



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103119168 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201180043114. 9

A61P 31/20 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 07. 15

A61P 37/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 14/025 (2006. 01)

61/364, 750 2010. 07. 15 US

C12Q 1/70 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/564 (2006. 01)

2013. 03. 07

G01N 33/569 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2011/000823 2011. 07. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02012/006727 EN 2012. 01. 19

(71) 申请人 不列颠哥伦比亚癌症局分支机构

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 约翰·R·韦伯 戴润·阿恩·维克

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 15/37 (2006. 01)

A61K 39/12 (2006. 01)

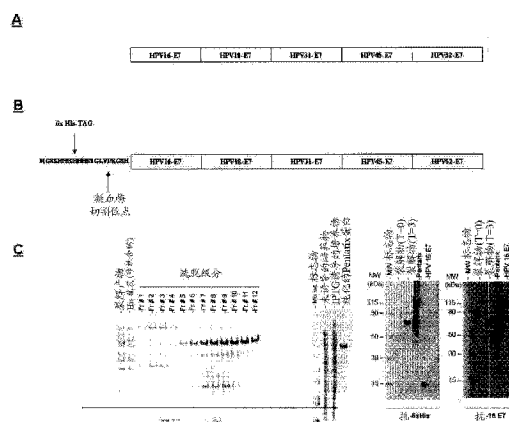
权利要求书3页 说明书33页 附图26页

(54) 发明名称

人乳头瘤病毒 E7 抗原组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗人乳头瘤病毒感染及相关疾病状况的人乳头瘤病毒 E7 抗原化合物和组合物。部分地, 本发明提供多肽和核酸分子及其使用方法, 所述多肽和核酸分子包含与两种或更多种人乳头瘤病毒 (HPV) E7 抗原的序列基本上一致的序列, 其中所述 E7 抗原选自至少两种不同的 HPV 毒株。



1. 多肽,其包含与两种或更多种人乳头瘤病毒 (HPV) E7 抗原的氨基酸序列基本上一致的氨基酸序列,其中所述 E7 抗原选自至少两种不同的 HPV 毒株。

2. 如权利要求 1 所述的多肽,其中所述不同的 HPV 毒株为高危毒株。

3. 如权利要求 2 所述的多肽,其中所述高危毒株选自以下的两种或更多种:HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68、HPV73 和 HPV82。

4. 如权利要求 1 所述的多肽,其中所述 E7 抗原选自 5 种不同的 HPV 毒株。

5. 如权利要求 4 所述的多肽,其中所述 5 种不同的 HPV 毒株包括 HPV16、HPV18、HPV31、HPV45 和 HPV52。

6. 如权利要求 1 所述的多肽,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:1-15 所示的两条或更多条氨基酸序列。

7. 如权利要求 6 所述的多肽,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:1-5 所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求 7 所述的多肽,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:16 或 17 所示的氨基酸序列。

9. 如权利要求 6 所述的多肽,其中所述多肽由这样的核苷酸序列编码,该核苷酸序列包含 SEQ ID NO:18-32 所示的两条或更多条核苷酸序列。

10. 如权利要求 8 所述的多肽,其中所述多肽由包含 SEQ ID NO:33 或 34 的核苷酸序列编码。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的多肽,其中所述多肽能够诱导针对至少两种不同 HPV 毒株的免疫应答。

12. 核酸分子,其包含与两种或更多种人乳头瘤病毒 (HPV) E7 抗原的核苷酸序列基本上一致的序列,其中所述 E7 抗原选自至少两种不同的 HPV 毒株。

13. 如权利要求 12 所述的核酸分子,其中所述不同的 HPV 毒株为高危毒株。

14. 如权利要求 13 所述的核酸分子,其中所述高危毒株选自以下的两种或更多种:HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68、HPV73 和 HPV82。

15. 如权利要求 12 所述的核酸分子,其中所述 E7 抗原选自 5 种不同的 HPV 毒株。

16. 如权利要求 15 所述的核酸分子,其中所述 5 种不同的 HPV 毒株包括 HPV16、HPV18、HPV31、HPV45 和 HPV52。

17. 如权利要求 12 所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:18-32 所示的两条或更多条核酸序列。

18. 如权利要求 17 所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:18-22 所示的核酸序列。

19. 如权利要求 18 所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO:33 或 34 所示的核酸序列。

20. 核酸分子,其编码权利要求 1-11 中任一项所述的多肽。

21. 表达载体,其包含权利要求 12-20 中任一项所述的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接到允许所述核酸序列在宿主细胞中表达的序列。

22. 宿主细胞,其包含权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 中所述

的表达载体。

23. 组合物,其包含权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞。

24. 如权利要求 23 所述的组合物,其还包含载体。

25. 如权利要求 23 或 24 所述的组合物,其还包含佐剂。

26. 如权利要求 25 所述的组合物,其中所述佐剂包含 T_{ol}1 样受体 (TLR) 激动剂。

27. 如权利要求 26 所述的组合物,其中所述 TLR 激动剂为 TLR3 激动剂或 TLR9 激动剂。

28. 如权利要求 27 所述的组合物,其中所述 TLR3 激动剂为多聚 (I:C)。

29. 如权利要求 27 所述的组合物,其中所述 TLR9 激动剂为包含 CpG 的寡核苷酸。

30. 如权利要求 25 所述的组合物,其中所述佐剂包括干扰素 α 、4-1BB 受体的激动剂、CD40 受体的激动剂或抗 CD40 抗体。

31. 在有需要的个体中刺激免疫应答的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞。

32. 治疗或预防有需要的个体中与 HPV 感染相关的疾病状况的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述与 HPV 感染相关的疾病状况选自以下的一种或多种:乳腺癌、宫颈癌、肛门癌、外阴癌、阴道癌、阴茎癌、头颈癌和肺癌,或以上的癌前病变。

34. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述与 HPV 感染相关的疾病状况为癌前宫颈上皮内瘤变 (CIN I 至 CIN III) 或宫颈癌。

35. 治疗有需要的个体中 HPV 感染的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞。

36. 如权利要求 31-35 中任一项所述的方法,其中所述 HPV 感染由高危型 HPV 引起。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述高危型 HPV 选自以下的一种或多种:HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68、HPV73 和 HPV82。

38. 如权利要求 31-37 中任一项所述的方法,其还包括给予佐剂。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述佐剂包含 T_{ol}1 样受体 (TLR) 激动剂。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述 TLR 激动剂为 TLR3 激动剂或 TLR9 激动剂。

41. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述 TLR3 激动剂为多聚 (I:C)。

42. 如权利要求 40 所述的方法,其中所述 TLR9 激动剂为包含 CpG 的寡核苷酸。

43. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述佐剂包括干扰素 α 、4-1BB 受体的激动剂、CD40 受体的激动剂或抗 CD40 抗体。

44. 如权利要求 31-43 中任一项所述的方法,其中所述给予包括在少于 14 天的时间范围内多剂量的给药。

45. 如权利要求 31-43 中任一项所述的方法,其中所述给予包括在 1-4 天内多剂量的给

药。

46. 如权利要求 44 或 45 所述的方法,其中所述给予包括多次日剂量的给药。

47. 有效量的权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞在有需要的个体中刺激免疫应答的用途。

48. 有效量的权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞在有需要的个体中治疗或预防与 HPV 感染相关的疾病状况的用途。

49. 如权利要求 48 所述的用途,其中所述与 HPV 感染相关的疾病状况选自以下的一种或多种:乳腺癌、宫颈癌、肛门癌、外阴癌、阴道癌、阴茎癌、头颈癌和肺癌,或以上的癌前病变。

50. 如权利要求 48 所述的用途,其中所述与 HPV 感染相关的疾病状况为癌前宫颈上皮内瘤变(CIN I 至 CIN III)或宫颈癌。

51. 有效量的权利要求 1-11 中任一项所述的多肽或权利要求 12-20 中任一项所述的核酸分子或权利要求 21 所述的表达载体或权利要求 22 所述的宿主细胞在有需要的个体中治疗 HPV 感染的用途。

52. 肽,其基本上由氨基酸序列 TSNYNIVTF(SEQ ID NO:35)、AEPDTSNYNIVTFCC(SEQ ID NO:36)或 TSNYNIVTFCCQCKS(SEQ ID NO:37)中的一个或多个组成。

53. 诊断 HPV31 感染的方法,其包括将样品与肽接触,所述肽基本上由氨基酸序列 TSNYNIVTF(SEQ ID NO:35)、AEPDTSNYNIVTFCC(SEQ ID NO:36)或 TSNYNIVTFCCQCKS(SEQ ID NO:37)中的一个或多个组成。

54. 确定个体对 HPV31 感染应答的方法,其包括将样品与肽接触,所述肽基本上由氨基酸序列 TSNYNIVTF(SEQ ID NO:35)、AEPDTSNYNIVTFCC(SEQ ID NO:36)或 TSNYNIVTFCCQCKS(SEQ ID NO:37)中的一个或多个组成。

人乳头瘤病毒 E7 抗原组合物及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗人乳头瘤病毒感染及相关疾病状况的化合物和组合物。更具体地,本发明涉及用于治疗人乳头瘤病毒感染及相关疾病状况的人乳头瘤病毒 E7 抗原化合物和组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 人乳头瘤病毒 (HPV) 是一组超过 100 种相关,但通常不同的病毒“种类”,其可以广义地分为低危和高危。低危型 HPV 与寻常疣(或乳头状瘤)相关,它们通常是良性的且没有生命危险。相比之下,高危型 HPV 的持续感染与癌前宫颈非典型性增生和宫颈癌相关(1、2)。高危型 HPV 还与肛门癌、外阴癌、阴道癌和阴茎癌(3),以及头颈癌的某些子集(4-6)和乳腺癌(57)相关。

[0004] 引起宫颈癌的高危型 HPV 通过性传播并且在正常的健康人群中十分普遍。据估算,大部分人在发生性活跃之后不久就被感染(7、59)。绝大部分高危 HPV 感染被认为是自我限制的,与病理学很少相关,然而感染高危 HPV 可能发展为恶性肿瘤(8)。

[0005] 尽管 HPV16 和 HPV18 是最普遍的高危型 HPV,然而还有很多其他高危型 HPV。近期对 1,918 例宫颈癌患者 1,928 例健康对照妇女的比较分析揭示,癌症患者中最常见的 HPV 类型(按频率降序排列)为 HPV 类型 16、18、45、31、33、52、58 和 35(11)。类似地,宫颈癌中 HPV 盛行的全球分析揭示,HPV16 存在于 50% 的病例中,HPV18 存在于 14% 的病例中,HPV45 存在于 8% 的病例中并且 HPV31 存在于 5% 的病例中,而 13 种“高危”类型中的其他成员组成剩余的病例(12)。

[0006] 由于 HPV16 和 HPV18 的盛行,它们已经是意在预防 HPV 的最初感染的广泛预防免疫计划的焦点(9、10),并且目前批准的预防性疫苗靶向高危毒株 HPV16 和 HPV18(以及低危毒株 HPV6 和 HPV11),预期预防性疫苗将消灭或预防以后的生活中 HPV 相关的恶性肿瘤的发生。还显示,HPV16 和 HPV18 预防性疫苗可以赋予针对其他高危型 HPV 的部分交叉保护(13-15)。

[0007] 目前临床应用的预防性 HPV 疫苗由自发地形成人工病毒样颗粒(VLP)的重组病毒衣壳糖蛋白(L1)组成(60、61)。用基于 VLP 的免疫,预防性疫苗产生针对 L1 蛋白的强烈的中和抗体应答,其防止病毒感染变成既定事实。

[0008] 然而,预防性疫苗似乎对既定的感染有很小的影响(16)。例如,宫颈癌预防性疫苗对那些已经暴露于 HPV 的个体是无效的,因为一旦病毒已经进入到细胞中,其被保护免受细胞外抗体的中和作用,从而允许病毒复制(和潜在性感染)顺利进行。感染高危 HPV 可能导致病毒游离基因整合入宿主 DNA 中,通常导致一些早期(E2、E4 和 E5)基因和晚期(L1 和 L2)基因的删除,保留 HPV 蛋白 E6 和 E7,它们是仅有的在感染的细胞中持续表达的病毒蛋白(23, 24, 59)。在这种情况下,疫苗诱导的针对 L1 衣壳蛋白的免疫对治疗无效。

[0009] 此外,由于 HPV 感染在当今成人人群中的高度流行以及宫颈癌变的缓慢进程,预期将在 20 年或更多年后直到预防性疫苗大量实施后,将对宫颈癌的发病率有影响。此外,在一些实例中,预防性疫苗已经遭遇抗性并且接种疫苗的比例是多变的(17)。在一些地区,

疫苗成本仍然是个问题 (18)。

[0010] 治疗性 HPV 疫苗 (设计为通过产生针对表达病毒蛋白的 HPV 感染细胞的细胞免疫, 消灭之前已经存在的病变) 已被开发作为 HPV 相关癌症治疗的替代品 (综述于, 参见 19, 20, 62-65), 并且许多这些方法已经针对开发能引起强烈 CD8T 细胞应答的疫苗, 因为目前证明许多疫苗通常难以引起 CD8 免疫 (66, 67)。HPV E7 治疗性接种方法已经包括肽免疫 (26, 28-30), DNA 免疫 (31-33, 68), 利用重组的表达 E7 的牛痘病毒免疫 (25, 34), 用腺病毒免疫 (35-37), 用鼠伤寒沙门氏菌免疫 (38, 39) 或用单核细胞增多性李斯特氏菌免疫 (40, 41), 用 E7 脉冲树突状细胞免疫 (42-45) 或用包含 E7 的病毒样颗粒 (VLP) 免疫, 以及用已经进行早期临床试验的这样一些治疗性疫苗策略免疫。

[0011] 许多这些治疗性疫苗策略通常在逻辑上是繁琐的, 并且其引起的应答极少达到在真正的抗病毒免疫应答的急性期所观察到的 CD8T 细胞增殖的水平 (69)。通过加强接种增强 CD8 免疫的策略已经用于引起 CD8 免疫, 所述策略例如多种类型的异源初免-加强策略, 包括用于初免-加强的 DNA-肽, DNA-病毒或两种不同的病毒载体 (70-72)。然而, 这些方法难以转化至临床, 并且关于哪种方法最佳没有共识。

[0012] HPV 疫苗已在很多出版物中公布, 包括 PCT 公布 W02005/089164 (2005 年 9 月 29 日公布), W02007/121894 (2007 年 11 月 1 号公布), W02007/121895 (2007 年 11 月 1 日公布), W02008/049329 (2008 年 5 月 2 日公布), 和 W02008/145745 (2008 年 12 月 4 号公布)。

