

Настоящее изобретение относится к вакцинам против вируса папилломы человека (HPV).

Предшествующий уровень техники

Вирусы папилломы представляют собой небольшие ДНК-содержащие опухолевые вирусы, которые являются высоко видоспецифичными. К настоящему времени описано свыше 100 индивидуальных генотипов вируса папилломы человека (HPV). HPV, как правило, специфичны в отношении кожи (например HPV-1 и -2) или поверхностей слизистых оболочек (например, HPV-6 и -11) и обычно вызывают доброкачественные опухоли (бородавки), которые сохраняются в течение нескольких месяцев или лет. Такие доброкачественные опухоли могут беспокоить индивидов, но не представляют угрозу для жизни, за редким исключением.

Некоторые HPV также ассоциированы с раком и известны как онкогенные HPV-типы. Самая сильная положительная взаимосвязь между HPV и раком у человека представляет собой взаимосвязь, существующую между HPV-16 и HPV-18 и раком шейки матки. Рак шейки матки представляет собой наиболее распространенную злокачественную опухоль в развивающихся странах, причем ежегодно в мире возникает 500000 новых случаев.

Другие HPV-типы, которые могут вызвать рак, представляют собой типы 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 (названные как "онкогенные типы HPV"). Типы 16 и 18 представляют собой типы, которые имеют наибольшую взаимосвязь с раком шейки матки. Типы 31 и 45 представляют собой типы, которые имеют наибольшую взаимосвязь с риском возникновения рака (Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S. et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. N Engl J Med 2003; 348: 518-27).

Предположили, что вирусоподобные частицы (VLP) HPV представляют собой потенциальные вакцины для лечения HPV. Исследования на животных показали, что VLP не обеспечивают перекрестный иммунитет против инфекции, вызванной другими типами HPV- смотри, например, Suzich, J. A., et al., Proc Natl Acad Sci, 92: 11553-11557, 1995, и Breitburd, Seminars in Cancer Biology, vol. 9, 1999, pp. 431-445.

В WO 2004/056389 раскрыто, что вакцина на основе VLP HPV 16, 18 может обеспечить перекрестный иммунитет против инфекции, вызванной HPV-типами, отличными от 16 и 18. Статистически значимый иммунитет обнаружен против некоторых групп HPV-типов. Однако уровень перекрестного иммунитета против индивидуальных типов в группах не был раскрыт.

Все еще сохраняется потребность в вакцине, которая защищает от множества HPV-типов.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к мультивалентной HPV-вакцине, содержащей белок L1 или его иммуногенный фрагмент из по меньшей мере 3 различных онкогенных HPV-типов, включающих HPV 16 и HPV 18, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV-типа, выбранного из перечня, состоящего из HPV 31, HPV 45, HPV 52 или любой их комбинации.

Настоящее изобретение также относится к применению композиции, содержащей белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 16 и HPV 18, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванных одной или более чем одной группой, состоящей из HPV31, HPV45 и HPV52.

Настоящее изобретение также относится к применению композиции, содержащей белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 16 и HPV 18, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения цитологических аномалий и/или снижения частоты цитологических аномалий и/или предупреждения поражений, представляющих собой интраэпителиальный рак шейки матки (cervical intra-epithelial neoplasia, CIN) (ASCUS, CIN 1, CIN 2, CIN, рак шейки матки) у индивида, где аномалии или поражения вызваны по меньшей мере одним HPV-типом, отличным от HPV 16 или HPV 18, соответственно вызванных HPV-типом 31, или 45, или 52, или их комбинацией.

Данное изобретение также относится к способу предупреждения и/или лечения инфекции HPV и/или заболевания, включающему доставку индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, содержащей белок L1 или его иммуногенный фрагмент из по меньшей мере 3 различных онкогенных HPV-типов, включающих HPV 16 и HPV 18, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV-типа, выбранного из перечня, состоящего из HPV 31, HPV45, HPV 52 или любой их комбинации.

Данное изобретение также относится к применению мультивалентной композиции в изготовлении лекарственного средства для предупреждения и/или лечения инфекции HPV и/или заболевания, где мультивалентная композиция содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из по меньшей мере 3 различных онкогенных HPV-типов, включающих HPV 16 и HPV 18, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV-типа, выбранного из перечня, состоящего из HPV 31, HPV 45, HPV 52 или любой их комбинации, и где лекарственное средство обеспечивает иммунитет против инфекции и/или заболевания, вызванных HPV-типом, не включенным в вакцину.

Данное изобретение также относится к способу изготовления вакцины, включающему объединение белка L1 или его иммуногенного фрагмента из по меньшей мере 3 различных онкогенных HPV-типов, включающих типы HPV 16 и HPV 18, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV-типа, выбранного из перечня, состоящего из HPV 31, HPV 45, HPV 52 или любой их ком-

бинации.

Подробное описание изобретения

Общая информация о существовании перекрестного иммунитета, обеспечивающего HPV 16 и HPV 18 против эпизодической и хронической инфекции, оцениваемого в отношении некоторых групп HPV-типов, раскрыта в WO 2004/056389.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что перекрестный иммунитет против некоторых (отличных от HPV 16, HPV 18) HPV-типов (оцениваемый по эффективности вакцины на основе HPV 16 и HPV 18 против этих типов) выше, чем против некоторых других (отличных от HPV 16, HPV 18) HPV-типов. Перекрестный иммунитет можно рассматривать как иммунитет, обеспечиваемый вакциной, содержащей один HPV-тип, против инфекции (эпизодической или хронической) и/или заболевания, вызванных другим HPV-типом. Перекрестный иммунитет можно оценить с учетом эффективности вакцины (Э.В.), где Э.В. представляет собой % улучшения защиты против инфекции или заболевания с помощью вакцины по сравнению с группой плацебо для данного типа.

Инфекция может быть эпизодической или хронической. Заболевание может представлять собой аномальную цитологию, атипичные плоские клетки невыясненной этиологии (ASCUS), CIN1, CIN2, CIN3 или рак шейки матки, связанный с HPV-инфекцией. Инфекцию можно оценить, например, путем полимеразной цепной реакции (ПЦР). Заболевание можно оценить путем гистологического исследования или анализа биомаркеров, таких как p16.

Такое обнаружение имеет потенциальное значение для разработки вакцины. Например, уровень перекрестного иммунитета, обеспечивающего вакцинами, содержащими L1 HPV 16 и HPV 18, против некоторых других HPV-типов, таких как HPV 31, HPV 45 и HPV 52, дает возможность не включать компоненты L1 этих HPV-типов в вакцину, содержащую HPV 16 и HPV 18, в то же время обеспечивая получение вакцины, обеспечивающей некоторый иммунитет против эпизодической и/или хронической инфекции и/или заболевания, связанного с данными типами, не включенными в вакцину.

После HPV-типа 16 (обнаруженного в 53,5% рака шейки матки) и 18 (обнаруженного в 17,2% рака шейки матки) типы 45 (6,7%) и 31 (2,9%) представляют собой следующие наиболее важные с точки зрения частоты их встречаемости при раке шейки матки (Munoz et al., выше). Далее следует HPV 33 (2,6%), затем HPV 52 (2,3%). Таким образом, при разработке мультивалентной HPV-вакцины против рака шейки матки, содержащей по меньшей мере 3 HPV-типа, специалист в данной области техники, как правило, включил бы типы 31 и 45 после типов 16 и 18, исходя из статистической картины.

Возможность не включать в вакцину антигены из некоторых HPV-типов потенциально дает возможность для включения белка L1 из других HPV-типов или действительно антигенов из других вирусов или патогенов в вакцину в том случае, когда общее количество антигена в вакцине может быть ограничено, например, ввиду физических, химических, регуляторных или других ограничивающих факторов.

В частности, другие HPV-типы включают онкогенные HPV-типы, такие как HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68.

Настоящее изобретение относится к мультивалентной HPV-вакцине, содержащей белок L1 или его иммуногенный фрагмент из по меньшей мере 3 различных онкогенных HPV-типов, включающих HPV 16 и HPV 18, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV-типа, выбранного из перечня, состоящего из HPV 31, HPV 45, HPV 52 или любой их комбинации.

В одном из аспектов изобретения вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 31.

В одном из аспектов изобретения вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 45.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 45.

В одном из аспектов изобретения вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 52.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 52.

В одном из аспектов изобретения вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31 и 45.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 31 и 45.

В одном из аспектов изобретения вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31 и 52.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 31 и 52.

В одном из аспектов изобретения вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 45 и 52.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 52 и 45.

В одном из аспектов изобретения вакцина способна обеспечить иммунитет от эпизодической и/или хронической HPV-инфекции, вызванной HPV 31, HPV45 и HPV52.

Подходящим образом, вакцина способна обеспечить иммунитет против хронической инфекции.

Подходящим образом, вакцина способна обеспечить иммунитет против эпизодической инфекции.

Эпизодическая и хроническая инфекция шейки матки определены в примере 1.

Авторы изобретения также определили, что вакцина, содержащая белки L1 HPV 16 и L1 HPV 18 (например, как описано в примере 1), обеспечивает иммунитет против цитологических аномалий, вызванных некоторыми другими онкогенными HPV-типами, такими как HPV 52, и обеспечивает существенный иммунитет в отношении таких аномалий, вызванных группой HPV-типов высокого риска (определенных как 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68). Цитологические аномалии подходящим образом обнаруживаются при помощи хорошо известного мазка по Папаниколау.

Таким образом, изобретение также относится к применению комбинации белка L1 или его иммуногенного фрагмента из HPV 16 и HPV 18 в изготовлении композиции для предупреждения цитологических аномалий или снижения частоты цитологических аномалий у индивида, вызванных другими (отличными от HPV 16, HPV 18) HPV-типами, соответственно онкогенными HPV-типами, и в предупреждении гистологически подтвержденных поражений CIN (CIN 1, CIN 2, CIN 3) и рака шейки матки, ассоциированных с инфекцией, вызванной HPV-типами, отличными от HPV 16 или 18. Указанное применение является дополнительным к предупреждению или уменьшению таких явлений, вызванных HPV-типами, в вакцине HPV 16 и 18.

Подходящим образом, предупреждение цитологических аномалий, снижение частоты цитологических аномалий или предупреждение гистологически подтвержденных поражений CIN представляет собой предупреждение этих аномалий или поражений, вызванных типами, не включенными в комбинацию, подходящим образом выбранными из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, или предупреждение этих аномалий или поражений, вызванных группой 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68. Указанное применение является дополнительным к предупреждению или уменьшению таких явлений, вызванных HPV-типами, в вакцине HPV 16 и 18.

Подходящим образом, композиция, содержащая HPV 16 и HPV 18 для вышеописанного применения, представляет собой мультивалентную HPV-вакцину по изобретению, где вакцина содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 3 различных онкогенных HPV-типов, включающих HPV 16 и HPV 18, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV-типа, выбранного из перечня, состоящего из HPV 31, HPV 45, HPV 52 или любой их комбинации.

