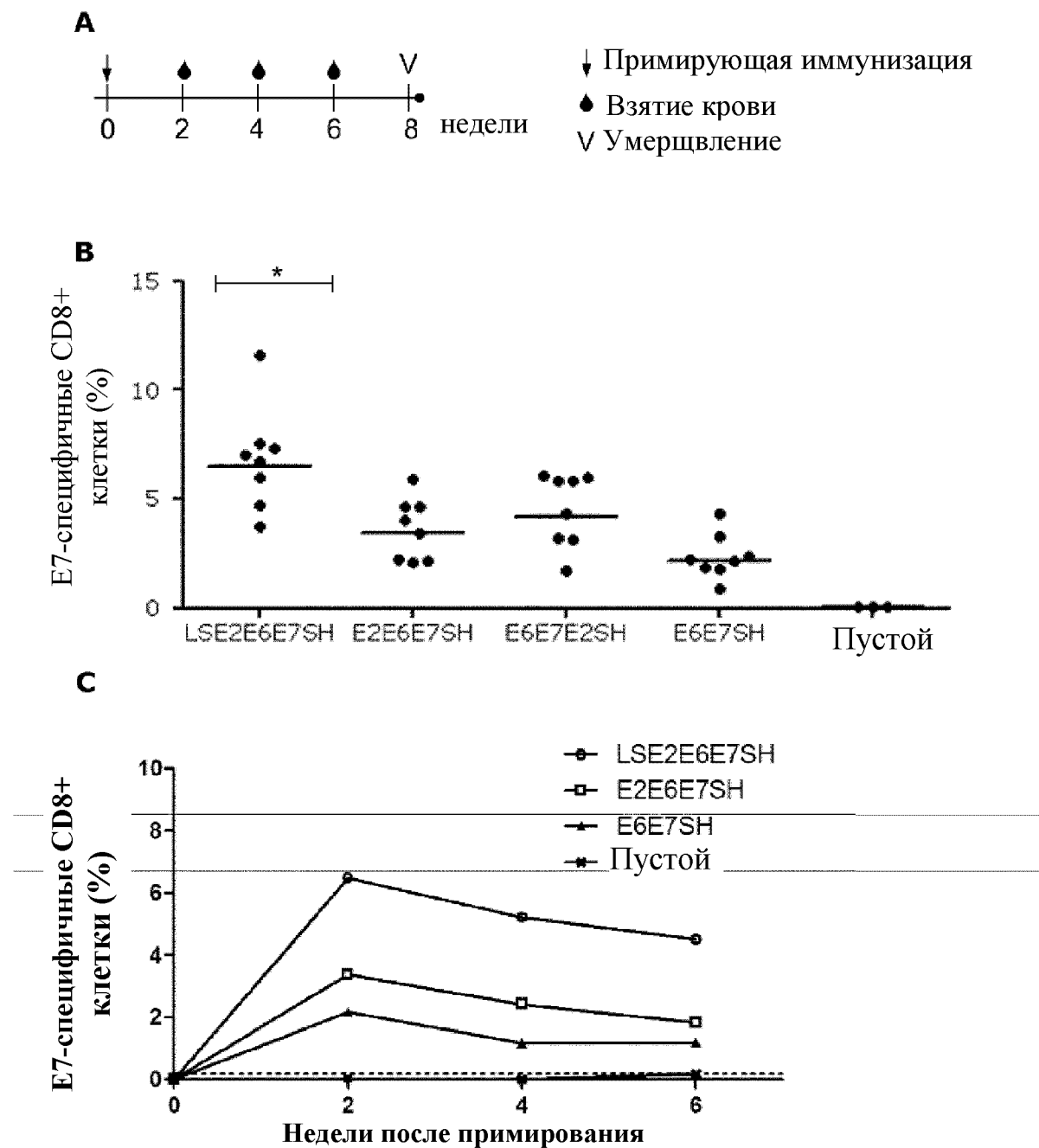
B



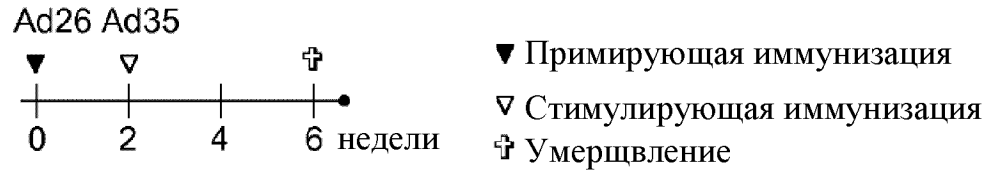
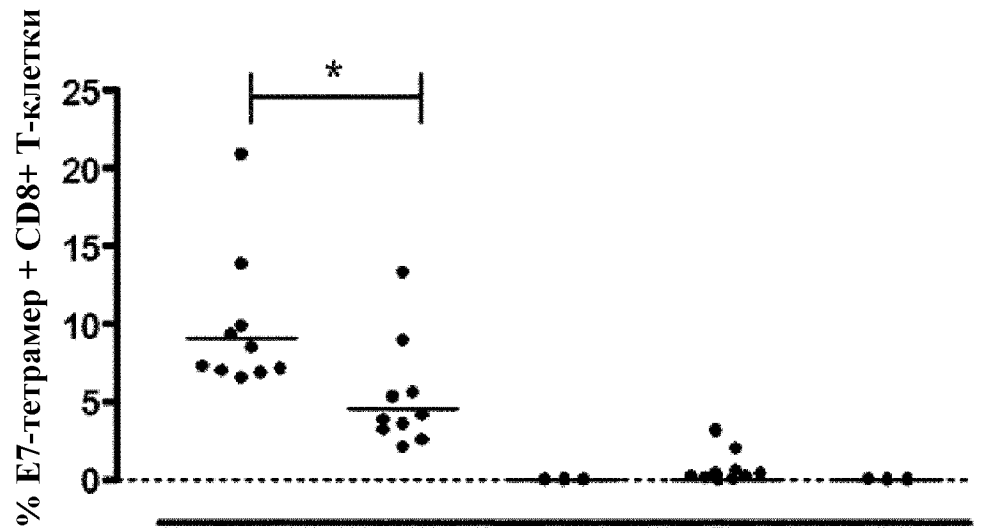
C



