

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/025 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780014385.5

[43] 公开日 2009 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 101426810A

[22] 申请日 2007.4.17

[21] 申请号 200780014385.5

[30] 优先权

[32] 2006.4.21 [33] EP [31] 06360013.4

[86] 国际申请 PCT/EP2007/003367 2007.4.17

[87] 国际公布 WO2007/121894 英 2007.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.21

[71] 申请人 特朗斯吉恩股份有限公司

地址 法国斯特拉斯堡

[72] 发明人 R·鲁克 S·保尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 24 页 序列表 5 页

[54] 发明名称

基于 HPV-18 的乳头瘤病毒疫苗

[57] 摘要

本发明涉及一种组合物在制备预防或治疗由除 HPV-18 之外的至少一种乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的药物中的用途，该组合物包含人乳头瘤病毒 (HPV)-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。本发明对免疫疗法具有特殊兴趣，尤其是在预防或治疗可能引起宫颈上皮内瘤形成 (CIN) 并最终引起宫颈癌的 HPV 持续感染方面。

1. 一种组合物在制备预防或治疗由除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的药物中的用途，该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。
2. 一种组合物在制备治疗由除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的药物中的用途，该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。
3. 一种组合物在诱导针对除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒的免疫反应中的用途，该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。
4. 根据权利要求 1 至 3 任一项的用途，其中所述除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒选自 HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-56、HPV-59、HPV-68、HPV-70 和 HPV-85。
5. 根据权利要求 1 至 4 任一项的用途，其中所述 HPV-18 的一种或多种早期多肽是 E6 多肽、E7 多肽，或 E6 多肽和 E7 多肽。
6. 根据权利要求 5 的用途，其中所述 HPV-18 E6 和/或 E7 多肽是非致癌变体。
7. 根据权利要求 6 的用途，其中所述 HPV-18 E6 多肽的非致癌变体包含与 SEQ ID NO : 1 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 6 的用途，其中所述 HPV-18 E7 多肽的非致癌变

体包含与 SEQ ID NO : 2 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 5 至 8 的任一项的用途, 其中所述 HPV-18 E6 和/或 E7 多肽是修饰的, 以致通过掺入膜锚定序列和分泌序列而固定于细胞膜。

10. 根据权利要求 9 的用途, 其中所述膜锚定序列和/或分泌序列是从狂犬病病毒糖蛋白、HIV 病毒包膜糖蛋白或麻疹病毒 F 蛋白获得的。

11. 根据权利要求 10 的用途, 其中所述 HPV-18 E6 多肽包含与 SEQ ID NO : 3 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 10 的用途, 其中所述 HPV-18 E7 多肽包含与 SEQ ID NO : 4 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列。

13. 根据权利要求 1 至 12 任一项的用途, 其中所述组合物进一步包含细胞因子或编码细胞因子的核酸。

14. 根据权利要求 13 的用途, 其中所述细胞因子是 IL-2。

15. 根据权利要求 1 至 14 任一项的用途, 其中所述编码一种或多种 HPV-18 早期多肽的核酸包括在载体中。

16. 根据权利要求 15 的用途, 其中所述载体是牛痘病毒。

17. 根据权利要求 16 的用途, 其中所述牛痘载体是 MVA 载体。

18. 根据权利要求 17 的用途, 其中所述 MVA 载体包含位于 7.5 K

启动子下的编码 HPV-18 E6 多肽的核酸, 和位于 7.5K 启动子下的编码 HPV-18 E7 多肽的核酸和位于 H5R 启动子控制下的人 IL-2 基因。

19. 根据权利要求 18 的用途, 其中所述编码所述 HPV-18 E6 多肽、所述 HPV-18 E7 多肽的核酸和所述人 IL-2 基因插入 MVA 基因组的缺失 III 区。

20. 根据权利要求 1 至 19 任一项的用途, 其中所述病理状态是 HPV 持续感染、癌症前期或癌症。

21. 根据权利要求 20 的用途, 其中所述 HPV 相关癌症是宫颈癌、肛门癌或口腔癌。

22. 根据权利要求 20 的用途, 其中所述 HPV 相关癌症前期病情是 1、2 或 3 级宫颈上皮内瘤形成(CIN)。

23. 根据权利要求 1 至 22 任一项的用途, 其中所述组合物通过皮下或肌肉途径给予。

24. 根据权利要求 20 至 23 任一项的用途, 其中所述组合物以包含 5×10^5 pfu 至 5×10^7 pfu 牛痘载体的剂量给予。

25. 根据权利要求 24 的用途, 其中所述组合物包含权利要求 17, 18 或 19 限定的 MVA 载体, 和以 5×10^5 pfu 至 5×10^7 pfu 的三个剂量通过皮下途径每隔一星期给予。

基于 HPV-18 的乳头瘤病毒疫苗

本发明涉及一种组合物在制备预防或治疗由除 HPV-18 之外的至少一种乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的药物中的用途，该组合物包含人乳头瘤病毒(HPV)-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。本发明对免疫疗法具有特殊兴趣，尤其是在预防或治疗可能引起宫颈上皮内瘤形成(CIN)并最终引起宫颈癌的 HPV 持续感染中。

乳头瘤病毒是已在很多高等生物，包括人类中鉴定到的小 DNA 病毒（参见例如 Pfister, 1987, in *The papovaviridae: The Papillomaviruses*, Salzman and Howley edition, Plenum Press, New York, p 1-38）。它们与良性到恶性肿瘤的病理状态有关。在良性肿瘤中，病毒基因组是游离型的，而在恶性肿瘤中，HPV DNA 被整合到宿主染色体中(Stoler, 2000, *Int. J. Gynecol. Path.* 19, 16-28)。

乳头瘤病毒具有大约 7900 个碱基对的双链环状 DNA，该 DNA 被蛋白衣壳围绕。该基因组包括含阅读框 E1-E7 的早期(E)区和晚期(L)区。晚期区编码结构 L1 和 L2 蛋白，它们形成病毒衣壳，而早期基因编码主要在细胞核中发现的调节蛋白。E1 编码在病毒基因组维持和复制中重要的两个蛋白。E2 编码调节指导 E6 和 E7 转录的病毒启动子的活化和阻遏蛋白(Bechtold et al., 2003, *J. Virol.* 77, 2021-2028)。E4 编码的蛋白结合和分裂胞质角蛋白网，且可能在病毒成熟中起作用。E5 蛋白的作用仍有争议，其在宿主染色体中病毒整合期间常常丧失表达。癌症相关 HPV 基因型的 E6 和 E7 编码的基因产物参与受感染细胞的致癌性转化(Kanda et al., 1988, *J. Virol.* 62, 610-613; Vousden et al., 1988, *Oncogene Res.* 3, 1-9; Bedell et al., 1987, *J. Virol.* 61, 3635-3640)，这大概是由于这些病毒蛋白分别结合细胞肿瘤抑制基因产物 p53 和成视网膜细胞瘤(Rb)的能力。已经清楚地

确定了参与天然 HPV-16 E6 多肽与 p53 结合的氨基酸残基是从残基 118 至 122(+1 是第一个 Met 残基, 或从优选使用的第二个 Met 残基开始, 从残基 111 至 115) (Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556), 和参与天然 HPV-16 E7 多肽与 Rb 结合的那些残基位于残基 21 至 26 (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446)。这种结合区在 HPV-18 的 E6 和 E7 中也是保守的 (Pirn et al., 1994, Oncogene 9, 1869-1876; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446)。

