



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107267530 A

(43)申请公布日 2017. 10. 20

(21)申请号 201710280349.9

A61K 39/12(2006.01)

(22)申请日 2010.01.22

A61P 31/20(2006.01)

(30)优先权数据

61/146,942 2009.01.23 US

12/691,588 2010.01.21 US

(62)分案原申请数据

201080005583.7 2010.01.22

(71)申请人 宾夕法尼亚大学托管会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 D·B·韦纳 严健

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

C12N 15/37(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

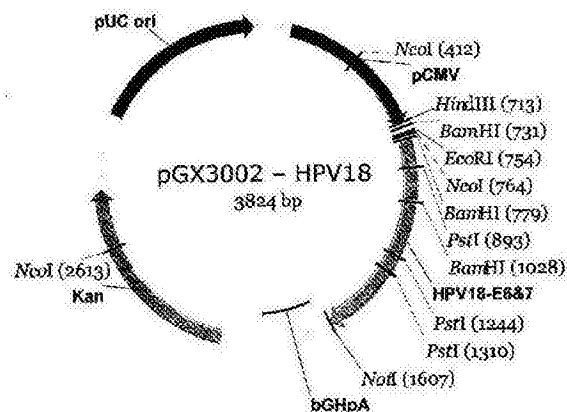
序列表6页 附图1页

(54)发明名称

改善的用于人乳头状瘤病毒的疫苗及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及改善的用于人乳头状瘤病毒的疫苗及其使用方法。具体公开了改善的抗-HPV免疫原和编码它们的核酸分子。公开的免疫原包括具有共有序列HPV 18 E6和E7的那些。公开药物组合物、包含其的重组疫苗和活减毒疫苗、以及公开在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法。



1. 一种核酸分子,包含选自下列的核苷酸序列:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5。
2. 权利要求1所述的核酸分子,包含SEQ ID NO:1。
3. 权利要求1所述的核酸分子,包含SEQ ID NO:5。
4. 权利要求1所述的核酸分子,其中所述分子是质粒。
5. 一种药物组合物,包含权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。
6. 一种可注射的药物组合物,包含权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。
7. 包含权利要求1-4中任一项所述的核酸分子的组合物在制备在个体中针对HPV诱导免疫应答的药物中的用途。
8. 权利要求7所述的用途,其中所述核酸分子是DNA分子。
9. 权利要求8所述的用途,其中所述核酸分子是质粒。
10. 权利要求7所述的用途,其中所述核酸分子通过电穿孔引入所述个体。
11. 权利要求7所述的用途,其中所述个体已经被诊断为患有HPV感染。
12. 一种重组疫苗,包含权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。
13. 权利要求12所述的重组疫苗,其中所述重组疫苗是重组牛痘疫苗。
14. 一种活减毒疫苗,包含权利要求1-4中任一项所述的核酸分子。

改善的用于人乳头状瘤病毒的疫苗及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2010年01月22日的题为“改善的用于人乳头状瘤病毒的疫苗及其使用方法”的中国专利申请号201080005583.7的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及改善的人乳头状瘤病毒 (HPV) 疫苗、诱导免疫应答的改善的方法、和针对HPV预防和/或治疗地免疫个体。

背景技术

[0003] 该申请要求2009年1月23日提交的美国临时申请No.61/146,942、2010年1月21日提交的美国专利申请No.12/691,588的优先权,其公开均通过引用的方式并入本文。

[0004] 乳头状瘤病毒是小DNA病毒,其包含至多7个早期基因和两个晚期基因。通常,乳头状瘤病毒早期基因表示为E1-E7,并且乳头状瘤病毒晚期基因表示为L1和L2。数个物种的动物可被乳头状瘤病毒家族的成员感染。

[0005] 人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染是常见的,并且可进行性传播。基于DNA序列的同源性,HPV已经裂化为56或更多的类型。HPV型16和18(其引起上皮异常增生和其他损害)通常和下列情况有关:癌症风险增加,特别是子宫颈、阴道、阴户和肛管的原位和侵入性癌。

[0006] DNA疫苗法相对于更加传统的疫苗法具有更多概念上的优点,例如活减毒病毒和重组蛋白-基疫苗。DNA疫苗是安全、稳定、容易生产和在前期临床的人中具有良好忍耐性的,这表明质粒整合的较少证据[Martin,T.,et al.,Plasmid DNA malaria vaccine:the potential for genomic integration after intramuscular injection.Hum Gene Ther,1999.10(5):p.759-68;Nichols,W.W.,et al.,Potential DNA vaccine integration into host cell genome.Ann N Y Acad Sci,1995.772:p.30-9]。另外,DNA疫苗非常适用于反复施用,因为下列事实疫苗的效果不受到对于载体预存在的抗体滴度的影响[Chattergoon,M.,J.Boyer,and D.B.Weiner,Genetic immunization:a new era in vaccines and immune therapeutics.FASEB J,1997.11(10):p.753-63]。然而,在移动至较大动物时,临床采用DNA疫苗的一个主要障碍在平台免疫原性中减少[Liu,M.A.and J.B.Ulmer,Human clinical trials of plasmid DNA vaccines.Adv Genet,2005.55:p.25-40]。DNA疫苗免疫原的工程化中的近期技术进展例如密码子优化、RNA优化和免疫球蛋白前导序列的加入已经改善了DNA疫苗的表达和免疫原性[Andre,S.,et al.,Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage.J Virol,1998.72(2):p.1497-503;Deml,L.,et al.,Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1Gag protein.J Virol,2001.75(22):p.10991-1001;Laddy,D.J.,et al.,Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza.Vaccine,2007.25(16):p.2984-9;Frelin,L.,et al.,Codon optimization and mRNA amplification

effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. Gene Ther, 2004. 11 (6): p. 522-33], 以及质粒递送系统的近期开发的技术例如电穿孔 [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. Vaccine, 2008. 26 (3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. J Virol, 2007. 81 (10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+T cells. J Immunol, 2007. 179 (7): p. 4741-53]。另外, 相比于单独的天然抗原, 研究表明共有序列免疫原的使用可能增加细胞免疫应答的宽度 [Yan., J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. Mol Ther, 2007. 15 (2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. J Virol, 2007. 81 (16): p. 8507-14]。

[0007] 仍保留对于改善的疫苗和预防与治疗 HPV 感染的方法的需要。

发明内容

[0008] 发明概述

[0009] 提供包含共有序列 HPV 型 18 (HPV 18) E6 和 E7 氨基酸序列的蛋白、和包含编码这些蛋白的核苷酸序列的核酸分子。这些核酸构建体和进而编码的蛋白提供针对可产生抗-HPV 免疫应答的改善的免疫原性靶。