Фиг. 8

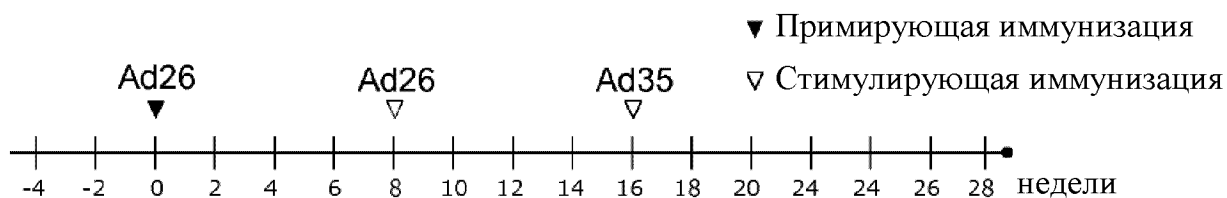
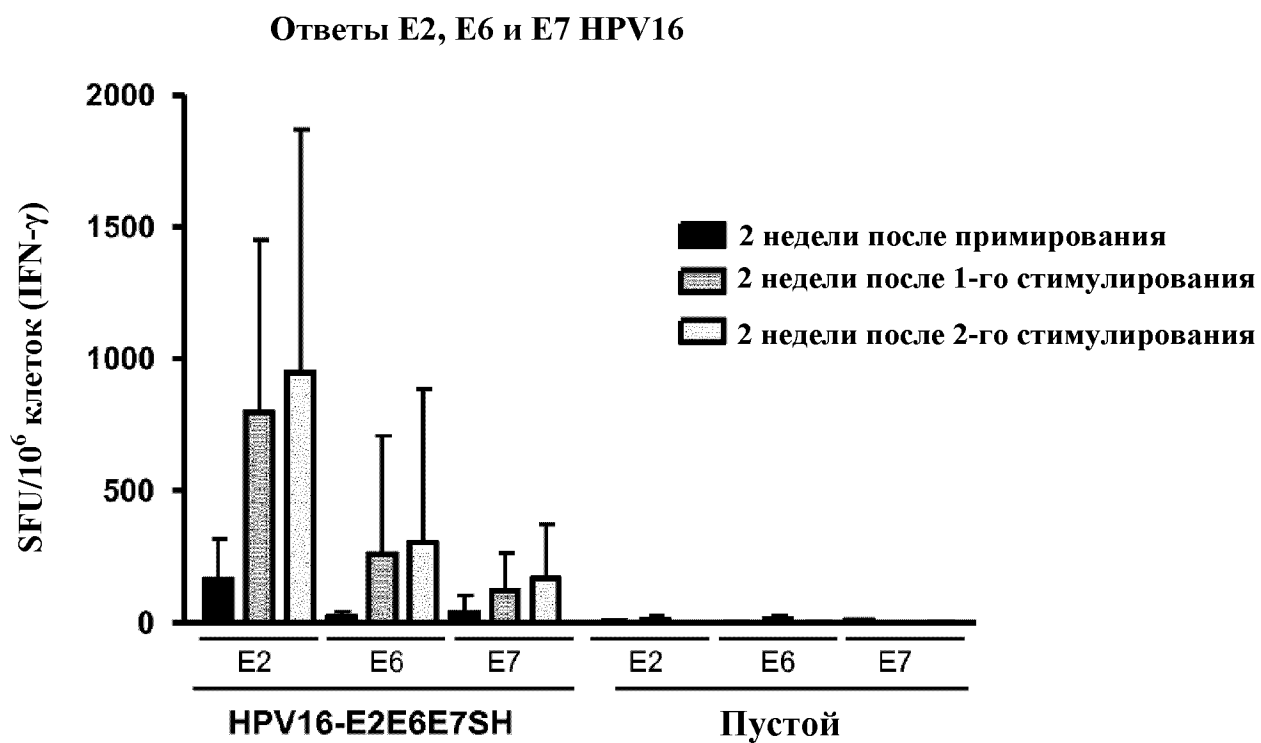


Фиг. 9

A**B**

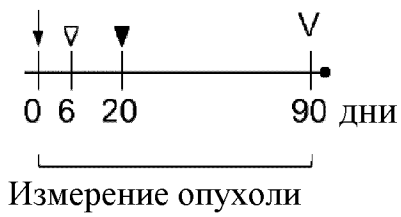
Примирование (Ad26): HPV16-Tx HPV16-Tx Пустой SLP+CpG CpG
 Стимулирование (Ad35): HPV16-Tx Пустой Пустой SLP+CpG CpG

Фиг. 10

A**B**

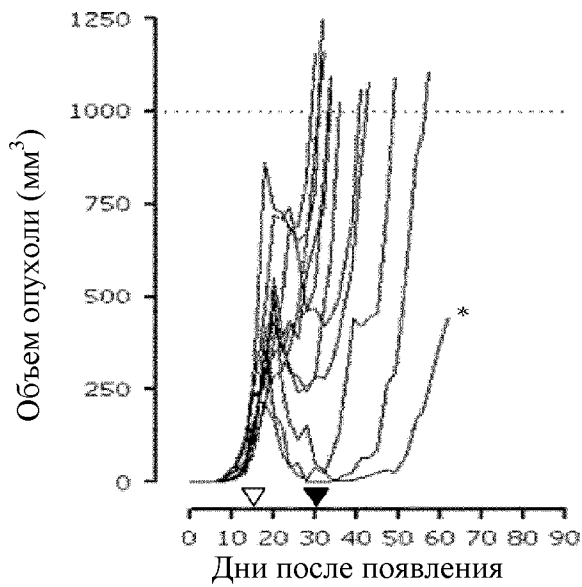
Фиг. 11

A

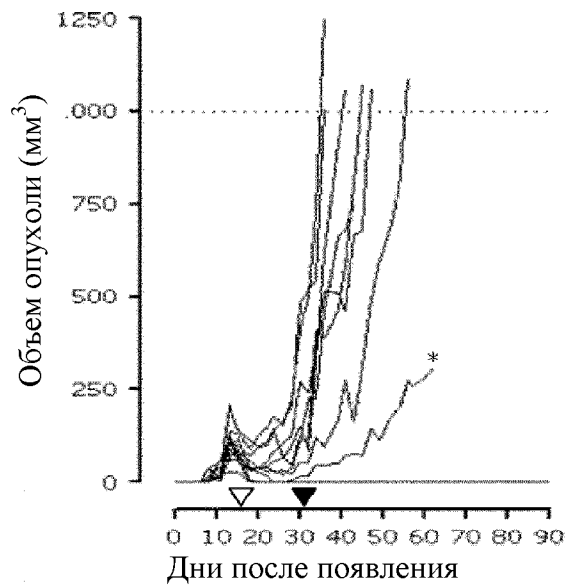


- ↓ TC-1
- ▽ Примирующая иммунизация
- ▼ Стимулирующая иммунизация
- ∇ Умерщвление