[0013] TC-1 模型肿瘤系统, 最初来源于用 HPV16 的 E6 和 E7 癌基因转化的小鼠原代肺上皮细胞, E6 和 E7 癌基因是感染细胞的转化和永生化以及转化状态的细胞的维持 (21, 22), 以及活化人 c-Ha-ras 所必需的 (25), 该系统已被广泛采用为 HPV 治疗性疫苗的测试系统。TC-1 肿瘤细胞植入免疫感受态 C57BL/6 小鼠导致接种部位形成快速进展的肿瘤。然而, 针对 HPV16E7 蛋白的特异性细胞免疫可以赋予对 TC-1 肿瘤生长的保护。例如, 已报道, 对 E7 的 H-2Db-限制性表位 (E749-57; RAHYNIVTF) 特异的 CD8+T 细胞能够裂解表达 E7 的肿瘤细胞, 并且造成已建立的 TC-1 肿瘤的消退 (26, 27)。

[0014] 整个外源蛋白质免疫接种已经表明是诱导 I 类 MHC 限制性 CD8+T 细胞应答的低效手段 (50)。然而, 已经报道, 当分别与 QuilA 或含有 CpG 的寡核苷酸一起递送时, 用重组的 (51) 或合成的 (52) 全长 E7 蛋白免疫能够诱导 CD8+T 细胞免疫。同样, 由免疫原性的热休克蛋白 (HSP) 和选定的靶抗原之间融合组成的重组蛋白也被报告诱导对该靶抗原的 CD8+免疫。已经表明, 用整个外源蛋白质加 TLR3 或 TLR9 激动剂的免疫促进交叉启动的过程, 并促进抗原特异性 CD8+T 细胞应答的发展 (55, 56)。

[0015] 目前, 宫颈非典型性增生和早期宫颈癌是最常见使用被称为 LEEP (环形电切术) 的外科手术治疗, 其中使用带有电流的细铁丝环去除异常组织。更晚期的宫颈癌通过手术 (部分或根治性子宫切除术) 结合化疗或放射治疗而治疗。

[0016] 发明简述

[0017] 本发明一部分提供了人乳头瘤病毒 E7 抗原的化合物和组合物。所述化合物和组合物可用于治疗或诊断人乳头瘤病毒感染和相关的疾病状况。

[0018] 在一方面中, 本发明提供了多肽, 其包含与两种或更多种人乳头瘤病毒 (HPV) E7 抗原的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列, 其中所述 E7 抗原选自至少两种不同的 HPV 毒株。

[0019] 在可替代的实施方案中,不同的 HPV 毒株可以是高危毒株,如 HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 或 HPV82。在可替代的实施方案中,E7 抗原可以选自五种不同的 HPV 毒株,如 HPV18, HPV16, HPV31, HPV45 和 HPV52。

[0020] 在可替代的实施方案中,所述多肽可包含两个或更多个 SEQ ID NO:1 至 15 所示的氨基酸序列,或 SEQ ID NO:1 至 5 中所示的氨基酸序列,如 SEQ ID NO:16 或 17 所示的氨基酸序列。

[0021] 在可替代的实施方案中,所述多肽可由包含两个或更多个 SEQ ID NO:18 到 32 所示的核苷酸序列的核苷酸序列编码。

[0022] 在可替代的实施方案中,所述多肽可由包含两个或更多个 SEQ ID NO:18 到 22 所示的核苷酸序列的核苷酸序列编码,如 SEQ ID NO:33 或 34。

[0023] 在可替代的实施方案中,E7 抗原可以诱导对两种不同 HPV 毒株的免疫应答。

[0024] 在其它方面,本发明提供了核酸分子,其包含与两种或更多种人乳头瘤病毒 (HPV) E7 抗原的核苷酸序列基本上相同的序列,其中所述 E7 抗原选自至少两种不同的 HPV 毒株。

[0025] 在可替代的实施方案中,不同的 HPV 毒株可以是高危毒株,如 HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 或 HPV82。

[0026] 在可替代的实施方案中,E7 抗原可以选自五种不同的 HPV 毒株,如 HPV16, HPV18, HPV31, HPV45 和 HPV52。

[0027] 在可替代的实施方案中,所述核酸分子可以包含两个或更多个 SEQ ID NO:18 至 32 所示的核酸序列。

[0028] 在可替代的实施方案中,所述核酸分子可以包含 SEQ ID NO:18 至 22 所示的核酸序列,如 SEQ ID NO:33 或 34。

[0029] 在其它方面中,本发明提供了编码 HPV E7 多肽的核酸分子。

[0030] 在其它方面中,本发明提供了包含本文所述的核酸序列的表达载体,所述核酸序列可操作地连接到允许所述核酸序列在宿主细胞中表达的序列。

[0031] 在其它方面中,本发明提供了包含如本文所述的核酸分子或表达载体的宿主细胞。

[0032] 在其它方面中,本发明提供一种组合物,所述组合物包含本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞。所述组合物可包含载体和 / 或佐剂。佐剂可以是 Toll 样受体 (TLR) 激动剂诸如 TLR3 激动剂 (例如,多聚 (I:C)) 或 TLR9 激动剂 (例如,含有 CpG 的寡核苷酸) 等。作为另外一种选择或除此之外,该佐剂可以是干扰素 α , 4-1BB 受体的激动剂, CD40 受体的激动剂,或抗 -CD40 抗体。

[0033] 在其它方面中,本发明提供了通过给予有需要的个体本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞而在所述个体中刺激免疫应答的方法。在替代方面中,本发明提供了通过给予有需要的个体本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞而治疗或预防所述个体中与 HPV 感染相关的疾病状况的方法。在替代方面中,本发明提供了通过给予有需要的个体本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞而治疗所述个体 HPV 感染的方法。

[0034] 在其它方面中,本发明提供了本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞在有需要的个体中刺激免疫应答的用途。在其它方面中,本发明提供了本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞在治疗或预防有需要的个体中与 HPV 感染相关的疾病状况的用途。在其它方面中,本发明提供了本文所述的多肽、核酸分子、表达载体或宿主细胞治疗有需要的个体中 HPV 感染的用途。

[0035] 与 HPV 感染相关的疾病状况可以是乳腺癌,宫颈癌,肛门癌,外阴癌,阴道癌,阴茎癌,头颈癌和肺癌,或其癌前病变中的一种或多种,或者可以是癌前宫颈上皮内瘤变 (CIN I 至 CIN III) 或宫颈癌。

[0036] 在可替代的实施方案中,HPV 感染可以是高危型 HPV,如 HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 或 HPV82。在可替代的实施方案中,所述方法或用途还可以包括给予佐剂,如 Toll 样受体 (TLR) 激动剂 (例如,TLR3 激动剂如多聚 (I:C) 或 TLR9 激动剂如含有 CpG 的寡核苷酸)。作为另外一种选择或除此之外,该佐剂可包括干扰素 α , 4-1BB 受体的激动剂,CD40 受体的激动剂,或抗-CD40 抗体。给药可以包括在少于 14 天的时期多剂量给药,或可以包括在 1 至 4 天的多剂量给药,和 / 或可以包括多个日剂量给药。

[0037] 在其它方面中,本发明提供了基本上由序列 TSNYNIVTF (SEQ ID NO :35), AEPDTSNYNIVTFCC (SEQ ID NO :36) 或 TSNYNIVTFCCQCKS (SEQ ID NO :37) 中的一个或多个组成的肽。在其它方面中,本发明提供了诊断 HPV31 感染的方法,包括将样品与基本上由序列 TSNYNIVTF (SEQ ID NO :35), AEPDTSNYNIVTFCC (SEQ ID NO :36) 或 TSNYNIVTFCCQCKS (SEQ ID NO :37) 中的一个或多个组成的肽接触。在其它方面中,本发明提供了确定个体对 HPV31 感染的应答的方法,包括将样品与基本上由序列 TSNYNIVTF (SEQ ID NO :35), AEPDTSNYNIVTFCC (SEQ ID NO :36) 或 TSNYNIVTFCCQCKS (SEQ ID NO :37) 中的一个或多个组成的肽接触。

[0038] 本发明简述不一定描述了本发明的所有特征。

附图说明

[0039] 从下面的描述中,参考了附图,本发明的这些特征和其它特征将变得更加明显,其中:

[0040] 图 1A-B 是示出不具有亲和标签的 Pentarix 蛋白 (A),或具有可切割的 6 $\times$ 亲和标签和凝血酶切割位点的 Pentarix 蛋白 (B) 的示意图。

[0041] 图 1C 示出了具有可切割的 6 $\times$ 亲和标签的 Pentarix 蛋白的制备和纯化。该图显示了重组 Pentarix 蛋白在大肠杆菌中的表达和使用镍亲和纯化的典型纯化的实例。通过考马斯亮蓝染色检测通过 HisTrap 柱 (GE Healthcare) 之前和之后的 IPTG- 诱导的大肠杆菌裂解物内包含的总蛋白和在渐增浓度的咪唑存在下从该柱 (Fr # 1-12) 中洗脱的蛋白 (左图)。纯化的 Pentarix 蛋白的鉴定是通过利用抗 6 $\times$ his 标签抗体或抗 HPV16E7 抗体对来自未诱导的和诱导的培养物的裂解物以及纯化的 Pentarix 和 HPV16E7 蛋白进行免疫印迹分析来确认。

[0042] 图 2A 是图表,示出响应于用完整的外源性 OVA 蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 或多聚 IC/LC 免疫而诱导的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8_T 细胞应答。用加上或减去多聚 (I:C) (10 μ g)

或多聚 IC/LC (10 μ g/ml) 的完整的 OVA 蛋白 (500 μ g) 对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (2 只小鼠 / 情况) 进行免疫。免疫后七天处死小鼠, 并通过 IFN- γ ELISPOT 对免疫小鼠大量脾细胞中的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。结果报告为仅用介质、用 SIINFEKL 肽 (10 μ g/ml) 或不相关的 H2Db 结合肽 (10 μ g/ml) 刺激后, 每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。

[0043] 图 2B 是图表, 示出用完整的外源性 OVA 蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 免疫接种后, 以剂量依赖性的方式诱导 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8T 细胞应答。

[0044] 图 3A-E 显示响应于长或短间隔 (集群) 的同源初免 - 加强免疫而诱导的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8+T 细胞或 HPV16E7 应答。A. 用完整的 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 在 -7 天、-21 天、或 -7 天和 -21 天对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (2 只小鼠 / 情况) 进行免疫, 并在第 0 天处死。通过 IFN- γ ELISPOT 对免疫小鼠大量脾细胞中的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。B. 用指定数量的连续日剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 与多聚 (I:C) (10 μ g) 混合对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (3 只小鼠 / 情况) 进行免疫。一组额外的小鼠接受单次免疫, 相当于正常日剂量的 4 倍 (即 400 μ g 的 OVA 蛋白加 40 μ g 的多聚 (I:C))。第一次免疫后七天处死小鼠, 通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂, 以对 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。A 和 B 的结果被报告为仅用介质或用 SIINFEKL 肽 (10 μ g) 刺激后每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。C. 如显示的, 用 1 次剂量或 4 次连续日剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠进行免疫。D. 从第一轮免疫模拟后第 47 天开始, 用另一相同的 4 次连续日剂量对图 C 中接受 4 次连续日剂量的 OVA 蛋白加多聚 (I:C) 的小鼠进行重新免疫。从个体小鼠的隐静脉获得外周血, 在免疫后指定的天数连续放血。裂解外周血中的 RBC, 用 FITC 标记的抗 -CD8 和 PE 标记的 H-2Kb/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 四聚体对淋巴细胞进行染色, 并通过流式细胞术分析。C 和 D 中所示的事件是在 CD8+ 淋巴细胞上设门分选的, 并来自代表性的单个动物, 从而允许精确监测指定的动物中抗原特异性 T 细胞应答随时间的进展。E. 用 1 次剂量 (左图), 四次连续日剂量的完整的可溶性 HPV16E7 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g), 或仅用四次连续日剂量的完整的可溶性 HPV16E7 蛋白 (100 μ g) 对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠进行免疫。免疫后七天, 从免疫的小鼠获得外周血。用 FITC 标记的抗 -CD8 和 PE 标记的 D^b/E7₄₉₋₅₇ 四聚体对淋巴细胞进行染色, 并通过流式细胞术进行分析。显示的事件是对 CD8⁺ 淋巴细胞设门分选的。

[0045] 图 4 是表示用完整的可溶性蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 连续每日免疫接种诱导大的已建立的肿瘤的消退的一系列图表。在第 0 天向 C57BL/6 小鼠 (3 只小鼠 / 群) 植入表达 OVA 的 EG7 肿瘤细胞 (1×10^5), 并进行以下处理: 留下未处理 (左上), 或用 1 次剂量的多聚 (I:C) (10 μ g) 处理 (右上), 或用 1 次剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 处理 (左下), 或用 4 次连续日剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 处理 (右下)。箭头指示每组的处理时间。每组处理时的平均肿瘤体积为 224mm³ (只用多聚 (I:C)), 194mm³ (1 次剂量的 OVA+ 多聚 (I:C)) 或 344mm³ (4 次剂量的 OVA+ 多聚 (I:C))。最后一群小鼠故意在肿瘤尺寸较大时处理, 以体现连续每日免疫接种的有利影响。

[0046] 图 5A 和 5B 是示出响应于用完整的 Pentarix 蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 进行

单次免疫接种而诱导的 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞应答的图。初次接受实验的 C57BL/6 小鼠被留下未处理,或用 100 μ g 完整的可溶性 Pentarix 蛋白与 10 μ g 的多聚 (I:C) 混合进行免疫,或仅用 10 μ g 的多聚 (I:C) 处理 (5B)。免疫后七天处死小鼠,通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂,以对 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。简要地说,仅用介质或用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽 (10 μ g/ml) 或不相关的对照肽 (KAVYNFATM; SEQ ID NO:40) 对来自个体动物的脾细胞 (3×10^5 细胞 / 孔,每种情况三个孔) 进行过夜刺激。包括来自初次接受实验 (未免疫过) 的小鼠的结果用于进行比较。结果报告为仅用介质,或用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽或不相关的肽 (10 μ g/ml) 刺激后,每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目 (5B)。

[0047] 图 6A 和 6B 是示出响应于用完整的 Pentarix 蛋白加 TLR9 激动剂 CpG 寡核苷酸的单次免疫接种而诱导的 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞应答的图。初次接受实验的 C57BL/6 小鼠被留下未处理或用 100 μ g 完整的可溶性 Pentarix 蛋白与 10 μ g 的 CpG 寡聚物 # 2395 (Invivogen) 混合进行免疫,或仅用 CpG 寡聚物进行免疫。免疫后七天处死小鼠,通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂,以对 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。简要地说,仅用介质或用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽 (10 μ g/ml) 或不相关的对照肽 (KAVYNFATM; SEQ ID NO:40) 对来自个体动物的脾细胞 (3×10^5 细胞 / 孔,每种情况三个孔) 进行过夜刺激。包括来自初次接受实验 (未免疫过) 的小鼠的结果用于进行比较。结果报告为仅用介质,或用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽或不相关的肽 (10 μ g/ml) 刺激后,每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。图 6B 中所给出的数据代表三次实验;结果报告为每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目 $\pm$ SD,一式三份。