[0010] 还提供编码这些蛋白的构建体、包含这些蛋白的疫苗、包含编码这些蛋白的核酸分子的疫苗、以及诱导抗-HPV 免疫应答的方法。

[0011] 本发明的方面包括核酸分子, 包含选自下列的核苷酸序列: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 1 的片段; 与 SEQ ID NO: 1 具有至少 90% 同源性的序列; 与 SEQ ID NO: 1 具有至少 90% 同源性的序列的片段; SEQ ID NO: 5; 包括 HPV 编码序列的 SEQ ID NO: 5 的片段; 与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90% 同源性的序列; 以及包括 HPV 编码序列的与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90% 同源性的序列的片段; SEQ ID NO: 7; 包括 HPV 编码序列的 SEQ ID NO: 7 的片段; 与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90% 同源性的序列; 以及包括 HPV 编码序列的与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90% 同源性的序列的片段。

[0012] 本发明涉及核酸分子, 包含选自下列的核苷酸序列: 编码 SEQ ID NO: 2 的核苷酸序列; 编码与 SEQ ID NO: 2 具有至少 90% 同源性的氨基酸序列的核苷酸序列; 编码 SEQ ID NO: 2 的片段的核苷酸序列; 编码与 SEQ ID NO: 2 的片段具有至少 90% 同源性的氨基酸序列的核苷酸序列; 编码 SEQ ID NO: 6 的核苷酸序列; 包括 HPV 序列的编码 SEQ ID NO: 6 的片段的核苷酸序列; 包括 HPV 序列的编码与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90% 同源性的氨基酸序列的核苷酸序列; 以及包括 HPV 序列的编码与 SEQ ID NO: 6 的片段具有至少 90% 同源性的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0013] 本发明还提供包含这种核酸分子的药物组合物、以及它们在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法中的用途,该方法包括向个体施用包含这种核酸分子的组合物。

[0014] 本发明还提供包含这种核酸分子的重组疫苗、以及它们在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法中的用途,该方法包括向个体施用重组疫苗。

[0015] 本发明还提供包含这种核酸分子的活减毒的病原体、以及它们在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法中的用途,该方法包括向个体施用这些活减毒的病原体。

[0016] 本发明还提供包含氨基酸序列的蛋白,所述氨基酸序列选自:SEQ ID NO:2,与SEQ ID NO:2具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:2的片段;与SEQ ID NO:2具有至少90%同源性的序列的片段;SEQ ID NO:6,与SEQ ID NO:6具有至少90%同源性的序列;SEQ ID NO:6的片段;以及与SEQ ID NO:6具有至少90%同源性的序列的片段。

[0017] 本发明还提供包含这些蛋白的药物组合物、以及它们在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法中的用途,该方法包括向个体施用包含这些蛋白的组合物。

[0018] 本发明还提供包含这些蛋白的重组疫苗、以及它们在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法中的用途,该方法包括向个体施用包含这些重组疫苗。

[0019] 本发明还提供包含这些蛋白的活减毒的病原体、以及它们在个体中针对HPV诱导免疫应答的方法中的用途,该方法包括向个体施用这些活减毒的病原体。

附图说明

[0020] 图1提供质粒构建体的描述。

具体实施方式

[0021] 如本文中所使用的,措词“严格杂交条件”或“严格条件”是指这样的条件,在该条件下核酸分子将杂交另外的核酸分子,但不杂交其他序列。严格条件是序列依赖性的并且不同情况下将是不同的。较长序列在较高温度下特异性杂交。通常,对于在限定离子强度和pH下的特定序列,严格条件被选择为低于热熔点(T_m)约5℃。 T_m 是这样的温度(在限定的离子强度、pH和核酸浓度),在该温度下与靶序列互补的50%的探针与靶序列杂交平衡。由于靶序列通常存在过量,因此在 T_m 下50%的探针被占据平衡。典型地,严格条件被选择为其中在pH 7.0至8.3下盐浓度低于约1.0M钠离子,典型地约0.01至1.0M钠离子(或其他盐),并且对于较短探针、引物或寡核苷酸(例如10至50个核苷酸)温度为至少约30℃,对于较长探针、引物或寡核苷酸温度为至少约60℃。严格条件还可使用加入去稳定剂例如甲酰胺来实现。

[0022] 核苷酸和氨基酸的序列同源性可使用FASTA、BLAST和Gapped BLAST(Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 1997, 25, 3389, 其通过引用全部并入本文)和PAUP*4.0b10软件(D.L.Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)来测定。“类似百分率”使用PAUP*4.0b10软件(D.L.Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)来计算。共有序列的平均类似度比较于系统树中的所有序列来计算。

[0023] 简言之,代表Basic Local Alignment Search Tool的BLAST算法适用于确定序列类似性(Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410, 其通过引用全部并入本文)。进行BLAST分析的软件通过National Center for Biotechnology Information公开可得

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。该算法包括首先通过鉴定在查询序列中长度W的短字串,该字串与数据库序列中相同长度的字串比对时或者匹配或者满足某些正数值阈值分值T,从而来鉴定高分序列配对(HSP)。T被称为邻近字串阈值(Altschul et al.,同上)。这些原始邻近字串命中作为起始搜索以发现含有它们的更长HSP的种子。只要累积序列比对分值可以增加,字串命中则以两个方向沿每个序列延伸。字串命中在每个方向的延伸当遇到下述情况之一时终止:1) 累积序列比对分值比其获得的最大值低数量X;2) 累积分值为零或零以下,这是由于一个或多个负打分残基比对的累积所致;或者3) 到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定所述比对的灵敏度和速度。BLASTN程序使用的比对(B)为50,缺省字长(W)为11,期望值(E)为10, M=5, N=4,并且比较两条链, BLOSUM62打分矩阵(参见Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919, 其通过引用全部并入本文)。BLAST算法(Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787, 其通过引用全部并入本文)和Gapped BLAST进行两个序列之间相似性的统计学分析。BLAST算法提供的一种相似性测定是最小和概率(P(N)),它提供两个核苷酸序列或氨基酸序列可能偶然发生匹配的概率的指标。例如,如果待测核酸与参比核酸比较中的最小和概率大约小于1,优选大约小于0.1,更优选大约小于0.01,最优选小于约0.001,则认为待测核酸与参比序列相似。

[0024] 如本文中所使用的,术语“基因构建体”是指DNA或RNA分子,其包含编码蛋白的核苷酸序列。编码序列包括可操作的连接调节元件(包括启动子)的引发和终止信号、和能够在个体(其施用核酸分子)细胞内引导表达的聚腺苷酸化信号。

[0025] 如本文中所使用的,术语“可表达的形式”是指含有可操作地连接编码序列的必需调节元件的基因构建体,所述编码序列编码蛋白使得当存在于个体的细胞中时,编码序列被表达。