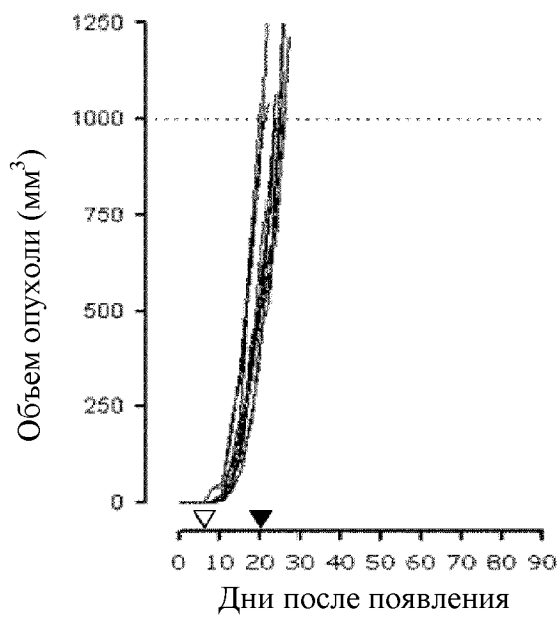
B



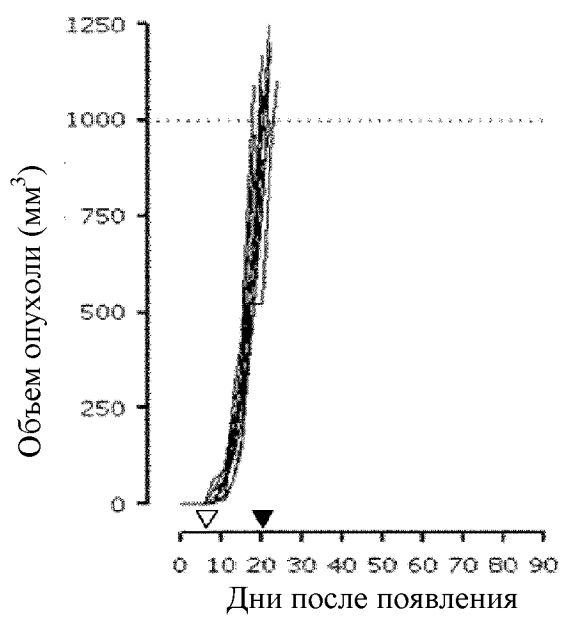
C



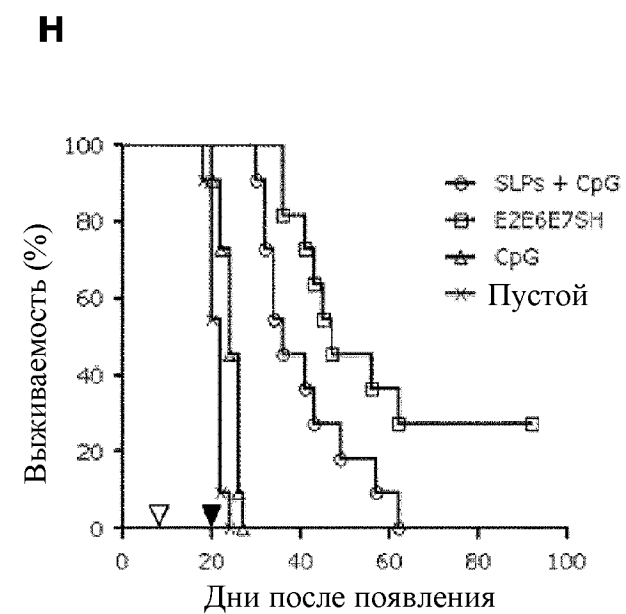
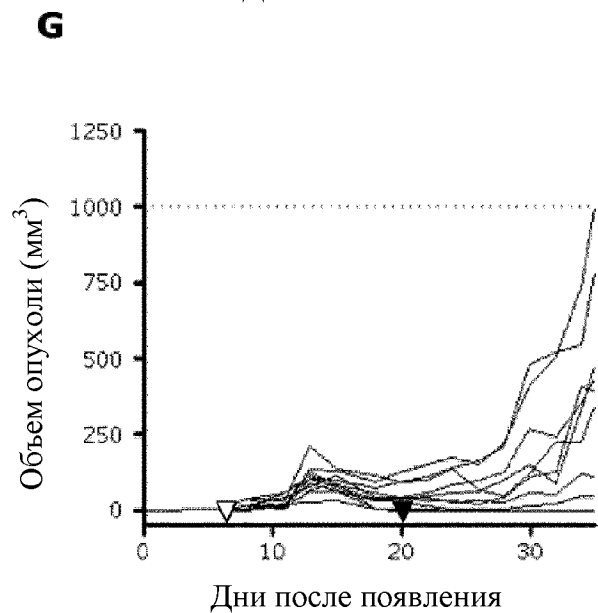
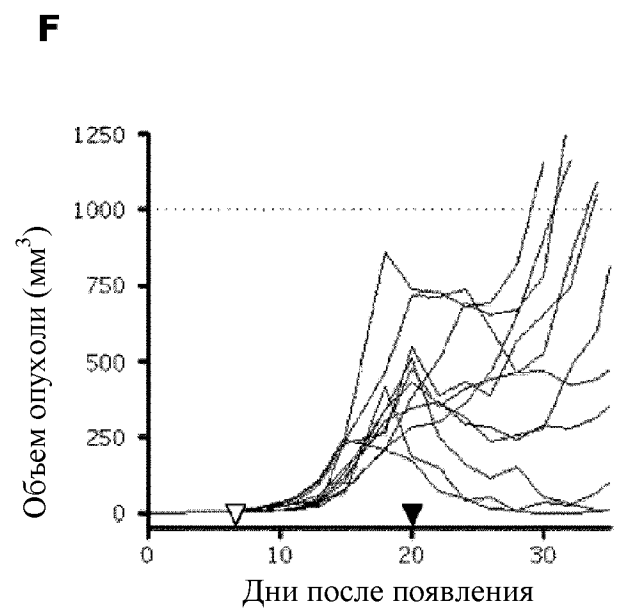
D