[0048] 图 7A-B 是示出响应于用完整的 Pentarix 蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 单次免疫接种,或用 4 次连续日剂量的 Pentarix 蛋白加多聚 (I:C) 免疫接种而诱导的 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞应答的图。初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (对于图 7B 每群 3 只) 被留下未处理 (初次接受实验),或用 100 μ g 完整的可溶性 Pentarix 蛋白与 10 μ g 多聚 (I:C) 混合进行 1 次或 4 次免疫 (第 1-4 天每天 1 次)。免疫后七天 (7A) 或八天 (7B) 处死小鼠,通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂,以对 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。结果报告为仅用介质或用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 或不相关的肽 (10 μ g/ml) 刺激后每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目 (7B)。仅用介质或用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽 (10 μ g/ml) 或不相关的对照肽 (KAVYNFATM, SEQ ID NO:40) 对来自个体动物的脾细胞 (3×10^5 细胞 / 每孔) 进行过夜刺激。图 7B 中所给出的数据代表三次实验;结果报告为每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目 $\pm$ SD,一式三份。

[0049] 图 7C 显示了研究结果,其中用 FITC 标记的抗 -CD8 和 PE 标记的 D^b/16E7₄₉₋₅₇ 四聚体对来自连续 4 天用 100 μ g Pentarix 蛋白加 10 μ g 多聚 (I:C) (左二图) 或仅用 100 μ g Pentarix 蛋白 (右图) 进行免疫的小鼠的脾脏和外周血淋巴细胞进行染色,并用流式细胞术分析。示出的事件是对 CD8 淋巴细胞设门分选的并代表 4 只这样的动物。

[0050] 图 8A 和 8B 是显示用完整的可溶性 Pentarix 蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 进行免疫接种诱导大的已建立的 TC1 的一系列图表。A. 在第 -14 天向 C57BL/6 小鼠 (3 只小鼠 / 群) 植入表达 E7 的 TC1 肿瘤细胞 (3×10^5),在第 0 天 (当肿瘤达到约 200mm³ 的尺寸),小鼠被留下未处理 (左),或用 1 次剂量的多聚 (I:C) (10 μ g) 处理 (中) 或 1 次剂量的完整的可溶性 Pentarix 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 处理 (右)。使用电子数显卡

尺每 2-3 天测量肿瘤,并使用以下公式计算大小:宽度²×长度×0.5。B. 向初次接受实验的 C57BL/6 小鼠(8 只/群)皮下植入 1×10^5 个表达 E7 的 TC-1 肿瘤细胞。一旦肿瘤达到 350mm^3 的平均体积,用单次剂量的 Pentarix(100 μg) 加多聚(I:C)(10 μg) 处理小鼠,4 次连续日剂量的 Pentarix(100 μg) 加多聚(I:C)(10 μg) 处理小鼠,仅用 4 次连续日剂量的多聚(I:C)(每剂量 10 μg) 处理小鼠,或保留小鼠为未处理。用电子卡尺每 2 至 4 天测量肿瘤,当肿瘤体积超过约 $2,000\text{mm}^3$ 或当小鼠垂死或失去 >20% 的体重时处死荷瘤小鼠。数据显示为群内所有小鼠的平均肿瘤体积(左图)或存活率(右图)。

[0051] 图 8C 为用 Pentarix 蛋白加多聚(I:C)对 TC1 荷瘤小鼠进行免疫接种诱导肿瘤完全消退,并建立在肿瘤进展后保持的 E7 特异性 CD8+ 记忆细胞。向初次接受实验的 C57BL/6 小鼠皮下植入 1×10^5 个表达 E7 的 TC-1 肿瘤细胞。一旦肿瘤达到 200mm^3 的平均体积,用单次剂量的 Pentarix(100 μg) 加多聚(I:C)(10 μg) 处理小鼠,免疫接种后 15 天之内肿瘤完全消退。免疫后 21 天从隐静脉取外周血样品,并用 FITC 标记的抗-CD8 和 PE 标记的 D^b/16E7₄₉₋₅₇ 四聚体,以及记忆表现型标记 CD62L,CD127 和 KLRG1 进行染色,并用流式细胞仪分析。示出的时间是对 CD8+ 淋巴细胞设门分选的。

[0052] 图 9A-B 是表示用完整的可溶性 Pentarix 蛋白结合多聚(I:C)或 CpG 寡核苷酸进行免疫接种诱导已建立的 TC1 肿瘤的消退的一系列图表。A. 在第 -21 天向 C57BL/6 小鼠(4 只小鼠/群)植入表达 E7 的 TC1 肿瘤细胞(1×10^5),并且在第 0 天,用 1 次剂量的完整的可溶性 Pentarix 蛋白(100 μg) 加 CpG 寡聚物 # 2395(10 μg) 处理(左上)或仅用 1 次剂量的 CpG 寡聚物 # 2395(10 μg) 处理(右上)或留下未经处理(左下)。使用电子数显卡尺每 2-3 天测量肿瘤,并使用以下公式计算大小:宽度²×长度×0.5。左上方,右上方和左下方 3 张图显示个体小鼠中的肿瘤消退,而右下图显示每群的组合平均肿瘤体积测量结果。B. 向初次接受实验的 C57BL/6 小鼠(指定数量的小鼠/群)皮下植入 1×10^5 个表达 E7 的 TC-1 肿瘤细胞。一旦肿瘤达到约 200mm^3 的平均体积,(如上)用单次剂量的 Pentarix(100 μg) 加多聚(I:C)(10 μg) 处理小鼠,或用单次剂量的 Pentarix(100 μg) 加 CpG 寡核苷酸(10 μg) 或多聚(I:C)(10 μg) 处理小鼠,或仅用 CpG 寡核苷酸(10 μg) 或 Pentarix 蛋白(100 μg) 处理小鼠,或留下小鼠未处理。用电子卡尺每 2 至 4 天测量肿瘤,并且数据显示为每群内的个体小鼠随时间的肿瘤体积(上部 6 幅图)或群内所有小鼠的存活率(下部 2 幅图)。当肿瘤体积超过约 $2,000\text{mm}^3$ 或当小鼠垂死或失去 >20% 体重时处死荷瘤小鼠,采用 log 秩次(曼特尔-考克斯)检验计算 p 值。

[0053] 图 10A 是示出响应于用完整的 Pentarix 蛋白加 TLR3 激动剂多聚(I:C)进行单次免疫接种而诱导的表位特异性 CD8+T 细胞应答的图。用 100 μg 完整的可溶性 Pentarix 蛋白与 10 μg 多聚(I:C)(Amersham)混合对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠进行免疫接种。免疫后七天处死小鼠,通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂,以对示出的各种肽特异的 CD8+T 细胞的数目进行定量。结果报告为仅用介质或指定的肽(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激后,每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。

[0054] 图 10B-D 是表示用完整的可溶性 Pentarix 蛋白加多聚(I:C)进行免疫接种诱导针对多个 HPV 基因型的免疫应答的图。用 100 μg Pentarix 蛋白结合 10 μg 多聚(I:C)对 C57BL/6(B) 或 HLA-A2/D^b 转基因小鼠(C) 连续 4 天每天进行免疫(s.c.)。免疫后八天处死小鼠,通过 IFN- γ ELISPOT 分析大量(B和C)或 CD4 剔除的脾细胞制剂(仅B)(剔除后通过

FACS 分析测量, CD4 剔除为 >99%)。用跨越整个 Pentarix 蛋白的覆盖 15 聚体的肽组 (重叠 11 个氨基酸) 对大量脾细胞和 CD4 剔除的脾细胞制剂进行过夜刺激。D. 仅用介质, 或用最小肽表位 HPV16E7₄₉₋₅₇, HPV31E7₄₉₋₅₇ 或不相关的对照肽 (KAVYNFATM) 对来自利用 Pentarix 蛋白结合 10 μg 多聚 (I:C) 进行免疫 (s. c.) 的 C57BL/6 小鼠的脾细胞进行过夜刺激, 并通过 IFN-γ ELISPOT 进行分析。结果报告为每 1×10⁶ 个脾细胞中 IFN-γ 斑点形成细胞的数目, 并代表 3 个这样的实验。

[0055] 图 11 是示出响应于仅用完整的 Pentarix 蛋白 (无佐剂) 单次免疫或仅用 4 次连续日剂量的 Pentarix 蛋白 (无佐剂) 免疫而诱导的 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞应答的图。用 PBS 中的 100 μg 完整的可溶性 Pentarix 蛋白对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠进行 1 次或 4 次 (第 1-4 天每天 1 次) 免疫接种。免疫后七天处死小鼠, 通过 IFN-γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂, 以对 HPV16E7₄₉₋₅₇ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。结果报告为仅用介质, 用 HPV16E7₄₉₋₅₇ 或不相关的阴性对照肽 (每种为 10 μg/ml) 刺激后, 每 1×10⁶ 个脾细胞中 IFN-γ 斑点形成细胞的数目。

[0056] 图 12A-0 显示分别来自 HPV16, HPV18, HPV31, HPV45, HPV52, HPV33, HPV35, HPV39, HPV51, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73, HPV82 的 E7 蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NOs : 1-15) 和核苷酸序列 (SEQ ID NOs : 18-32)。

[0057] 图 12P-Q 显示有 (SEQ ID NO : 16) 和没有 (SEQ ID NO : 17) 氨基末端的 6×His 亲和标签的 Pentarix 蛋白的氨基酸序列。

[0058] 图 12R-S 显示有 (SEQ ID NO : 34) 和没有 (SEQ ID NO : 33) 氨基末端的 6×His 亲和标签的 Pentarix 蛋白的核苷酸序列。

[0059] 发明详述

[0060] 本发明一部分提供了人乳头瘤病毒 E7 抗原的化合物和组合物。所述化合物和组合物可用于治疗或诊断人乳头瘤病毒感染和相关的疾病状况。

[0061] 在一些实施方案中, 本发明的化合物和组合物可用于靶向多种 HPV 类型, 例如, 至少两种或更多种 HPV 基因型, 如高危型 HPV。因此, 本发明的化合物和组合物可以用于诱导针对一种或多种 HPV 类型的免疫应答, 从所述 HPV 类型得到所述化合物或组合物所包含的 HPV E7 抗原, 或与 HPV E7 抗原基本相同的序列。具有广泛的人口覆盖率的这些化合物和组合物在商业上可能是有用的, 因为它们适用于更大的人群。

[0062] 人乳头瘤病毒 (HPV)

[0063] “人乳头瘤病毒”或“HPV”是指属于一组 100 多种相关, 但遗传上为不同“类型”的病毒, 大致可归类为“低危”和“高危”。

[0064] “低危”型 HPV 包括, 但不限于, HPV 类型 HPV11, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV54, HPV61, HPV70, HPV72, 和 HPV81。

[0065] “高危”型 HPV 包括, 但不限于, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 和 HPV82。

[0066] HPV 基因组通常是由蛋白质衣壳包围的约 7000-8000 个碱基对的双链环状 DNA。基因组具有编码早期抗原 E1-E7 的早期 (E) 区和编码结构性 L1 和 L2 衣壳蛋白的晚期 (L) 区。E6 和 E7 蛋白是感染的细胞的转化和永生化的, 并且需要这些蛋白质的持续表达以维持细胞处于转化状态。有时, HPV DNA 整合到宿主细胞的 DNA 中, 并且这一过程与几

种病毒基因的丧失有关。例如,整合通常导致几种早期(E2, E4 和 E5) 和晚期(LI 和 L2) 基因的缺失,留下 E6 和 E7 作为在被感染的细胞中持续表达的唯一病毒蛋白。HPV 基因组序列已被描述,并且在不同的公共数据库可获得。这样的序列,可以参见,例如,GenBank 登录号 02718(HPV16), X05015(HPV18), J04353(HPV31), M12732(HPV33), M62849(HPV39), X74479(HPV45), NC_001533(HPV51), X74481(HPV52), X74483(HPV56), D90400(HPV58), NC_001635/X77858(HPV59), X67161(HPV68) 等。

[0067] 来自多种 HPV 类型的 E7 抗原的序列已被描述,并且在不同的公共数据库可获得。这样的序列,可以参见,例如,GenBank 登录号 NP_041326(HPV16E7), NP_040311(HPV18E7), AAA46951(HPV31E7), AAA46959(HPV33E7), AAA46967(HPV35E7), AAA47051(HPV39E7), P21736(HPV45E7), P26558(HPV51E7), P36831(HPV52E7), P36833(HPV56E7), P26557(HPV58E7), CAA54850(HPV59E7), P54668(HPV68E7), CAA63883(HPV73E7) 和 AAK28450(HPV82E7) 等。

[0068] 治疗的适应症

[0069] 本发明的化合物和组合物可用于治疗 HPV 感染或与这样的感染相关的疾病状况。HPV 感染已与多种疾病状况相关,包括但不限于,寻常疣(或乳头状瘤),癌症等。在一般情况下,低危型 HPV 与寻常疣(或乳头状瘤)相关,而高危型 HPV 与癌症相关。

[0070] “癌”或“赘生物”是指任何不想要的没有生理功能的细胞生长。在一般情况下,赘生物细胞从其正常的细胞分裂控制脱离,即其在细胞环境中的生长不受通常的生物化学和物理影响的细胞。在大多数情况下,赘生物细胞增殖形成良性或恶性的细胞克隆。癌或赘生物的例子包括,但不限于,转化的和永生化的细胞,肿瘤,以及癌症,例如乳腺细胞癌和宫颈癌。术语癌包括严格来说是良性的,但携带变成恶性的风险的细胞生长。“恶性”是指任何细胞类型或组织的异常生长。术语恶性包括严格来说是良性的,但携带变成恶性的风险的细胞生长。该术语还包括任何癌(cancer),癌症(carcinoma),赘生物(neoplasm),瘤形成(neoplasia)或肿瘤(tumor)。

[0071] 因此,“与 HPV 感染相关的疾病状况”是指已经与现有的 HPV 感染的存在相关的任何疾病状况、疾病或病症,例如,已经与现有的高危 HPV 感染的存在相关的任何疾病状况、疾病或病症。在一些实施方案中,与 HPV 感染相关的疾病状况包括宫颈、下生殖道或肛门生殖道、皮肤或口腔的疾病状况、疾病或病症。

[0072] 在一些实施方案中,与 HPV 感染相关的疾病状况包括宫颈、下生殖道或肛门生殖道道的恶性和/或癌前病变,例如,宫颈癌,肛门癌,外阴癌,阴道癌,会阴癌,阴茎癌等,或其癌前病变。在可替代的实施方案中,与 HPV 感染相关的疾病状况包括肺癌,呼吸道癌,上皮细胞癌,头颈癌,乳腺癌,口腔癌等,或其癌前病变。

[0073] 在可替代的实施方案中,与 HPV 感染相关的疾病状况包括癌前非典型性增生的疾病状况,例如癌前宫颈非典型性增生,宫颈上皮内瘤样病变(CIN)1 级,2 级或 3 级,外阴上皮内瘤样病变(VIN),阴道上皮内瘤样病变(VAIN),肛门上皮内瘤样病变(AIN) 等。