Вакцина по изобретению содержит L1 или иммуногенный фрагмент из HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одного другого онкогенного HPV-типа. Онкогенные HPV-типы представляют собой типы, ассоциированные с риском возникновения рака шейки матки, и те онкогенные типы, которые могут быть включены в вакцину по изобретению дополнительно к HPV 16 и HPV 18, включают HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68, но не ограничены ими, при условии, что вакцина не содержит все из HPV 31, 45 и 52.

Вакцина по изобретению подходящим образом содержит белок L1 HPV 33 или его иммуногенный фрагмент.

Вакцина по изобретению подходящим образом содержит белок L1 HPV 58 или его иммуногенный фрагмент.

Вакцина по изобретению подходящим образом содержит белок L1 HPV 59 или его иммуногенный фрагмент.

Вакцина по изобретению подходящим образом содержит белок L1 HPV 16 или его иммуногенный фрагмент, белок L1 HPV 18 или его иммуногенный фрагмент, белок L1 HPV 33 или его иммуногенный фрагмент и белок L1 HPV 58 LI или его иммуногенный фрагмент.

Белок L1 или белковые фрагменты из дополнительных HPV-типов могут быть включены в вакцину по изобретению, такие как кожные типы (в частности, HPV 5 и 8) и типы, ассоциированные с остроконечными кондиломами, такие как HPV 6 и 11. Типы 6 и 11 здесь не рассматриваются как онкогенные типы.

В одном из аспектов изобретения вакцина может содержать ранний антиген HPV, например антиген, выбранный из перечня, состоящего из E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 или E8 HPV. В альтернативном аспекте вакцина может быть лишена раннего антигена HPV, например антигена, выбранного из перечня, состоящего из E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 или E8 HPV.

В одном из аспектов вакцина по изобретению является трехвалентной (содержит L1 HPV или его фрагмент из 3 различных онкогенных HPV-типов). В еще одном аспекте вакцина является тетравалентной. В еще одном аспекте вакцина является пентавалентной. В еще одном аспекте вакцина является гептавалентной. В еще одном аспекте вакцина является септавалентной. В еще одном аспекте вакцина является октавалентной. Здесь также рассмотрены более высокие валентности. В дополнительных аспектах вакцина, по меньшей мере, является тетравалентной, пентавалентной, гептавалентной, септавалентной или октавалентной в отношении онкогенных HPV-типов.

Предпочтительно комбинация компонентов HPV в вакцине не влияет значительно на иммуногенность любого из компонентов HPV. В частности, предпочтительно, чтобы отсутствовала биологически релевантная интерференция между антигенами HPV в комбинации по изобретению, так что комбинированная вакцина по изобретению способна обеспечивать эффективный иммунитет против инфекции или заболевания, вызванных каждым генотипом HPV, представленным в вакцине. Подходящим образом, иммунный ответ против данного HPV-типа в комбинации составляет по меньшей мере 50% от иммунного ответа того же самого HPV-типа при индивидуальном измерении, предпочтительно 100% или по существу 100%. В отношении ответов на HPV 16 и HPV 18 комбинированная вакцина по изобретению предпочтительно стимулирует иммунный ответ, который составляет по меньшей мере 50% от обеспечиваемого комбинированной HPV 16/HPV 18 вакциной. Подходящим образом, иммунный ответ, генерируемый вакциной по изобретению, находится на уровне, при котором все еще обнаруживается защитный эффект каждого HPV-типа. Иммунный ответ может быть измерен подходящим образом, например путем ответа в виде антител, в доклинических исследованиях или экспериментах на людях. Измерение ответов в виде антител хорошо известно в данной области техники и раскрыто (например) в WO 03/077942.

Авторы изобретения определили, что вакцина, содержащая белки L1 HPV 16 и L1 HPV 18 (например, см. пример 1), обеспечивает перекрестный иммунитет против инфекции или заболевания, вызванного некоторыми HPV-типами. Наряду с получением новых композиций эта информация дает возможность для разработки новых применений.

В частности, изобретение относится к применению композиции, содержащей белок L1 HPV 16 и HPV 18 или его иммуногенный фрагмент, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции, вызванной HPV 31.

Изобретение также относится к применению композиции, содержащей белок L1 HPV 16 и HPV 18 или его иммуногенный фрагмент, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции, вызванной HPV 45.

Изобретение также относится к применению композиции, содержащей белок L1 HPV 16 и HPV 18 или его иммуногенный фрагмент, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции, вызванной HPV 52.

В одном из аспектов изобретение относится к применению вакцины, содержащей белки L1 HPV 16 или их иммуногенные фрагменты, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванных HPV 31 или HPV 52 или любой их комбинацией.

В одном из аспектов изобретение относится к применению вакцины, содержащей белки L1 HPV 18 или их иммуногенные фрагменты, в изготовлении лекарственного средства для предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванных HPV 45.

Композиция для указанного применения может быть лишена антигенного компонента из HPV-типа, для которого обеспечивается перекрестный иммунитет. Альтернативно, композиция для указанного применения может содержать такой антигенный компонент, например белок L1 или его фрагмент из указанного типа, для которого обеспечивается перекрестный иммунитет. В последнем случае применение композиции, содержащей белок L1 HPV 16 и HPV 18 или его иммуногенный фрагмент, обеспечивает как перекрестный иммунитет (например против HPV 31, 45 и 52), так и гомологичную защиту (например, против HPV 16 и HPV 18).

Композиция в одном из аспектов представляет собой мультивалентную композицию, содержащую белки L1 или их иммуногенные фрагменты из HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одного другого онкогенного HPV-типа, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из одного или более чем одного HPV-типа, выбранного из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, не включен в вакцину, и где вакцина обеспечивает иммунитет против инфекции, вызванной HPV-типом, не включенным в вакцину.

Когда вакцина или композиция по изобретению содержит иммуногенный фрагмент L1, то подходящие иммуногенные фрагменты L1 HPV включают мутанты L1 по усечениям, делециям, заменам или вставкам. Такие иммуногенные фрагменты подходящим образом способны повышать иммунный ответ (если необходимо, с адьювантом), причем указанный иммунный ответ способен распознавать белок L1, такой как вирусоподобную частицу, из HPV-типа, от которого белок L1 происходит.

Подходящий иммуногенный фрагмент HPV 16 способен обеспечивать перекрестный иммунитет против по меньшей мере одного из HPV 31 и HPV 52 и, в одном из аспектов изобретения, способен обеспечивать перекрестный иммунитет против обоих.

Подходящий иммуногенный фрагмент HPV 18 способен обеспечивать перекрестный иммунитет против HPV 45.

Перекрестный иммунитет, обеспечиваемый иммуногенными фрагментами HPV 16 и/или HPV 18, может быть оценен в исследованиях на людях, например, как изложено в примере 1.

Аналогично, различные вакцины по настоящему изобретению могут быть протестированы с использованием стандартных способов, например, как в примере 1, или в стандартных доклинических моделях, для подтверждения того, что вакцина является иммуногенной.

Подходящие иммуногенные фрагменты L1 включают усеченные белки L1. В одном из аспектов усечением удаляют сигнал ядерной локализации. В еще одном аспекте усечение представляет собой усе-

чение С-конца. В еще одном аспекте усечением С-конца удаляют менее чем 50 аминокислот, подходящим образом предпочтительно менее чем 40 аминокислот. Когда L1 получен из HPV 16, то в еще одном аспекте усечением С-конца удаляют 34 аминокислоты из L1 HPV 16. Когда L1 получен из HPV 18, то в еще одном аспекте усечением С-конца удаляют 35 аминокислот из L1 HPV 18. Усеченные белки L1 описаны в US606024, US6361778 и US6599508, включенныхных в данное описание ссылкой.

В одном из аспектов последовательность HPV 16 представляет собой следующую последовательность (SEQ ID NO: 1):

MSLWLPSSEATVYLPPVPVKVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPIKKPNNNKI	60
LVPKVSGLQYRVFRILPDPNKFGLPDTSFYNPDQTQLWACVGVEVGRGQPLGVGISGH	120
PLLNLDDTENASAYAAANAGVDNRECISMDYKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPCTNAV	180
NPGDCPPLLEINTVIQDGDMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSE	240
PYGDSLFFYLRRREQMFVRHLFNRAAGAVGENVPDDLYIKGSGSTANLASSNYFPPTSGSMV	300
TSDAQIFNKPYWLQRAGHNNNGICWGNQLFVTVDTRSTNMSLCAAISTSETTYKNTNF	360
KEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGBTLEDTYRF	420
VTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTWFWEVNLSKEFKSADLDQFPLGRKFLLQ	471

В еще одном аспекте изобретение относится к вирусоподобным частицам, состоящим только из L1 HPV 16, имеющим представленную выше аминокислотную последовательность, и к композициям, содержащим такие VLP.

Последовательность HPV 16 также может представлять собой последовательность, раскрытую в WO9405792 или US6649167, например усеченную подходящим образом. Подходящие усечения представляют собой усечения в положении, эквивалентном показанному выше, как оценивают путем сравнения последовательностей.

В одном из аспектов последовательность HPV 18 представляет собой следующую последовательность (SEQ ID NO: 2):

MALWRPSDNTVYLPPPSVARVVNTDDYVTRTSIFYHAGSSRLLTVGNPYFRVPAGGGNKQ	60
DIPKVSAYQYRVFRVQLPDPNKFGLPDNSIYNPETQRLWACVGVEIGRGQPLGVGLSGH	120
PFYNLDDTESSHAATSNVSEDRVNDNSVSYDVKQTQLCILGCAPIGEHWAKGTACKSRPL	180
SQGDCPPLLEKNTVLEDGDMVDTGYGAMDFSTLQDTKCEVPLDICQSICKYPDYLQMSAD	240
PYGDMSMFFCLRREQLF ARHFWRNAGTMGDTVPPSLYIKGTGMRASPGSCVYSPSPSGSIV	300
TSDSQLFNPKYWLNKAQGHNNNGVCWHNQLFVTVDTRSTNLTICASTQSPVPGQYDATK	360
FKQYSRHRVEEYDLQFIFQLCTITLTADVMSYIHSMNSSILEDWNFGVPPPPPTSLVDTYR	420
FVQSVAITCQKDAAPAENKDPYDKLKFWNVDLKEKFSDLDDQYPLGRKFVQ	472

В еще одном аспекте изобретение относится к вирусоподобным частицам, состоящим только из L1 HPV 18, имеющим представленную выше аминокислотную последовательность, и к композициям, содержащим такие VLP.

Альтернативная последовательность HPV 18, раскрытая в WO 9629413, может быть усечена подходящим образом. Подходящие усечения представляют собой усечения в положении, эквивалентном показанному выше, как оценивают путем сравнения последовательностей.