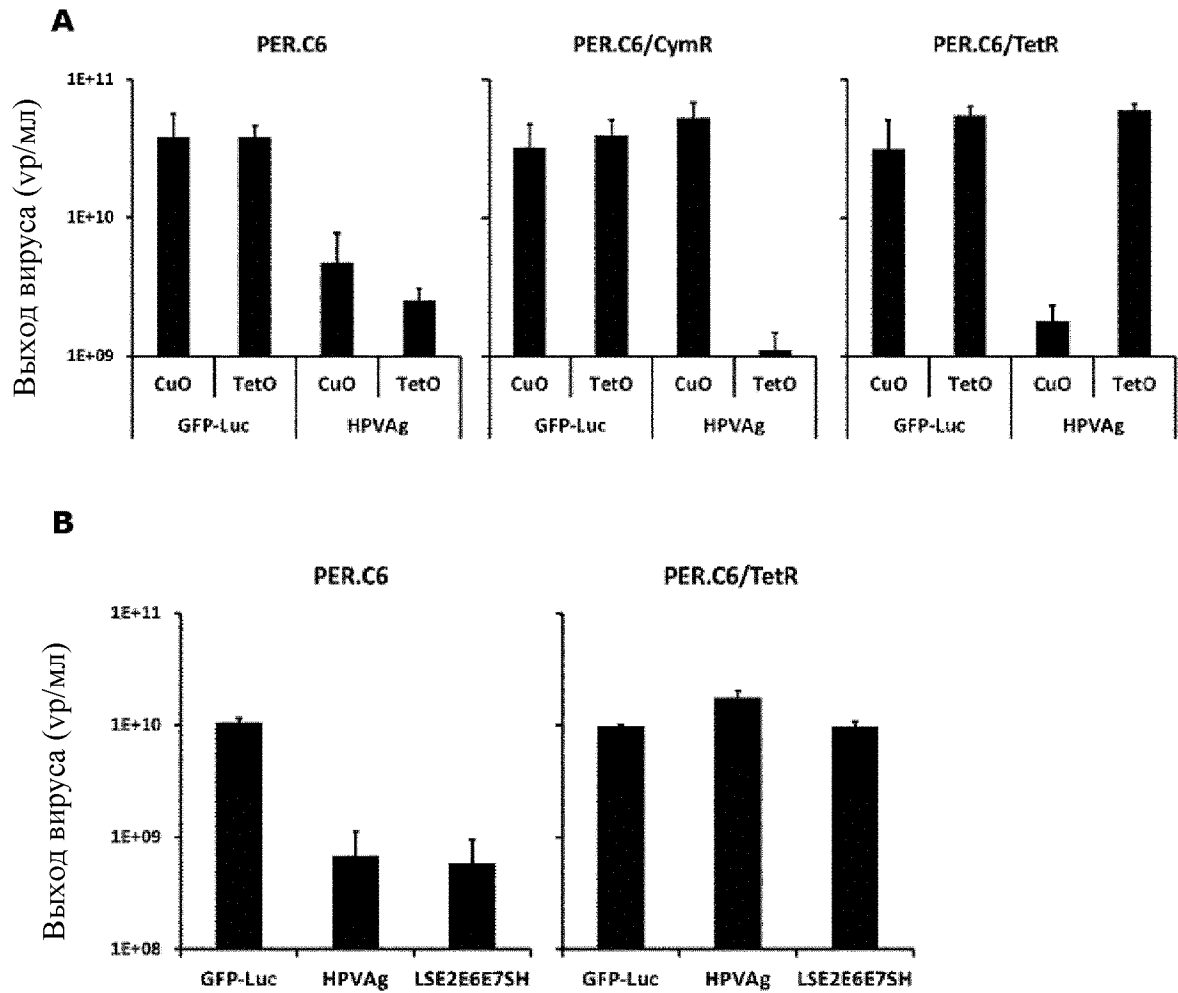
E



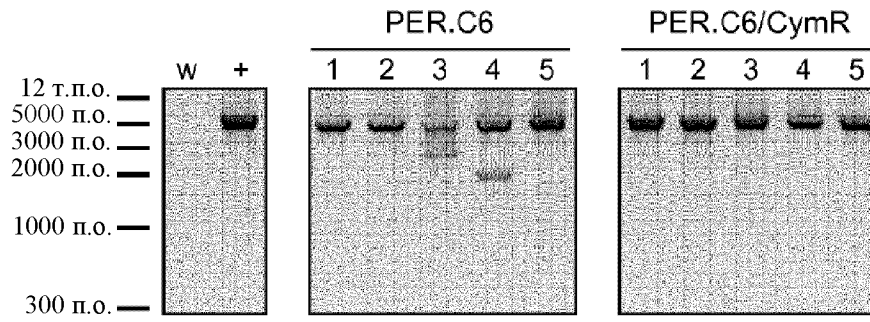
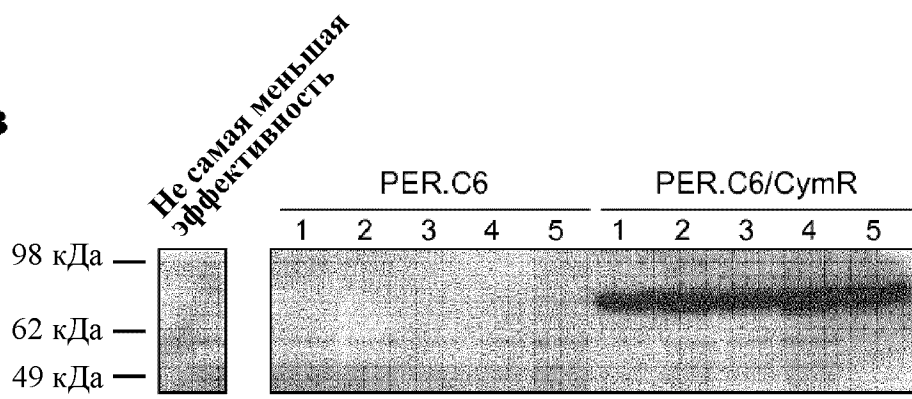
Фиг. 12