[0074] 在一些实施方案中,本发明的化合物和组合物可用于诊断 HPV 感染。在可替代的实施方案中,包含序列 TSNYNIVTF(SEQ ID NO:35), AEPDTSNYNIVTFCC(SEQ ID NO:36) 或 TSNYNIVTFCCQCKS(SEQ ID NO:37) 中的一个或多个的肽可用于诊断 HPV31 感染,或用于确定包含 HPV31E7 序列的化合物对 HPV31 的免疫应答。另外,TSNYNIVTF, AEPDTSNYNIVTFCC

或 TSNYNIVTFCCQCKS 中的一个或多个序列可以用于排除 HPV31 感染。

[0075] HPV E7 化合物,测试化合物,及其制备方法

[0076] 本发明的化合物包括,但不限于,包含来自不同 HPV 基因型的两种或更多种 HPV E7 抗原的氨基酸序列的多肽,其类似物,变体,同系物和片段,以及编码这些多肽的核酸分子。在一些实施方案中,所述两种或更多种 HPV E7 抗原将能够诱导针对它们所衍生自的不同 HPV 基因型的免疫应答,如 T 细胞 CD8⁺ 应答。

[0077] “蛋白”,“肽”或“多肽”是两个或多个氨基酸的任何链,包括天然存在的或非天然存在的氨基酸或氨基酸类似物,与翻译后修饰(例如,糖基化或磷酸化)无关。本发明的“氨基酸序列”,“多肽”,“肽”或“蛋白”可包括具有异常键,交叉连接和端帽,非肽键或替代性的修饰基团的肽或蛋白。这些修饰也在本发明的范围内。术语“修饰基团”意图包括直接连接到肽结构的结构(例如,通过共价连接),以及间接连接到肽结构的那些结构(例如,通过稳定的非共价结合,或共价连接到其它氨基酸残基,或其模拟物,类似物或衍生物,所述氨基酸残基,或其模拟物,类似物或衍生物可以位于核心肽结构侧翼)。例如,修饰基团可被连接到肽结构的氨基末端或羧基末端,或被连接至核心结构域侧翼的肽或肽模拟物区。或者,修饰基团可连接到肽结构中的至少一个氨基酸残基的侧链,或核心结构域侧翼的肽或肽模拟物区(例如,通过赖氨酰残基的 ε 氨基基团,通过天冬氨酸残基或谷氨酸残基的羧基,通过的酪氨酰残基,丝氨酸残基或苏氨酸残基的羟基基团,或氨基酸侧链上的其它合适的反应性基团)。共价连接到肽结构的修饰基团可以通过在本领域中公知的用于连接化学结构的工具和方法连接,包括,例如,酰胺基,烷基氨基,氨基甲酸酯或脲键。

[0078] 术语“核酸”或“核酸分子”包括两个 RNA(正负链)和 DNA,所述 DNA 包括 cDNA,基因组 DNA 和合成的(例如,化学合成的)DNA。核酸可以是双链或单链。在单链的情况下,核酸可以是有义链或反义链。核酸分子,可以是两个或多个共价键合的核苷酸的任何链,包括天然存在的或非天然存在的核苷酸或核苷酸类似物或衍生物。“RNA”是指两个或多个共价键合的,天然存在的或修饰的核糖核苷酸的序列。该术语包括的修饰 RNA 的一个实例的是硫代磷酸酯 RNA。“DNA”,是指两个或多个共价键合的,天然存在的或修饰的脱氧核糖核苷酸的序列。“cDNA”是指通过 RNA 依赖的 DNA 聚合酶(逆转录酶)的作用从 RNA 模板产生的互补的或拷贝的 DNA。因此,“cDNA 克隆”是指在克隆载体中携带的与目的 RNA 分子互补的双链 DNA 序列。“互补”是指两个核酸,如 DNA 或 RNA,含有足够数量的能够形成 Watson-Crick 碱基对的核苷酸,从而在两个核酸之间产生双链区。因此,在 DNA 或 RNA 的一条链中的腺嘌呤与相对的互补 DNA 链中的胸腺嘧啶配对,或与相对的互补 RNA 链中的尿嘧啶配对。应当理解,不需要核酸分子中的每个核苷酸与相对的互补链中的核苷酸形成匹配的 Watson-Crick 碱基对,以形成双链。如果在高严谨条件下核酸分子与第二核酸分子杂交,则所述核酸分子与另一核酸分子是“互补”的。本发明的核酸分子包括两个互补的分子。

[0079] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与来自不同的 HPV 类型的两种或更多种 E7 抗原的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽,或编码这类多肽的核酸分子,所述不同的 HPV 类型例如 HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 或 HPV82。

[0080] 在可替代的实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与来自不同的 HPV 类型的三种或更多种 E7 抗原的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽,或编码这类

多肽的核酸分子,所述不同的 HPV 类型例如 HPV 类型,如 HPV16,HPV18,HPV31,HPV33,HPV35,HPV39,HPV45,HPV51,HPV52,HPV56,HPV58,HPV59,HPV68,HPV73 或 HPV82。

[0081] 在可替代的实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与来自不同的 HPV 类型的四种或更多种 E7 抗原的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽,或编码这类多肽的核酸分子,所述不同的 HPV 类型例如 HPV 类型,如 HPV16,HPV18,HPV31,HPV33,HPV35,HPV39,HPV45,HPV51,HPV52,HPV56,HPV58,HPV59,HPV68,HPV73 或 HPV82。

[0082] 在可替代的实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与来自不同的 HPV 类型的五种或更多种 E7 抗原的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽,或编码这类多肽的核酸分子,所述不同的 HPV 类型例如 HPV16,HPV18,HPV31,HPV33,HPV35,HPV39,HPV45,HPV51,HPV52,HPV56,HPV58,HPV59,HPV68,HPV73 或 HPV82。

[0083] 在可替代的实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与来自不同的 HPV 类型的五种 E7 抗原的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽,或编码这类多肽的核酸分子,所述不同的 HPV 类型例如 HPV16,HPV18,HPV31,HPV45 和 HPV52。

[0084] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:1-15 中两个或更多个所示的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0085] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:1-15 中三个或更多个所示的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0086] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:1-15 中四个或更多个所示的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:1-15 中五个或更多个所示的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0088] 例如,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:16 或 17 所示的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0089] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:18-32 中两个或更多个所示的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的核酸分子。

[0090] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:18-32 中三个或更多个所示的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的核酸分子。

[0091] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:18-32 中四个或更多个所示的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的核酸分子。

[0092] 在一些实施方案中,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:18-32 中五个或更多个所示的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的核酸分子。

[0093] 例如,本发明的化合物包括,但不限于,包含与 SEQ ID NO:33 或 34 所示的核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的核酸分子。

[0094] “基本上相同”的序列是仅由一个或多个本文中所述的保守型取代或由一个或多个非保守型取代,缺失,或插入而不同于参照序列的氨基酸或核苷酸序列,所述非保守型取代、缺失或插入处于所述序列的不会破坏或基本上不会降低由所述氨基酸序列表示的、或由所述核酸分子编码的多肽的 T 细胞识别和 / 或 HLA 结合的位置。当使用例如比对程序 (Myers 和 Miller, CABIOS, 1989, 4:11-17) 或 FASTA 在氨基酸或核苷酸水平上与用于比较的序列进行最佳比对时,这样的序列可以是 50% 至 99%,或更通常地至少为 50%。

55% 或 60%, 或至少 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 或 95%, 或高达 96%, 97%, 98%, 或 99% 一致的任何值。对于多肽, 比较序列的长度可以是至少 2, 5, 10, 或 15 个氨基酸, 或至少 20, 25, 或 30 个氨基酸。在可替代的实施方案中, 比较序列的长度可以是至少 35, 40, 或 50 个氨基酸, 或超过 60, 80, 或 100 个氨基酸。对于核酸分子, 比较序列的长度可以是至少为 5, 10, 15, 20, 或 25 个核苷酸, 或至少 30 个, 40 个, 或 50 个核苷酸。在可替代的实施方案中, 比较序列的长度可以是至少 60, 70, 80, 或 90 个核苷酸, 或超过 100, 200, 或 500 个核苷酸。序列同一性, 可以很容易地使用公众可用的序列分析软件测量 (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, 或可从 National Library of Medicine 得到的 BLAST 软件, 或本文所述的软件)。有用的软件的实例包括程序 Pile-up 和 PrettyBox。这种软件通过指定与各种取代, 缺失, 置换和其它修饰的同源性程度而匹配相似的序列。

[0095] 可选地或另外, 如果两条核酸序列在高严谨条件下杂交, 则它们可以是“基本相同的”。在一些实施方案中, 高严谨条件例如是, 允许与以下发生的杂交可比的杂交条件: 使用长度为至少 500 个核苷酸的 DNA 探针, 在含有 0.5M 的 NaHPO_4 , pH 值 7.2, 7% SDS, 1mM EDTA 和 1% BSA (组分 V) 的缓冲液中, 在 65°C 的温度下杂交; 或在含 48% 甲酰胺, 4.8×SSC, 0.2M Tris-Cl, pH 值 7.6, 1×Denhardt 溶液, 10% 硫酸葡聚糖和 0.1% SDS 的缓冲液中, 在 42°C 的温度下杂交。(这些是高严谨 Northern 或 Southern 杂交的典型条件)。杂交可进行约 20 至 30 分钟的一段时间, 或约 2 至 6 小时, 或约 10 至 15 小时, 或超过 24 小时或更长时间。高严谨杂交也依赖于分子生物学家进行的众多技术的成功, 如高严谨 PCR, DNA 测序, 单链构象多态性分析以及原位杂交。与 Northern 和 Southern 杂交相反, 这些技术通常用相对较短的探针进行 (例如, 对于 PCR 或测序, 通常为约 16 个核苷酸或更长, 对于原位杂交, 为约 40 个核苷酸或更长)。在这些技术中所使用的高严谨条件是分子生物学领域的技术人员所公知的, 并且它们的例子可以参见, 例如, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1998, 通过引用将其并入本文。

[0096] 在一些实施方案中, 本发明的化合物包括与天然 HPV E7 抗原序列基本上相同的化合物。因此, 本发明化合物中使用的序列可包括与 SEQ ID NO: 1-34 中的任何一个, 或任何其它 HPV E7 序列基本上相同的序列。

[0097] 应该理解, 单个 E7 抗原序列可以以任何顺序存在于本发明化合物的氨基酸或核苷酸序列中, 只要来自不同的 HPV 基因型的至少两个或更多个 E7 抗原序列存在于单个分子中。在一些实施方案中, 来自不同的 HPV 类型的 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 种或更多种不同的 HPV E7 抗原可以用于本发明的化合物中。

[0098] 示例性的 HPV E7 抗原序列排序包括在表 1 中所示的那些。

[0099] 表 1: 来自 5 种 HPV 类型的 E7 序列的示例性排列

[0100]

16, 18, 31, 45, 52	16, 18, 31, 52, 45	16, 18, 45, 31, 52
16, 18, 45, 52, 31	16, 18, 52, 31, 45	16, 18, 52, 45, 31
16, 31, 18, 45, 52	16, 31, 18, 52, 45	16, 31, 45, 18, 52
16, 31, 45, 52, 18	16, 31, 52, 18, 45	16, 31, 52, 45, 18
16, 45, 18, 31, 52	16, 45, 18, 52, 31	16, 45, 31, 18, 52
16, 45, 31, 52, 18	16, 45, 52, 18, 31	16, 45, 52, 31, 18
16, 52, 18, 31, 45	16, 52, 18, 45, 31	16, 52, 31, 18, 45
16, 52, 31, 45, 18	16, 52, 45, 18, 31	16, 52, 45, 31, 18
18, 16, 31, 45, 52	18, 16, 31, 52, 45	18, 16, 45, 31, 52
18, 16, 45, 52, 31	18, 16, 52, 31, 45	18, 16, 52, 45, 31
18, 31, 16, 45, 52	18, 31, 16, 52, 45	18, 31, 45, 16, 52
18, 31, 45, 52, 16	18, 31, 52, 16, 45	18, 31, 52, 45, 16
18, 45, 16, 31, 52	18, 45, 16, 52, 31	18, 45, 31, 16, 52
18, 45, 31, 52, 16	18, 45, 52, 16, 31	18, 45, 52, 31, 16
18, 52, 16, 31, 45	18, 52, 16, 45, 31	18, 52, 31, 16, 45
18, 52, 31, 45, 16	18, 52, 45, 16, 31	18, 52, 45, 31, 16
31, 16, 18, 45, 52	31, 16, 18, 52, 45	31, 16, 45, 18, 52
31, 16, 45, 52, 18	31, 16, 52, 18, 45	31, 16, 52, 45, 18
31, 18, 16, 45, 52	31, 18, 16, 52, 45	31, 18, 45, 16, 52
31, 18, 45, 52, 16	31, 18, 52, 16, 45	31, 18, 52, 45, 16
31, 45, 16, 18, 52	31, 45, 16, 52, 18	31, 45, 18, 16, 52
31, 45, 18, 52, 16	31, 45, 52, 16, 18	31, 45, 52, 18, 16
31, 52, 16, 18, 45	31, 52, 16, 45, 18	31, 52, 18, 16, 45
31, 52, 18, 45, 16	31, 52, 45, 16, 18	31, 52, 45, 18, 16
45, 16, 18, 31, 52	45, 16, 18, 52, 31	45, 16, 31, 18, 52
45, 16, 31, 52, 18	45, 16, 52, 18, 31	45, 16, 52, 31, 18
45, 18, 16, 31, 52	45, 18, 16, 52, 31	45, 18, 31, 16, 52
45, 18, 31, 52, 16	45, 18, 52, 16, 31	45, 18, 52, 31, 16
45, 31, 16, 18, 52	45, 31, 16, 52, 18	45, 31, 18, 16, 52
45, 31, 18, 52, 16	45, 31, 52, 16, 18	45, 31, 52, 18, 16
45, 52, 16, 18, 31	45, 52, 16, 31, 18	45, 52, 18, 16, 31

[0101]

45, 52, 18, 31, 16	45, 52, 31, 16, 18	45, 52, 31, 18, 16
52, 16, 18, 31, 45	52, 16, 18, 45, 31	52, 16, 31, 18, 45
52, 16, 31, 45, 18	52, 16, 45, 18, 31	52, 16, 45, 31, 18
52, 18, 16, 31, 45	52, 18, 16, 45, 31	52, 18, 31, 16, 45
52, 18, 31, 45, 16	52, 18, 45, 16, 31	52, 18, 45, 31, 16
52, 31, 16, 18, 45	52, 31, 16, 45, 18	52, 31, 18, 16, 45
52, 31, 18, 45, 16	52, 31, 45, 16, 18	52, 31, 45, 18, 16
52, 45, 16, 18, 31	52, 45, 16, 31, 18	52, 45, 18, 16, 31
52, 45, 18, 31, 16	52, 45, 31, 16, 18	52, 45, 31, 18, 16

[0102] 在一些实施方案中, E7 抗原序列是“天然存在的”或“天然的”, 即从天然来源分离而不是人工修饰的。这些来源可以包括, 但不限于, 从受感染的受试者, 或从其它来源获得的生物样品 (例如, 血液, 血清, 血浆, 精液, 粘液, 尿液, 口腔分泌物, 阴道分泌物和宫颈分泌物, 妇科样品, 活检等)。