[0026] 公开改善的疫苗,该疫苗源自多阶段战略以增强由免疫原诱导的细胞免疫应答。产生修饰的共有序列序列。还公开了基因修饰,包括密码子优化、RNA优化和添加高效免疫球蛋白前导序列。新的构建体已经被设计来诱导比对应的密码子优化的免疫原更强和更宽的细胞免疫应答。

[0027] 改善的HPV疫苗基于蛋白和编码具有抗原决定基的蛋白的基因构建体,所述抗原决定基使它们作为免疫原特别有效,针对所述所述免疫原可诱导抗-HPV。因此,疫苗可诱导治疗或预防性免疫应答。在一些实施方案中,递送免疫原的方式是DNA疫苗,重组疫苗,蛋白质亚单位疫苗,包含免疫原、减毒疫苗或灭活疫苗的组合物。在一些实施方案中,疫苗包含选自下列的组合:一种或多种DNA疫苗,一种或多种重组疫苗,一种或多种蛋白质亚单位疫苗,一种或多种包含免疫原的组合物,一种或多种减毒疫苗和一种或多种灭活疫苗。

[0028] 根据一些实施方案,疫苗递送至个体以调节个体的免疫系统的活性并且从而增强针对HPV的免疫应答。当编码蛋白的核酸分子被个体细胞所摄取时,核苷酸序列在细胞中表达并且蛋白从而递送至个体。提供:在核酸分子例如质粒(作为重组疫苗的一部分和作为减毒疫苗的一部分,作为分离的蛋白或载体的蛋白部分)上递送蛋白的编码序列的方法。

[0029] 提供预防和/或治疗免疫针对HPV的个体的组合物和方法。

[0030] 递送核酸分子(其包含编码免疫原的核苷酸序列)的组合物可操作地连接调节元件。组合物可包含编码免疫原的质粒、包含编码免疫原的核苷酸序列的重组疫苗、编码本发

明的蛋白和/或包含本发明的蛋白的活减毒的病原体、包含本发明的蛋白的灭活的病原体、或组合物例如包含本发明的蛋白的脂质体或亚单位疫苗。本发明还涉及包含组合物的可注射的药物组合物。

[0031] SEQ ID NO:1包含编码HPV 18E6和E7蛋白的共有序列免疫原的核苷酸序列。SEQ ID NO:5包括SEQ ID NO:1,并且还包含连接编码HPV 18E6和E7蛋白的共有序列免疫原的核苷酸序列的IgE前导序列。SEQ ID NO:2包含HPV 18E6和E7蛋白的共有序列免疫原的氨基酸序列。SEQ ID NO:6包含SEQ ID NO:2并且还包含连接共有序列免疫原序列的IgE前导序列。IgE前导序列是SEQ ID NO:4,并且可被SEQ ID NO:3编码。SEQ ID NO:7是质粒pGX302的核酸序列,其中引入SEQ ID NO:5以用于表达。

[0032] 在一些实施方案中,疫苗包括SEQ ID NO:2或编码SEQ ID NO:2的核酸分子。在一些实施方案中,疫苗包括SEQ ID NO:1作为编码SEQ ID NO:2的核酸分子。在一些实施方案中,疫苗优选包含SEQ ID NO:6或编码其的核酸分子。在一些实施方案中,疫苗优选包含SEQ ID NO:5作为编码SEQ ID NO:6的核酸分子。在一些实施方案中,疫苗优选包含SEQ ID NO:7。

[0033] SEQ ID NO:1的片段可包含90或更多个核苷酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含180或更多个核苷酸;在一些实施方案中可包含270或更多个核苷酸;在一些实施方案中可包含360或更多个核苷酸;在一些实施方案中可包含450或更多个核苷酸;在一些实施方案中可包含540或更多个核苷酸;在一些实施方案中可包含630或更多个核苷酸;在一些实施方案中可包含720或更多个核苷酸;以及在一些实施方案中可包含770或更多个核苷酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段例如本文中阐述的那些还可包含用于IgE前导序列的编码序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段不包含用于IgE前导序列的编码序列。SEQ ID NO:1的片段可包含少于180个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于270个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于360个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于450个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于540个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于630个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于690个核苷酸,在一些实施方案中可包含少于760个核苷酸、以及在一些实施方案中可包含少于780个核苷酸。

[0034] SEQ ID NO:2的片段可包含30或更多个氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含60或更多个氨基酸;在一些实施方案中可包含90或更多个氨基酸;在一些实施方案中可包含120或更多个氨基酸;在一些实施方案中可包含150或更多个氨基酸;在一些实施方案中可包含180或更多个氨基酸;在一些实施方案中可包含210或更多个氨基酸;以及在一些实施方案中可包含240或更多个氨基酸。片段可包含少于90个氨基酸,在一些实施方案中可包含少于120个氨基酸,在一些实施方案中可包含少于150个氨基酸,在一些实施方案中可包含少于180个氨基酸,在一些实施方案中可包含少于210个氨基酸,以及在一些实施方案中可包含少于240个氨基酸。

[0035] SEQ ID NO:5的所有片段包含编码HPV序列的编码序列,即SEQ ID NO:5的片段必须包含除了那些编码IgE前导肽之外的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:5的片段包含90或更多个核苷酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:5的片段可包含180或更多个核苷酸;在一些实施方案中包含270或更多个核苷酸;在一些实施方案中包含360或更多个核苷酸;在一些实施方案中包含450或更多个核苷酸;在一些实施方案中包含540或更多个核苷酸;在

一些实施方案中包含630或更多个核苷酸;在一些实施方案中包含720或更多个核苷酸;在一些实施方案中包含810或更多个核苷酸;以及在一些实施方案中包含830或更多个核苷酸。SEQ ID NO:5的片段可包含少于180个核苷酸,在一些实施方案中包含少于270个核苷酸,在一些实施方案中包含少于360个核苷酸,在一些实施方案中包含少于450个核苷酸,在一些实施方案中包含少于540个核苷酸,在一些实施方案中包含少于630个核苷酸,在一些实施方案中包含少于690个核苷酸,在一些实施方案中包含少于720个核苷酸,在一些实施方案中包含少于780个核苷酸,以及在一些实施方案中包含少于840个核苷酸。