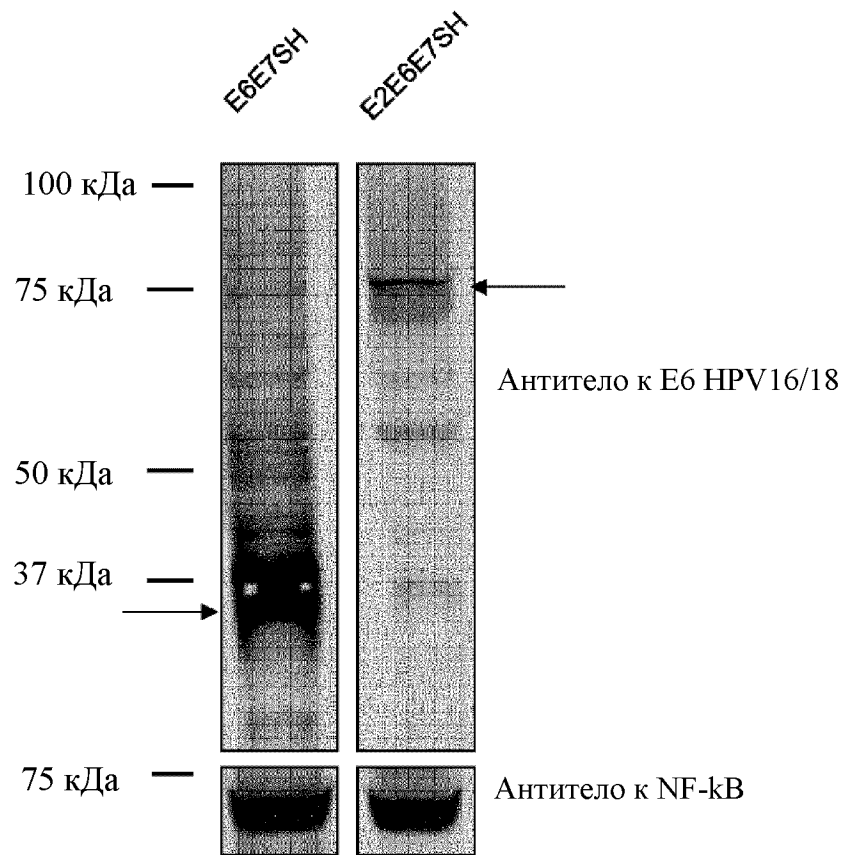
Фиг. 12 – продолжение



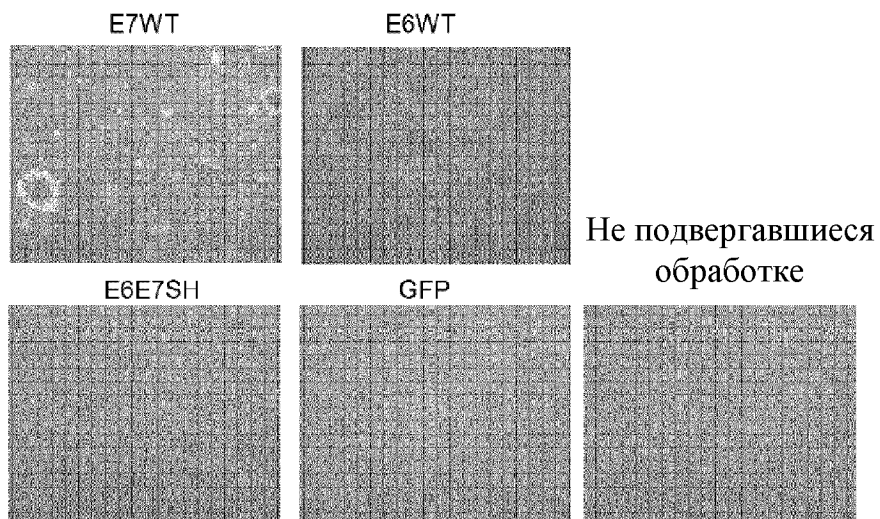
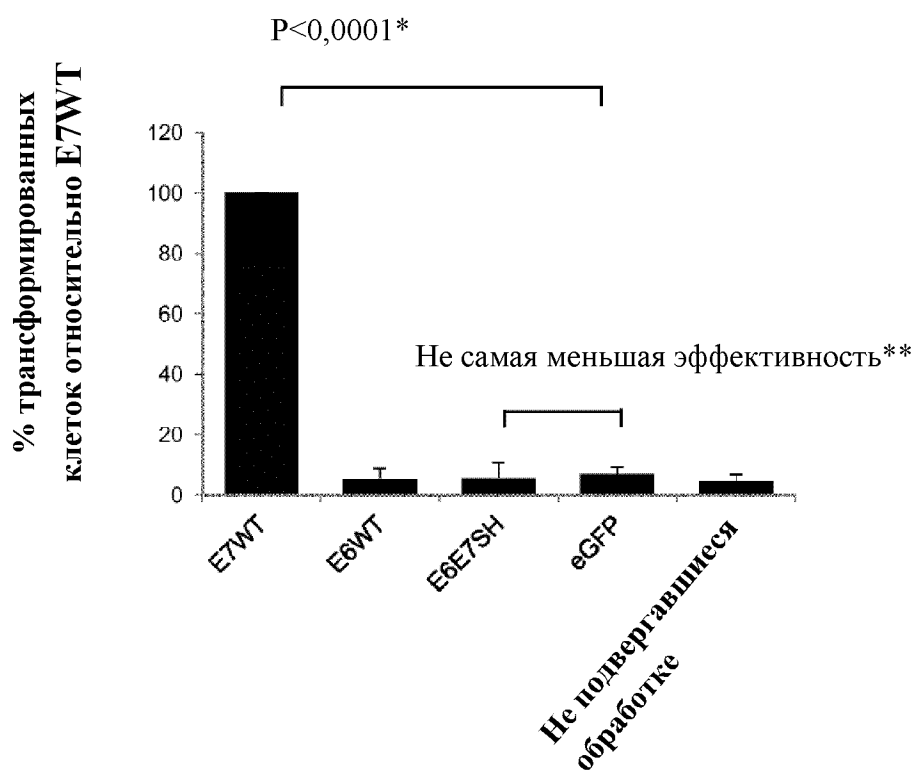
Фиг. 13