[0103] 在可替代的实施方案中, 可以通过以下来制备化合物: 例如用其它保守的氨基酸残基 (即具有相似的物理, 生物或化学性质的残基) 替换, 缺失或插入 E7 抗原序列的任何位置处的氨基酸残基并例如筛查化合物诱导本文所述或本领域中已知的 CD8+T 细胞应答的能力, 所述 E7 抗原序列来自本文所述的任何 HPV 类型或多肽。在一些实施方案中, 预期天然 E7 抗原的片段在本发明的范围内, 只要该片段不表现出降低 T 细胞识别和 / 或 HLA 结合或没有大幅降低 T 细胞识别和 / 或 HLA 结合。

[0104] 如本文所用, 术语“保守的氨基酸取代”是指在肽中给定位置的一个氨基酸被另一个氨基酸取代, 其中所述取代可以在不显著损失有关功能的情况下进行。在进行这样的变化时, 可以基于侧链取代基的相对相似性 (例如, 其大小, 电荷, 疏水性, 亲水性等) 进行类似氨基酸残基的替代, 并且可以通过常规试验测定这样的替换对肽功能的影响。

[0105] 如本文所用, 术语“氨基酸”是指常见于天然存在的蛋白质中的那些 L- 氨基酸, D- 氨基酸和已被修改的这类氨基酸。因此, 本发明的氨基酸可包括, 例如: 2- 氨基己二酸, 3- 氨基己二酸, β - 丙氨酸, β - 氨基丙酸, 2- 氨基丁酸, 4- 氨基丁酸, 哌啶酸, 6- 氨基己酸, 2- 氨基庚酸, 2- 氨基异丁酸, 3- 氨基异丁酸, 2- 氨基庚二酸, 2, 4- 二氨基丁酸, 锁链素, 2, 2'- 二氨基庚二酸, 2, 3- 二氨基丙酸, N- 乙基甘氨酸, N- 乙基天冬氨酸, 羟基赖氨酸, 别羟基赖氨酸, 3- 羟脯氨酸, 4- 羟脯氨酸, 异锁链素, 别异亮氨酸, N- 甲基甘氨酸, 肌氨酸, N- 甲基异亮氨酸, 6-N- 甲基赖氨酸, N- 甲基缬氨酸, 正缬氨酸, 正亮氨酸和鸟氨酸。

[0106] 在一些实施方案中, 如果氨基酸残基被另一具有类似亲水值的残基 (例如, 在加或减 2.0 以内的值, 或加或减 1.5 以内, 或加或减 1.0 以内, 或加或减 0.5 以内) 取代, 则可以形成保守的氨基酸取代, 其中以下可以是具有约 -1.6 的亲水指数的氨基酸, 如被分配到氨基酸残基中的 Tyr (-1.3) 或 Pro (-1.6) (如在美国专利第 4, 554, 101 号中详述, 通过引用将其并入本文): 精氨酸 (+3.0), 赖氨酸 (3.0), 天冬氨酸 (3.0), 谷氨酸 (+3.0), 丝氨酸 (0.3), 天冬酰胺 (+0.2), 谷氨酰胺 (+0.2), 甘氨酸 (0), 脯氨酸 (-0.5), 苏氨酸 (-0.4),

丙氨酸 (-0.5), 组氨酸 (-0.5), 半胱氨酸 (-1.0), 蛋氨酸 (-1.5), 缬氨酸 (-1.3), 亮氨酸 (-1.8), 异亮氨酸 (-1.8), 酪氨酸 (-2.3), 苯丙氨酸 (-2.5) 和色氨酸 (-3.4)。

[0107] 在可替代的实施方案中, 如果氨基酸残基被另一具有类似亲水指数的残基 (例如, 在加或减 2.0 以内的值, 或加或减 1.5 以内, 或加或减 1.0 以内, 或加或减 0.5 以内) 取代, 则可以形成保守的氨基酸取代。在这样的实施方案中, 每个氨基酸残基根据其疏水性和电荷特性可被分配亲水指数, 如下所示: 异亮氨酸 (+4.5), 缬氨酸 (+4.2), 亮氨酸 (+3.8), 苯丙氨酸 (+2.8), 半胱氨酸 (+2.5), 蛋氨酸 (+1.9), 丙氨酸 (+1.8), 甘氨酸 (-0.4), 苏氨酸 (-0.7), 丝氨酸 (-0.8), 色氨酸 (-0.9), 酪氨酸 (-1.3), 脯氨酸 (-1.6), 组氨酸 (-3.2), 谷氨酸 (-3.5), 谷氨酰胺 (-3.5), 天冬氨酸 (-3.5), 天冬酰胺 (-3.5), 赖氨酸 (-3.9) 和精氨酸 (-4.5)。

[0108] 在可替代的实施方案中, 可以使用公众可获得的相似性矩阵家族进行保守的氨基酸取代 (73-79)。PAM 矩阵基于从演化模型得到的计数, 而 BLOSUM 矩阵使用从比对中高度保守的模块得到的计数。PAM 或 BLOSUM 矩阵中 0 以上的相似性得分可用于进行保守型氨基酸取代。

[0109] 在可替代的实施方案中, 如果氨基酸残基被同一类中另一残基取代, 则可以形成保守的氨基酸取代, 其中氨基酸被分为如下所示的非极性, 酸性, 碱性和中性类别: 非极性: 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 苯丙氨酸, 色氨酸, 脯氨酸, 蛋氨酸; 酸性: 天冬氨酸, 谷氨酸; 碱性: 赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸; 中性: 甘氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 半胱氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 酪氨酸。

[0110] 保守的氨基酸变化可以包括 L-氨基酸由相应的 D-氨基酸取代, 由保守的 D-氨基酸, 或由天然存在的, 非基因编码形式的氨基酸取代, 以及 L-氨基酸的保守型取代。天然存在的非基因编码的氨基酸包括 β -丙氨酸, 3-氨基-丙酸, 2, 3-二氨基丙酸, α -氨基异丁酸, 4-氨基丁酸, N-甲基甘氨酸 (肌氨酸), 羟脯氨酸, 鸟氨酸, 瓜氨酸, 叔丁基丙氨酸, 叔丁基甘氨酸, N-甲基异亮氨酸, 苯基甘氨酸, 环己基丙氨酸, 正亮氨酸, 正缬氨酸, 2-萘基丙氨酸, 吡啶丙氨酸, 3-苯并噻吩基丙氨酸, 4-氯代苯丙氨酸, 2-氟代苯丙氨酸, 3-氟代苯丙氨酸, 4-氟代苯丙氨酸, 青霉素, 1, 2, 3, 4-四氢异喹啉-3-羧酸, β -2-噻吩基丙氨酸, 蛋氨酸亚砷, 高精氨酸, N-乙酰基赖氨酸, 2-氨基丁酸, 2-氨基丁酸, 2, 4-二氨基丁酸, 对-氨基苯丙氨酸, N-甲基缬氨酸, 高半胱氨酸, 高丝氨酸, 磺基丙氨酸, ϵ -氨基己酸, δ -氨基戊酸或 2, 3-二氨基丁酸。

[0111] 在可替代的实施方案中, 保守的氨基酸变化包括基于考虑亲水性或疏水性, 大小或体积, 或电荷的变化。主要根据氨基酸侧链的性质, 氨基酸大体分类为疏水性的或亲水性的。基于 Eisenberg 等人的标准化的一致疏水性等级, 疏水性氨基酸表现出大于零的疏水性, 并且亲水性氨基酸表现出小于零的亲水性 (80)。基因编码的疏水性氨基酸包括甘氨酸, 丙氨酸, 苯丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 蛋氨酸和色氨酸, 并且基因编码的亲水性氨基酸包括苏氨酸, 组氨酸, 谷氨酸, 谷氨酰胺, 天门冬氨酸, 精氨酸, 丝氨酸和赖氨酸。非基因编码的疏水性氨基酸包括叔丁基丙氨酸, 而非基因编码的亲水性氨基酸包括瓜氨酸和高半胱氨酸。

[0112] 根据其侧链的特性, 疏水性或亲水性的氨基酸可进一步细分。例如, 芳族氨基酸是侧链含有至少一个芳族或杂芳族环的疏水性氨基酸, 所述芳族或杂芳族环可以包含一

个或多个取代基,例如 -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -NO, -NH₂, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH₂, -C(O)NHR, -C(O)NRR 等,其中, R 独立地是 (C₁-C₆) 烷基,取代的 (C₁-C₆) 烷基, (C₁-C₆) 烯基,取代的 (C₁-C₆) 烯基, (C₁-C₆) 炔基,取代的 (C₁-C₆) 炔基, (C₅-C₂₀) 芳基,取代的 (C₅-C₂₀) 芳基, (C₆-C₂₆) 烷芳基,取代的 (C₆-C₂₆) 烷芳基, 5 元 -20 元杂芳基,取代的 5 元 -20 元杂芳基, 6 元 -26 元烷杂芳基或取代的 6 元 -26 元烷杂芳基。基因编码的芳香族氨基酸包括苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸,而非基因编码的芳香族氨基酸包括苯基甘氨酸, 2- 萘基丙氨酸, β-2- 噻吩丙氨酸, 1, 2, 3, 4- 四氢 - 异喹啉 -3- 羧酸, 4- 氯代苯丙氨酸, 2- 氟代苯丙氨酸, 3- 氟代苯丙氨酸和 4- 氟代苯丙氨酸。

[0113] 非极性氨基酸是侧链在生理 pH 下不带电荷的疏水性氨基酸,其具有这样的键,其中由两个原子共同分享的电子对通常由两个原子中的每一个平等保留(即,侧链为非极性)。基因编码的非极性氨基酸包括甘氨酸,亮氨酸,缬氨酸,异亮氨酸,丙氨酸和蛋氨酸,而非基因编码的非极性氨基酸,包括:环己基丙氨酸。非极性氨基酸可以进一步细分,包括脂肪族氨基酸,其是具有脂肪族烃侧链的疏水性氨基酸。基因编码的脂肪族氨基酸包括丙氨酸,亮氨酸,缬氨酸和异亮氨酸,而非基因编码的脂肪族氨基酸包括正亮氨酸。

[0114] 极性氨基酸是侧链在生理 pH 下不带电荷的亲水性氨基酸,但其具有这样的键,其中由两个原子共同分享的电子对由一个原子更接近地保留。基因编码的极性氨基酸包括丝氨酸,苏氨酸,天冬酰胺,和谷氨酰胺,而非转基因编码的极性氨基酸包括瓜氨酸, N- 乙酰基赖氨酸,和甲硫氨酸亚砷。

[0115] 酸性氨基酸是侧链的 pKa 值小于 7 的亲水性氨基酸。通常,酸性氨基酸的侧链在生理 pH 下由于氢离子的损失而带负电荷。基因编码的酸性氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。碱性氨基酸是侧链的 pKa 值大于 7 的亲水性氨基酸。通常,碱性氨基酸的侧链在生理 pH 下由于与水合氢离子的结合而带正电荷。基因编码的碱性氨基酸包括精氨酸,赖氨酸和组氨酸,而非基因编码的碱性氨基酸包括非环状氨基酸鸟氨酸, 2, 3- 二氨基丙酸, 2, 4- 二氨基丁酸和高精氨酸。

[0116] 因此,保守型取代包括,但不限于,以下取代:

[0117]

原始残基	示例性的取代	优选的取代
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

[0118] 本领域技术人员将理解,上述分类不是绝对的,氨基酸可以被分类在一个以上的类别中。此外,可以根据已知的行为和或特有的化学,物理或生物特性,根据指定的实验或与先前鉴定的氨基酸比较对氨基酸进行分类。氨基酸也可以包括具有氨基酸样侧链的双官能基团。

[0119] 保守的改变,也可包括化学衍生的基团取代非衍生的残基,例如,通过氨基酸官能侧基的反应。因此,这些取代可以包括游离氨基基团已被衍生成胺盐酸盐,p- 甲苯磺酰基,苄氧羰基,叔丁氧羰基,氯乙酰基基或甲酰基的化合物。同样的,游离的羧基基团可以被衍生成成盐,甲基和乙基酯或其它类型的酯或酰肼,并且侧链可以被衍生化,对于游离羟基基

团形成 O- 酰基或 O- 烷基衍生物或对于组氨酸的咪唑氮形成 N-im- 苄基组氨酸。肽类似物还包括已被化学改变的氨基酸,例如,经甲基化,通过烷基胺如乙胺、乙醇胺、乙二胺酰胺化氨基酸的 C- 末端,或氨基酸侧链的酰基化或甲基化(如赖氨酸的 ϵ -氨基的酰化作用)。肽类似物也可以包括用取代的酰胺(例如,式 $-C(O)-NR$ 基团,其中 R 是 (C_1-C_6) 烷基, (C_1-C_6) 烯基, (C_1-C_6) 炔基,取代的 (C_1-C_6) 烷基,取代的 (C_1-C_6) 烯基,或取代的 (C_1-C_6) 炔基),或酰胺键的电子等排物(例如, $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (顺式和反式), $-C(O)CH_2-$, $-CH(OH)CH-$ 或 $-CH_2SO-$) 替换肽中的酰胺键。

[0120] 化合物可以共价连接,例如,通过聚合或偶联,从而形成同聚物或异聚物。可以使用通常由小的中性分子(例如在生理条件下不带电荷的氨基酸)组成的间隔区和接头。连接可以通过多种方式实现。例如,半胱氨酸残基可以被添加在肽的末端,并且通过控制氧化,多个肽可被共价键合。另外,可以使用异型双功能剂,如二硫化物/酰胺形成剂或硫醚/酰胺形成剂。化合物也可以与可以调节免疫应答的另一种化合物连接。化合物也可以例如通过具有环状部分被限制。

[0121] 多肽,肽或肽类似物可以通过标准的化学技术来合成,例如,通过使用溶液或固相合成方法自动合成。自动化肽合成仪是市售的,并使用本领域中公知的技术。也可以利用重组 DNA 技术使用标准方法从它们相应的核酸分子制备多肽,肽和肽类似物,所述标准方法例如描述于 Sambrook 等人 (81) 或 Ausubel 等人 (82) 中的那些方法。

[0122] 在一些实施方案中,核酸分子可以可操作地连接。“可操作地连接”是指基因和调节序列以这样方式连接,以便当合适的分子(例如,转录激活蛋白)结合到调节序列时允许基因表达。这种可操作地连接的序列可以处于载体或表达构建体的形式,所述载体或表达构建体可以被转化或转染到宿主细胞中进行表达。可以使用任何合适的载体,例如 pET15b(氨苄青霉素抗性)或 pET24a(卡那霉素抗性)。