目前, 已经克隆了 100 个以上人乳头瘤病毒 (HPV) 基因型并进行了测序 (Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path 19, 16-28)。只有 40 个 HPV 基因型感染生殖器粘膜, 其中大约 15 个使女性处于生殖道恶性肿瘤的风险中。更具体地说, 在 70% 以上的侵入性宫颈癌中检测到两个最流行的基因型 - HPV-16 和 HPV-18, 而 HPV-31、HPV-33 和 HPV-45 加起来占到这种情况的 10% (Cohen et al., 2005, Science 308, 618-621)。

尽管存在宫颈筛选程序, 但是根据国际癌症研究机构的资料, 每年全世界近五十万女性被诊断为宫颈癌和 270,000 以上死亡。常规方法仍然是手术和放疗, 但是最近 15 年已经设计了新的疫苗策略, 例如基于肽的疫苗 (Feltkamp et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23, 2242-2249)、病毒样颗粒 (VLP) 疫苗、DNA 疫苗 (Osen et al., 2001, Vaccine 19, 4276-4286; Smahel et al., 2001, Virology 281, 231-238) 和病毒载体疫苗 (EP 462,187, Daemen et al., 2000, Gene Ther. 7: 1859-1866; He et al., 2000, Virology 270, 146-161; Borysiewicz et al., 1996, Lancet 347, 1523-1527)。

从概念上讲, 针对 HPV 疫苗有两个方法: 预防性的和治疗性的。预防性方法设法预防病毒感染, 即在病毒穿透宿主细胞前主要通过诱导中和抗体来阻止病毒。通常, 预防性疫苗靶向在病毒表面表达的衣壳蛋白。它们中大多数依赖于重组产生的 L1 蛋白的 VLP 或最流行的 HPV 类型的 VLP 混合物。Merck 和 GlaxoSmithKline (GSK) 最近已经报

道了成功的 III 期临床试验，在预防特殊类型宫颈癌感染中具有 100% 的功效。在给予 HPV-16 和 HPV-18 VLP 的混合物之后，已描述了针对致癌的 HPV-31 和 HPV-45 基因型的交叉保护 (WO 2004/056389)。然而，预期基于 VLP 的预防性疫苗不能诱导 HPV 感染后发生的病理状态逆转。

治疗性方法设法治疗确定的 HPV 感染，并主要通过诱导细胞免疫反应而诱导 HPV 相关的癌症前期和癌症病理状态逆转。通常，治疗策略依赖于针对 HPV 诱导肿瘤细胞所表达的 E6 和/或 E7 癌蛋白的免疫作用。迄今为止，E6 和 E7 HPV 抗原提供的免疫被认为是基因型特异性的，和目前临床和临床前开发的治疗性疫苗主要集中于最流行的致癌 HPV-16 和相对较少扩展的 HPV-18。

然而，理想的治疗性疫苗应该允许不仅提供针对最流行的 HPV 基因型的保护，而且提供针对参与仍有 30% 宫颈癌的其他较少 HPV 基因型的保护。这可以通过开发针对每种致癌 HPV 基因型的选择性候选疫苗来实现。然而，考虑到管理当局所需临床和临床前开发的成本与接触次要 HPV 基因型的有限数量的患者相比，这个策略可能不是特别有吸引力。

人们可以预料到由于这种感染的慢性和持续的性质、它的高流行性和 HPV 诱导癌症的显著的发病率，HPV 将是持续多年的严重的全球健康威胁因素。因此，需要开发一种提供更宽覆盖范围的疫苗，其能够针对多种 HPV 基因型提供保护和/或治疗，包括除 HPV-18 外的其他次要的和潜在的致癌性 HPV 基因型。

因此，本发明代表了在改善工业化国家以及发展中国家中乳头瘤病毒感染或乳头瘤病毒相关恶性前和恶性损害的预防和治疗方面的显著进步。

如权利要求书中限定的实施方案解决了这个技术问题。

根据下列本发明目前优选实施方案的描述，本发明的其他和更多方面、特征和优点将显而易见。为了公开的目的给出了这些实施方案。

因此，在第一个方面，本发明提供了一种组合物在制备预防或治疗由除 HPV-18 之外的至少一种乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的

药物中的用途，该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。

更特别地，本发明涉及一种组合物在制备治疗由除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的药物中的用途，该组合物包含人 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。本发明还涉及治疗由除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒引起的感染或病理状态的方法，该方法包括给宿主生物施用一种组合物，该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。

贯穿整个申请，本文所使用的术语“一个”和“一种”，除非上下文另外规定，其意思是它们意味着“至少一个(种)”、“至少第一个(种)”、“一个(种)或多种(种)”或“很多”提及的化合物或步骤。例如，术语“一个细胞”包括包含其混合物的很多细胞。更具体地说，“至少一个(种)”和“一个(种)或多种(种)”意思是一个(种)或大于一个(种)的数字，特别优选一个(种)、两个(种)或三个(种)。

本文无论什么地方使用的术语“和/或”包括“和”、“或”和“由所述术语连接的要素的全部或任何其他组合”的意思。

本文使用的术语“大约”或“近”意思是给定值或范围的 20% 以内，优选 10% 以内，和更优选 5% 以内。

术语“氨基酸”和“残基”是同义词。这些术语涉及天然、非天然和/或合成氨基酸，包括 D 或 L 光学异构体、修饰的氨基酸和氨基酸类似物。

在本文中术语“多肽”、“肽”和“蛋白”可以互换使用，是指氨基酸残基的聚合物，其包含由肽键结合的九个或更多个氨基酸。该聚合物可以是线性的、分支的或环状的，和可以包括天然存在的和/或氨基酸类似物，且也可以被非氨基酸间断。作为一般表示，如果氨基酸聚合物长(例如 50 个以上氨基酸残基)，那么优选被称为多肽或蛋白。

在本发明的上下文内，术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷

酸”和“核苷酸序列”可以互换使用，和定义多脱氧核糖核酸(DNA)(例如 cDNA、基因组 DNA、质粒、载体、病毒基因组、分离的 DNA、探针、引物和其任何混合物)或多核糖核酸(RNA)分子(例如 mRNA、反义 RNA)或混合的多核糖核酸-多脱氧核糖核酸的任何长度聚合物。它们包括单链或双链、线性或环状、天然或合成多核苷酸。此外，多核苷酸可以包含非天然存在的核苷酸，例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物(参见 US 5,525,711、US 4,711,955 或 EPA 302 175，如修饰实例)和可以被非核苷酸成分间断。如果存在的话，核苷酸的修饰可以在聚合前或后给予。

如本文使用的术语“包含”当用于限定产品、组合物和发放是，用来指该产品、组合物和方法包括参考化合物或步骤，但是不排除其他的。“基本上由……组成”意思应该排除任何必需意义的其他化合物或步骤。因此，一种组合物基本上由叙述的化合物组成不会排除痕量染污物和药物可接受载体。由……组成意思应该排除超过微量的其他化合物或步骤的成分。例如，当多肽除了叙述的氨基酸序列外，不含任何氨基酸时，则该多肽“由氨基酸序列组成”。当这种氨基酸序列与仅少数(典型地约1至约50个左右另外的残基)另外的氨基酸序列一起存在时，则该多肽“基本上由氨基酸序列组成”。当氨基酸序列至少是多肽的最终氨基酸序列的一部分时，则该多肽“包含”氨基酸序列。这种多肽可以具有几个直至几百个另外的氨基酸残基。这种另外的氨基酸残基可以在多肽运输、促进多肽生产或纯化；尤其是延长半衰期中起作用。同样的情况可以应用于核苷酸序列。