A**B**

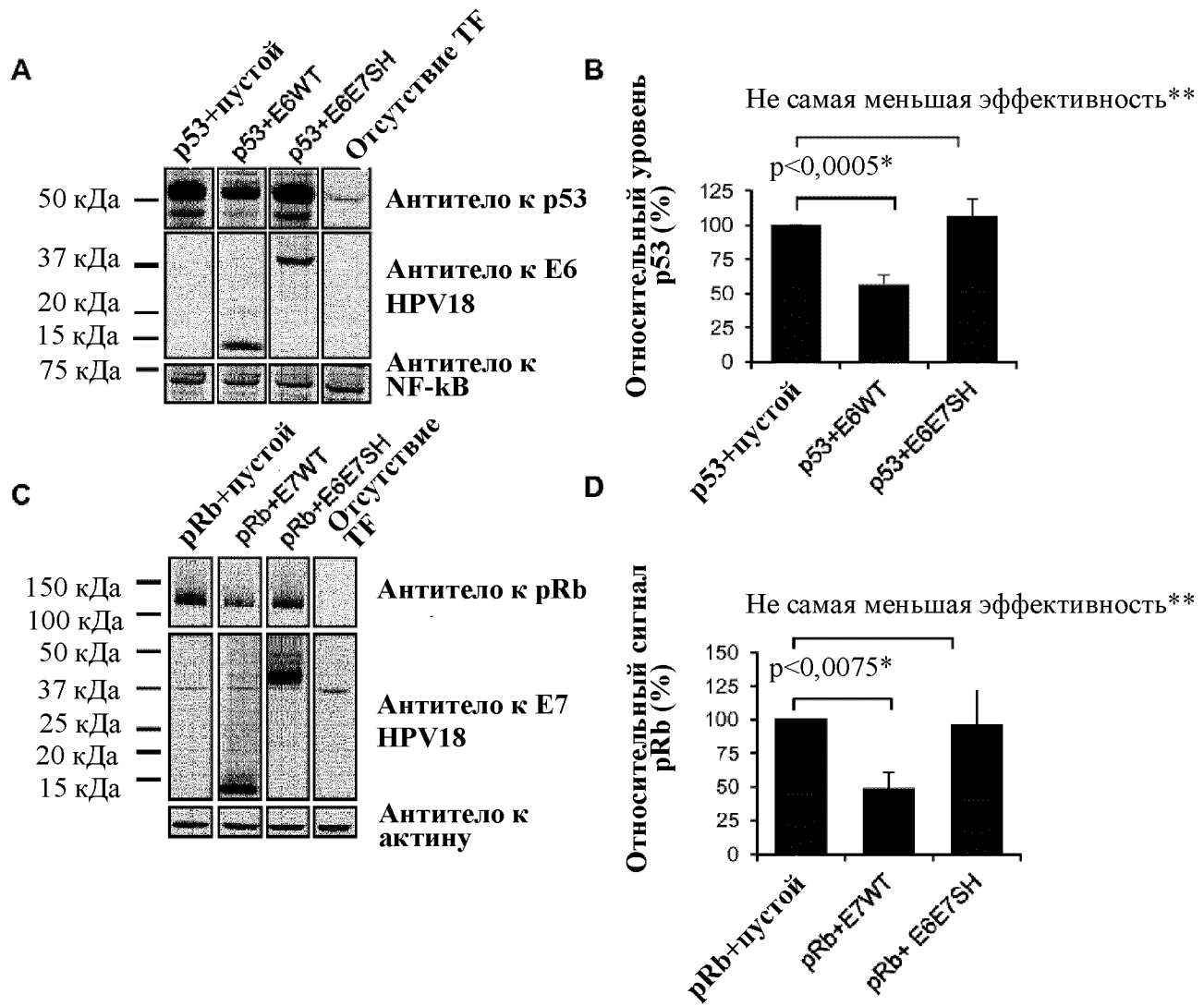
Фиг. 14



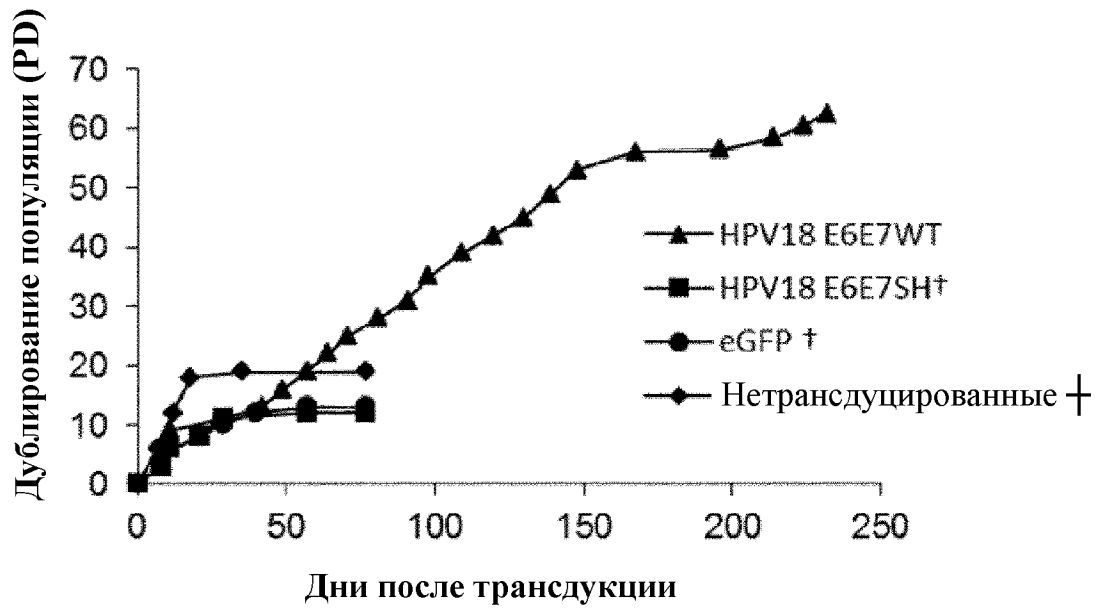
Фиг. 15

A**B**

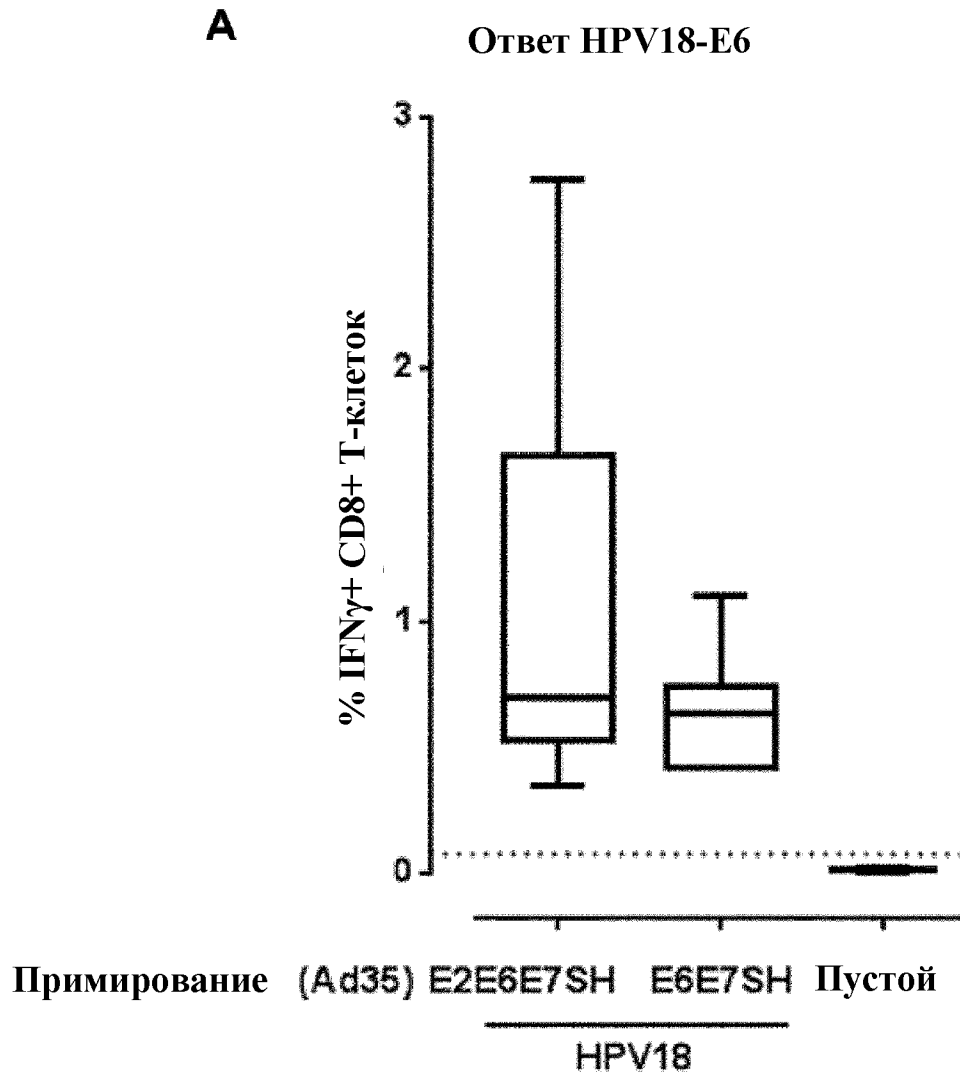
Фиг. 16



Фиг. 17