[0123] 术语“重组”是指某物已被重新组合,这样,当涉及核酸构建体时,该术语是指由连接在一起或通过分子生物学技术产生的核酸序列构成的分子。当涉及蛋白质或多肽时,术语“重组”是指使用通过分子生物学技术创建的重组核酸构建体表达的蛋白质或多肽分子。重组核酸构建体可包括这样的核苷酸序列,其被连接至或者经操纵而连接至在自然界中并不连接的核酸序列,或其被连接至或者经操纵而连接至在自然界中在不同位置连接的核酸序列。因此,称核酸构建体为“重组的”是指核酸分子已经被使用基因工程技术操纵,即通过人工干预。重组核酸构建体可以例如,通过转化导入到宿主细胞中。这样的重组核酸构建体可以包含来源于相同的宿主细胞物种或不同的宿主细胞物种的序列,这些序列已被分离并重新导入宿主物种的细胞中。无论是作为宿主细胞的原始转化的结果,还是作为随后的重组和/或修复事件的结果,重组核酸构建体序列可以整合到宿主细胞基因组中。

[0124] 鉴定为有用的化合物随后可以使用 TC1 模型,或用于 HPV 感染的任何其它动物模型进行分析。

[0125] 药品及兽医组合物,剂量和给药

[0126] 本发明的化合物可以在脂质体,佐剂,或任何载体(如药学上可接受的载体)的存在下以适合对哺乳动物(例如,人,牛,绵羊等)给药的形式单独提供或与其它化合物组合提供(例如核酸分子,小分子,肽或肽类似物)。

[0127] 如本文所用的“药学上可接受的载体”或“赋形剂”包括任何及所有生理上相容的

溶剂,分散介质,涂层,抗菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂等。在一个实施方案中,载体适合于肠胃外给药。可选地,载体可以适合于静脉内,腹膜内,肌内,舌下或口腔给药。药学上可接受的载体包括无菌水性溶液或用于临时制备无菌注射溶液或分散液的分散剂和无菌粉末。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物是不兼容的,其在本发明的药物组合物的用途是预期的。补充的活性化合物也可以被并入组合物中。

[0128] 常规的制药实践也可以用于提供合适的制剂或组合物,从而将所述化合物给予患 HPV 感染的个体,或给予与 HPV 感染相关的疾病状况症状发生前的个体。也可以采用任何适当的给药途径,例如,肠胃外给药,静脉给药,皮下给药,肌内给药,颅内给药,眶内给药,眼部给药,脑室内给药,囊内给药,椎管内给药,鞘内给药,脑池内给药,腹膜内给药,鼻内给药,气溶胶给药,局部给药或口服给药。治疗性制剂可以为液体溶液或悬浮液的形式;对于口服给药,制剂可以是片剂或胶囊剂的形式;并且对于鼻内制剂,制剂可以是散剂,滴鼻剂或气雾剂的形式。

[0129] 本领域中公知的用于制备制剂的方法可以见于,例如,“Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药科学)”(83)。例如,用于肠胃外给药的制剂可含有赋形剂,无菌水或生理盐水,聚亚烷基二醇如聚乙二醇,植物来源的油,或氢化萘。可以使用生物相容的,生物可降解的丙交酯聚合物,丙交酯/乙交酯共聚物,或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物,以控制化合物的释放。其它可能有用的肠胃外递送系统包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒,渗透泵,可植入式输注系统和脂质体。用于吸入的制剂可含有赋形剂(例如,乳糖),或可以是含有例如,聚氧乙烯-9-月桂基醚,甘胆酸盐和脱氧胆酸盐的水性溶液,或可以是用于以滴鼻剂的形式或作为凝胶给药的油性溶液。一般情况下,以足以停止或减慢与 HPV 感染相关的疾病状况,或足以治疗 HPV 感染的量(取决于病症)将化合物给予个体。

[0130] 对于疫苗制剂,有效量的本发明的化合物可以单独提供,或其它化合物,与免疫佐剂一起提供,例如弗氏不完全佐剂,双十八烷基二甲基氢氧化铵或氢氧化铝。

[0131] 在可替代的实施方案中,本发明的化合物可以与选自以下的佐剂一起提供:To11样受体(TLR)激动剂,如 TLR3 激动剂(例如,多聚(I:C)及其衍生物,多聚 A:U 及其衍生物,合成的 RNA 分子,天然存在的 RNA 分子,双链 RNA,微生物核酸等)或 TLR9 激动剂(例如,含有 CpG 的寡核苷酸,微生物核酸等),干扰素 α , 4-1BB 受体激动剂, CD40 受体激动剂或抗-CD40 抗体。

[0132] 化合物也可以连接到载体或其它分子,如牛血清白蛋白或匙孔血蓝蛋白,以提高免疫原性。在一些实施方案中,该化合物可以与钙网蛋白,结核分枝杆菌热休克蛋白(HSP70),泛素,细菌毒素,细胞因子(如白细胞介素),咪唑并喹啉等一起提供。

[0133] 在一些实施方案中,可以将本发明的化合物或组合物提供在试剂盒中,任选地与载体和/或佐剂,以及使用说明书一起。

[0134] 本发明化合物的“有效量”包括治疗有效量,免疫有效量,或预防的有效量。“治疗有效量”是指在所需要的剂量和时期有效达到期望的治疗效果的量,如 HPV 感染或与这样的感染相关的疾病状况的治疗。治疗的结果例如可以通过以下来测量:HPV 病毒血症的减轻,病毒基因表达的抑制,与 HPV 感染相关的病理发展的延迟,免疫系统的刺激,或确定治疗益处的任何其它方法。化合物的治疗有效量可根据以下因素而变化:如疾病状态,年龄,性别

和个体重量,以及化合物在个体中诱导所需应答的能力。剂量方案可被调整以提供最佳的治疗反应。治疗有效量也是其中化合物的治疗有益效果超过任何有毒或有害影响的量。“免疫有效量”是指在所需要的剂量和时期有效达到期望的免疫效果的量,如免疫应答,如 T 细胞 CD8+ 应答的刺激或诱导。在一些实施方案中,“免疫应答的刺激”或“刺激免疫应答”是指当与对照或参照样品或化合物相比时,测得的免疫应答(如 T 细胞 CD8+ 应答)中任何数值增加约 5% 至约 95%,或约 10% 至约 90%,或约 30% 至约 60%,或超过 100%。在可替代的实施方案中,由“免疫应答的刺激”或“刺激免疫应答”是指当与对照或参照样品或化合物相比时,测得的免疫应答(如 T 细胞 CD8+ 应答)中任何数值增加约 2 倍至约 1000 倍,或约 10 倍至约 500 倍,或约 30 倍至约 100 倍,或超过 1000 倍。“预防有效量”是指在所需要的剂量和时期有效实现期望的预防效果的量,如与 HPV 感染相关的疾病状况的发病预防。通常,在疾病之前或早期阶段的个体中使用预防剂量,因此预防有效量可以小于治疗有效量。化合物的有效量的合适范围,例如可以是 0.1nM 至 0.1M,0.1nM-0.05M,0.05nM-15 μ M 或 0.01nM-10 μ M 的任何整数。

[0135] 需要注意的是剂量值可以根据待缓解的疾病状况的严重程度而发生变化。对于任何特定的个体,特定的剂量方案可以随时间根据个人的需要和实施或监督组合物给药的人员的专业判断进行调整。这里所示的剂量范围仅是示例性的,并没有限制可以由医生选择的剂量范围。组合物中活性化合物的量可根据如下因素而不同:例如疾病状态,年龄,性别和个体重量。剂量方案可被调整以提供最佳的治疗反应。例如,可以给予单剂量,可以随着时间给予数次分开的剂量,或如治疗情况的紧急状态所示酌情减少或增加剂量。为方便给药和统一剂量,以剂量单位形式配制肠胃外组合物可能是有利的。

[0136] 在可替代的实施方案中,可以将包含本发明化合物以及 TLR 激动剂或其它佐剂的组合物以“集群(cluster)”给药方案提供,以诱导增强的 CD8+T 细胞应答。“集群”给药方案是指在很短的一段时间,即小于约 14 天,例如,约 1 天至约 4,5,6,7 或 8 天内给予组合物。在一些实施方式中,集群给药方案包括在很短的一段时间,即小于约 14 天,例如,约 1 天至约 4,5,6,7 或 8 天内每日多个剂量给予组合物。

[0137] 如果需要的话,利用本发明化合物的治疗可以与 HPV 感染或与这类感染相关的疾病状况的更传统的和现有的疗法组合。例如,本发明的化合物按需要可以与放射疗法,化学疗法或外科手术(例如,LEEP)一起提供。

[0138] 可以长期或间断地提供本发明的化合物。“长期”给药是指在连续模式下,而不是短期模式下给予药剂,以便使初始治疗效果(活性)持续较长的时间。“间断”给药并非是没有中断地连续进行,而是实际上周期性地进行治疗。

[0139] 在一般情况下,本发明的化合物应当在不造成重大毒性的情况下使用。本发明化合物的毒性可以用标准技术来确定,例如,通过在细胞培养物或实验动物中测试并确定治疗指数,即 LD50(群体 50% 致死剂量)和 LD100(群体 100% 致死剂量)的比率。然而,在某些情况下,如在重度疾病的情况下,可能需要给予显著过量的组合物。

[0140] 在整个下面的描述中,列出了具体细节,以便提供对本发明更透彻的了解。然而,本发明没有这些细节也可以实施。在其它情况下,公知的元素没有被示出或详细描述,以避免不必要地模糊本发明。因此,本说明书和附图应当被视为说明性的,而不是限制性的意义。

[0141] 将在下面的实施例中进一步说明本发明。

[0142] 实施例 1 :PentariX 蛋白的制备和纯化

[0143] HPV 毒株 16, 18, 31, 45 和 52 的 E7 癌基因蛋白作为全长的重组蛋白 (称为“PentariX”) 在大肠杆菌中产生 (图 1A)。在一项研究中, 包含来自 HPV16, 18, 31, 45 和 52 中每种 of 完整 E7 蛋白, 加氨基末端 6×His 亲和标签以及凝血酶切割位点的单个连续 DNA 作为合成的 DNA 构建体产生 (图 1B)。多基因的序列随后被克隆入表达载体 pET17 和 pET24a (Invitrogen) 中, 并且具有可切割的 6×His 亲和标签的全长蛋白 (PentariX) 在大肠杆菌基因型 BL21 (DE3) pLysS 中表达。

[0144] 简言之,, 用重组大肠杆菌的单菌落接种 5ml 含有氨苄青霉素 (100 μg/ml) 加氯霉素 (34 μg/ml) 的 LB 培养基 (对于 pET17 构建体), 或 5ml 含有卡那霉素 (34 μg/ml) 加氯霉素 (34 μg/ml) 的 LB 培养基 (对于 pET24a 构建体), 并允许过夜增长至饱和。第二天早晨, 用 5ml 培养物接种 1000ml 含有氨苄青霉素 (100 μg/ml) 加氯霉素 (34 μg/ml) (对于 pET17 构建体) 的 LB 培养基, 或 1000ml 含有卡那霉素 (34 μg/ml) 加氯霉素 (34 μg/ml) 的 LB 培养基 (对于 pET24a 构建体)。当 1000ml 培养物的生长达到 OD₆₀₀ 0.2 至 0.4 时, 向培养物加入 IPTG 至终浓度为 2mM, 并继续生长 2 至 3 小时以允许重组蛋白表达。细菌随后通过离心沉淀, 并重新悬浮在 30ml 的裂解缓冲液 (20mM 磷酸钠, pH 为 7.4, 500mM 氯化钠, 10mM 咪唑, 6M 脲, 1mM DTT)。通过两个连续的冷冻和解冻周期, 随后是四个连续的超声周期 (每个周期 30 秒) 来裂解细菌。通过在 15,000rpm 离心 15 分钟除去裂解碎片和不溶性蛋白质以呈现可溶性裂解物溶液。通过连接到 AKTA 柱色谱系统的亲和柱 (HisTrap HP, GE Healthcare), 从可溶性裂解物纯化具有可切割的 6× 亲和标签的 PentariX 蛋白。用裂解缓冲液充分洗涤后, 使用含有 500mM 咪唑的裂解缓冲液从柱中洗脱具有可切割的 6× 亲和标签的 PentariX 蛋白。收集含有 PentariX 蛋白 (其具有可切割的 6× 亲和标签) 的洗脱级分, 并针对 4 种变换的组织培养物梯度磷酸缓冲液透析, 以呈现 PentariX 蛋白的终溶液。通过在 SDS-PAGE 上运行多种过程中级分和最终级分, 并通过考马斯亮蓝染色或使用抗 6×HIS 标签抗体 (ABM) 或抗 -HPV16E7 抗体 (Invitrogen) 的 Western 印迹可视化蛋白质, 来监测蛋白的表达和纯化 (图 1C)。将纯化的蛋白质完全溶解在 PBS 中, 并根据其预期的 59037Da 的分子量在 SDS-PAGE 凝胶上迁移 (图 1C)。

[0145] 实施例 2 :对外源蛋白质抗原的 CD8 应答

[0146] 进行研究以确定响应于用完整的外源 OVA 蛋白加 TLR3 激动剂多聚 (I:C) 或多聚 IC/LC 的免疫接种而诱导的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异的 CD8+T 细胞应答。用加上或减去多聚 (I:C) (10 μg) 或多聚 IC/LC (10 μg/ml) 的完整的 OVA 蛋白 (500 μg) 对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (2 只小鼠 / 情况) 进行免疫。免疫后七天处死小鼠, 并通过 IFN-γ ELISPOT 对免疫小鼠的大量脾细胞中 OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。结果报告为仅用介质、用 SIINFEKL 肽 (10 μg/ml) 或不相关的 H2Db 结合肽 (10 μg/ml) 刺激后, 每 1×10⁶ 个脾细胞中 IFN-γ 斑点形成细胞的数目。结果表明, 多聚 (I:C) 和多聚 IC/LC 在体内具有类似于佐剂的活性 (图 2A)。

[0147] 在另一项研究中, 用指定量的完整的可溶性 OVA 蛋白加多聚 (I:C) 对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (2 只小鼠 / 剂量, 共 18 只小鼠) 进行免疫。免疫后七天处死小鼠, 通过 IFN-γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂。仅用介质或用 SIINFEKL 肽 (10 μg/ml) 过夜刺激来

自个体动物的脾细胞 (3×10^5 /孔, 每种情况三个孔), 结果报告为每群每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目 $\pm$ SD。