Другие последовательности HPV 16 и HPV 18 хорошо известны в данной области техники и могут быть подходящими для применения по настоящему изобретению.

Также могут быть получены подходящие усечения HPV 31, HPV 45 и HPV 52 путем подходящего удаления С-концевых фрагментов белка L1, эквивалентных описанным выше, как оценивают путем совмещения последовательностей.

Усеченные белки L1 раскрыты, например, в WO 9611272 и US 6066324, включенных в данное описание ссылкой.

Белок L1 или его фрагмент по изобретению могут находиться в форме слитого белка, такого как слияние белка L1 с L2 или ранним белком.

Белок L1 HPV подходящим образом находится в форме капсомера или вирусоподобной частицы (VLP). В одном из аспектов в настоящем изобретении могут быть использованы VLP HPV. VLP HPV и способы получения VLP хорошо известны в данной области техники. Как правило, VLP конструируют из структурных белков L1 и возможно L2 вируса, см., например, WO 9420137, US 5985610, WO 9611272, US 6599508B1, US 6361778B1, EP 595935. Любая подходящая VLP HPV может быть использована в настоящем изобретении, которая обеспечивает перекрестный иммунитет, например L1 или L1 + L2 VLP.

Подходящим образом, VLP представляет собой только L1 VLP.

В одном из аспектов изобретения вакцина содержит только L1 VLP HPV 16 и HPV18, подходящим образом в комбинации с L1 VLP, выбранных из HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68, при условии, что вакцина не содержит VLP каждого из HPV 31, 45 и 52.

Образование VLP может быть оценено с использованием стандартных способов, таких как, например, электронная микроскопия и динамическое лазерное светорассеяние.

VLP может включать полноразмерный белок L1. В одном из аспектов белок L1, использованный с

образованием VLP, представляет собой усеченный белок L1, как описано выше.

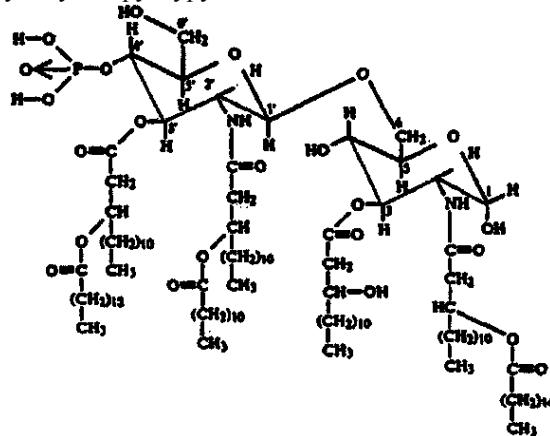
VLP могут быть получены в любом подходящем клеточном субстрате, таком как клетки дрожжей или клетки насекомых, например клетки бакуловируса, и способы получения VLP хорошо известны в данной области техники, например в WO 9913056, US 6416945B1, US 6261765B1 и US 6245568, и приведенных в них источниках информации, которые включены в данное описание ссылкой.

VLP подходящим образом получают с использованием способов разборки и обратной сборки, которые могут привести к получению более стабильных и/или гомогенных VLP вируса папилломы. Например, в McCarthy et al., 1998 "Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Virus like Particles in Vitro" J. Virology 72(1):33-41 описана разборка и обратная сборка рекомбинантных L1 VLP HPV 11, очищенных из клеток насекомых, с получением гомогенного препарата VLP. В WO 9913056 и US 6245568 также описаны способы разборки/обратной сборки для получения VLP HPV.

В одном из аспектов VLP HPV по изобретению получают в соответствии с описанным в WO9913056 или US6245568.

L1 HPV по изобретению можно объединять с адьювантом или иммуностимулятором, таким как детоксифицированный липид A из любого источника и нетоксичные производные липида A, сапонины и другие реагенты, способные стимулировать ответ TH1-типа, но не ограниченным ими.

Давно известно, что энтеробактериальный липополисахарид (ЛПС) представляет собой сильный стимулятор иммунной системы, хотя его применение в адьювантах ограничено его токсическими действиями. Нетоксичное производное ЛПС, представляющее собой монофосфориллипид A (МФЛ), получаемое путем удаления коровой углеводной группы и фосфата из глюказамина с редуцирующим концом, описано Ribi et al. (1986, Immunology и Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p. 407-419) и имеет следующую структуру:



Еще один детоксифицированный вариант МФЛ является результатом удаления ацильной цепи из положения 3 дисахаридной цепи и назван 3-О-деацетилированным монофосфориллипидом А (3D-МФЛ). Он может быть очищен и получен способами, раскрытыми в GB 2122204B, в котором также раскрыт препарат дифосфориллипода А и его 3-О-деацетилированных вариантов.

Подходящая форма 3D-МФЛ находится в форме эмульсии, имеющей небольшой размер частиц, составляющий в диаметре менее 0,2 мкм, и способ ее изготовления раскрыт в WO 94/21292. Водные препараты, включающие монофосфориллипид А и поверхностно-активное вещество, описаны в WO 9843670A2.

Адьюванты на основе бактериального липополисахарида, которые включают в состав композиций по настоящему изобретению, могут быть очищены и получены из бактериальных источников или, альтернативно, они могут быть синтетическими. Например, очищенный монофосфориллипид А описан Ribi et al. 1986 (выше), и 3-О-деацетилированный монофосфорил или дифосфориллипид А, полученный из *Salmonella* sp., описан в GB 2220211 и US 4912094. Описаны другие очищенные и синтетические липополисахариды (Hilgers et al., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(l):141-6; и EP 0549074 B1). В одном из аспектов адьюvant на основе бактериального липополисахарида представляет собой 3D-МФЛ.

Соответственно, производные ЛПС, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, представляют собой такие иммуностимуляторы, которые по структуре подобны структуре ЛПС или МФЛ, или 3D-МФЛ. В еще одном аспекте настоящего изобретения производные ЛПС могут представлять собой ацилированный моносахарид, представляющий собой субфрагмент вышеописанной структуры МФЛ.

Сапонины упомянуты в: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol. 2 pp. 363-386). Сапонины представляют собой стероидные или тритерпеновые гликозиды, широко распространенные в царствах растений и морских животных. Сапонины примечательны тем, что образуют коллоидные растворы в воде, которые пенятся при

встряхивании, и что осаждают холестерин. Когда сапонины находятся около клеточных мембран, они образуют порообразные структуры в мембране, что приводит к разрыву мембраны. Гемолиз эритроцитов представляет собой пример этого явления, которое представляет собой свойство некоторых, а не всех сапонинов.

Сапонины известны в качестве адьювантов в вакцинах для системного введения. Адьювантная и гемолитическая активность индивидуальных сапонинов широко исследованы в данной области техники (Lacaille-Dubois and Wagner, выше). Например, Quil A (полученный из коры североамериканского дерева Quillaja Saponaria Molina) и его фракции описаны в US 5057540 и "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; и EP 0362279 B1. Структуры частиц, названных иммуностимулирующими комплексами (ИСК), включающих фракции Quil A, являются гемолитическими и используются в изготовлении вакцин (Morein, B., EP 0109942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Гемолитические сапонины QS21 и QS17 (Фракции Quil A, очищенные с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)), описаны в качестве сильных системных адьювантов, и способ их получения раскрыт в патенте США 5057540 и EP 0362279 B1. Другие сапонины, которые используют в исследованиях системной вакцинации, включают сапонины, полученные из других видов растений, таких как Gypsophila и Saponaria (Bomford et al., Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

Усиленная система включает комбинацию нетоксичного производного липида A и сапонинового производного, в частности комбинацию QS21 и 3D-МФЛ, раскрытою в WO 94/00153, или менее реактивную композицию, в которой QS21 гасят холестерином, как раскрыто в WO 96/33739.

В WO 95/17210 описан особенно сильный адьювантный препарат, содержащий QS21 и 3D-МФЛ в эмульсии масло-в-воде, и применение этого адьюванта образует один из аспектов данного изобретения.

Соответственно, в одном из воплощений настоящего изобретения предложена вакцина с детоксифицированным липидом A или нетоксичным производным липида A в качестве адьюванта, более предпочтительно с монофосфориллипидом A или его производным в качестве адьюванта.

В одном из аспектов вакцина дополнитель но включает сапонин, например QS21.

В одном из аспектов вакциниальный препарат включает эмульсию масло-в воде. В настоящем изобретении также предложен способ изготовления вакциниального препарата, включающий смешивание L1 пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым эксципиентом, таким как 3D-МФЛ.

Дополнительные компоненты, которые могут быть включены в вакциниальный препарат по изобретению, включают неионные детергенты, такие как октоксины и полиоксиэтиленовые эфиры, как здесь описано, в частности трет-октилфеноксиполизоксизтанол (Triton X-100) и моноолеат полиоксиэтилен-сорбита (Tween 80); и соли желчных кислот или производные холиновой кислоты, как здесь описано, в частности дезоксихолат натрия или тауродезоксихолат. Таким образом, в одном из аспектов изобретения препарат содержит 3D-МФЛ, Triton X-100, Tween 80 и дезоксихолат натрия, которые можно объединять с антигенным препаратом L2 с получением подходящей вакцины.

В одном из воплощений настоящего изобретения вакцина включает везикулярный адьювантный препарат, содержащий холестерин, сапонин и производное ЛПС. В этой связи адьювантный препарат подходящим образом содержит моноламеллярную везикулу, включающую холестерин, имеющую липидный бислой, подходящим образом содержащий диолеофосфатидилхолин, где сапонин и производное ЛПС ассоциированы с липидным бислой или внедрены в него. В одном из аспектов эти адьювантные препараты содержат QS21 в качестве сапонина и 3D-МФЛ в качестве производного ЛПС, где отношение QS21:холестерин составляет от 1:1 до 1:100 мас./мас., и в одном из аспектов отношение 1:5 мас./мас. Такие адьювантные препараты описаны в EP 0 822 831 B, который включен в данное описание ссылкой.

Подходящим образом вакцины по изобретению применяют в комбинации с алюминием, и подходящим образом они адсорбированы или частично адсорбированы на алюминиевых адьювантах. Подходящим образом, адьювант представляет собой соль алюминия, которая может находиться в комбинации с 3D-МФЛ, такой как фосфат алюминия и 3D-МФЛ. Также подходит гидроксид алюминия, возможно в комбинации с 3D-МФЛ.

В еще одном аспекте настоящего изобретения вакцина содержит комбинацию VLP HPV с солью алюминия или солью алюминия + 3D-МФЛ. Гидроксид алюминия подходит в качестве соли алюминия.

Вакцина также может содержать алюминий или алюминиевое соединение в качестве стабилизатора.