如本文使用的术语“分离的”是指蛋白、多肽、肽或核酸是从其自然环境中纯化的或脱离了其自然环境。术语“纯化的”是指蛋白、多肽、肽或核酸与其天然结合的至少一种其他成分分离。

术语“宿主细胞”应该宽泛理解，不限制组织、器官或分离的细胞中的特殊结构。这种细胞可以是一种独特类型的细胞或一组不同类型的细胞，和包括培养的细胞系、原代细胞和增殖细胞。术语“宿主生物”是指脊椎动物，特别是哺乳动物物种的成员，和尤其是家畜、

运动动物和灵长目动物，包括人。

“HPV”是指“人乳头瘤病毒”。它们的分类基于它们基因组的相关性程度。目前已经鉴定了100个以上HPV基因型和已经根据它们分离的时间顺序对它们进行了编号。按照惯例，如果它们在其基因组含可读框E6、E7和L1的约2000个核苷酸长的部分中享有小于90%的同一性，则两个分离株构成不同的类型。根据可得到的核苷酸序列的比对建立了系统演化树(Van Ranst et al., 1992, J. Gen. Virol. 73, 2653; De Villiers et al., 2004, Virology 324, 17-27)。

本文使用的术语“早期多肽”是指本领域认可的非结构蛋白，优选选自中E1、E2、E4、E5、E6和E7的多肽。在本发明上下文中，包括在根据本发明使用的组合物中的或由包括在组合物中的核酸编码的一种或多种早期多肽来源于HPV-18。术语“来源于”是指分离、克隆、衍生或相关的。因此，根据本发明，一种或多种HPV-18早期多肽可以来源于天然HPV-18早期多肽或其衍生物。“天然HPV-18早期多肽”是指天然来源中发现或分离的蛋白、多肽或肽，与人工修饰的或在实验室人为改变的不同。这种天然来源包括生物样品(例如感染HPV-18的患者血液、血浆、血清、阴道和宫颈液、组织切片、活组织检查、妇科样品)、培养细胞，以及重组材料(例如HPV-18病毒或基因组、基因组或cDNA文库、含HPV-18基因组片段的质粒、HPV-18重组早期多肽等等)。因此术语“天然HPV-18早期多肽”将包括天然存在的HPV-18早期多肽及其片段。该片段优选是至少9个氨基酸残基和包含至少一个免疫原性表位，特别是T表位。这种片段可以单独或组合(例如融合)使用。文献中已经描述了HPV-18早期基因/多肽的核苷酸和氨基酸序列，并且可以从专业数据库获得，例如Genbank登录号分别是NC_001357和X05015。然而，天然早期HPV-18多肽不限于这些示例的序列。实际上，不同HPV-18分离株之间氨基酸序列可以变化，和这种自然范围的遗传变异包括在本发明范围内。

HPV-18早期多肽的衍生物包括相对于天然HPV-18早期多肽包括一种或多种修饰，例如下面限定的那些。修饰可以通过突变和/或添加

化学部分(例如烷化、乙酰化、酰胺化、磷酸化等等)或标记部分而产生。突变包括缺失、置换或添加一种或多种氨基酸残基或这些可能事物的任何组合。当包括几个修饰时,它们可以涉及连续残基和/或非连续残基。可以以本领域技术人员已知的很多方法进行修饰,例如定点诱变(例如使用 Amersham, Les Ulis, 法国的 Sculptor (TM) 体外诱变系统)、PCR 诱变和 DNA 改组。

有利地,修饰的 HPV-18 早期多肽与相应天然 HPV-18 早期多肽在全长氨基酸序列或其较短片段(例如长度至少 9、20、30、40、50、100 个氨基酸)上保留高程度氨基酸序列同一性,同一性优选大于 75%,有利地大于 80%、最好大于 85%,优选大于 90%,更优选大于 95%,更优选大于 97%(例如 100%序列同一性)。两个多肽之间同一性百分比是序列享有相同位置数量的函数,考虑为了获得最佳比对需要引入的缺口数量和每个缺口的长度。本领域可以利用各种计算机程序和数学算法,以确定氨基酸序列之间同一性百分比,例如可在 NCBI 上得到的 W2H HUSAR 软件和 Blast 程序(例如 Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402; Altschul et al., 2005, FEBS J. 272, 5101-5109)。

令人期望地,根据本发明使用的修饰的 HPV-18 早期多肽保留天然 HPV-18 早期多肽的免疫原性活性,例如刺激细胞介导的免疫反应的能力。

在一个实施方案中,该组合物用于治疗由除 HPV-18 外的至少一种 HPV 基因型引起的 HPV 感染和/或病理状态,特别是肛门与生殖道、皮肤或口腔。在一个方面,至少一种人乳头瘤病毒的基因组与编码 E6 或 E7 多肽的 HPV-18 基因组的部分享有小于 90%,有利地小于 87%和期望地小于 86%的核苷酸序列同一性,但是与编码 E6 或 E7 多肽的 HPV-18 基因组的部分享有超过 50%,有利地超过 55%和期望地超过 60%的核苷酸序列同一性。优选它与完整 HPV-18 E6 或 E7 ORF 享有大约 61%到大约 86%的核苷酸同一性。HPV 基因组的各部分之间同一性百分比是两个序列享有的相同位置的数量的函数,考虑为了获得最佳比对需要引入的缺口数量和每个缺口的长度。本领域可利用各种计算机程序和数学

算法确定核苷酸序列之间的同一性百分比。这种 HPV 基因型的代表性实例包括但不限于 HPV-13、HPV-18、HPV-30、HPV-32、HPV-39、HPV-40、HPV-42、HPV-44、HPV-45、HPV-51、HPV-56、HPV-59、HPV-61、HPV-64、HPV-68、HPV-70 和 HPV-85。

优选，除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒选自 HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-56、HPV-59、HPV-68、HPV-70 和 HPV-85 或其任何可能组合，特别优选 HPV-45。文献中已经描述了这些 HPV 基因型的核苷酸和氨基酸序列并可以在专利数据库中获得，如表 I 举例说明。

表 I: Genbank 登录号

HPV18	X05015
HPV39	M62849
HPV45	X74479
HPV51	NC_001533
HPV56	X74483
HPV59	NC_001635 (X77858)
HPV68	X67161
HPV-70	U21941
HPV-85	AF131950

在另一个实施方案中，根据本发明使用的组合物包含或编码 HPV-18 E6 多肽、HPV-18 E7 多肽，或 HPV-18 E6 多肽和 HPV-18 E7 多肽二者。已知以上对 E6 和 E7 多肽转化能力检索的观察结果，优选使用修饰的 HPV-18 E6 和/或 E7 多肽，它们分别是在与细胞肿瘤抑制基因产物 p53 和 Rb 相互作用中所涉及的区域发生突变的非致癌变体。本发明包括与 p53 结合改变或至少显著减少的任何 HPV-18 E6 多肽的用途和/或与 Rb 结合改变或至少显著减少的任何 HPV 18 E7 多肽的用途 (Pirn et al., 1994, Oncogene 9, 1869-1876; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446)。适于本发明目的的

非致癌 HPV-18 E6 变体缺失了位于大约 113 位至大约 117 位的一种或多种氨基酸残基(从天然 HPV-18 E6 多肽的第一个甲硫氨酸残基开始),特别优选完全缺失 113 至 117 位残基(NPAEK)。最优选的 HPV-18 E6 多肽的非致癌变体包含与 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。适于本发明目的的非致癌 HPV-18 E7 变体缺失了位于大约 24 位至大约 28 位的一种或多种氨基酸残基(+1 代表天然 HPV-18 E7 多肽的第一个氨基酸),特别优选完全缺失 24 至 28 位残基(DLLCH)。最优选的 HPV-18 E7 多肽的非致癌变体包含与 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列,或基本上由该序列组成,或由该序列组成。