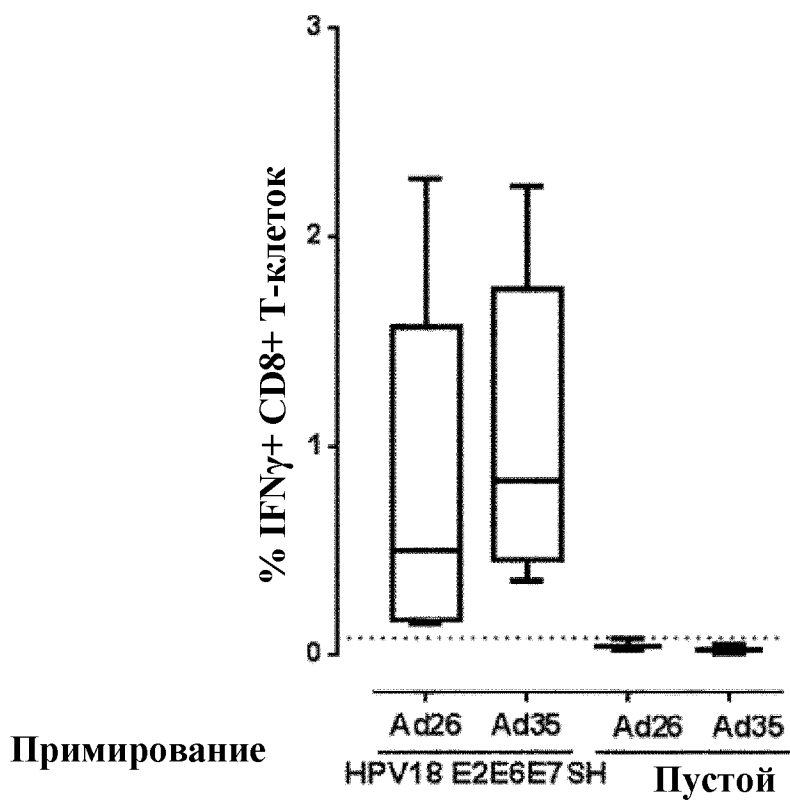


Фиг. 18



В

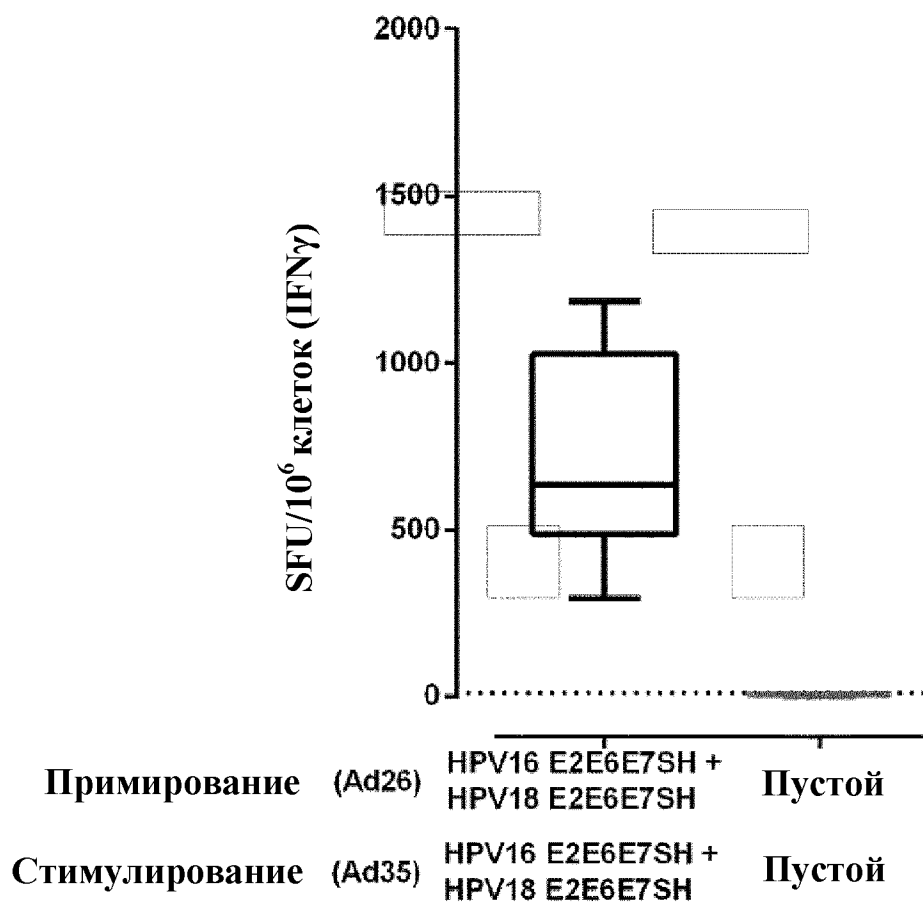
Ответ HPV18-E6



Фиг. 19 – продолжение

A

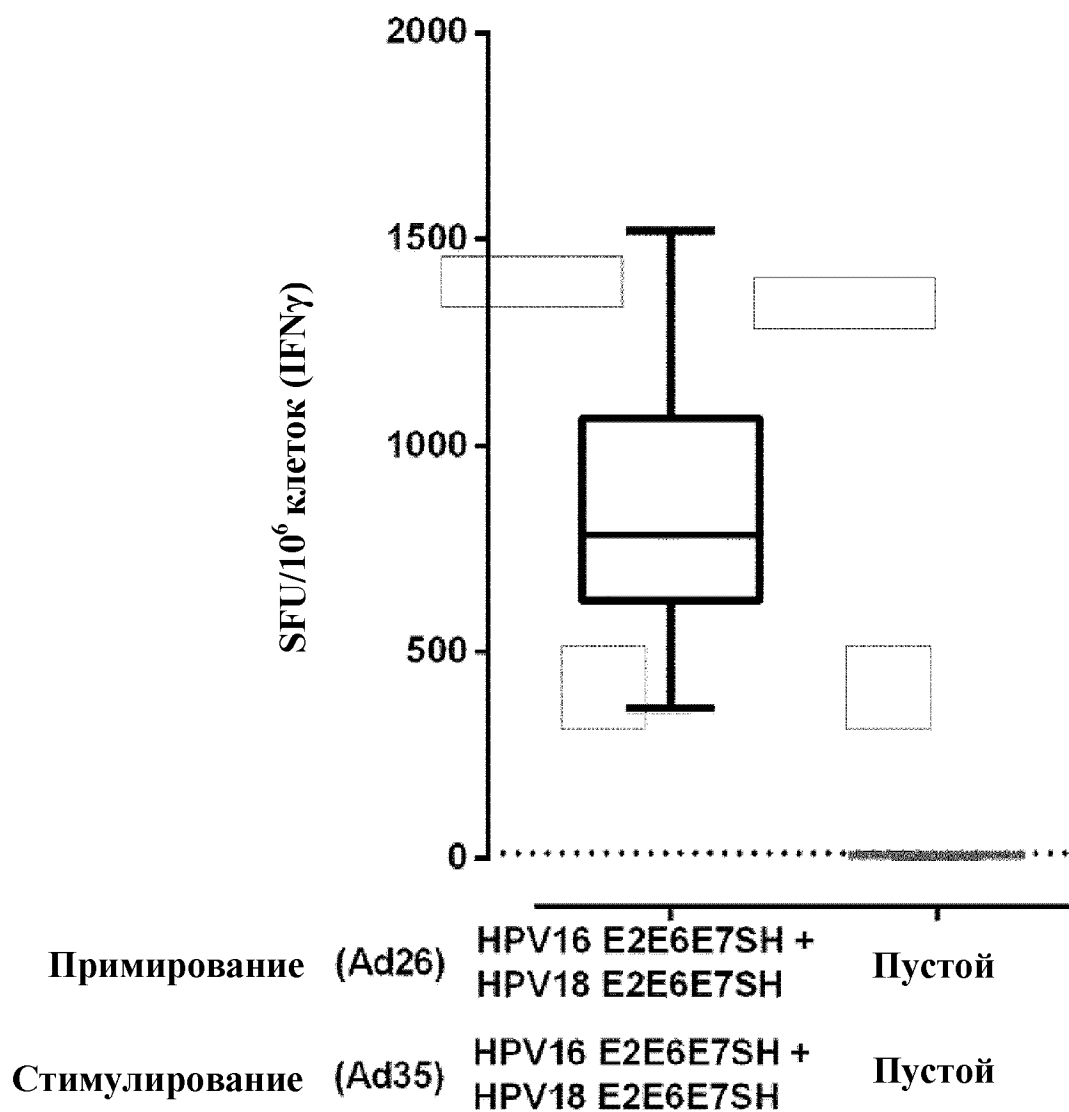