В еще одном аспекте адьювант может представлять собой комбинацию адьюванта на основе эмульсии масло-в-воде и 3D-МФЛ. В одном из аспектов эмульсия масло-в-воде содержит метаболизируемое масло, стерин и эмульгатор.

Вакцины по изобретению могут быть доставлены при помощи любого из множества путей, таких как пероральная доставка (например, см. WO 9961052 A2), местный, подкожный путь, введение в слизистые оболочки (как правило, внутривагинально), внутривенный, внутримышечный, интраназальный, подъязычный, внутрикожный путь и при помощи суппозитория.

Возможно, вакцина также может быть приготовлена или введена вместе с другими антигенами HPV или антигенами, отличными от HPV. Подходящим образом, эти антигены, отличные от HPV, могут обеспечивать иммунитет против других заболеваний, таких как заболевания, передающиеся половым путем,

таких как вирус простого герпеса, вирус Эпштейна-Барр (EBV), хламидии и вирус иммунодефицита человека (HIV). Авторы изобретения предпочитают, чтобы вакцина включала gD или его усеченный вариант на основе вируса простого герпеса (HSV). Таким образом, вакцина обеспечивает иммунитет против HPV и HSV.

Доза компонентов вакцины варьирует в зависимости от состояния, пола, возраста и массы индивида, пути введения и HPV вакцины. Количество также может варьировать в зависимости от количества типов VLP. Подходящим образом доставляют количество вакцины, подходящее для того, чтобы вызвать иммунологически защитный ответ. Подходящим образом каждая доза вакцины включает 1-100 мкг каждой VLP, в одном из аспектов 5-80 мкг, в еще одном аспекте 5-30 мкг каждой VLP, в еще одном аспекте 5-20 мкг каждой VLP, в еще одном аспекте 5, 6, 10, 15 или 20 мкг.

В одном из аспектов вакцина может содержать компоненты белка L1 HPV, предпочтительно в виде вирусоподобных частиц, в различных количествах. В одном из аспектов VLP HPV 16 и HPV 18 могут быть предложены в более высокой дозе по сравнению с онкогенными типами, такими как HPV 33 или 58. В одном из аспектов VLP только HPV 16 и HPV 18 L1 предложены в количестве 20 мкг на дозу для применения у людей. Другие VLP HPV могут быть использованы в меньшем количестве, таком как 15 или 10 мкг на дозу для применения у людей.

Для всех вакцин по изобретению в одном из аспектов вакцину используют для вакцинации девушек-подростков в возрасте 10-15 лет, таких как 10-13 лет. Тем не менее, также могут быть вакцинированы более старшие девушки в возрасте больше 15 лет и взрослые женщины. Вакцина также может быть введена женщине в случае аномального мазка по Папаниколау или после хирургического вмешательства по удалению повреждения, вызванного HPV, или тем, кто являются серонегативными и ДНК-негативными в отношении онкогенных HPV-типов.

Вакцина по изобретению может быть использована для мужчин.

В одном из аспектов вакцину вводят в 2 или 3 дозы, например в соответствии со схемой, соответственно, 0, 1 месяц или 0, 1 или 6 месяцев. Подходящим образом, схема вакцинации включает бустер-инъекцию через 5-10 лет, например 10 лет.

В одном из аспектов вакцина представляет собой жидкий вакциновый препарат, хотя вакцина может быть лиофилизирована и разведена перед введением.

Сущность всех источников информации в настоящей заявке, включая заявки на патенты и выданые патенты, включены в данное описание ссылкой.

Вакцины по изобретению содержат некоторые компоненты HPV, как изложено выше. В еще одном аспекте изобретения вакцина состоит по существу или состоит из указанных компонентов.

Используемый в настоящем изобретении термин "вакцина" относится к композиции, содержащей иммуногенный компонент, способный вызывать иммунный ответ у индивида, такого как человек, возможно подходящим образом изготовленная или с адьювантом. Вакцина подходящим образом вызывает защитный иммунный ответ против эпизодической инфекции или хронической инфекции, или цитологической аномалии, такой как ASCUS, CIN1, CIN2, CIN3 или рак шейки матки, вызванной одним или более чем одним HPV-типом.

Настоящее изобретение далее описано следующими примерами, которые служат для иллюстрации изобретения.

Пример 1. Точные подробности проводимого эксперимента приведены в Harger et al., the Lancet. 2004 Nov 13; 364 (9447): 1757-65, включенной в данное описание ссылкой.

В общих словах, здоровых женщин в возрасте от 15 до 25 лет иммунизировали смесью L1 VLP HPV 16 и HPV 18. При регистрации женщины были: 1) серонегативными в отношении HPV-16 и HPV-18; 2) негативными в отношении инфекции шейки матки HPV высокого риска (обнаруживаемой путем ПЦР HPV); 3) в течение жизни имели 6 или меньшее количество сексуальных партнеров и 4) имели нормальные мазки по Папаниколау.

Смесь содержала на дозу 0,5 мл 20 мкг L1 VLP HPV-16, 20 мкг L1 VLP HPV-18 и в качестве адьюванта 500 мкг гидроксида алюминия и 50 мкг 3D-МФЛ. Группе плацебо инъектировали 500 мкг одного лишь гидроксида алюминия.

Оценивали эффективность вакцины (ЭВ) против некоторых онкогенных HPV-типов, где ЭВ представляет собой % улучшения защиты от инфекции при помощи вакцины по сравнению с группой плацебо.

Перекрестный иммунитет оценивали по обнаружению наличия нуклеиновой кислоты, специфичной в отношении различных онкогенных типов в вакцинах и контрольной группе. Обнаружение осуществляли с использованием способов, описанных в WO 03014402, и ссылок в ней, в частности путем неспецифической амплификации ДНК HPV и последующего обнаружения типов ДНК с использованием системы LiPA в соответствии с описанным в WO 99/14377 и в Kleter et al., [Journal of Clinical Microbiology (1999), 37 (8): 2508-2517], полное содержание которых включено в данное описание ссылкой.

Тем не менее, для обнаружения ДНК HPV в образце может быть использован любой подходящий способ, такой как типоспецифичная ПЦР, с использованием праймеров, специфичных в отношении каждого интересующего типа HPV. Подходящие праймеры известны специалисту в данной области техники

или могут быть легко сконструированы, принимая во внимание, что последовательности онкогенных HPV-типов известны.

Подробно раздел со способами из статьи Lancet для полноты воспроизведен ниже (продолжение до раздела под заголовком "Исходный анализ и результаты").

Первичная задача этого исследования заключалась в том, чтобы оценить эффективность вакцины в предупреждении инфекции HPV-16, HPV-18 или обоих (HPV-16/18) у участников за период 6-18 месяцев, которые, как было исходно показано при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), являются серонегативными в отношении HPV-16/18 и в соответствии с ПЦР негативными в отношении ДНК HPV-16/18. Вторичные задачи включали: оценку эффективности вакцины в предупреждении хронической инфекции HPV-16/18 и оценку эффективности вакцины в предупреждении цитологически подтвержденных плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (LSIL), плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (HSIL) и гистологически подтвержденного LSIL (CIN 1), HSIL (CIN 2 или 3) плоскоклеточного рака, или adenокарциномы, ассоциированной с инфекцией HPV-16/18 в течение периода 6-18 месяцев и 6-27 месяцев. Предупреждение цитологии атипичных плоских клеток невыясненной этиологии (ASCUS), ассоциированной с инфекцией HPV-16/18, представляло собой вторичный анализ к итоговым анализам.

Кроме того, авторы провели пробный анализ гистопатологических конечных результатов CIN 1 и 2, ассоциированных с ДНК HPV-16/18, обнаруживаемой при помощи ПЦР в пораженной ткани. Другие задачи включали оценку иммуногенности, безопасности и иммунности вакцины.

Исследователи в Северной Америке (Канада и США) и Бразилии приглашали женщин для этого исследования эффективности при помощи рекламы или на основе предыдущего участия в перекрестном эпидемиологическом исследовании HPV, которое проводили с июля по декабрь 2000 года.

Для каждой из 32 исследуемых областей получено разрешение в узаконенной комиссии относительно протокола, форм согласия и дополнений. Женщины дали отдельные письменные согласия на участие в исследовании и кольпоскопию. Для женщин, не достигших 18 лет, обязательным было согласие родителей и самого участника.

Проведены две фазы исследования: исходная фаза для вакцинации и наблюдения, завершившаяся на 18-й месяц; и слепая длительная фаза наблюдения, завершившаяся на 27-й месяц.

Женщины, подходящие для исходной фазы (месяцы 0-18), включали здоровых женщин в возрасте 15-25 лет, которые имели ранее не более шести сексуальных партнеров, не имели аномальных мазков по Папаниколау или аблативного или хирургического лечения шейки матки и не лечились от наружных кондилом; и которые были цитологически негативными, серонегативными в отношении антител к HPV-16 и HPV-18 в соответствии с ELISA и HPV-ДНК-негативными в соответствии с ПЦР для 14 HPV-типов высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, и 68) не более чем за 90 дней до начала исследования.

Женщины, завершившие исходную фазу самого раннего исследования и не перенесшие аблативного или хирургического лечения шейки матки, или удаления матки после регистрации, были допущены к участию в расширенной фазе исследования (месяцы 18-27).

Процедуры

Каждая доза бивалентной вакцины на основе вирусоподобных частиц HPV-16/18 (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) содержала 20 мкг HPV-16 L1 вирусоподобных частиц и 20 мкг HPV-18 L1 вирусоподобных частиц. Каждый тип вирусоподобных частиц получали на клеточном субстрате Spodoptera frugiperda Sf-9 и Trichoplusia ni Hi-5 с адьювантом AS04, содержащим 500 мкг гидроксида алюминия и 50 мкг 3-деацилированного монофосфориллипida A (МФЛ, Corixa, Montana, USA), содержащегося в однодозовом флаконе. Плацебо содержала 500 мкг гидроксида алюминия на дозу и по внешнему виду была идентична вакцине HPV-16/18. Каждый участник исследования получал дозу вакцины или плацебо 0-5 мл на нулевой месяц, в 1-й месяц и 6-й месяц.

Специалисты, обеспечивающие медицинское обслуживание, получали образцы из шейки матки при помощи цервикальной кисточки и шпателя (промытого в PreservCyt, Cytos Corporation, Boxborough, MA, USA) на цитологию и тестирование ДНК HPV при отборе и на 6-й, 12-й, и 18-й месяцы. На нулевой и 6-й месяцы и затем каждые 3 месяца женщины сами получали цервико-вагинальные образцы при помощи двух последовательных тампонов на стержне (помещаемых в PreservCyt) для тестирования ДНК HPV. [DM Harper, WW Noll, DR Belloni and BF Cole, Randomized clinical trial of PCR-determined human papillomavirus detection methods: self-sampling versus clinician-directed -biologic concordance and women's preferences. Am J Obstet Gynecol 186 (2002), pp. 365-373]. Центральная лаборатория (Quest Diagnostics, Teterboro, NJ, USA) сообщала о цитологических результатах (ThinPrep, Cytos Corporation), используя систему классификации 1991 Bethesda.