[0036] SEQ ID NO:6的片段可包含30或更多个氨基酸包含HPV序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:6的片段可包含60或更多个氨基酸包含HPV序列;在一些实施方案中,90或更多个氨基酸包含HPV序列;在一些实施方案中,120或更多个氨基酸包含HPV序列;在一些实施方案中,150或更多个氨基酸包含HPV序列;在一些实施方案中,180或更多个氨基酸包含HPV序列;在一些实施方案中,210或更多个氨基酸包含HPV序列;在一些实施方案中,240或更多个氨基酸包含HPV序列;以及在一些实施方案中,270或更多个氨基酸包含HPV序列。片段可包含少于90个氨基酸包含HPV序列,在一些实施方案中包含少于120个氨基酸包含HPV序列,在一些实施方案中包含少于150个氨基酸包含HPV序列,在一些实施方案中包含少于180个氨基酸包含HPV序列,在一些实施方案中包含少于210个氨基酸包含HPV序列,在一些实施方案中包含少于240个氨基酸包含HPV序列,以及在一些实施方案中包含少于270个氨基酸包含HPV序列。

[0037] 根据一些实施方案,在个体中诱导针对免疫原的免疫应答的方法包括向个体施加HPV 18E6和E7蛋白、或其功能片段、或其可表达的编码序列的共有序列免疫原的氨基酸序列。一些实施方案包括分离的核酸分子,其编码HPV 18E6和E7蛋白或其片段的共有序列免疫原的氨基酸序列。一些实施方案包括重组疫苗,其编码HPV 18E6和E7蛋白或其片段的共有序列免疫原的氨基酸序列。一些实施方案包括亚单位疫苗,其包含HPV18E6和E7蛋白或其片段的共有序列免疫原的氨基酸序列。一些实施方案包括活减毒疫苗和/或灭活疫苗,其包含HPV 18E6和E7蛋白的共有序列免疫原的氨基酸序列。

[0038] 改善的疫苗包含蛋白和编码具有抗原决定基的蛋白的基因构建体,所述抗原决定基使它们作为免疫原特别有效,针对所述所述免疫原可诱导抗-HPV免疫应答。因此,可提供疫苗以诱导治疗或预防性免疫应答。在一些实施方案中,递送免疫原的方式是DNA疫苗,重组疫苗,蛋白质亚单位疫苗,包含免疫原、减毒疫苗或灭活疫苗的组合物。在一些实施方案中,疫苗包含选自下列的组合:一种或多种DNA疫苗,一种或多种重组疫苗,一种或多种蛋白质亚单位疫苗,一种或多种包含免疫原的组合物,一种或多种减毒疫苗和一种或多种灭活疫苗。

[0039] 本发明的方面提供在核酸分子例如质粒(作为重组疫苗的一部分和作为减毒疫苗的一部分,作为分离的蛋白或载体的蛋白部分)上递送蛋白的编码序列的方法。

[0040] 根据本发明的一些方面,提供预防和/或治疗免疫个体的组合物和方法。

[0041] DNA疫苗描述于美国专利No.5,593,972,5,739,118,5,817,637,5,830,876,5,962,428,5,981,505,5,580,859,5,703,055,5,676,594和本文中引用的优先权申请,其均通过引用并入本文。除了这些申请中所述的递送方案,递送DNA的可替换的方法描述于美国专利No.4,945,050和5,036,006,其都通过引用并入本文。

[0042] 本发明涉及改善的减毒活疫苗,改善的灭活疫苗、和改善的疫苗(其使用重组载体以递送编码抗原的外部基因)、以及亚单位和糖蛋白疫苗。减毒活疫苗、使用重组载体以递送外部抗原的那些疫苗、亚单位疫苗和糖蛋白疫苗的例子描述于美国转利No.:4,510,245;4,797,368;4,722,848;4,790,987;4,920,209;5,017,487;5,077,044;5,110,587;5,112,749;5,174,993;5,223,424;5,225,336;5,240,703;5,242,829;5,294,441;5,294,548;5,310,668;5,387,744;5,389,368;5,424,065;5,451,499;5,453,364;5,462,734;5,470,734;5,474,935;5,482,713;5,591,439;5,643,579;5,650,309;5,698,202;5,955,088;6,034,298;6,042,836;6,156,319和6,589,529,其均通过引用的方式并入本文。

[0043] 当被细胞摄取时,基因构建体可保持在细胞中作为功能染色体外分子和/或整合到细胞的染色体DNA中。DNA可引入细胞中,在该细胞中其保持为一种或多种质粒形式的单独的基因材料。可选择地,可整合到染色体中的线性DNA可引入到细胞中。当将DNA引入细胞中时,可以加入这样的试剂,该试剂促进DNA整合到染色体中。用于促进整合的DNA序列还可包括在DNA分子中。可选择地,RNA可施加至细胞。还涵盖提供基因构建体作为线性微型染色体,包括着丝粒,端粒和复制源。基因构建体可在减毒活微生物或在细胞中存活的重组微生物载体中保持为基因材料的一部分。基因构建体可以是重组病毒疫苗的基因组的一部分,其中基因材料整合到细胞的染色体中或保持染色体外。基因构建体包括核酸分子的基因表达所必需的调节元件。元件包括:启动子、启动密码子、终止密码子和聚腺苷酸化信号。另外,通常需要增强子进行序列的基因表达,所述序列编码靶蛋白或免疫调节蛋白。必需的是这些元件可操作地连接编码期望的蛋白的序列、以及调节元件在施加它们的个体中是可操作的。

[0044] 启动密码子和终止密码子通常被认为是编码期望的蛋白的核苷酸序列的一部分。然而,必需的是这些元件在施加基因构建体的个体中是发挥作用的。启动密码子和终止密码子必须和编码序列在框架内。

[0045] 使用的启动子和聚腺苷酸化信号必须在个体的细胞内是可发挥功能的。

[0046] 用于实施本发明、特别是用于人的基因疫苗的制备的启动子的例子包括但不限于:来自猿猴病毒40(SV40)的启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子,人类免疫缺陷病毒(MV)例如BIV长末端重复(LTR)启动子,莫洛尼氏病毒,ALV,细胞巨化病毒(CMV)例如CMV即刻早期启动子,EB病毒(EBV),劳氏肉瘤病毒(RSV)、以及来自人基因(例如人肌动蛋白,人肌球蛋白,人血红蛋白,人肌肉肌酸和人金属硫蛋白)的启动子。

[0047] 用于实施本发明、特别是用于人的基因疫苗的制备的聚腺苷酸化信号的例子包括但不限于:SV40聚腺苷酸化信号和LTR聚腺苷酸化信号。特别地,使用在pCEP4质粒(Invitrogen, San Diego, CA)中的SV40聚腺苷酸化信号,称为SV40聚腺苷酸化信号。

[0048] 除了DNA表达所需要的调节元件,其他元件也可包含在DNA分子中。这些另外的元件包括增强子。增强子可选自下列组,所述组包括但不限于:人肌动蛋白,人肌球蛋白,人血红蛋白,人肌肉肌酸和病毒增强子例如来自CMV,RSV和EBV的那些。