在优选方面,本发明使用的一种或多种 HPV-18 早期多肽被进一步修饰,以便提高 I 型 MHC 和/或 II 型 MHC 呈递和/或刺激抗 HPV 免疫。HPV-18 E6 和 E7 多肽是核心蛋白,以前已经表明膜呈递允许提高相应 HPV-16 多肽的治疗效能(参见例如 W099/03885)。因此,修饰至少一个 HPV-18 早期多肽以便固定于细胞膜也许是适当的。膜锚定可以通过将膜锚定序列引入,和如果天然多肽缺乏分泌序列(即信号肽)的话,将分泌序列引入 HPV-18 早期多肽而很容易地实现。优选通过引入膜锚定序列和分泌序列修饰 HPV-18 E6 和/或 E7 多肽。膜锚定和分泌序列是本领域已知的。简言之,分泌序列存在于存在或隐匿多肽的膜的 N 末端并启动它们穿过进入内质网(ER)。它们通常包含 15 至 35 个基本上疏水氨基酸,然后被位于 ER 的特异性肽链内切酶除去从而得到成熟多肽。膜锚定序列性质上通常是高度疏水的并用来将多肽固定在细胞膜上(参见例如 Branden and Tooze, 1991, in *Introduction to Protein Structure* p. 202-214, NY Garland)。

可用在本发明的上下文中的膜锚定和分泌序列的选择广泛。它们可以从包含它(例如细胞或病毒多肽)的任何膜锚定和/或分泌多肽获得,例如狂犬病病毒糖蛋白、HIV 病毒包膜糖蛋白或麻疹病毒 F 蛋白的,或可以是合成的。插入根据本发明使用的每个 HPV-18 早期多肽中的膜锚定和/或分泌序列可以是共同或不同的来源。分泌序列优选的插

入位点是翻译起始密码子下游的 N-末端, 和膜锚定序列优选的插入位点是 C 末端, 例如就在终止密码子上游。此外, 可使用接头肽连接分泌序列和本发明使用的 HPV-18 早期多肽, 或连接 HPV-18 早期多肽和膜锚定序列。接头肽是本领域已知的。典型地, 它们含有 2 至 20 个氨基酸, 和包括丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸和/或丝氨酸。

本发明使用的 HPV-18 E6 多肽优选通过插入麻疹病毒 F 蛋白的分泌和膜锚定信号而被修饰, 特别优选包含与 SEQ ID NO : 3 所示氨基酸序列同源或相同的多肽, 或基本上由该序列组成, 或由该序列组成的多肽。任选地或组合地, 本发明使用的 HPV-18 E7 多肽优选通过插入狂犬病病毒糖蛋白的分泌和膜锚定信号而被修饰, 特别优选包含与 SEQ ID NO : 4 所示氨基酸序列同源或相同的多肽, 或基本上由该序列组成, 或由该序列组成的多肽。

在另一个和更优选方面, 也可以通过使用一种或多种免疫增强多肽或编码这种多肽的一种或多种核酸来提高本发明使用的组合物的治疗功效。例如, 将 HPV-18 早期多肽与多肽连接可能是有利的, 例如肌钙网蛋白 (Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678)、结核分枝杆菌热休克蛋白 70 (HSP70) (Chen et al., 2000, Cancer Res. 60, 1035-1042)、泛素 (Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71, 8497-8503) 或细菌毒素, 例如铜绿假单胞菌外毒素 A 的易位结构域 (ETA(dII)) (Hung et al., 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703)。作为选择, 本领域使用的组合物可以进一步包含细胞因子或编码细胞因子的核酸。适当的细胞因子包括但不限于白介素 (IL)-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21 和 IFNg, 特别优选 IL-2。

根据另一个和优选实施方案, 根据本发明使用的组合物包含编码一种或多种如上限定的 HPV-18 早期多肽的核酸。优选的是编码至少下列的核酸:

- o 包含与 SEQ ID NO : 1 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列, 或基本上由该氨基酸序列组成, 或由该氨基酸序列组成的 HPV-18 E6 多肽; 和

o 包含与 SEQ ID NO : 2 或 SEQ ID NO : 4 所示氨基酸序列同源或相同的氨基酸序列, 或基本上由该氨基酸序列组成, 或由该氨基酸序列组成的 HPV-18 E7 多肽。

如果需要, 本发明使用的核酸分子可以被优化以使 HPV-18 早期多肽在特定宿主细胞或生物, 例如人宿主细胞或生物中高水平表达。典型地, 用哺乳动物宿主细胞中更经常使用的编码同一氨基酸的一个或多个密码子取代相当于哺乳动物宿主细胞中很少使用的密码子的一个或多个“天然”(例如 HPV) 密码子来进行密码子优化。这可以通过常规诱变或化学合成技术(例如产生合成核酸)来实现。没有必要取代全部相应于很少使用的密码子的天然密码子, 因为即使部分取代亦可以实现表达增加。此外, 可以进行一些背离严格忠实于优化密码子的衍化以容纳引入限制性位点。

优选, 本发明使用的编码 HPV-18 早期多肽的核酸是适于其在宿主细胞或生物中表达的形式, 意思是编码 E6 多肽的核酸序列和/或编码 E7 多肽的核酸序列位于在宿主细胞或生物中表达所需的一个或多个调控元件的控制下。本文使用的术语“调控元件”是指任何序列允许、有助于或调节核酸在给定宿主细胞中表达的任何序列, 包括核酸或其一种衍生物(即 mRNA)的复制、复制、转录、剪接、翻译、稳定性和/或运输入宿主细胞。本领域技术人员会认识到调控元件的选择可以取决于诸如宿主细胞、载体和期望的表达水平等因素。

启动子特别重要, 本发明包括使用指导核酸在很多类型宿主细胞中表达的组成型启动子, 和仅指导在某些宿主细胞中表达或对特定事件或外部因素(例如温度、营养添加剂、激素或其他配体)作出反应的启动子。文献中广泛描述了合适的启动子, 且更具体地说人们可以引用病毒启动子例如 RSV(鲁斯氏肉瘤病毒)、SV40(猿猴病毒-40)、CMV(巨细胞病毒)和 MLP(主要晚期启动子)启动子。痘病毒载体中使用的优选启动子包括但不限于牛痘启动子 7.5K、H5R、TK、p28、p11 和 K1L, 早期和晚期痘病毒启动子的嵌合启动子, 以及合成启动子, 例如 Chakrabarti 等(1997, Biotechniques 23, 1094-1097)、Hammond 等

(1997, J. Virological Methods 66, 135-138) 和 Kumar 和 Boyle (1990, Virology 179, 151-158) 描述的那些。

本领域技术人员会认识到控制核酸表达的调控元件可以进一步包含用于正常启动、调节和/或终止转录(例如 polyA 转录终止序列)、mRNA 转运(例如核定位信号序列)、加工(例如剪接信号)、稳定性(例如内含子和非编码 5' 和 3' 序列)和翻译(例如三联前导序列、核糖体结合位点、Shine-Dalgarno 序列等等)的另外元件到宿主细胞或生物中。