[0148] 实施例 3: 给药方案

[0149] 按如下确定响应于用长或短间隔 (集群) 的同源初免 - 加强免疫诱导的 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8+T 细胞应答。用完整的 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 在 -7 天、-21 天、或 -7 天和 -21 天对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (2 只小鼠 / 情况) 进行免疫, 并在第 0 天处死。通过 IFN- γ ELISPOT 对免疫小鼠的大量脾细胞中 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。还用指定数量的连续日剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 与多聚 (I:C) (10 μ g) 混合对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (3 只小鼠 / 情况) 进行免疫。一组额外的小鼠接受单次免疫, 相当于正常日剂量的 4 倍 (即 400 μ g 的 OVA 蛋白加 40 μ g 的多聚 (I:C))。第一次免疫后七天处死小鼠, 通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂, 以对 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特异性 CD8+T 细胞的数目进行定量。图 3a 和 b 中的结果被报告为仅用介质或 SIINFEKL 肽 (10 μ g) 刺激后, 每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。如图 3c 所示, 还用 1 次剂量或 4 次连续日剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 对初次接受实验的 C57BL/6 小鼠进行免疫。从第一轮免疫模拟后第 47 天开始, 用另一相同的 4 次连续日剂量对接受 4 次连续日剂量的 OVA 蛋白加多聚 (I:C) 的小鼠进行重新免疫。从个体小鼠的隐静脉获得外周血, 在免疫后指定的天数连续放血。裂解外周血中的 RBC, 用 FITC 标记的抗 -CD8 和 PE 标记的 H-2Kb/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 四聚体对淋巴细胞进行染色, 并通过流式细胞术分析。图 3c 和 d 所示的事件是在 CD8+ 淋巴细胞上设门分选的, 并来自代表性的单个动物, 从而允许精确监测指定的动物中抗原特异性 T 细胞应答随时间的进展。在这第二轮疫苗接种后, OVA 特异性 CD8+T 细胞增殖到甚至比初次免疫后所实现的水平更高的水平, 在第二次免疫的 7 天之内达到 52% 的外周 CD8+T 细胞 (图 3d)。因此, 在较晚的时间点诱导的第二次应答明显强于由集群疫苗接种诱导的初次应答。

[0150] 在另一项研究中, 如用模式抗原 OVA 所观察到的, 相对于用 HPV16E7 蛋白的单独免疫, 用 4 次剂量的 HPV16E7 蛋白加多聚 (I:C) 的免疫诱导了强烈的 CD8 免疫应答 (图 3e)。

[0151] 在另一项研究中, 如图 4 所示, 在第 0 天向 C57BL/6 小鼠 (3 只小鼠 / 群) 植入表达 OVA 的 EG7 肿瘤细胞 (1×10^5), 并进行以下处理: 留下未处理, 或 1 次剂量的多聚 (I:C) (10 μ g) 处理, 或用 1 次剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 处理, 或在指定的时间段用 4 次连续日剂量的完整的可溶性 OVA 蛋白 (100 μ g) 加多聚 (I:C) (10 μ g) 处理。每组处理时的平均肿瘤体积为 224mm^3 (多聚 (I:C)), 194mm^3 (1 次剂量的 OVA+多聚 (I:C)) 或 344mm^3 (4 次剂量的 OVA+多聚 (I:C))。最后一群小鼠故意在肿瘤尺寸较大时处理, 以体现连续每日免疫接种的有利影响。

[0152] 实施例 4: 用单剂量或多剂量的 Pentarix 蛋白免疫

[0153] 小鼠 (初次接受实验的 C57BL/6) 被留下未处理, 或用 100 μ g 重组 Pentarix 蛋白与 10 μ g 的 TLR3 激动剂多聚 I-C (Amersham 或 Sigma) (图 5A) 或 TLR9 激动剂 CpG-2395 (oligo # 2395, Invivogen) 混合进行皮下免疫, 或仅用 CpG 寡聚物进行皮下免疫 (图 6A)。免疫后七天处死小鼠, 切除脾脏。通过使用 5ml 注射器的活塞, 使脾脏通过 70 μ M 过滤器打浆, 而在 10ml cRPMI (RPMI 1640, 10%FCS, 2mM 的 L-谷氨酰胺, 50 μ M 的 2-巯基乙醇, 10mM HEPES 和 10mM 丙酮酸钠) 中制备脾细胞单细胞悬浮液。用 10 μ g/ml 抗 -IFN- γ

捕获抗体 (AN18Mabtech) 过夜预包被 ELISPOT 板 (MSIP, Millipore), 然后在 37°C 下用 cRPMI 封闭 2 小时。在没有任何刺激的情况下 (仅介质), 在存在 $10\mu\text{g/ml}$ 源自 HPV16 的 H-2D^b 限制性 E7₄₉₋₅₇ 肽的情况下, 或在存在不相关的 H2-D^b 结合对照肽 (KAVYNFATC) 的情况下, 将脾细胞 (3×10^5 细胞 / 孔) 一式三份铺板。在 37°C 下孵育过夜后, 洗涤 ELISPOT 板并在 37°C 下用 $1\mu\text{g/ml}$ 的生物素化的抗小鼠 IFN- γ (mAb R4-6A2, Mabtech) 孵育 2 小时, 随后用 Vectastain ABC Elite 试剂盒和 Vectastain AEC 底物试剂根据制造商的说明书 (Vector Labs) 显影。使用商业的 ELISPOT 计数服务 (Zellnet) 对斑点进行定量。结果表示为当在仅存在介质的情况下, 在存在添加 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽或不相关的肽 ($10\mu\text{g/ml}$) 的介质的情况下, 每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。

[0154] 在另一项研究中 (图 7A), 小鼠 (初次接受实验的 C57BL/6) 被留下未处理, 或用 $100\mu\text{g}$ 重组 Pentarix 蛋白与 $10\mu\text{g}$ 的 TLR3 激动剂多聚 I-C (Amersham 或 Sigma) 混合进行 1 次或 4 次 (第 1-4 天每天 1 次) 皮下免疫。接受多次连续每日免疫接种的小鼠以约 24 小时的间隔被免疫。初次免疫后七天处死小鼠, 切除脾脏。通过使用 5ml 注射器的活塞, 使脾脏通过 $70\mu\text{M}$ 过滤器打浆, 而在 10ml cRPMI (RPMI1640, 10%FCS, 2mM 的 L- 谷氨酰胺, $50\mu\text{M}$ 的 2- 巯基乙醇, 10mM HEPES 和 10mM 丙酮酸钠) 中制备脾细胞单细胞悬浮液。用 $10\mu\text{g/ml}$ 抗 -IFN- γ 捕获抗体 (AN18Mabtech) 过夜预包被 ELISPOT 板 (MSIP, Millipore), 然后在 37°C 下用 cRPMI 封闭 2 小时。在没有任何刺激的情况下 (仅介质), 或在存在 $10\mu\text{g/ml}$ 的 E7₄₉₋₅₇ 肽的情况下, 将脾细胞 (3×10^5 细胞 / 孔) 一式三份铺板。在 37°C 下孵育过夜后, 洗涤 ELISPOT 板并在 37°C 下用 $1\mu\text{g/ml}$ 的生物素化的抗小鼠 IFN- γ (mAb R4-6A2, Mabtech) 孵育 2 小时, 随后用 Vectastain ABC Elite 试剂盒和 Vectastain AEC 底物试剂根据制造商的说明书 (Vector Labs) 显影。使用商业的 ELISPOT 计数服务 (Zellnet) 对斑点进行定量。结果表示为当在仅存在介质的情况下, 或在添加 E7₄₉₋₅₇ 肽的介质的情况下培养时, 每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。

[0155] 在另一项研究中, 我们发现, 在接受 4 次连续剂量的 Pentarix 蛋白加多聚 (I:C) 的小鼠中, 外周血中高达 11% 的 CD8T 细胞和脾脏中高达 22% 的 CD8T 细胞用 H-2D^b HPV16E7₄₉₋₅₇ 四聚体染色呈阳性 (图 7C)。在这项研究中, 在仅用 4 次剂量的 Pentarix 蛋白免疫的小鼠的脾脏中没有检测到 HPV 特异的 T 细胞, 这表明在研究条件下佐剂对于 CD8T 细胞扩增的重要性。

[0156] 在另一项研究中 (图 8A), 在第 -14 天经皮下注入左侧腹部, 初次接受实验的 C57BL/6 小鼠 (3 只小鼠 / 群) 被植入表达 E7 的 TC1 肿瘤细胞 (3×10^5 / 小鼠)。在第 0 天 (当肿瘤达到约 200mm^3 的尺寸时), 小鼠被留下未处理, 或仅用多聚 I-C ($10\mu\text{g}$) 或用 Pentarix 蛋白 ($100\mu\text{g}$) 加 TLR3 激动剂多聚 I-C ($10\mu\text{g}$) 的单次接种 (颈背皮下) 进行处理。用 Pentarix 蛋白 ($100\mu\text{g}$) 加 TLR3 激动剂多聚 I-C ($10\mu\text{g}$) 免疫的小鼠 (图 8A, 右图) 完全消退肿瘤并在研究期间 (60 天) 保持无瘤。使用电子数显卡尺每 2-3 天测量肿瘤, 并使用以下公式计算体积: 宽度² × 长度 × 0.5, 根据 CCAC (加拿大动物保护协会) 的指导方针, 当肿瘤体积达到约 2000mm^3 时, 处死荷瘤小鼠。

[0157] 在另一项研究中, TC-1 肿瘤细胞在含 0.4mg/ml G418 的 cRPMI 中生长至 60-80% 汇合, 并通过短暂暴露于 0.25% 胰蛋白酶, 随后用 cRPMI 中和来收集。将 TC-1 肿瘤细胞 (1×10^5 / 小鼠) 经皮下植入初次接受实验的 C57BL/6 小鼠的左侧腹部, 并通过利用电子卡尺

每 2 至 3 天测量肿瘤来监测肿瘤的生长。利用公式宽度 $2 \times$ 长度 $\times 0.5$ 计算肿瘤体积。根据 CCAC(加拿大动物保护协会)的指导方针,当肿瘤体积超过 2000mm^3 时,处死荷瘤小鼠。

[0158] 在这项研究中,由集群疫苗接种诱发的 E7 特异性 CD8T 细胞水平的提高还赋予提高消退表达 E7 的 TC1 肿瘤的能力,这是通过肿瘤比治疗开始前增长到比正常更大的尺寸表现出的(图 8B)。在处理时,具有平均体积为 350mm^3 的肿瘤的小鼠,用单次剂量或 4 次连续日剂量的 Pentarix 加多聚(I:C)免疫。与未经处理的小鼠或仅用多聚(I:C)处理的小鼠相比,8 只接受单次剂量疫苗的小鼠中,有 5 只表现出短暂的(但不完全的)肿瘤消退和显著提高的存活时间。然而,所有接受单次剂量疫苗的小鼠最终屈服于肿瘤的逐步生长。相反,接受 4 次连续剂量的 Pentarix 加多聚(I:C)的小鼠中,100%(8/8)将这些大肿瘤完全消退至肿瘤不再被感知的程度。虽然某些肿瘤在处理 4-5 周复发,4 次剂量群中 75% 的小鼠(6/8)在第 38 天时仍然活着,并且 50% 仍然无肿瘤。由于肿瘤的逐步生长,到该时间点时,所有其它群体中的所有小鼠已被处死。

[0159] 在另一项研究中,其中向初次接受实验的 C57BL/6 小鼠中植入表达 E7 的 TC1 肿瘤细胞,用 Pentarix 蛋白加多聚 I:C 免疫荷 TC1 瘤小鼠诱导肿瘤完全消退,以及肿瘤消退后持续的 E7 特异性 CD8 记忆细胞的建立(图 8C)。

[0160] 在另一项研究中(图 9A)中,在第 -21 天向初次接受实验的 C57BL/6 小鼠(4 只小鼠/群)的左侧腹部皮下植入表达 HPV E7 的 TC-1 肿瘤细胞(1×10^5 个细胞/鼠)。在第 0 天(当肿瘤的大小达到约 200mm^3 时),用 Pentarix 蛋白($100\mu\text{g}$)加 $10\mu\text{g}$ TLR9 激动剂 CpG2395(Invivogen)或仅用 $10\mu\text{g}$ TLR9 激动剂 CpG2395(无 Pentarix)对小鼠进行单次接种(颈背部皮下)对小鼠进行接种,或保留小鼠未经处理。用 Pentarix 蛋白($100\mu\text{g}$)加 $10\mu\text{g}$ TLR9 激动剂 CpG2395 免疫的小鼠完全消退肿瘤并在研究期间保持无瘤。每两到三天通过使用卡尺测量肿瘤来监测肿瘤的生长,并使用公式“宽度² $\times$ 长度 $\times 0.5$ 计算肿瘤体积,根据 CCAC(加拿大动物保护协会)的指导方针,当肿瘤体积达到约 2000mm^3 时,处死荷瘤小鼠。

[0161] 在评估由 Pentarix 蛋白加这些佐剂单次免疫诱导的 CD8T 细胞效应器功能(关于其消退建立的表达 E7 的肿瘤的能力)的另一项研究中,将表达 HPV16E7 的 TC-1 肿瘤经皮下植入到初次接受实验的受体小鼠中并允许生长直到它们达到约 200mm^3 的体积。用 Pentarix 蛋白与多聚(I:C)或 CpG 寡核苷酸混合免疫的动物开始消退这些肿瘤,一般在免疫的一个星期内(图 9B)。在这项研究中,用 Pentarix 蛋白加佐剂免疫的所有动物在免疫接种后 3 周肿瘤完全消退,并保持无瘤持续至少 3 个月。相反,未经处理或仅用佐剂或用 Pentarix 蛋白处理的小鼠只显示出逐步的肿瘤生长,并且由于肿瘤负荷过大而被处死(一般在肿瘤植入 28 天内)。

[0162] 总之,如通过 OVA 蛋白所观察到的,当与 TLR3 激动剂(图 5A 和 5B)或 TLR9 激动剂(图 6A 和 6B)混合时, Pentarix 诱导强烈的 CD8+T 细胞介导的免疫应答。还如通过模式抗原 OVA 所观察到的,连续每日(集群)的免疫策略的应用显著提高由 Pentarix 诱导的 CD8+ 免疫应答(图 7A-C)。没有佐剂时, Pentarix 也诱导 CD8+T 细胞介导的免疫应答(图 11)。

[0163] 通过接种 Pentarix 蛋白诱导的免疫应答能够在接种的几天内消退建立的 TC-1 肿瘤(图 8A, 8B, 9A 和 9B)。当 Pentarix 与多聚(I:C)(图 8A, 8B 和 9B)或 CpG 寡核苷酸(图

9A 和 9B) 结合时这是真实的。在两个不同的实验中,所有接受 Pentarix 的小鼠中实现了建立的 TC-1 肿瘤的完全或几乎完全消退,而对照小鼠(没有处理或只有佐剂)100% 屈服于逐步增长的肿瘤。

[0164] 实施例 5 :Pentarix 诱导针对 HPV31E7 表位的免疫

[0165] 用 100 μ g 完整的可溶性 Pentarix 蛋白与 10 μ g 多聚 (I:C) (Amersham) 混合免疫初次接受实验的 C57BL/6 小鼠。免疫后七天处死小鼠,通过 IFN- γ ELISPOT 评估大量脾细胞制剂,以对利用两种不同的预测 MHC- 结合算法 (SYFPEITHI 和 IEDB) 鉴定的肽特异的 CD8+T 细胞的数目进行定量。结果报告为仅用介质或指定的肽 (10 μ g/ml) 刺激后每 1×10^6 个脾细胞中 IFN- γ 斑点形成细胞的数目。发现长 (14 聚体和 20 聚体) 版本和短 (9 聚体) 版本的 HPV16E7₄₉₋₅₇ 肽均能从免疫的小鼠诱导应答,以及 HPV31 衍生的候选肽 (HPV31E7₂₅₂₋₂₆₀-TSNYNIVTF; SEQ ID NO :35) 在两种算法上得到最高 H2D_b 分数 (图 10A)。这一发现表示 HPV31E7 的新的表位,并且证明 Pentarix 能诱导针对 HPV31E7 表位的免疫。实施例 6 :Pentarix 诱导针对多种 HPV 基因型的免疫应答