В руководствах по протоколу рекомендовалась кольпоскопия после двух результатов ASCUS, или одного результата атипичных глангулоцитов невыясненной этиологии, LSIL или HSIL, плоскоклеточного рака, adenокарциномы *in situ* или adenокарциномы. В этих руководствах также рекомендовали биопсию при каждом подозрении на поражение.

Центральная гистологическая лаборатория ставила исходный диагноз на основе фиксированных в

формалине образцов ткани для клинической оценки. Группа из трех патологов ставила последующий согласованный диагноз в отношении поражений, ассоциированных с HPV-16 и HPV-18, при помощи системы CIN. Этот согласованный диагноз также включал обзор срезов, полученных на момент микропрепарирования для обнаружения путем ПЦР патологической ДНК HPV.

ДНК HPV, выделенную из цитологического образца (MagNaPure Total Nucleic Acid system, Roche Diagnostics, Almere, Netherlands) и из образца цервикальной биопсии (экстракция протеиназой K), амплифицировали из аликвоты очищенной тотальной ДНК при помощи SPF 10 праймеров широкого спектра, амплифицирующих область гена L1 в 65 п.о. [B Kleter, LJ van Doom, J ter Schegget et al., Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. Am J Pathol 153 (1998), pp. 1731-1739; LJ van Doom, W Quint, B Kleter et al, Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF(10) line probe assay. J Clin Microbiol 40 (2002), pp. 979-983 и WG Quint, G Scholte, LJ van Doom, B Kleter, PH Smits and J. Lindeman, Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF(10) PCR and HPV genotyping. J Pathol 194 (2001), pp. 51-58]. Продукты амплификации обнаруживали при помощи ДНК-ферментного иммуноанализа. Анализ при помощи линейных зондов (LiPA Kit HPV INNO LiPA HPV генотипирование, система SPF-10 версия 1, Innogenetics, Gent, Belgium, произведенный Labo Bio-medical Products, Rijswijk, Netherlands) позволил обнаружить 25 генотипов HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, и 74). [B Kleter, LJ van Doom, L Schrauwen et al, Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. J Clin Microbiol 37 (1999), pp. 2508-2517]. Любую частицу, положительную в соответствии с ДНК-ферментным иммуноанализом, тестировали при помощи ПЦР, типоспецифичной в отношении HPV-16 и HPV-18. Праймеры для ПЦР, типоспецифичной в отношении HPV-16, амплифицировали сегмент гена E6/E7 длиной 92 п.о., праймеры для ПЦР, типоспецифичной в отношении HPV-18, амплифицировали сегмент гена L1 длиной 126 п.о. [MF Baay, WG Quint, J Koudstaal et al., Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. J Clin Microbiol 34 (1996), pp. 745-747].

Авторы определяли эпизодическую инфекцию шейки матки с HPV-16/18 по меньшей мере по одному положительному результату ПЦР для HPV-16 или HPV-18 в течение исследования и хроническую инфекцию HPV-16/18 по меньшей мере по двум положительным результатам анализов HPV-ДНК ПЦР для того же самого вирусного генотипа, с периодом времени между тестами по меньшей мере 6 месяцев. [H Richardson, G. Kelsall, P. Tellier et al., The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12 (2003), pp. 485-490 и AB Moscicki, JH Ellenberg, S Farhat и J. Xu, Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. J Infect Dis 190 (2004), pp. 37-45]. Результаты HPV-ДНК теста скрыты от исследователей в процессе исследования, и цитологические и гистологические диагнозы раскрывали только для задач клинического лечения. Анализы включали результаты ДНК HPV-16/18 для образцов из шейки матки и комбинированных образцов из шейки матки и полученных самостоятельно цервиковагинальных образцов.

Авторы отбирали сыворотку крови у участников исследования на 0, 1, 6, 7, 12 и 18 месяцы для оценки иммуногенности. Серологическое тестирование антител к вирусоподобным частицам HPV-16 и HPV-18 осуществляли путем ELISA. Рекомбинантные вирусоподобные частицы HPV-16 или HPV-18 использовали в качестве антигенов вирусной оболочки для обнаружения антител (смотри webappendix <http://image.thelancet.com/extras/04art10103webappendix.pdf>). Серопозитивную реакцию определяли как титр, превышающий или равный отсекающему титру для анализа, установленному на уровне 8 единиц ELISA/мл для HPV-16 и 7 единиц ELISA/мл для HPV-18. Типичные природные титры определяли путем использования образцов крови, полученных у женщин в предшествующем эпидемиологическом исследовании, которые, как было обнаружено, в соответствии с ELISA являются серопозитивными в отношении HPV-16 или HPV-18.

Женщины регистрировали симптомы, которые испытывали в течение первых 7 суток после вакцинации, в ежедневных картах по трехуровневой шкале интенсивности симптомов. Дополнительно, путем интервью они сообщали персоналу, проводящему исследования, все негативные явления в течение первых 30 суток после вакцинации. В течение исследования собирали информацию о серьезных негативных явлениях и беременности.

Статистические способы

Исходя из 6% кумулятивного коэффициента заболеваемости для инфекций типов HPV-16 и HPV-18 в течение 12 месяцев авторы оценили, что 500 женщин на исследуемую группу обеспечивали 80%-ную возможность оценить нижний предел 95%-ного доверительного интервала (ДИ) эффективности вакцины выше нуля. Авторы предположили 80%-ный уровень удержания в течение 18 месяцев. Предварительные анализы эффективности, безопасности и иммуногенности осуществляли исключительно для задач планирования будущих исследований; Способ O'Brien and Fleming использовали для приведения значения для конечного анализа после проведения предварительных анализов (в общем $\alpha=0,05$; двухстадийный

тест) [PC O'Brien and TR. Fleming, A multiple testing procedure for clinical trials. Biometrics 35 (1979), pp. 549-556].

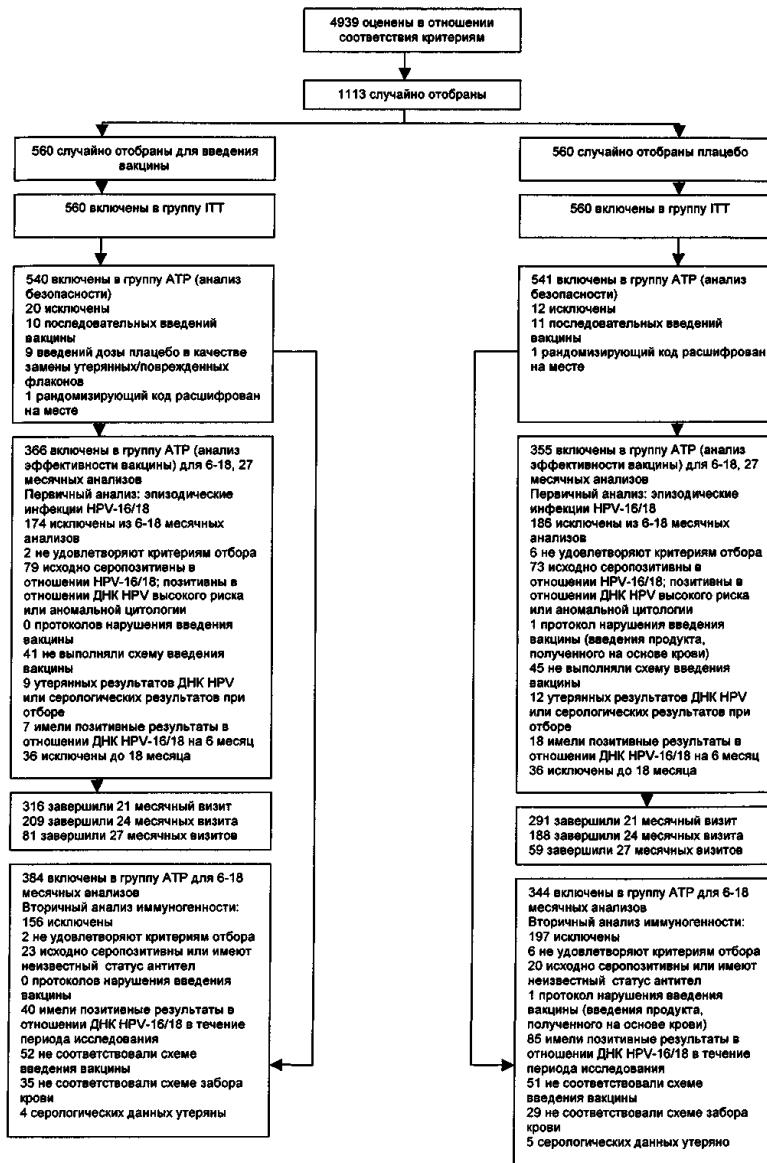
Стратифицированную блок-рандомизацию в соответствии с принятymi алгоритмами централизовали при помощи системы рандомизации в Интернете. Стратификацию осуществляли в соответствии с возрастом (15-17, 18-21 и 22-25 лет) и регионом (Северная Америка и Бразилия). Каждой дозе вакцины присваивали случайно выбранный номер, основываясь на специфической информации об участнике, введенной в компьютерную систему рандомизации персоналом, проводящим исследования. Распределение обработки остается скрытым от исследователей и женщин, участвующих в длительном исследовании.

Группы "всех включенных пациентов" (intention-to-treat, ITT) и "в соответствии с протоколом" (according-to-protocol, ATP) представлены на схеме, в которой причины исключения из анализов перечислены в порядке ранжирования; женщин, удовлетворяющих более чем одному исключающему критерию, только подсчитывали в соответствии с самым высоким рангирующим критерием. Авторы ссылаются на множества участников, входящих в группы всех включенных пациентов и в соответствии с протоколом, как на группы, хотя информация, используемая для ограничения включения субъекта в группу "в соответствии с протоколом", известна только после выполнения. Авторы провели анализы эффективности как для группы всех включенных пациентов, так и для группы в соответствии с протоколом. Расчет эффективности вакцины в 18-месячном анализе в соответствии с протоколом основан на доле участников с инфекцией HPV-16/18 в вакцинированной группе по сравнению с плацебо. Эффективность вакцины определяли как 1 минус отношение между этими двумя долями; 95% ДИ измерял точность оценки эффективности, р-значения рассчитывали при помощи двустороннего точного критерия Фишера. Соответствующие уровни выражали как количества случаев с исходами, разделенные на количества участников в группе риска. В соответствии с протоколом 18-месячная группа включала зарегистрированных женщин, которые приняли три дозы в соответствии со схемой приема вакцины и следовали протоколу, описанному на схеме.