根据另一个优选实施方案,根据本发明使用的核酸包括在载体中。本文使用的术语“载体”是指病毒以及病毒(例如质粒 DNA)载体,包括染色体外的(例如游离体)、多拷贝和整合型载体(即掺入宿主染色体中的)。本发明范围内特别重要的是基因治疗载体(即其能够将核酸递送到宿主生物中)以及在各种表达系统中使用的表达载体。合适的非病毒载体包括质粒,例如 pREP4、pCEP4 (Invitrogen)、pCI (Promega)、pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840)、pVAX 和 pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746)。合适的病毒载体可以来源于各种不同的病毒(例如逆转录病毒、腺病毒、AAV、痘病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、泡沫病毒等等)。本文使用的术语“病毒载体”包括载体 DNA 以及其产生的病毒颗粒。病毒载体可以是复制型的,或可以是丧失遗传能力的以致成为复制缺陷型的或复制受损的。本文使用的术语“复制型的”包括选择性复制型和有条件复制型病毒载体,其被工程改造而在特殊宿主细胞(例如肿瘤细胞)中更好或选择性地复制。

在一个方面,本发明中使用的载体是腺病毒载体(对于综述,参见 "Adenoviral vectors for gene therapy", 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press)。它可以来源于各种人或动物来源,和可以使用来自腺病毒血清型 1 直至 51 的任何血清型。特别优选的是人腺病毒 2 (Ad2)、5 (Ad5)、6 (Ad6)、11 (Ad11)、24 (Ad24) 和 35 (Ad35)。这种腺病毒可以从美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, Md.) 获得并且一直是描述它们的序列、结构和生产方法,允许本领域技术

人员应用它们的很多出版物的主题(参见例如 US 6,133,028; US 6,110,735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels et al., 5 2003, J. Virol. 77, 8263-8271)。

本发明中使用的腺病毒载体可以是复制型的。很多复制型腺病毒载体的实例是本领域技术人员容易获得的(Hernandez-Alcoceba et al., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis et al., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany et al., 2000, Nature 0 Biotechnology 18, 723-727)。例如,它们可以从野生型腺病毒基因组通过缺失 E1A CR2 结构域(例如 W000/24408)和/或用组织、肿瘤或细胞状态特异性启动子取代天然 E1 和/或 E4 启动子而被工程改造(例如 US5,998,205, W099/25860, US5,698,443, W000/46355, W000/15820 和 W001/36650)。

作为选择,本发明中使用的腺病毒载体是复制缺陷型的(参见例如 W094/28152; Lusky et al., 1998, J. Virol 72, 2022-2032)。优选的复制缺陷型腺病毒载体是 E1 缺陷型的(例如 US 6,136,594 和 US 6,013,638), E1 缺失从大约 459 位延伸至 3328 或从大约 459 位延伸至 3510(参考 GeneBank 中公开的人腺病毒 5 型的序列,登录号 M 73260 和 Chroboczek et al., 1992, Virol. 186, 280-285)。克隆能力可以通过删除腺病毒基因组的另外的部分(全部或部分非必需的 E3 区或其他必需的 E2、E4 区)而进一步提高。核酸的插入可以通过在腺病毒基因组的任何位置同源重组来进行,如 Chartier et al(1996, J. Virol. 70, 4805-4810)描述。例如,编码 HPV-18 E6 多肽的核酸可以插入取代 E1 区,和编码 HPV-18 E7 多肽的核酸可以插入取代 E3 区,反之亦然。

在另一个和优选方面,本发明使用的载体是痘病毒载体(参见例如 Cox et al. in "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press)。它可以从痘病毒科的任何成员获得,尤其是金丝雀痘病毒、禽痘病毒和牛痘病毒,后者是优选的。合适的牛痘病毒包括但不限于 Copenhagen 株(Goebel et al., 1990, Virol.

179, 247-266 and 517-563; Johnson et al., 1993, Virol. 196, 381-401)、Wyeth株和高度减毒的改变的 Ankara (MVA)株 (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16)。MVA 基因组的全序列的确定和与 Copenhagen基因组的比较允许精确鉴定MVA基因组中发生的七个缺失(I至VII) (Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396), 其任何一个都可以用来插入编码 HPV-18 早期多肽的核酸。

本领域技术人员能够理解的许多文件中描述了用于将核酸和表达所需相关调控元件插入痘病毒基因组中的基本技术 (Paul et al., 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini et al., 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; US 4,769,330; US 4,772,848; US 4,603,112; US 5,100,587 and US 5,179,993)。通常,人们通过病毒基因组和携带要插入核酸的质粒中都存在的重叠序列间的同源重组(即期望插入位点的侧翼)来进行。

为了使重组痘病毒仍然有活力和有感染性,优选核酸插入痘病毒基因组的非必需位点。非必需区是非编码基因间隔区或其失活或缺失不明显损害病毒生长、复制或感染的任何基因。人们还可能想到插入必需的病毒位点,只要病毒颗粒生产过程中缺陷功能被反式补充,例如通过使用携带相当于痘病毒基因组中被删除的那些序列的互补序列的辅助细胞系。

当使用 Copenhagen 牛痘病毒时,优选编码 HPV-18 早期多肽的核酸被插入胸苷激酶基因中(tk) (Hruby et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415; Weir et al., 1983, J. Virol. 46, 530-537)。然而,其他插入位点也是合适的,例如血球凝集素基因中 (Guo et al., 1989, J. Virol. 63, 4189-4198)、K1L 位点中、u 基因中 (Zhou et al., 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190)或牛痘病毒基因组左侧末端,这些情况下,文献中已经报道了各种自发或工程改造的缺失 (Altenburger et al., 1989, Archives Virol. 105, 15-27; Moss et al. 1981, J. Virol. 40, 387-395; Panicali et al., 1981, J. Virol. 37, 1000-1010; Perkus et al., 1989, J. Virol.

63, 3829-3836 ; Perkus et al, 1990, Virol. 179, 276-286 ; Perkus et al, 1991, Virol. 180, 406-410)。

当使用 MVA 时, 编码 HPV-18 早期多肽的核酸可以插入鉴定的缺失 I 至 VII 以及 D4R 位点的任一个, 但是优选插入缺失 II 或 III (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 ; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040)。当使用禽痘病毒时, 尽管认为可以插入胸苷激酶基因内, 但是优选编码 HPV-18 早期多肽的核酸被引入位于 ORF 7 和 9 之间的基因间隔区 (参见例如 EP 314 569 和 US 5,180,675)。

如上所述, 本发明使用的组合物可以进一步表达细胞因子的核酸。它可以由编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的载体或可具有相同或不同来源的单独载体携带。

本发明的优选实施方案涉及组合物的用途, 该组合物包含编码位于 7.5 K 启动子下的 HPV-18 E6 多肽, 和位于 7.5K 启动子下的 HPV-18 E7 多肽和位于 H5R 启动子控制下的人 IL-2 基因的 MVA 载体。优选, 编码 HPV-18 E6 多肽、HPV-18 E7 多肽和人 IL-2 的核酸插入 MVA 基因组的缺失 III 区。

此外, 为了保持组合物在动物/人体内降解和/或提高载体转染/感染宿主细胞或生物, 本发明使用的组合物可以包括一种或多种稳定物质, 例如脂质 (例如阳离子脂质、脂质体、如 W098/44143 中描述的脂质)、核酸酶抑制剂、水凝胶、透明质酸酶 (W098/53853)、胶原酶、阳离子聚合物、多糖、螯合剂 (EP890362)。这种物质可以单独或组合 (例如阳离子和中性脂类) 使用。