[0049] 为了保持染色体外构建和在细胞中制备构建体的多个拷贝,基因构建体可设置有复制的哺乳动物源。来自Invitrogen(San Diego, CA)的质粒pVAX1,pCEP4和pREP4含有复制的EB病毒源和核抗原EBNA-1编码区域,该编码区域产生高拷贝的附加型复制而没有整合。

[0050] 在涉及免疫应用的一些优选实施方案中,核酸分子被递送,其包含编码本发明的

蛋白的核苷酸序列,并且另外包含进一步增强针对这些靶蛋白的免疫应答的蛋白的基因。这些基因的例子是:编码其他细胞因子和淋巴因子的那些例如 α -干扰素, γ -干扰素,血小板源生长因子(PDGF),TNF α ,TNF β ,GM-CSF,上皮生长因子(EGF),IL-1,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-10,IL-12,IL-18,MHC,CD80,CD86和IL-15诱导IL-15(具有缺失的信号序列并且任选地包含来自IgE的信号肽)。可使用的其他基因包括编码下列的那些:MCP-1,MIP-1,MIP-1p,IL-8,RANTES,L-选择蛋白,P-选择蛋白,E-选择蛋白,CD34,GlyCAM-1,MadCAM-1,LFA-1,VLA-1,Mac-1,p150.95,PECAM,ICAM-1,ICAM-2,ICAM-3,CD2,LFA-3,M-CSF,G-CSF,IL-4,IL-18的突变形式,CD40,CD40L,血管生长因子,IL-7,神经生长因子,血管内皮生长因子,Fas,TNF受体,F1t,Apo-1,p55,WSL-1,DR3,TRAMP,Apo-3,AIR,LARD,NGRF,DR4,DR5,KILLER,TRAIL-R2,TRICK2,DR6,半胱天冬酶ICE,Fos,c-jun,Sp-1,Ap-1,Ap-2,p38,p65Rel,MyD88,IRAK,TRAF6,IkB,失活NIK,SAP K,SAP-1,JNK,干扰素应答基因,NFkB,Bax,TRAIL,TRAILrec,TRAILrecDRC5,TRAIL-R3,TRAIL-R4,RANK,RANK LIGAND,Ox40,Ox40LIGAND,NKG2D,MICA,MICB,NKG2A,NKG2B,NKG2C,NKG2E,NKG2F,TAP1,TAP2及其功能片段。

[0051] 可加入另外的元件,如果期望为了任何原因除去接受基因构建体的细胞,该元件起到细胞破坏的靶的作用。可表达形式的疱疹病毒胸苷激酶(tk)基因可包含在基因构建体中。药物更昔洛韦可施加至个体并且药物将引起任何产生tk的细胞的选择性杀死,因此提供选择性破坏具有基因构建体的细胞的方式。

[0052] 为了最大化蛋白制备,可选择调节序列,其非常适用于在施用构建体的细胞中基因表达。而且,可选择密码子,其在细胞中最高效地转录。本领域技术人员可制备在细胞中发挥功能的DNA构建体。

[0053] 在一些实施方案中,可提供基因构建体,其中本文中所述的蛋白的编码序列连接IgE信号肽。在一些实施方案中,本文中所述的蛋白连接IgE信号肽。

[0054] 在使用蛋白的一些实施方案中,例如使用熟知的技术,本领域技术人员可使用熟知的技术来制备和分离本发明的蛋白。在使用蛋白的一些实施方案中,例如,本领域技术人员可使用熟知的技术来将编码本发明的蛋白的DNA分子插入在熟知表达系统中使用的市售表达载体。例如,市售质粒pSE420(Invitrogen, San Diego, Calif.)可用于制备E.coli中的蛋白。市售质粒pYES2(Invitrogen, San Diego, Calif.)可例如用于在酵母的S.cerevisiae菌株中制备。市售MAXBAC™完整的杆状病毒表达系统(Invitrogen, San Diego, Calif.)可例如用于在昆虫细胞中制备。市售质粒pcDNA 1或pcDNA3(Invitrogen, San Diego, Calif.)可例如用于在哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢细胞中制备。本领域技术人员可使用这些市售表达载体和系统或其他载体和系统来通过常规技术和容易获得的起始材料制备蛋白。(例如参见Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989), 其通过引用并入本文)。因此,期望蛋白可在真核和原核系统中制备,从而导致蛋白的加工形式的谱。

[0055] 本领域技术人员可使用其他市售表达载体和系统或使用熟知方法和容易获得的起始材料来制备载体。含有需要的控制序列例如启动子和聚腺苷酸化信号、优选增强子的表达系统对于大部分宿主是容易获得的和本领域已知的。例如参见Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)。基因构建体包括可操作地连接启动子的蛋白编码序列,所述启动子在转染构建体

的细胞系中发挥作用。组成型启动子的例子包括来自细胞巨化病毒或SV40的启动子。可诱导启动子的例子包括小鼠乳腺细胞白血病病毒或金属硫蛋白启动子。本领域技术人员可容易地制备用于使用DNA转染细胞的基因构建体,所述DNA编码来自市售起始材料的本发明的蛋白。包含编码蛋白的DNA的表达载体用于转化相容性宿主,所述宿主然后培养并保持在这样的条件,在该条件下发生外源DNA的表达。

[0056] 制备的蛋白通过下列方式从培养基中回收:使细胞胞溶或者使用本领域技术人员意识到和已知的培养基。本领域技术人员可使用熟知技术分离蛋白,所述蛋白使用这些表达系统来制备。使用抗体(如上所述特异性结合特定的蛋白)从天然源纯化蛋白的方法可相同地应用于通过重组DNA方法制备的蛋白的纯化。

[0057] 除了通过重组技术来制备蛋白,还可以使用自动肽合成来产生分离的基本上纯的蛋白。这些技术是本领域技术人员熟知,并且如果在DNA-编码的蛋白制备中未提供具有置换的衍生物。这些技术是有用的。

[0058] 核酸分子可使用数种熟知的技术中的任一者来递送,包括DNA注射(也称为DNA接种),重组载体例如重组腺病毒、重组腺病毒相关的病毒和重组牛痘。

[0059] 施用途径包括但不限于肌肉内、鼻内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及局部、透皮、通过吸入或栓剂、或至粘膜组织例如灌洗阴道、直肠、尿道、面颊和皮下组织。优选的施用途径包括肌肉内、腹膜内、皮内和皮下注射。基因构建体可通过这样的方式来施用,该方式包括但不限于电穿孔方法和装置、传统注射器、无针注射装置或“微弹轰击基因枪法”。