Расчет эффективности вакцины в 27-месячных анализах в группах всех включенных пациентов и в соответствии с протоколом основан на Сох пропорциональной модели рисков с использованием проявления по времени случаев инфекции HPV-16/18 в вакцинированных группах по сравнению с плацебо. Это позволяло контролировать накапливающиеся данные для индивида по времени в каждой группе. Эффективность вакцины рассчитывали с использованием 1 минус относительный риск и р-значения рассчитывали с использованием логарифмического рангового критерия. Соответствующие значения выражали в виде количества случаев, разделенного на общее время для индивида. Все зарегистрированные женщины, которые получали по меньшей мере одну дозу вакцины или плацебо, были негативными в отношении HPV-ДНК с высоким риском в 0 месяц и имели какие-либо данные, доступные для измерения исхода, включали в группу "всех включенных пациентов".

27-месячная группа "в соответствии с протоколом" включала результаты исходов из 18-месячной группы "в соответствии с протоколом" и результаты, полученные в течение длительной фазы (от 18 до 27 месяцев).

Расчет р-значений для анализа безопасности осуществляли с использованием сравнений в соответствии с точным критерием Фишера. Группа для анализа безопасности включала всех зарегистрированных женщин, которые получали по меньшей мере одну дозу вакцины или плацебо и удовлетворяли установленным минимальным требованиям протокола (смотри протокол ниже).



Иммуногенность оценивали в подмножестве группы оценки безопасности в соответствии с протоколом, которая включала женщин с серологическими результатами на 0, 7 и 18 месяцы, получивших все три дозы исследуемой вакцины или плацебо в соответствии со схемой, удовлетворяющих схеме отбора образцов крови, и не становились позитивными в отношении HPV-16/18-ДНК в течение исследования. Уровни серопозитивной реакции в вакцинированной группе и группе плацебо сравнивали с использованием точного критерия Фишера ($p<0,001$ считалась значимой). Геометрические средние титры сравнивали с использованием теста ANOVA и Крускала-Валлиса.

Блок-рандомизацию и статистические анализы проводили с использованием SAS версия 8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

Исходный анализ и результаты

Результаты исходных анализов по перекрестному иммунитету представлены в заявке на патент WO 2004/056389, которая включена в данное описание ссылкой.

Исходный анализ осуществляли в группе "ITT" intention-to-treat, представляющей всех индивидов, получающих по меньшей мере одну дозу вакцины). Эти данные представлены в табл. А.

Результаты, представленные в табл. Б и В, относятся к группе "ATP" (according-to-protocol, в соответствии с протоколом) для пациентов, удовлетворяющих всем критериям исследования. Табл. Б представляет собой медианный анализ с данными, полученными на всех пациентах в момент времени, в который по меньшей мере 50% группы составляли 18 месяцев после первой вакцинации. В табл. В приведены окончательные результаты, все данные получены на субъектах через 18 месяцев после первой вакцинации (месяц 0). В группе ATP все пациенты получали 3 дозы вакцины через 0, 1 и 6 месяцев и были серонегативными через 6 месяцев.

Как продемонстрировано данными, представленными в табл. А, иммунизация смесью VLP HPV 16 и HPV 18 обеспечивала выраженный перекрестный иммунитет против других HPV-типов. В этот момент

времени размеры образцов слишком малы для того, чтобы обеспечить точный статистический анализ, тем не менее данные демонстрируют положительную тенденцию и свидетельствуют о том, что иммунизация VLP HPV 16 и HPV 18 является эффективной против инфекции, вызванной другими HPV-типами.

Это было подтверждено по мере осуществления исследования.

В табл. Б продемонстрировано, что HPV 16 и HPV 18 обеспечивают статистически значимый перекрестный иммунитет против группы онкогенных типов высокого риска 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68.

В табл. В продемонстрировано, что за исключением типов, родственных HPV-18 (которые демонстрируют очень сильную тенденцию), имеется оцененный статистически значимый перекрестный иммунитет против групп: HPV 31, 35, 58; HPV 31, 33, 35, 52, 58; и 12 типов высокого риска (отличных от HPV-16/18).

Осуществили дополнительный анализ на специфический перекрестный иммунитет против специфических типов.

Эффективность вакцины оценивали против инфекций и заболеваний, связанных с 12 онкогенными типами высокого риска 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68, HPV-16 филогенетически родственными типами (группы 31, 35 и 58; 31, 33, 35, 52 и 58) и HPV-18 филогенетически родственные типы (45 и 59).

Анализ осуществляли в группе "АТР" (в соответствии с протоколом) на пациентах, удовлетворяющих всем критериям исследования. В группе АТР все пациенты получали 3 дозы вакцины в 0, 1 и 6 месяцы и были серонегативными на 6 месяц.

В соответствии с продемонстрированными данными, представленными в табл. Г, иммунизация сместью VLP HPV 16 и HPV 18 обеспечивала статистически значимый перекрестный иммунитет против эпизодической инфекции типами HPV 31, 52 и 45 по сравнению с контролем.

Статистически значимый перекрестный иммунитет против эпизодической инфекции также наблюдали против группы всех типов, родственных HPV 16 (HPV-31, 33, 35, 52 и 58), и группы всех типов высокого риска, за исключением 16 и 18 (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68).

Статистически значимый перекрестный иммунитет против хронической инфекции также наблюдали против типов 31 и 52 и также наблюдали против группы всех типов, родственных HPV 16 (смотри табл. Д).

Статистически значимый перекрестный иммунитет также наблюдали против цитологических аномалий, ассоциированных с HPV 52, и также наблюдали против цитологических аномалий, ассоциированных с группой всех типов, родственных HPV 16 (HPV-31, 33, 35, 52 и 58), и группой всех типов высокого риска, за исключением 16 и 18 (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) (табл. Е).

Таблица А

Анализируемые HPV-типы	HPV 31, 35, 58	HPV 31, 33, 35, 52, 58	HPV 45, 59	HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Количество инфицированных женщин (вакцинированная группа)	5	17	3	27
% инфицированных женщин (вакцинированная группа) = А	1,1	3,8	0,7	6,3
Количество инфицированных женщин (группа плацебо)	11	24	6	40
% инфицированных женщин (группа плацебо) = В	2,4	5,4	1,3	9,4
% эффективности вакцины 1- (A/B)×100, приведенная к относительному размеру вакцинированной группы и группы плацебо	55,1	30,3	50,6	34,6
95% доверительный интервал – нижний предел	-29,1	-29,7	-97,7	-6,5
95% доверительный интервал – верхний предел	84,4	62,6	87,6	59,9
P	0,127	0,252	0,309	0,086

Образцы отбирали на 9, 12, 15 и 18 месяцы у пациентов и тестировали в отношении инфекции HPV, вызванной указанными выше типами.

Таблица Б. Эффективность вакцины после трех доз в предупреждении эпизодических гетерологических инфекций

Эффективность вакцины против инфекции, вызванной типами, филогенетически родственными HPV-16, типами, филогенетически родственными HPV-18, типами, филогенетически родственными HPV-16 и/или HPV-18 и всеми типами высокого риска, за исключением HPV-16 и HPV-18 -группа АТР (месяц 6-18)

Тип инфекции	Пораженная доля						Эффективность вакцины		
	Вакцина			Плацебо					
	N	n	ПД	N	n	ПД	%	95% ДИ	p-значение
Родственный HPV-16	433	12	2,8	438	24	5,5	49,4	0,2 74,4	0,060
Родственный HPV-16 *	423	29	6,9	423	46	10,9	37,0	1,6 59,6	0,052
Родственный HPV-18	442	9	2,0	449	16	3,6	42,9	-27,9 74,5	0,223
Родственный HPV-16/HPV-18	433	21	4,9	438	41	9,4	48,2	13,8 68,9	0,012
Родственный HPV-16/HPV-18*	423	34	8,0	423	56	13,2	39,3	9,0 59,5	0,019
Высокий риск**	385	53	13,8	386	88	22,8	39,6	17,7 55,7	0,001

N = количество субъектов в конкретной группе;

N = количество субъектов с эпизодической HPV-инфекцией;

ПД = пораженная доля = n/N;

95% ДИ = 95% доверительный интервал;

нижний предел = $1 - \exp(\log(arv/arp) + 1,96 * \sqrt{1/nv-1/Nv+1/np-1/Np})$,

верхний предел = $1 - \exp(\log(arv/arp) - 1,96 * \sqrt{1/nv-1/Nv+1/np-1/Np})$,

когда количество случаев в вакцине = 0:

нижний предел* = $1 - \exp(\log(arv^*/arp^*) + 1,96 * \sqrt{1/(nv+0,5)-1/(Nv+0,5)+1/(np+0,5)-1/(Np+0,5)})$,

верхний предел* = $1 - \exp(\log(arv^*/arp^*) - 1,96 * \sqrt{1/(nv+0,5)-1/(Nv+0,5)+1/(np+0,5)-1/(Np+0,5)})$;

где argv = пораженная доля в группе вакцинированных реципиентов;

arp = пораженная доля в группе реципиентов плацебо;

nv = количество случаев в группе вакцинированных реципиентов;

Nv = количество случаев и отсутствие случаев в группе вакцинированных реципиентов;

np = количество случаев в группе реципиентов плацебо;

Np = количество случаев и отсутствие случаев в группе реципиентов плацебо.

Родственный HPV-16: типы 35, 31, 58, филогенетически родственные HPV-16, без учета других типов HPV.

Родственный HPV-16*: типы 35, 31, 58, 33, 52, филогенетически родственные HPV-16, без учета других типов HPV.

Родственный HPV-18: типы 45, 59, филогенетически родственные HPV-18, без учета других типов HPV.

Родственный HPV-16 и/или HPV-18: типы 35, 31, 58, 45, 59, филогенетически родственные HPV-16 и/или HPV-18, без учета других типов HPV.

Родственный HPV-16 и/или HPV-18*: типы 35, 31, 58, 33, 52, 45, 59, филогенетически родственные HPV-16 и/или HPV-18, без учета других типов HPV.

** = Типы высокого риска, за исключением HPV-16 и HPV-18.

Таблица В

Анализируемые типы HPV	HPV 31, 35, 58	HPV 31, 33, 35, 52, 58	HPV 45, 59	HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Общее количество субъектов с информацией, доступной для группы	412	403	421	368
Количество инфицированных женщин (вакцинированная группа)	11	28	10	58
% инфицированных женщин (вакцинированная группа) = А	2,7	6,9	2,4	15,8
Количество инфицированных женщин (группа плацебо)	26	48	15	90
% инфицированных женщин (группа плацебо) = В	6,3	12,2	3,6	25,3
% эффективности вакцины 1-(A/B)x100, приведенная к относительному размеру вакцинированной группы и группы плацебо	57,9	43,0	33,5	37,7
95% доверительный интервал – нижний предел	15,9	11,0	-46,3	16,2
95% доверительный интервал – верхний предел	78,9	63,5	69,8	53,6
P	0,012	0,015	0,319	0,002

Образцы отбирали на 18 месяц у пациентов и тестировали в отношении HPV-инфекции, вызванной указанными выше типами.