包含上述核酸或载体的有感染力病毒颗粒可以通过常规方法生产。示例方法包括步骤: (a) 将病毒载体导入合适的细胞系, (b) 在合适的条件下培养所述细胞系, 使得允许产生所述有感染力的病毒颗粒, (c) 从所述细胞系的培养物中回收产生的有感染力的病毒颗粒, 和 (d) 任选纯化所述回收的有感染力的颗粒。

当病毒载体是缺陷型载体时, 通常在互补细胞系中或经使用提供反式无功能病毒基因的辅助病毒生产有感染力的颗粒。例如, 补充 E1

缺失腺病毒载体的合适细胞系包括 293 细胞(Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72)以及 PER-C6 细胞(Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917)。适于繁殖痘病毒载体的细胞是鸟细胞, 且最优选从受精蛋获得的小鸡胚胎制备的原代小鸡胚胎成纤维细胞(CEF)。

可以从培养上清液或从裂解后的细胞回收有感染力的病毒颗粒(例如通过化学方法、冻/融、渗透压休克、mecanic 休克、超声等等)。可以通过连续多轮的噬斑纯化, 然后使用本领域的技术(层析法、氯化铯或蔗糖梯度上超速离心法)而分离病毒颗粒。

本发明还包括已被修饰而允许优先靶向特定靶向宿主细胞的载体或病毒颗粒的用途(参见例如 Wickam et al., 1997, J. Virol. 71, 8221-8229; Arnberg et al., 1997, Virol. 227, 239-244; Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668; W094/10323; W002/96939 和 EP 1 146 125)。靶向载体和病毒颗粒的特征是在其表面存在能够识别和与细胞和暴露表面的成分结合的配体, 例如细胞特异性标记(例如感染 HPV 的细胞)、组织特异性标记(例如宫颈特异性标记), 以及病毒(例如 HPV)抗原。合适的配体实例包括针对 HPV 抗原结构域的其抗体或片段。该配体通常遗传插入病毒表面上存在的多肽中(例如腺病毒纤维、五邻体、pIX 或牛痘 p14 基因产物)。

本发明使用的组合物可以通过任何合适的方法生产, 例如标准指导肽合成技术(例如 Bodanszky, 1984 in Principles of peptide synthesis, Springer-Verlag)和在适当的宿主细胞中重组 DNA 技术。例如, 可以从含 HPV 的细胞、cDNA 和基因组文库、病毒基因组或已知包括它的任何现有载体, 通过常规分子生物学或 PCR 技术直接分离编码 HPV-18 E6 和 E7 早期多肽的核酸。如果需要, 可以通过常规诱变技术进一步修饰它。作为选择, 本发明使用的核酸还可以以自动方法通过化学合成产生(例如 Edge, 1981, Nature 292, 756; Nambair et al., 1984, Science 223, 1299; Jay et al., 1984, J. Biol. Chem. 259, 6311)中描述的从重叠合成寡核苷酸组配)而产生。本领域技术人

员熟知可用于在适当的宿主细胞生产 HPV-18 早期多肽的许多表达系统和将载体或有感染力的病毒颗粒导入宿主细胞的方法。

根据本发明组合物的优选用途是治疗各种疾病和病理状况，尤其是与由上列至少一种 HPV 基因型引起的 HPV 感染相关的。尽管本发明也包括预防，但是它特别是对治疗有用，例如治疗感染 HPV 的患者可能发展成的 HPV 持续感染、癌症前期以及癌症。HPV 相关癌症的实例包括宫颈癌、肛门癌和口腔癌。HPV 相关癌症前期病情是从包括 1、2 或 3 级宫颈内上皮细胞的瘤形成(CIN)的低度到高度损害迁延而来。

优选，在根据本文描述的形式给予宿主生物时，本发明的组合物对所治疗宿主生物提供治疗益处。治疗益处可以通过与治疗前相比的很多方法证明，例如在群体水平，通过 HPV 感染频率下降，典型地与 HPV 感染相关的病理状态发展延缓(例如 CIN 损害或宫颈癌发展延缓)，或在个体水平，通过 HPV 病毒血症降低、和/或病毒基因表达抑制(例如表达 HPV E6 或 E7 的 RNA 降低)和/或临床后果改善(例如 HPV 相关损害稳定、部分或全部逆转)和/或刺激免疫系统引起抗 HPV 反应增强发生，无论反应是体液反应或细胞反应或二者都有(例如产生抗 HPV 抗体和/或 T 细胞介导的免疫)和/或宿主生物对常规治疗的反应改善。例如，当给予 HPV 阳性女性时，根据本发明使用的组合物提供益处，(i) 一次或多次阳性检测后，HPV 检测结果阴性，(ii) 高度 CIN2/3 损害逆转至低度 CIN 1 或 (iii) 侵入性宫颈癌稳定或逆转。推荐治疗后常规随访患者最少 6 个月以上。

可以测定生物流体(例如阴道或宫颈流体、血液、血清、血浆)、使用常规宫颈取样装置收集的妇科样品、组织切片和活组织检查中 HPV 的存在。本领域技术人员可以利用各种方法评价样品中 HPV DNA 和 RNA 的存在，例如 LiPA 系统(W099/14377; Labo Biomedical products, Netherlands)、Pre Tect HPV Proofer(NorChip AS, Norway)、Hybrid Capture II 系统(Digene Corp, USA)、Thin Prep 系统(Cytoc Corporate; Marlborough, MA)和 PCR/RT-PCR 系统。合适的引物是本领域技术人员已知的，或可以根据感兴趣 HPV 基因型的

核苷酸序列而容易地合成。人们也可以使用合适的抗体用免疫原性试验(例如 ELISA)来进行。HPV 诱发的损害逆转或稳定可以通过测定一段时间内损害的实际大小来确定。可以使用直接观察法(例如阴道镜检查)、放射成像法、免疫成像法或超声来估计损害随着时间改变的大小。此外,为了预测宿主生物中 HPV 相关损害的稳定或逆转,可以使用各种体外方法,例如细胞学和组织学分析,以评估不正常细胞的存在。抗 HPV 免疫反应的刺激可以通过很多常规技术来估计,例如如下在该组合物用于诱导或刺激免疫反应方面描述的那些。

适当地,本发明的组合物进一步包含药物可接受载体以提供药物组合物。本文使用的“药物可接受载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、助剂、分散剂、包衣、抗菌剂、抗真菌剂和吸收延迟剂等等。组合物中包括的药物可接受载体还应该允许保持它在制造和长期保存(即至少一个月)条件下在冰冻(例如 -70°C 、 -20°C)、冷藏(例如 4°C)或环境温度(例如 20°C)或冻干状态下的稳定性。

为了适于生理或略碱性 pH 下(例如大约 pH 7 至大约 pH 9 之间)供人使用,适当地缓冲本发明使用的组合物。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液(例如 PBS)、碳酸氢盐缓冲液和/或 Tris 缓冲液。

此外它可以包含适于人或动物使用的稀释剂。这种稀释剂优选是等渗、低渗或弱高渗的,并且具有相对低的离子强度。代表性的实例包括无菌水、生理盐水(例如氯化钠)、林格氏溶液、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、Hank's 溶液及其他生理平衡盐水溶液(参见例如最近的版本 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins)。

该组合物还可以含有提供期望的药物或药物动力特性的其他药物可接受赋形剂,包括例如改变或维持渗透压度、粘性、透明度、颜色、无菌、稳定性、制剂的溶解速度,改变或维持释放或吸收入人或动物体,促进通过血液屏障转运或渗透入特定的器官(例如肝)。合适的赋形剂包括氨基酸。