[0060] 优选用于促进DNA疫苗的递送的电穿孔装置和电穿孔方法的例子包括下列中描述的那些:美国专利No.7,245,963(Draghia-Akli, et al.),美国专利公开2005/0052630,由Smith, et al.递交,其内容通过引用全部并入本文。还优选的是,促进DNA疫苗的递送的电穿孔装置和电穿孔方法提供于共同待审和共同拥有的美国专利申请序列No.11/874072中,其提交于2007年10月17日,并且在35USC 119(e)下要求下列的优先权:2006年10月17日提交的美国临时申请序列No.60/852,149和2007年10月10日提交的美国临时申请序列No.60/978,982,其所有通过引用全部并入。

[0061] 下列是使用电穿孔技术的实施方案的例子,并且在上述专利文献中更详细地讨论:电穿孔装置可被构造为以能量脉冲递送至哺乳动物的期望组织,从而产生类似于用户输入的预设电流的恒定电流。电穿孔装置包括电穿孔组件和电极配件或把手配件。电穿孔组件可包括和引入电穿孔装置的多种元件中的一个或多个,包括:控制器、电流波形产生器、阻抗试验器、波形记录仪、输入元件、状态记录元件、通信端口、内存组件、电源和电源开关。电穿孔组件可起到电穿孔装置的一种元件的作用,并且其他元件是和电穿孔组件通信的单独元件(或组件)。在一些实施方案中,电穿孔组件可起到多于电穿孔装置的一个元件的作用,其可通信独立于电穿孔组件的电穿孔装置的甚至其他元件。使用电穿孔技术递送改善的HCV疫苗不受到电穿孔装置的元件的限制,所述电穿孔装置现存为一种机电或机械装置的部分,因为元件可起到和另一种通信的一种装置或单独元件的功能。电穿孔组件能够递送能量脉冲,其在期望组织产生恒定电流并且包括反馈机构。电极配件包括以空间配置具有多个电极的电极阵列,其中电极配件从电穿孔组件接收能量脉冲,并且通过电极将其递送至期望组织。多个电极中的至少一个在能量脉冲的递送过程中是中性的,并且在期

望组织测量电阻和将电阻通信至电穿孔组件。反馈机构可接收测量的电阻,并且可调节由电穿孔组件递送的能量脉冲以保持恒定电流。

[0062] 在一些实施方案中,多个电极可以分散方式来递送能量脉冲。在一些实施方案中,多个电极可以以分散方式通过电极控制在编程程序下递送能量脉冲,并且编程程序由用户输入至电穿孔组件。在一些实施方案中,编程序列包含在程序中递送的多个脉冲,其中多个脉冲中的各脉冲通过至少两个有源电极(其中一个测量电阻的中性电极)来递送,并且其中多个脉冲的随后脉冲通过至少两个有源电极(其中一个测量电阻的中性电极)中的不同的那个来递送。

[0063] 在一些实施方案中,反馈机构通过硬件或软件来进行。优选地,反馈机构通过模拟闭环电路来进行。优选地,该反馈发生每隔50 μ s,20 μ s,10 μ s或1 μ s发生,但优选是实时反馈或瞬时的(即,如通过用于测定应答时间的可得技术所测定的,其基本上是即刻的)。在一些实施方案中,中性电极测量期望组织中的电阻,并且将电阻通信至反馈机构,反馈机构应答于电阻并且调节能量脉冲以使恒定电流保持在类似于预设电流的数值。在一些实施方案中,反馈机构在能量脉冲递送的过程中连续和瞬间地保持恒定电流。

[0064] 在一些实施方案中,核酸分子结合下列物质的施用而递送至细胞:多核苷酸功能增效子或基因疫苗增效剂。多核苷酸功能增效子描述于美国序列号5,593,972,5,962,428和1994年1月26日提交的国际申请序列号PCT/US94/00899,其均通过引用的方式并入本文。基因疫苗增效剂描述于1994年4月1日提交的美国序列号021,579,其通过引用并入本文。结合核酸分子施用的共同药剂可以和核酸分子的混合物的方式来施用,或者在核酸分子施用的同时、之前或之后单独施用。另外,其他药剂可发挥转染剂和/或复制剂和/或消炎剂的作用,并且可和下列物质共同施用:GVF包括生长因子,细胞因子和淋巴因子例如 α -干扰素, γ -干扰素,GM-CSF,血小板源生长因子(PDGF),TNF,表皮生长因子(EGF),IL-1,IL-2,IL-4,IL-6,IL-10,IL-12和IL-15以及成纤维细胞生长因子,表面活性剂例如免疫刺激络合物(ISCMS),弗氏不完全佐剂,LPS类似物包括单磷酸基脂质A(WL),胞壁肽,醌类似物和囊泡例如三十碳六烯和角鲨烯,并且透明质酸也可结合基因构建体施用。在一些实施方案中,免疫调节蛋白可用作GVF。在一些实施方案中,提供和PLG相关的核酸分子以增强递送/摄取。

[0065] 根据本发明的药物组合物包含约1纳克至约2000微克DNA。在一些优选实施方案中,根据本发明的药物组合物包含约5纳克至约1000微克DNA。在一些优选实施方案中,药物组合物含有约10纳克至约800微克DNA。在一些优选实施方案中,药物组合物含有约0.1至约500微克DNA。在一些优选实施方案中,药物组合物含有约1至约350微克DNA。在一些优选实施方案中,药物组合物含有约25至约250微克DNA。在一些优选实施方案中,药物组合物含有约100至约200微克DNA。

[0066] 根据本发明的药物组合物根据使用的施用方式来进行配制。在药物组合物是可注射的药物组合物的情况下,它们是无菌、无热原和无颗粒的。优选使用等渗制剂。通常,用于等渗的添加剂可包括氯化钠、右旋糖酐、甘露醇、山梨糖醇和乳糖。在一些情况下,优选等渗溶液例如磷酸盐缓冲液。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实施方案中,将血管收缩剂加入制剂。

[0067] 根据本发明的一些实施方案,提供诱导免疫应答的方法。疫苗可以是蛋白基、活减毒疫苗、细胞疫苗、重组疫苗或核酸或DNA疫苗。在一些实施方案中,在个体中针对免疫原诱

导免疫应答的方法包括诱导粘膜免疫应答的方法,包括向个体施加下列中的一种或多种:CTACK蛋白,TECK蛋白,MEC蛋白及其功能片段、或其可表达的编码序列,并且联合编码本发明的蛋白的分离的核酸分子、和/或编码本发明的蛋白的重组疫苗、和/或本发明的蛋白的亚单位疫苗、和/或活减毒疫苗和/或灭活疫苗。CTACK蛋白,TECK蛋白,MEC蛋白及其功能片段中的一种或多种可在下列物质施用之前、同时或之后施用:编码免疫原的分离的核酸分子、和/或编码免疫原的重组疫苗、和/或包含免疫原的亚单位疫苗、和/或活减毒疫苗和/或灭活疫苗。在一些实施方案中,向个体施加编码选自下列中的一种或多种蛋白的分离的核酸分子:CTACK,TECK,MEC及其功能片段。