Таблица Г. Эффективность против эпизодических инфекций, вызванных типами, родственными 16/18*

Тип HPV	Вакцина		Контроль		Эффективность вакцины	
	N	ПД	N	ПД	%	P-значение
Родственные 16	HPV-31	1	0,2	10	2,4	90,0 0,006
	HPV-33	6	1,4	6	1,4	-0,2 1,000
	HPV-35	1	0,2	3	0,7	66,5 0,624
	HPV-52	6	1,4	16	3,9	63,0 0,031
	HPV-58	5	1,2	5	1,2	0,0 1,000
	HPV-45	0	0,0	5	1,2	100,0 0,031
Родственные 18	HPV-59	4	0,9	2	0,5	-100,5 0,448
	Все, родственные 16	16	4,0	32	8,1	51,1 0,017
	Все, родственные 18	4	1,0	7	1,7	43,0 0,384
	Все высокого риска (за исключением 16/18)	32	9,0	53	15,6	42,3 0,011

*Образцы из шейки матки: группа АТР

Таблица Д. Эффективность против хронических инфекций, вызванных типами, родственными 16/18*

	Тип HPV	Вакцина		Контроль		Эффективность вакцины	
		N	ПД	N	ПД	%	P-значение
Родственные 16	HPV-31	2	0,48	9	2,15	78,5	0,030
	HPV-33	3	0,71	5	1,18	40,2	0,476
	HPV-35	1	0,24	1	0,24	0,4	0,998
	HPV-52	5	1,20	21	5,10	77,1	0,001
	HPV-58	4	0,95	6	1,42	34,1	0,515
	HPV-45	1	0,24	4	0,94	75,4	0,174
Родственные 18	HPV-59	3	0,71	0	0,00	-	0,083
Все, родственные 16		11	2,7	30	7,6	65,1	0,002
Все, родственные 18		4	1,0	4	1,0	1,0	0,989
Все высокого риска (за исключением 16/18)		36	10,1	46	13,5	27,1	0,155

*Все образцы: группа АТР

Таблица Е. Эффективность против цитологических аномалий, ассоциированных с типами, родственными 16/18*

	Тип HPV	Вакцина		Контроль		Эффективность вакцины	
		N	ПД	N	ПД	%	P-значение
Родственные 16	HPV-31	1	0,24	5	1,20	80,1	0,123
	HPV-33	2	0,47	4	0,94	49,9	0,686
	HPV-35	0	0,00	2	0,47	100	0,499
	HPV-52	1	0,24	11	2,67	91	0,003
	HPV-58	2	0,47	2	0,47	0,2	1,000
	HPV-45	0	0,00	2	0,47	100	0,249
Родственные 18	HPV-59	4	0,94	2	0,47	-101	0,451
Все, родственные 16		5	1,2	18	4,6	72,8	0,005
Все, родственные 18		4	1,0	4	1,0	0,2	1,000
Все высокого риска (за исключением 16/18)		10	2,8	30	8,8	68,2	меньше 0,001

*группа АТР

В табл. Г, Д и Е:

N = количество субъектов в конкретной группе;

ПД = пораженная доля = n (количество субъектов с эпизодической HPV-инфекцией, хронической HPV-инфекцией или цитологическими аномалиями, в зависимости от таблицы)/N;

% эффективности вакцины составляет $1-(A/B) \times 100$, приведенный к относительному размеру вакцинированной группы и группы плацебо, где

A =% женщин в вакцинированной группе с эпизодической инфекцией, хронической инфекцией или

цитологическими аномалиями в зависимости от таблицы;

В = % женщин в группе плацебо с эпизодической инфекцией, хронической инфекцией или цитологическими аномалиями в зависимости от таблицы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультивалентная вакцина против вируса папилломы человека (HPV), содержащая белки L1 или их иммуногенные фрагменты из HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одного другого онкогенного HPV-типа, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из одного или более чем одного HPV-типа, выбранного из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, не включен в вакцину, и где вакцина обеспечивает иммунитет против инфекции, вызванной HPV-типом, не включенным в вакцину.
2. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31 не включен в вакцину.
3. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 45 не включен в вакцину.
4. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 52 не включен в вакцину.
5. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31 и из HPV 45 не включены в вакцину.
6. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31 и из HPV 52 не включены в вакцину.
7. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 45 и из HPV 52 не включены в вакцину.
8. Вакцина по п.1, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из HPV 31, из HPV 45 и из HPV 52 не включены в вакцину.
9. Вакцина по п.1, которая обеспечивает защиту против эпизодической инфекции.
10. Вакцина по п.1, которая обеспечивает защиту против хронической инфекции.
11. Вакцина по п.1, где другой онкогенный HPV-тип представляет собой HPV 33.
12. Вакцина по п.1, где другой онкогенный HPV-тип представляет собой HPV 58.
13. Вакцина по п.1, где другой онкогенный HPV-тип представляет собой HPV 59.
14. Вакцина по п.1, содержащая белок L1 HPV 16 или его иммуногенный фрагмент, белок L1 HPV 18 или его иммуногенный фрагмент, белок L1 HPV 33 или его иммуногенный фрагмент и белок L1 HPV 58 или его иммуногенный фрагмент.
15. Вакцина по п.1, где по меньшей мере один из белков L1 или их фрагментов находится в форме вирусоподобной частицы.
16. Вакцина по п.1, где по меньшей мере один из белков L1 представляет собой усеченный белок L1.
17. Вакцина по п.16, где по меньшей мере один из белков L1 представляет собой белок L1, усеченный по С-концу.
18. Вакцина по п.1, дополнительно содержащая адьювант.
19. Вакцина по п.18, где адьювант представляет собой соль алюминия.
20. Вакцина по п.19, где адьювант представляет собой гидроксид алюминия.
21. Вакцина по п.18, где адьювант представляет собой 3D-монофосфориллипид А (3D-МФЛ).
22. Вакцина по п.18, где адьювант представляет собой 3D-МФЛ и гидроксид алюминия.
23. Вакцина по п.18, где адьювант представляет собой эмульсию масло-в-воде.
24. Вакцина по п.23, где адьювант дополнительно содержит соль алюминия.
25. Способ защиты пациента против инфекции, вызванной HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одним другим HPV-типом, выбранным из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, включающий введение вакцины по п.1, где вакцина обеспечивает иммунитет против инфекции, вызванной HPV-типом, не включенным в вакцину.
26. Способ по п.25, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 31.
27. Способ по п.25, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 45.
28. Способ по п.25, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 52.
29. Способ предупреждения или снижения частоты цитологических аномалий у пациента, вызванных HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одним другим HPV-типом, выбранным из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, включающий введение вакцины по п.1, где вакцина предупреждает или снижает частоту цитологических аномалий, вызванных HPV-типом, не включенным в вакцину.
30. Способ по п.29, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 52.
31. Способ по п.29, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 45.
32. Способ по п.29, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 31.
33. Способ предупреждения образования гистологически подтвержденных поражений, представляющих собой интраэпителиальный рак шейки матки (CIN), вызванных HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одним другим HPV-типом, выбранным из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, включающий введение вакцины по п.1, где вакцина предупреждает образование гистологически подтвержденных поражений CIN, вызванных HPV-типом, не включенным в вакцину.

34. Способ по п.33, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 52.
35. Способ по п.33, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 45.
36. Способ по п.33, где HPV-тип, не включенный в вакцину, представляет собой HPV 31.
37. Способ предупреждения или снижения частоты цитологических аномалий у пациента, вызванных онкогенными HPV-типами, включающий введение вакцины по п.1.
38. Способ предупреждения образования гистологически подтвержденных поражений CIN у пациента, вызванных онкогенными HPV-типами, включающий введение вакцины по п.1.
39. Способ изготовления вакцины по п.1, включающий объединение белков L1 или их иммуногенных фрагментов из HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одного другого онкогенного HPV-типа, где вакцина не содержит белок L1 или его иммуногенный фрагмент из одного или более чем одного HPV-типа, выбранного из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52.
40. Применение белков L1 или их иммуногенных фрагментов из HPV 16, HPV 18 и по меньшей мере одного другого онкогенного HPV-типа в вакцине для предупреждения HPV-инфекции и/или заболевания, где белок L1 или его иммуногенный фрагмент из одного или более чем одного HPV-типа, выбранного из группы, состоящей из HPV 31, HPV 45 и HPV 52, не включен в вакцину, и где вакцина обеспечивает иммунитет против инфекции и/или заболевания, вызванных HPV-типом, не включенным в вакцину.

Перечень последовательностей

<110> ГлаксоСмитКляйн Байолоджикалс С.А.

<120> ВАКЦИНА

<130> b45331-1

<150> 11/114301
<151> 2005-04-26

<150> 11/367601
<151> 2005-12-16

<150> PCT/EP2005/006461
<151> 2005-06-14

<160> 6

<170> FastSEQ для Windows, версия 4.0

<210> 1
<211> 471
<212> ПРТ

<213> ЧАСТИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА hpv 16

```

<400> 1
Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
   1          5          10          15
Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn
   20         25          30
Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro
   35         40          45
Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys
   50         55          60
Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro
   65         70          75          80
Asn Lys Phe Gly Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln
   85         90          95
Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro
   100        105         110
Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp
   115        120         125
Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg
   130        135         140
Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly
   145        150         155         160
Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr
   165        170         175
Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn
   180        185         190
Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met
   195        200         205
Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile
   210        215         220
Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu
   225        230         235         240
Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe
   245        250         255
Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro
   260        265         270
Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser

```

275	280	285
Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala		
290	295	300
Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn		
305	310	315
Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr		
325	330	335
Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu		
340	345	350
Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu		
355	360	365
Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr		
370	375	380
Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu		
385	390	395
Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp		
405	410	415
Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr		
420	425	430
Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu		
435	440	445
Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu		
450	455	460
Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln		
465	470	