此外,该组合物可以与适于在人的全身或粘膜应用的常规佐剂组合。

该组合物可以通过各种给药方式给予宿主生物,包括全身、局部和定位给予。合适的给药途径包括但不限于皮下、真皮内、肌肉、静脉内、腹内、肿瘤内、血管内和动脉内注射。可以用常规注射器和针,或本领域可利用的任何其他合适装置进行注射。作为选择,可以通过粘膜途径给予组合物,例如口/消化道、鼻、气管内、肺内、阴道内或肛门内途径。也可以使用透皮方法(例如贴剂等等)进行局部化给药。在本发明的上下文中,肌肉和皮下给药构成优选途径。可以单剂量或以一天到一年间变化的一定时间间隔重复一次或数次的剂量进行给药。最好,间隔是一周至一月。

适当的剂量可以根据各种参数的作用改变,尤其是给药方式;所使用的组合物;宿主生物的年龄、健康和体重;症状的性质和程度;同时进行治疗类型;治疗的频率;和/或预防或治疗的需要。专业人员可以根据有关情况常规进一步细化测定适当剂量所需的计算。作为一般的指导,含牛痘组合物的合适剂量从大约 10^4 至 10^9 pfu(噬斑形成单位)变化,期望从大约 10^5 至 10^8 pfu,而含腺病毒的组合物从大约 10^5 至 10^{13} iu(感染单位)变化,期望从大约 10^7 至 10^{11} iu。基于载体质粒的组合物可以以 $10\mu\text{g}$ 至 20mg 的剂量给予,有利地 $100\mu\text{g}$ 至 2mg 。蛋白组合物可以以 10ng 至 20mg 的剂量给予,特别优选每公斤体重大约 $0.1\mu\text{g}$ 至大约 2mg 的剂量。

在优选实施方案中,本发明使用的组合物包含上述 MVA 载体,并以 5×10^5 pfu 至 5×10^7 pfu 的三个剂量每隔一星期通过皮下途径给予。

如果期望,本发明的应用可以与一种或多种常规治疗形式(例如放疗、化疗和/或手术)一起进行。多种治疗方法对患者提供了广泛的干预。在一个实施方案中,本发明的方法可以在 HPV 相关损害手术切除(例如宫颈锥切术)之前,或优选在其后。在另一个实施方案中,它可以在放疗(例如 γ 辐射)之前或之后。本领域技术人员可以容易地制定适当的放疗规程和可以使用的参数(参见例如 Perez and Brady, 1992,

Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co; 使用对本领域技术人员显而易见的适当改变和改进)。在又一实施方案中,本发明的方法或应用与含有常规用来治疗或预防 HPV 感染、HPV 相关病理状态的一种或多种药物的化疗联合。

该组合物还可以与其他 HPV 多肽联合使用,例如 HPV-16 的一种或多种早期多肽,期望地优选如本领域所述修饰为非致癌性和膜呈递的 HPV-16 E6 和/或 E7 多肽(参见 W099/03885)。这种包含 HPV-16 和 HPV-18 的 E6 和/或 E7 多肽或编码 HPV-16 和 HPV-18 的 E6 和/或 E7 多肽的核酸的组合物尤其可以用于治疗由除了 HPV-16 和 HPV-18 之外的至少一种乳头瘤病毒引起的感染或病理状况,例如除 HPV-39、HPV-45 HPV-51、HPV-56、HPV-59、HPV-68、HPV-70 和 HPV-85 任一种之外的 HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-52、和 HPV-58 中任一种,或其任何组合(例如 HPV-31 和 HPV-45)。

在另一个实施方案中,按照初次加强治疗形式进行本发明的应用,该形式包括连续给予一种或多种致敏组合物和一种或多种加强组合物。典型地,致敏和加强组合物使用包含或编码至少共同免疫原性结构域的不同载体。致敏组合物初次给予宿主生物和在一天至十二个月内变动的一段时间将加强组合物随后给予。此外,可以在相同部位或可替换部位通过相同途径或通过不同给药途径给予致敏和加强组合物。例如,可以通过粘膜途径给予基于 HPV-18 早期多肽的致敏组合物,而优选注射基于核酸载体的加强组合物,例如皮下注射 MVA 载体,肌肉注射 DNA 质粒和腺病毒载体。

本发明还涉及一种组合物诱导或刺激针对除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒的免疫反应的用途,该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。本发明还涉及在哺乳动物中诱导或刺激针对除 HPV-18 之外的至少一种人乳头瘤病毒的免疫反应的方法,该方法包括给该哺乳动物施用一种组合物,该组合物包含 HPV-18 的一种或多种早期多肽或编码 HPV-18 的一种或多种早期多肽的核酸。优选该免疫反应是针对 HPV 早期多肽的细胞免

疫反应, 优选 CD4⁺、CD8⁺, 或 CD4⁺和 CD8⁺介导的免疫反应。

可以使用本领域标准的各种测定法在体外或体内评价给予动物或人体时诱导或刺激抗 HPV 免疫反应的能力。评价免疫反应开始和刺激的可利用的技术的一般描述, 参见例如 Coligan 等(1992 and 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health)。细胞免疫的测量可以通过下述进行, 测量活化效应细胞包括来源于 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的效应细胞分泌的细胞因子谱(例如通过 ELIspot 定量产生 IL-10 或 IFN γ 的细胞), 测定免疫效应细胞的活化状态(例如通过经典的 [³H] 胸苷摄取进行的 T 细胞增殖测定), 测定致敏受试者中的抗原特异性 T 淋巴细胞(例如细胞毒性测定中的肽特异性裂解), 例如通过 ⁵¹Cr 释放测定确定的淋巴细胞介导的抗肿瘤活性。可以通过抗体结合和/或竞争结合(参见例如 Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press)或通过体外产生肿瘤特异性抗体介导的细胞生长抑制来确定刺激体液反应的能力(Gazit et al., 1992, *Cancer Immunol. Immunother* 35, 135-144)。还可以在用适当的肿瘤诱导剂(例如表达 HPV-18 E6 和 E7 的 TC1 细胞)攻击的动物模型中测定抗肿瘤活性从而进一步验证本发明的方法, 反映了诱导或刺激抗-HPV 免疫反应。

已经以说明性方式描述了本发明, 应理解所使用的术语旨在具有描述的词语的性质, 而不是限制。显而易见, 根据上述教导可能对本发明进行多种改进和改变。因此应理解在所附权利要求的范围内, 可以用与本文具体描述的方式不同的方式实施本发明。

以上引用的全部专利、出版物和数据库项目以其整体具体地引入本文作为参考, 达到如同每篇单独的该专利、出版物或项目具体和逐一被指出而引入作为参考的程度。

下列实施例用来举例说明本发明。

实施例

实施例 1: 表达 HPV-18 E6 和 E7 多肽的病毒的构建

根据 Maniatis 等 (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY) 详述的普通遗传工程和分子克隆技术或当使用商业试剂盒时根据厂家的建议进行如下所述的构建。PCR 扩增技术是本领域技术人员已知的 (参见例如 PCR protocols-A guide to methods and applications, 1990, published by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press)。根据本领域上面引用文件种的常规技术和 Mackett 等 (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) 和 Mackett 等 (1984, J. Virol. 49, 857-864) 实施重组牛痘病毒的构建。使用大肠杆菌的选择基因 gpt (黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶) (Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) 利于重组牛痘病毒的选择。