[0068] 在下列实施例中进一步描述了本发明。应该理解,该实施例尽管指出了本发明的实施方案,但是其仅通过示意性的方式给出。从上述讨论和该实施例,本领域技术人员可确定本发明的实质性特性,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可对本发明进行多种改变和变化,以使其适应各种应用和条件。因此,除了本文中示出和描述那些,从前面描述,本发明的各种改变对于本领域技术人员来说是明显的。这些改变也旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0069] 本公开中的美国专利、美国申请和引用文献均通过引用全部并入本文。

[0070] 实施例

[0071] 制备用于人乳头状瘤病毒 (HPV) 病毒蛋白18E6&7的优化的共有序列序列。序列被设计用于高水平的表达。该序列在我们的基因免疫技术中是有用的。源自使用共有序列进行的试验的结果是阳性的。图1提供质粒构建体的描述,其包括质粒pGX3002中共有序列HPV 18-6&7的核酸序列 (SEQ ID NO:7)。引入质粒pGX3002中的共有序列HPV 18-6&7的核酸序列包括连接共有序列HPV 18-6&7的编码序列的IgE前导肽的编码序列。

[0072] 质粒pGX3002表达优化的人乳头状瘤病毒18-6&7抗原 (HPV18E6&7,其使用pVAX骨架由具有牛生长因子3'末端和聚腺苷酸化信号 (bGHpA) 的CMV启动子 (pCMV) 驱动,所述pVAX骨架包括卡那霉素抗性基因 (Kan) 和复制质粒源 (pUC ori)。

元件: 碱基对

CMV 启动子: 137-724

HPV 18-6&7 编码序列: 754-1606

[0073]

bGH PolyA: 1649-1879

Kan 抗性: 2052-2846

pUC Ori: 3145-3818

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学托管会

D·B·韦纳

J·严

<120> 改善的用于人乳头状瘤病毒的疫苗及其使用方法

<130> 133172.02700

<150> US 61/146,942

<151> 2009-01-23

<150> US 12/691,588

<151> 2010-01-21

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 783

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV 共有序列编码E6和E7

<400> 1

```
gccagattcg aggacccac caggagcggc tacaagctgc ccgatctgtg taccgagctg 60
aacaccagcc tgcaggacat cgagatcacc tgtgtgtact gtaagaccgt gctggagctg 120
accgaggtgt tcgagaagga cctgttcgtg gtgtacaggg acagcatccc ccacgccgcc 180
tgccacaagt gtatcgactt ctacagccgg atccgggagc tgagacacta cagcgacagc 240
gtgtacggcg ataccttga gaagctgacc aacaccggcc tgtacaacct gctgatccgg 300
tgcctgagat gccagaagcc cctgctgaga cacctgaacg agaagcggcg gttccacaac 360
atcgccggcc actacagagg ccagtgccac agctgctgta acagggccag gcaggagaga 420
ctgcagcggg gaagagagac ccaggtgagg ggcaggaaga gaagaagcca cggccccaag 480
gccaccctgc aggatatcgt gctgcacctg gagccccaga atgagatccc cgtggatctg 540
ctggggccacg gccagctgtc cgacagcgag gaggagaacg acgagatcga cggcgtgaat 600
caccagcacc tgcctgccag aagagccgag cctcagagge acaccatgct gtgtatgtgc 660
tgtaagtgtg aggcccggat cgaactggtg gtggagagca gcgccgacga cctgagagcc 720
ttccagcagc tgttcctgaa caccctgagc ttcgtgtgtc cttggtgtgc cagccagcag 780
tga 783
```

<210> 2

<211> 260

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有E6和E7的共有HPV肽序列

<400> 2

Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Gly	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Leu
1			5						10					15	
Cys	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr	Cys	Val
		20						25					30		
Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	Asp	Leu
	35						40					45			
Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala	Cys	His	Lys	Cys
	50					55					60				
Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser	Asp	Ser
65				70					75					80	
Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Tyr	Asn
			85					90					95		
Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg	His	Leu
		100						105					110		
Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His	Tyr	Arg	Gly	Gln
	115						120					125			
Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Arg	Arg
	130					135					140				
Arg	Glu	Thr	Gln	Val	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Gly	Pro	Lys
145				150					155					160	
Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Ile	Val	Leu	His	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn	Glu	Ile
			165					170					175		
Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	His	Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu
		180					185					190			
Asn	Asp	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Asn	His	Gln	His	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg
	195						200					205			
Ala	Glu	Pro	Gln	Arg	His	Thr	Met	Leu	Cys	Met	Cys	Cys	Lys	Cys	Glu
	210					215				220					
Ala	Arg	Ile	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala
225				230					235				240		
Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Phe	Val	Cys	Pro	Trp	Cys
			245					250				255			
Ala	Ser	Gln	Gln												
			260												

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgE引导DNA序列

<400> 3

atggactgga cctggatcct gttcctggtg gccgctgcca cacgggtgca cagc 54

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgE引导肽序列

<400> 4

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

1

5

10

15

His Ser

<210> 5

<211> 837

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含IgE的共有HPV核酸序列转基因

<400> 5

atggactgga cctggatcct gttcctggtg gccgctgcca cacgggtgca cagcgccaga 60
 ttcgaggacc ccaccaggag cggctacaag ctgcccagtc tgtgtaccga gctgaacacc 120
 agcctgcagg acatcgagat cacctgtgtg tactgtgaaga ccgtgctgga gctgaccgag 180
 gtgttcgaga aggacctgtt cgtggtgtac agggacagca tccccacgc cgcctgccac 240
 aagtgtatcg acttctacag ccggatccgg gagctgagac actacagcga cagcgtgtac 300
 ggcgataccc tggagaagct gaccaacacc ggctgtaca acctgctgat ccggtgcctg 360
 agatgccaga agcccctgct gagacacctg aacgagaagc ggcggttcca caacatcgcc 420
 ggccactaca gaggccagtg ccacagctgc tgtaacaggg ccaggcagga gagactgcag 480
 cggagaagag agaccaggt gaggggcagg aagagaagaa gccacggccc caaggccacc 540
 ctgcaggata tcgtgctgca cctggagccc cagaatgaga tccccgtgga tctgctgggc 600
 cacggccagc tgtccgacag cgaggaggag aacgacgaga tcgacggcgt gaatcaccag 660
 cacctgcctg ccagaagagc cgagcctcag aggcacacca tgctgtgtat gtgctgtaag 720
 tgtgaggccc ggatcgaact ggtggtggag agcagcgccg acgacctgag agccttcag 780
 cagctgttcc tgaacaccct gagcttcgtg tgtccttggt gtgccagcca gcagtga 837