<210> 2

<211> 472

<212> ПРТ

<213> ЧАСТИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА hpv 18

<400> 2

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

245	250	255
Ala Arg His Phe Trp Asn Arg Ala Gly Thr Met Gly Asp Thr Val Pro		
260	265	270
Pro Ser Leu Tyr Ile Lys Gly Thr Gly Met Arg Ala Ser Pro Gly Ser		
275	280	285
Cys Val Tyr Ser Pro Ser Pro Ser Gly Ser Ile Val Thr Ser Asp Ser		
290	295	300
Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu His Lys Ala Gln Gly His Asn		
305	310	315
Asn Gly Val Cys Trp His Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr		
325	330	335
Thr Arg Ser Thr Asn Leu Thr Ile Cys Ala Ser Thr Gln Ser Pro Val		
340	345	350
Pro Gly Gly Tyr Asp Ala Thr Lys Phe Lys Gln Tyr Ser Arg His Val		
355	360	365
Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Thr Ile Thr Leu		
370	375	380
Thr Ala Asp Val Met Ser Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Ser Ile Leu		
385	390	395
Glu Asp Trp Asn Phe Gly Val Pro Pro Pro Thr Thr Ser Leu Val		
405	410	415
Asp Thr Tyr Arg Phe Val Gln Ser Val Ala Ile Thr Cys Gln Lys Asp		
420	425	430
Ala Ala Pro Ala Glu Asn Lys Asp Pro Tyr Asp Lys Leu Lys Phe Trp		
435	440	445
Asn Val Asp Leu Lys Glu Lys Phe Ser Leu Asp Leu Asp Gln Tyr Pro		
450	455	460
Leu Gly Arg Lys Phe Leu Val Gln		
465	470	

<210> 3
<211> 1416
<212> ДНК

<213> ЧАСТИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА hpv 16

<400> 3
atgtatcttt ggctgcctag tgaggccact gtctacttgc ctccctgtccc agtatctaag 60
gtttaagca cggatgaata tggcggcacgc acaaacatcat attatcatgc aggaacatcc 120
agactacttg cagttggaca tccctatttt cctattaaaaa aacctaaca taacaaaata 180
ttagttccta aagtatcagg attacaatac agggtattta gaatacattt acctgaccgc 240
aataagtttgc ttttcctga cacccattt tataatccag atacacagcg gctgggttgg 300
gcctgtgttag gtgttggagg aggtcgtggt cagccattag gtgtggccat tagtggccat 360
cctttattaa ataaattgaa tgacacagaa aatgtctatgtt cttatgcago aaatgcagg 420
gtggataata gagaatgtat atctatggat tacaacaaa cacaattgtg ttaattgg 480
tgcaaacccatctatgggaa acactggggc aaaggatccc catgtaccaa tggtcagta 540
aatccagggtt attgatccacc attagagtttta ataaacacacat ttattcagga tggtgatatty 600
gttgatactg gctttgggtc tatggactttt actacattac aggctaaacaa aagtgaagttt 660
ccactggata tttgtacatc tatttgcaaa tatccagatt atattaaaat ggtgtcagaa 720
ccatatggcg acagcttattt tttttatcca cgaagggaac aaatgtttgt tagacattta 780
tttaataggg ctgggtctgt tggtaaaaat gtaccagacg atttatacat taaaggctct 840
gggttotactg caaattttgc cagttcaaat tattttccta cacctagtgg ttctatgggtt 900
acctctgtatc ccacaaatattt caataaacctt tattggttac aacgagcaca gggccacaaat 960
aatggcattt gttggggtaa ccaacttattt gttactgtt gttgatactac aegcagttaca 1020
aatatgtcat tatgtgtctgc catatctact tcagaaacta cataaaaaa tactaactttt 1080
aaggagtacc tacgacatgg ggagggatattt gatttacagt ttatTTTCA actgtgcacaa 1140
ataacccatcaat ctgcagacgt tatgcacatac atacatttca tgaattccac tattttggag 1200
gactggaatt ttggcttaca acctccccca ggagggcacac tagaagatac ttataggttt 1260
gtaacatccc aggcaattgc ttgtcaaaaaa catacacctc cagcacctaa agaagatccc 1320
cttaaaaaat acacttttttgc ggaagttaaat ttaaaggaaat agttttctgc agaccttagat 1380
cagttccctt taggacgcaat tttttacta caataa 1416

<210> 4
<211> 1419

<212> ДНК

<213> ЧАСТИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА hpv 18

<400> 4

atggctttgt ggccgcctag tgacaatacc gtatatottc cacctccccc tggcaaga 60
 gttgtaaata ccgatgatta tgtactcgc acaagcatat ttatccatgc tggcagtc 120
 agattattaa ctgttggtaa tccatatttt agggttccctg cagggtgtgg caataagca 180
 gatattcccta aggttctgc ataccaat agagtattta gggtgcaattt acctgacc 240
 aataaaattt gtttacctga taatagtatt tataatccctt aaacacaacg tttagtgtt 300
 gcccgttgg gagtggaaat tggccgttgg cagcccccttgc ttgttggccct tagtggccat 360
 ccattttata ataaatttgc tgacatgaa agtccatgc cccccacgtc taatgtttt 420
 gaggacgtt gggacaatgt gtctgttagat tataaggaga cacaggatgc tattttggc 480
 tggccctgtt ctattggggaa acactggctt aaaggccactt cttgtaaatc gogtccctt 540
 tcacaggggg attgcccccc tttagaactt aaaaacacag ttttggaaaga tggtgatatt 600
 gtagatactg gatatggtgc catggacttt agtacattgc aagatactaa atgtgaggta 660
 ccattggata ttgtcagtc tattttgttata tattccgtattt atttacaaat gtcgtccat 720
 ccttatgggg attccatgtt ttttgcctt cggcggtgagc agcttttgc taggcatttt 780
 tggaaataggg caggtactat ggggtgacact gtgcctccat ccttataatataa taaaggcaca 840
 ggtatgcgtg ctccacctgg cagctgtgtg tattctccct ctccaagtgg ctotattgtt 900
 acctctgact cccagttgtt taataaaacca tattggttac ataaggcaca gggtcataac 960
 aatgtgttt gctggcataaa tcaattttttt gttactgtgg tagataccac tcgcagtacc 1020
 aatattaacaa tatgtgtttc tacacagtctt cttgtacccgc ggcaatataatgc tgcaccaaa 1080
 ttttaagoagt atagcagaca tggtagggaa tatgattttgc agttttttt tcaagttgtt 1140
 actattactt taactgcaga tggtagttcc tatattccata gtagaaatag cagtattttt 1200
 gaggatttggaa actttgggtt tcccccccccc ccaactacta gtttgggttacatataatgtt 1260
 tttgtacaat ctgttgcattt tacctgttcaaa aaggatgttgc cccggcttga aaaaataggat 1320
 ccctatgata agttaaatgtt ttggaaatgtt gattttaaagg aaaagttttc tttagacttta 1380
 gatcaatacc cccttggacg taaatttttgc ttccatgtt 1419

<210> 5

<211> 1419

<212> ДНК

<213> ЧАСТИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА hpv 31

<400> 5

atgtctctgt ggccgccttag cgaggctact gtctacttac cacotgtccc agtgtctaaa 60
 gttgtaaacca cggatgataa tgtaacacgc accaacaatattt attatcacgc aggcagtgc 120
 aggctgcttca cagtaggcaccc tccatattttt tccatccatca aatctgacaa tccaaaaaaa 180
 atagggttac caaaagggttc aggattacaaat tataagggtat tttaggttgc ttaccagat 240
 ccaacaaat ttggattttcc tgatacatct ttttataatc otgaaactca acgttttagtt 300
 tggccctgtg ttgggtttaga ggttagtgc gggcagccat taggtgttagg tattgtgg 360
 catcattat taaataaaattt tgatgacact gaaaactctta atagatatgc cggtggctt 420
 ggcactgata atagggaatg tataatcaatg gattttaaac aaacacaact gtgtttactt 480
 ggttgcacaaac cacctatgg agagcattgg gttaaaggta gtccttgc taaaatgtt 540
 attaccctgtt gttttttttcc tccataggaa ttaaaaaattt cagttatataa agatggggat 600
 atgggttgc caggctttgg agctatggat tttactgttttcaatggat taaaatggat 660
 gttcttttttttgc acattttgtt aatatccatg attatcttta aatgggttgc 720
 gagccatgtt gggatcattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 780
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 840
 tccgttcaa cagttactttt agcttacatgtt acataactttt tttttttttt tttttttttt 900
 gttacttgc atgcacaaat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 960
 aataatggta tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020
 accaatatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1080
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1140
 aaaaatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1200
 aaaaatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1260
 ccattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1320
 gatcaatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1380
 gatcaatggat tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1419

<210> 6

<211> 1428

<212> ДНК

<213> ЧАСТИЧНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ L1 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА HPV45

<400> 6

atggctttgt ggccggccctag tgacagtacg gtatatcttc caccacccctt tggggccaga 60
 gttgtcaaca ctgtatgatta tgggtctcgcc acaaggcatat ttatccatgc aggccagttcc 120
 cgattattaa ctgttaggcaa tccatattttt aggggttgtac ctatgtgtgc aggtataaaa 180
 caggctgttc ctaagggttacat cgcataactgtat ttaggggtgt ttagagtage ttatcccgt 240
 cctaataaat ttggatttacc tgatctact atatataatcc ctgaaacaca acgtttgggt 300
 tggycatgtg taggtatggaa aattggcgtt gggcagccctt taggtatgg cctaagtggc 360
 catccatattt ataataaaattt ggatgataca gaaagtgcctc atgcggctac ggctgttgc 420
 acgcaggatg tttagggataa tgggtcaat tttttttttt gattataaagc aaacacacatgtt 480
 ggttgttgc ctgtatgg tgagcactgg gccaaggggca cactttgtaa acctgcacaa 540
 ttgcagccctg gtgactgtcc tcctttggaa cttaaaaaca ccattattga ggatgggtat 600
 atgtggata caggttatgg ggcaatggat ttttagtacat tgcaggatatac aaagtgcgag 660
 gttccatttag acatttgcata atccatctgt aaatatccat attatttgcata aatgtctgt 720
 gatccctatg gggattctat gttttttgc ctacccgtt aacaactgtt tgcaagacat 780
 ttttggataa gggcagggtgt tatgggtgac acagttaccta cagacccata tattaaaggc 840
 actagcgtca atatgcgtca aaccctggc agttgtgtgt attcccttc tcccaatggc 900
 tctatttattt ctctgtattt tcaatttattt aataagccat attggttaca taaggccccag 960
 ggccataaca atggattttt ttggcataat cagttgtttt ttactgtatgg gacactacc 1020
 cgcaatgtacta atttaaacattt atgtgcctctt acacaaaatc ctgtgcagg tacatatgtat 1080
 cctactaagt ttaagcacta tagtagacat gtggaggaat atgatttaca gtttattttt 1140
 cagttgtgca ctattactttt aactgcagag gttatgtcat atatccatag tatgaatagt 1200
 agtatattgg aaaattggaa ttttgggtgtt cttccaccac ctactacaag ttttagtggat 1260
 acatatcgat tttgtcaatc agttgtgtt acctgtcaaa aggataactac acctccagaa 1320
 aagcaggatc catatgataa attaaagtttt tggactgtttt acctaaagga aaaattttcc 1380
 tccgattttgg atcaatatcc ctttggcata aagtttttag ttcagttaa 1428