可以如 W099/03885 和 US 6,884,786 (描述了表达 HPV-16 E6 和 E7 多肽的膜锚定和非致癌变体的 MVATG8042) 描述构建表达 HPV-18 E6 和 E7 多肽的膜锚定和非致癌变体的重组 MVA 病毒 (E6*TMF 和 E7*TMR)。优选, 两条 HPV-18 基因序列都位于 p7.5K 启动子控制下并插入 MVA 基因组的 III 切除区。如果构建体包括免疫增强基因, 优选给予由 H5R 启动子驱动的 IL-2 基因。所产生的构建体命名为 MVA-HPV-18。

可以根据常规方法在 CEF 细胞中产生 MVA-HPV-18 的病毒颗粒。病毒原液保持在 -80°C 直到注射那天。快速融解病毒悬液, 和为了得到 $100\ \mu\text{l}$ 体积中 5×10^7 pfu 的病毒剂量, 给药前在合适的缓冲液中稀释, 该缓冲液含有例如 Tris-HCl 10 mM pH8, 蔗糖 5% (w/v), 和 50 mM NaCl。

实施例 2: HPV-18 E6 和 E7 多肽提供的交叉反应性

可以在从如下所述用 MVATG HPV-18 免疫的小鼠获得的脾细胞上进行 IFNg ELISPOT 试验, 估计交叉反应性。

使用 HUSAR 多序列比对程序 (CLUSTAL) (<https://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/cgi-bin/w2h/w2h.start>) 比对来自不同 HPV 基因型的 E6 和 E7 氨基酸序列。

可以使用因特网 (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) 上可得到的 BIMAS 肽结合软件鉴定预测的 T 细胞识别肽 ($H2^b$ 限制)。结合得分等于或超过用本领域描述的参照肽获得的得分的被 E7 特异性 CTL 识别的肽将被进一步分析。选择相对于 HPV-18 E6 和 E7 多肽氨基酸序列显示出一个或两个氨基酸差异的多肽进行这种交叉反应性分析。可以通过常规合成技术合成所选择的肽, 并可以如下测定它们与从 HPV-18 E6 和 E7 多肽免疫小鼠得到的脾细胞交叉反应的能力。

从商业供应商获得 SPF 健康雌性 C57B1/6 小鼠并在控制条件(单独的、独占的房间, 有空调以提供最少每小时 11 次空气变换, 温度和相对湿度范围分别在 18°C 至 22°C 和 40 至 70% 以内。光源自动控制以产生 12 小时白天和 12 小时黑夜的周期。贯穿本研究, 提供随意可得的食物和水)下饲养。

从商业供应商获得并在上述限定条件下饲养的七周龄无特殊病原体 (SPF) C57B1/6 雌性小鼠可以在第 0、7 和 14 天用 5×10^7 pfu 的 MVATGN33 或 MVATG HPV-18 皮下免疫 3 次。优选每次在动物右侧的不同部位进行皮下注射。在最后一次免疫后的第 24 天取出脾脏。可以使用本领域常规方法制备新鲜脾细胞。

可以用含 $3 \mu\text{g/ml}$ 大鼠抗小鼠 IFN γ 单克隆抗体(克隆 R4-6A2; Pharmingen, 目录号 551216, $100 \mu\text{l}$ /孔)的碳酸钠缓冲液包被 96 孔硝化纤维素板。该板可以在 4°C 孵育过夜或 37°C 孵育 1 小时。板可以用 DMEM 10% FCS 洗涤三次, 并用 $100 \mu\text{l}$ DMEM 10% FCS/孔在 37°C 浸透 2 小时。脾细胞可以以 10^6 细胞/ $100 \mu\text{l}$ 的浓度铺板。可以向孔中添加浓度为 6U/ $50 \mu\text{l}$ /孔的 IL-2 (R & D Systems; 10ng/ml)。通常使用伴刀豆球蛋白 A 作为阳性对照 ($5 \mu\text{g/ml}$)。

可以合成预测的带有 T 表位的肽, 并以 10mg/ml 提供于 DMSO 中, 4°C 保存。使用 HPV-18 参照肽作为阳性对照和不相关肽作为阴性对照。可以向孔中添加浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 的肽并在 37°C , 5% CO_2 下孵育 48 小时。

用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤一次和用 $0.05\% \text{ PBS-吐温}$ 洗涤五次后, 可以添加浓度为 $0.3 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /孔的生物素化的抗小鼠 IFN γ (克隆 XMG1.2, Pharmingen) 并在室温下缓慢搅动孵育 2 小时。板用 $0.05\% \text{ PBS-吐温}$ 洗涤 5 次。还可以向孔中添加以 $1/5000$ 稀释于 $0.05\% \text{ PBS-吐温-FCS}1\%$ 中的 Extravidin AKP (Sigma, St. Louis, MO) ($100 \mu\text{l}$ /孔)。该板在室温下孵育 45 分钟, 然后用 $0.05\% \text{ PBS-吐温}$ 洗涤 5 次。用 Biorad 试剂盒可以揭示 IFN γ 分泌。每孔可以添加 $100 \mu\text{l}$ 底物 (NBT+BCIP) 并将板留在室温下 0.5 小时。该板可以用水洗涤并在室温下干燥过夜。可以使用 Elispot reader Bioreader 4000 Pro-X (BIOS YS-GmbH; Serlabo France) 计数斑点。

可以预期在 HPV-18 参照肽存在下的免疫脾细胞培养物刺激 IFN γ 产生, 而在脾细胞培养物中添加非交叉反应肽 (诸如不相关肽) 没有明显的作用 (IFN γ 的产生低于基础水平)。当非 HPV-18 肽被免疫小鼠的 CTL 识别时显示交叉反应性, 提示用 HPV-18 E6 和/或 E7 多肽或表达载体 (例如 MVATG HPV-18) 接种也可以有效治疗其他的 HPV 基因型感染。

<110> TRANSGENE S.A.

<120> 基于 HPV-18 的乳头瘤病毒疫苗

<130> TG175

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列<220> <223>HPV-18 E6 多肽的非致癌变体

<400> 1

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 Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala
50 55 60

Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr
85 90 95

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100 105 110

Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His
115 120 125

Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg
130 135 140

Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150

<210> 2
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列<220> <223>HPV-18 E7 多肽的非致癌变体

<400> 2

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 Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu
20 25 30

Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg
35 40 45

Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu
50 55 60

Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala
65 70 75 80

Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys
85 90 95

Ala Ser Gln Gln

100

<210> 3

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列<220> <223>HPV-18 E6 多肽的膜呈递、非致癌变体

<400> 3

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Met Ala Arg Phe
20 25 30

Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr Glu
35 40 45

Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys
50 55 60

Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala Phe Lys Asp Leu
65 70 75 80

Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala Cys His Lys Cys
85 90 95

Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp Ser
100 105 110

Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn
115 120 125

Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Leu Arg His Leu
130 135 140

Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln
145 150 155 160

Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg
165 170 175

Arg Glu Thr Gln Val Gly Leu Ser Ser Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu
180 185 190

Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys
195 200 205

Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val Gly Met Ser
210 215 220

Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val
225 230 235 240

Arg Ser Leu

- <210> 4
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> 人工序列<220> <223>HPV-18 E7 多肽的膜呈递、非致癌变体
- <400> 4

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Met His Gly Pro Lys Ala Thr
20 25 30

Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val
 35 40 45

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

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

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

Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn
 100 105 110

Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln Arg Ser Tyr
 115 120 125

Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
 130 135 140

Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His
 145 150 155 160

Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly
 165 170 175

Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg
 180 185 190

Leu