<210> 6

<211> 278

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有IgE前导肽的共有HPV蛋白序列

<400> 6

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val
1				5					10					15	
His	Ser	Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Gly	Tyr	Lys	Leu	Pro
			20					25					30		
Asp	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr
		35					40					45			
Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys
		50				55					60				
Asp	Leu	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala	Cys	His
65					70					75				80	
Lys	Cys	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser
				85					90					95	
Asp	Ser	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu
				100					105					110	
Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg
				115					120					125	
His	Leu	Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His	Tyr	Arg
				130					135					140	
Gly	Gln	Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln
145					150					155				160	
Arg	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Val	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Gly
					165				170					175	
Pro	Lys	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Ile	Val	Leu	His	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn
				180					185					190	
Glu	Ile	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	His	Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu
				195					200				205		
Glu	Glu	Asn	Asp	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Asn	His	Gln	His	Leu	Pro	Ala
				210					215				220		
Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Gln	Arg	His	Thr	Met	Leu	Cys	Met	Cys	Cys	Lys
225					230					235				240	
Cys	Glu	Ala	Arg	Ile	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Asp	Asp	Leu
					245				250					255	
Arg	Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Phe	Val	Cys	Pro
					260				265					270	
Trp	Cys	Ala	Ser	Gln	Gln										

275

<210> 7

<211> 3824

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有共有序列和IgE前导序列pGX3002质粒

<400> 7

```

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60
atagtaaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120
acttacggta aatggccccgc ctggctgacc gcccacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240
gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggeat tatgcccagt acatgacctt 360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta ccatggtgat 420
gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc 540
aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga 660
aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggg 720
accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaattcgc caccatggac tggacctgga 780
tctgttcct ggtggccgct gccacacggg tgcacagcgc cagattcgag gacccacca 840
ggagcggcta caagctgccc gatctgtgta ccgagctgaa caccagcctg caggacatcg 900
agatcacctg tgtgtactgt aagaccgtgc tggagctgac cgagggtgtc gagaaggacc 960
tgttcgtggg gtacagggac agcatcccc acgccgcctg ccacaagtgt atgacttct 1020
acagccggat ccgggagctg agacactaca gcgacagcgt gtacggcgat accctggaga 1080
agctgaccaa caccggcctg tacaacctgc tgatccgggt cctgagatgc cagaagcccc 1140
tgctgagaca cctgaacgag aagcggcggg tccacaacat cgccggccac tacagaggcc 1200
agtgccacag ctgctgtaac agggccagge aggagagact gcagcggaga agagagacct 1260
aggtgagggg caggaagaga agaagccacg gcccacaggc caccctgcag gatatcgtgc 1320
tgcacctgga gcccagaat gagatccccg tggatctgct gggccacggc cagctgtccg 1380
acagcgagga ggagaacgac gagatcgacg gcgtgaatca ccagcacctg cctgccagaa 1440
gagccgagcc tcagaggcac accatgtgtg gtatgtgctg taagtgtgag gcccggatcg 1500
aactgggtgg ggagagcagc gccgacgacc tgagagcctt ccagcagctg ttctgaaca 1560
ccctgagctt cgtgtgtcct tgggtgtgcca gccagcagtg atgagcggc gctcgagtct 1620
agaggggccc tttaaaccg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct 1680
gttggttgcc cctcccccg gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt 1740
tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcacg tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg 1800
ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg 1860

```

gatgcggtgg gctctatggc ttctactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 1920
 tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtt ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 1980
 tcttgccgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagctc tgatcaagag acaggatgag 2040
 gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 2100
 agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 2160
 tccggctgtc agcgcagggg cgccccgttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc 2220
 tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt 2280
 gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 2340
 tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 2400
 ctgatgcaat gcggcggctg catacgttg atccggtac ctgcccattc gaccaccaag 2460
 cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg 2520
 atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttegccagg ctcaaggcga 2580
 gcatgcccga cggcgaggat ctcgctcgtga cccatggcga tgcttcttg ccgaatatca 2640
 tggtggaana tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2700
 gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgtgta agagcttggc ggcaaatggg 2760
 ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgtccccga ttccgcgcgc atgccttct 2820
 atgccttct tgacgagttc ttctgaatta ttaacgctta caatttctg atgcggtatt 2880
 ttctccttac gcactgtgc ggtatttcac accgcatcag gtggcacttt tcggggaaat 2940
 gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 3000
 agacaataac cctgataaat gcttcaataa tagcacgtgc taaaacttca tttttaattt 3060
 aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 3120
 ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 3180
 ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt 3240
 tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3300
 cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 3360
 gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3420
 gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg 3480
 tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 3540
 ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggccacg tcccgaagg gagaaaggcg 3600
 gacaggatc cggtaaagcg cagggtcggg acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 3660
 ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3720
 tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3780
 ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctt 3824

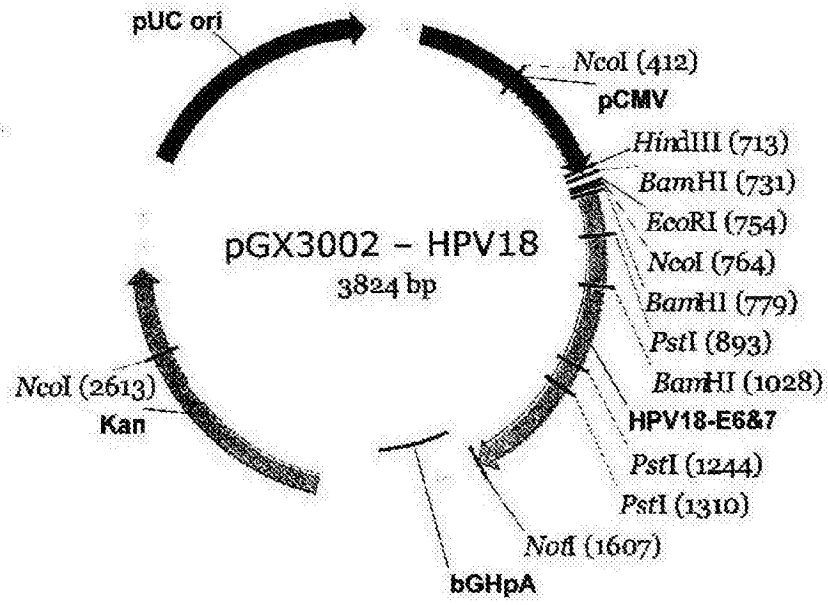


图1