Ответ HPV18-E7



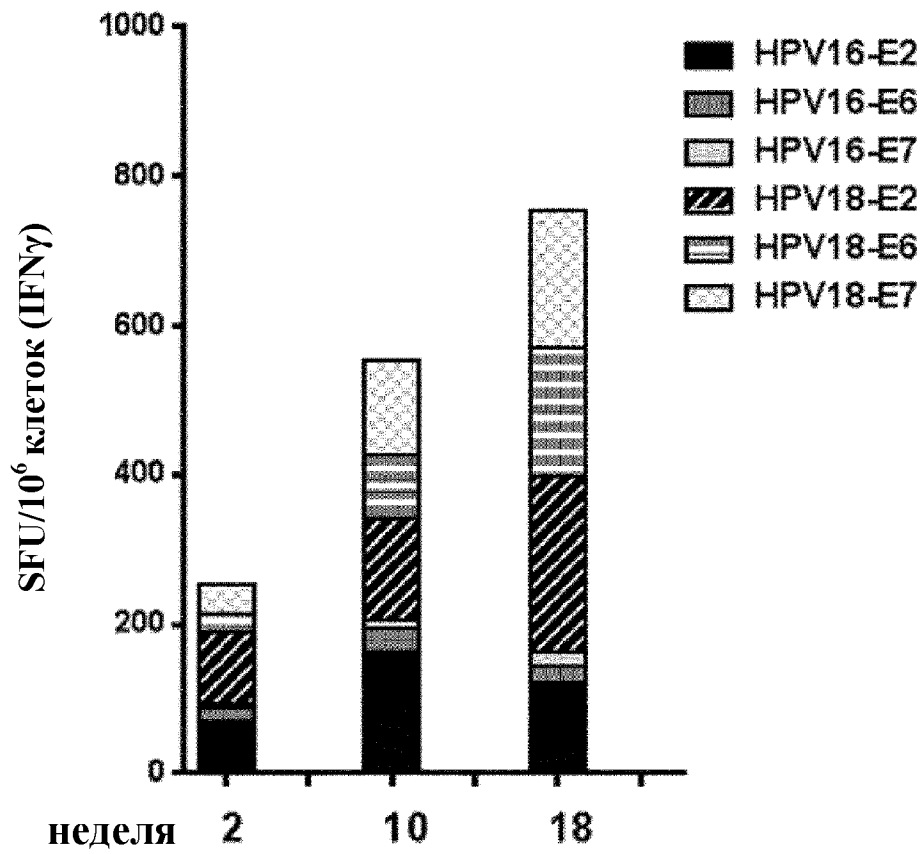
Фиг. 20

B

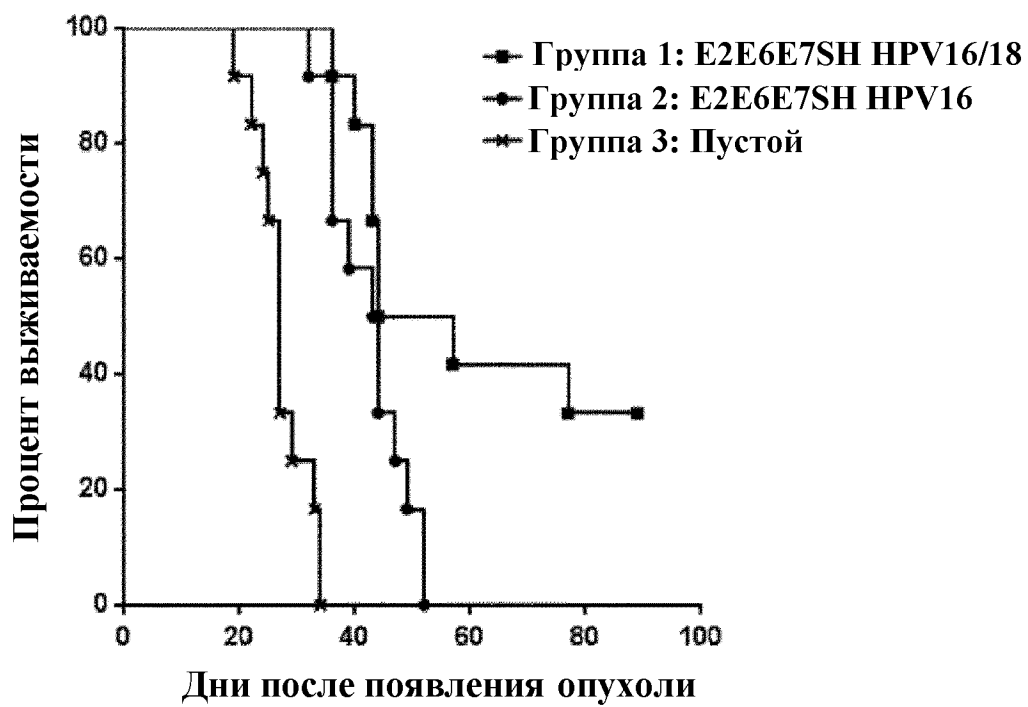
Ответ HPV18-E6



Фиг. 20 – продолжение



Фиг. 21



Фиг. 22