[0166] 为了评估由 Pentarix 诱导的细胞免疫应答的范围,利用跨越整个 pentarix 蛋白序列的覆盖 15 聚体的肽文库通过 ELISPOT,直接在体外分析来自用 Pentarix 加多聚 (I:C) 免疫的小鼠的大量脾细胞和 CD4 剔除的脾细胞。其中指出,使用磁珠剔除从大量脾细胞中剔除 CD4 细胞。简单地说,用 PE 标记的抗 CD4 抗体 (clone L3T4;BD Biosciences) 对大量的脾细胞进行染色,并使用抗 -PE 微珠根据制造商的说明书 (Miltenyi) 剔除标记的细胞。如在图 10B 所示, C57BL/6 小鼠中由 Pentarix 诱导的应答涵盖包含在疫苗中的所有 5 种 HPV 毒株。按照抗原特异性 CD8T 细胞的绝对数目,含有良好表征的 H-2D^b- 限制性表位的肽 HPV16E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF, SEQ ID NO :38) 包括最强烈的应答。次强的应答由包含相关肽 (TSNYNIVTF, SEQ ID NO :35) 的来自 HPV31 的 15 聚体肽诱导,由算法分析预测,所述相关肽与 H-2D^b 的结合甚至比 HPV16E7₄₉₋₅₇ 更强。多种来自其它 HPV E7 蛋白序列的 15 聚体肽也从大量脾细胞和 CD4 剔除的脾细胞诱导不同强度的应答,这确认了 Pentarix 能够诱导广泛范围的细胞免疫应答,即使在具有有限的 MHC 分子集合的近交系小鼠中。此外, HLA-A2 转基因小鼠 (HLA-A2/D^b, Jackson Labs stock # 004191) 也用 Pentarix 加多聚 (I:C) 免疫,并利用相同的覆盖 15 聚体的肽文库通过 ELISPOT 进行评估。有趣的是,虽然 C57BL/6 中一般的应答强度大于 HLA-A2/D^b 小鼠,但总的应答复杂性非常相似 (图 10C),表明已经诱导了 H2^b 限制性应答而未诱导 HLA-A2 限制性应答。此外,如在利用 HPV16E7 抗原的很多其它研究中观察到的,在用 Pentarix 加多聚 (I:C) 免疫的小鼠中,我们无法检测到针对 HPV16E7 的 HLA-A2 限制性 11-20 或 86-93 的最小肽表位的应答。

[0167] 为了确认 TSNYNIVTF (SEQ ID NO :35) 是强反应性 HPV3115 聚体肽 AEPDTSNYNIVTFCC (SEQ ID NO :36) 和 TSNYNIVTFCCQCKS (SEQ ID NO :37) 中的精确的最小表位,通过 ELISPOT 对来自用 Pentarix 加多聚 (I:C) 免疫的小鼠的脾细胞进行评估,并发现这些脾细胞对该 9 聚体最小肽是响应的 (图 10D)。

[0168] 其它实施方案

[0169] 虽然本文中公开了本发明的多个实施方案,可以根据本领域技术人员的公知常识在本发明的实质和范围内作出许多改编和修改。这些修改包括用已知的等同项替代本发明的任何方面,以便以基本相同的方式实现相同的结果。在此所用的登录号,可指来自

多个数据库的登录号,对于核苷酸序列包括 GenBank,欧洲分子生物学实验室 (EMBL),日本 DNA 数据库 (DDBJ),或基因组序列数据库 (GSDB);对于多肽序列包括蛋白质信息资源 (PIR),SWISSPROT,蛋白质研究基金会 (PRF) 和蛋白质数据银行 (PDB)(来自解决结构的序列),以及从 GenBank,EMBL,DDBJ 或 RefSeq 中的核苷酸序列的注释编码区翻译的序列。数值范围中包括限定该范围的数字,以及包含在其中的子范围。如本文所用,术语“包含 (comprising)”,“包含 (comprises)”,“具有 (having)”或“具有 (has)”被用作开放式术语,基本上等同于“包括,但不限于”的短语。术语如“所述 (the)”,“一 (a)”和“一个 (an)”被解释为表示单数或复数。本文参考文献的引用,不得被解释为承认这些参考文献是本发明的现有技术。通过引用将所有出版物并入本文,如同专门和单独地指出通过引用将每一篇单独的出版物并入本文,以及如同本文中完全列出。本发明包括基本上如上文所述,参照实施例和附图的所有实施方案和变化。

[0170] 已经结合一个或多个实施方案描述了本发明。但是,本领域技术人员显而易见的是,在不脱离权利要求中所限定的本发明的范围情况下,可以作出多种变化和修改。

[0171] 参考文献

[0172] 1. Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez, and S. Wacholder. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.

[0173] 2. Bosch, F. X., A. Lorincz, N. Munoz, C. J. Meijer, and K. V. Shah. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology* 55:244-265.

[0174] 3. Castellsague, X. 2008. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 110:S4-7.

[0175] 4. Psyrri, A., and D. DiMaio. 2008. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 5:24-31.

[0176] 5. Devaraj, K., M. L. Gillison, and T. C. Wu. 2003. Development of HPV vaccines for HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Critical reviews in oral biology and medicine:an official publication of the American Association of Oral Biologists* 14:345-362.

[0177] 6. Syrjanen, S. 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S59-66.

[0178] 7. Winer, R. L., S. K. Lee, J. P. Hughes, D. E. Adam, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky. 2003. Genital human papillomavirus infection:incidence and risk factors in a cohort of female university students. *American Journal of Epidemiology* 157:218-226.

[0179] 8. Frazer, I. H. 2004. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews. Immunology* 4:46-54.

[0180] 9. Cutts, F. T., S. Franceschi, S. Goldie, X. Castellsague, S. de Sanjose, G. Garnett, W. J. Edmunds, P. Claeys, K. L. Goldenthal, D. M. Harper, and L. Markowitz. 2007. Human papillomavirus and HPV vaccines:a review. *Bull World Health Organ* 85:719-726.

- [0181] 10. Leggatt, G. R., and I. H. Frazer. 2007. HPV vaccines: the beginning of the end for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 19:232-238.
- [0182] 11. Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, C. J. Meijer, and G. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 348:518-527.
- [0183] 12. Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. urman, and K. V. Shah. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute* 87:796-802.
- [0184] 13. Jenkins, D. 2008. A review of cross-protection against oncogenic HPV by an HPV-16/18AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: importance of virological and clinical endpoints and implications for mass vaccination in cervical cancer prevention. *Gynecol Oncol* 110:S18-25.
- [0185] 14. Ault, K. A. 2007. Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types. *Gynecol Oncol* 107:S31-33.
- [0186] 15. Harper, D. M., E. L. Franco, C. M. Wheeler, A. B. Moscicki, B. Romanowski, C. M. Roteli-Martins, D. Jenkins. A. Schuind, S. A. Costa Clemens, and G. Dubin. 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent LI virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 367:1247-1255.
- [0187] 16. Hildesheim, A., R. Herrero, S. Wacholder, A. C. Rodriguez, D. Solomon, M. C. Bratti, J. T. Schiller, P. Gonzalez, G. Dubin, C. Porras, S. E. Jimenez, and D. R. Lowy. 2007. Effect of human papillomavirus 16/18 LI viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *Jama* 298:743-753.
- [0188] 17. Herzog, T. J., W. K. Huh, L. S. Downs, J. S. Smith, and B. J. Monk. 2008. Initial lessons learned in HPV vaccination. *Gynecol Oncol* 109:S4-11.
- [0189] 18. Goldie, S. J., M. O' Shea, M. Diaz, and S. Y. Kim. 2008. Benefits, cost requirements and cost-effectiveness of the HPV16, 18 vaccine for cervical cancer prevention in developing countries: policy implications. *Reprod Health Matters* 16:86-96.
- [0190] 19. Monie, A., C. F. Hung, and T. C. Wu. 2007. Preventive and therapeutic HPV vaccines. *Curr Opin Investig Drugs* 8:1038-1050.
- [0191] 20. Hung, C. F., B. Ma, A. Monie, S. W. Tsen, and T. C. Wu. 2008. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert Opin Biol Ther* 8:421-439.

- [0192] 21. Narisawa-Saito, M., and T. Kiyono. 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science* 98:1505-1511.
- [0193] 22. Crook, T., J. P. Morgenstem, L. Crawford, and L. Banks. 1989. Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *Embo J* 8:513-519.
- [0194] 23. Smotkin, D., and F. O. Wettstein. 1987. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* 61:1686-1689.
- [0195] 24. Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78:11451-11460.
- [0196] 25. Lin, K. Y., F. G. Guarnieri, K. F. Staveley-O'Carroll, H. I. Levitsky, J. T. August, D. M. Pardoll, and T. C. Wu. 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer research* 56:21-26.
- [0197] 26. Feltkamp, M. C, H. L. Smits, M. P. Vierboom, R. P. Minnaar, B. M. de Jongh, J. W. Drijfhout, J. ter Schegget, C. J. Melief, and W. M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *European journal of immunology* 23:2242-2249.
- [0198] 27. Vierboom, M. P., M. C. Feltkamp, A. Neisig, J. W. Drijfhout, J. ter Schegget, J. J. Neefjes, C. J. Melief, and W. M. Kast. 1998. Peptide vaccination with an anchor-replaced CTL epitope protects against human papillomavirus type 16-induced tumors expressing the wild-type epitope. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md:1997)* 21:399-408.
- [0199] 28. Manuri, P. R., B. Nehete, P. N. Nehete, R. Reisenauer, S. Wardell, A. N. Courtney, R. Gambhira, D. Lomada, A. K. Chopra, and K. J. Sastry. 2007. Intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16 induces systemic and mucosal cellular immune responses and tumor protection. *Vaccine* 25:3302-3310.
- [0200] 29. Chen, W., W. Yan, and L. Huang. 2008. A simple but effective cancer vaccine consisting of an antigen and a cationic lipid. *Cancer immunology, immunotherapy*: CII 57:517-530.
- [0201] 30. Berraondo, P., C. Nouze, X. Preville, D. Ladant, and C. Leclerc. 2007. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer research* 67:8847-8855.
- [0202] 31. Peng, S., H. Ji, C. Trimble, L. He, Y. C. Tsai, J. Yeatermeyer, D. A. Boyd, C.

F. Hung, and T. C. Wu. 2004. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type16oncoprotein E6. *Journal of virology*78:8468-8476.

[0203] 32. Lin, C. T., Y. C. Tsai, L. He, R. Calizo, H. H. Chou, T. C. Chang, Y. . Soong, C. F. Hung, and C. H. Lai. 2006. A DNA vaccine encoding a codon-optimized human papillomavirus type16E6gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *Journal of Biomedical Science*13:481-488.

[0204] 33. Cheng, W. F, C. F. Hung, S. I. Pai, K. F. Hsu, L. He, M. Ling, and T. C. Wu. 2002. Repeated DNA vaccinations elicited qualitatively different cytotoxic T lymphocytes and improved protective antitumor effects. *Journal of Biomedical Science*9:675-687.

[0205] 34. Borysiewicz, L. K., A. Fiander, M. Nimako, S. Man, G. W. Wilkinson, D. Westmoreland, A. S. Evans, M. Adams, S. N. Stacey, M. E. Boursnell, E. Rutherford, J. K. Hickling, and S. C. Inglis. 1996. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types16and18, E6and E7proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*347:1523-1527.

[0206] 35. Li, J., Y. Sun, and A. Garen. 2002. Immunization and immunotherapy for cancers involving infection by a human papillomavirus in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*99:16232-16236.

[0207] 36. Zhang, L., Y. Tang, H. Akbulut, D. Zelterman, P. J. Linton, and A. B. Deisseroth. 2003. An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen CD40-ligand fusion protein to dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*100:15101-15106.

[0208] 37. Jin, H. S., E. K. Park, J. M. Lee, S. E. NamKoong, D. G. Kim, Y. J. Lee, H. J. Jun, B. D. Han, S. M. Bae, and W. S. Ann. 2005. Immunization with adenoviral vectors carrying recombinant IL-12and E7enhanced the antitumor immunity to human papillomavirus16-associated tumor. *Gynecologic oncology*97:559-567.

[0209] 38. Londono, L. P., S. Chatfield, R. W. Tindle, K. Herd, X. M. Gao, I. Frazer, and G. Dougan. 1996. Immunisation of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type16E7epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine*14:545-552.

[0210] 39. Krul, M. R., E. J. Tijhaar, J. A. Kleijne, A. M. Van Loon, M. G. Nievers, H. Schipper, L. Geerse, M. Van der Kolk, P. A. Steerenberg, F. R. Mooi, and W. Den Otter. 1996. Induction of an antibody response in mice against human papillomavirus (HPV) type16after immunization with HPV recombinant *Salmonella* strains. *Cancer immunology, immunotherapy*:CII43:44-48.

[0211] 40. Gunn, G. R., A. Zubair, C. Peters, Z. K. Pan, T. C. Wu, and Y. Paterson. 2001. Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms

of human papilloma virus-16(HPV-16)E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. :1950) 167:6471-6479.

[0212] 41. Lin, C. W., J. Y. Lee, Y. P. Tsao, C. P. Shen, H. C. Lai, and S. L. Chen. 2002. Oral vaccination with recombinant *Listeria monocytogenes* expressing human papillomavirus type16E7 can cause tumor growth in mice to regress. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 102:629-637.

[0213] 42. Mackova, J., L. Kutinova, P. Hainz, J. Krystofova, V. Sroller, P. Otahal, P. Gabriel, and S. Nemeckova. 2004. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *International journal of oncology* 24:1581-1588.

[0214] 43. Hauser, H., L. Shen, Q. L. Gu, S. Krueger, and S. Y. Chen. 2004. Secretory heat-shock protein as a dendritic cell-targeting molecule: a new strategy to enhance the potency of genetic vaccines. *Gene therapy* 11:924-932. 44.

[0215] 44. Kang, T. H., J. H. Lee, H. C. Bae, K. H. Noh, J. H. Kim, C. K. Song, B. C. Shin, C. F. Hung, T. C. Wu, J. S. Park, and T. W. Kim. 2006. Enhancement of dendritic cell-based vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. *Immunology letters* 106:126-134.

[0216] 45. Chandy, A. G., M. Nurkkala, A. Josefsson, and K. Eriksson. 2007. Therapeutic dendritic cell vaccination with Ag coupled to cholera toxin in combination with intratumoural CpG injection leads to complete tumour eradication in mice bearing HPV16 expressing tumours. *Vaccine* 25:6037-6046.

[0217] 46. Greenstone, H. L., J. D. Nieland, K. E. de Visser, M. L. De Bruijn, R. Kirnbauer, R. B. Roden, D. R. Lowy, W. M. Kast, and J. T. Schiller. 1998. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1800-1805.

[0218] 47. Da Silva, D. M., J. T. Schiller, and W. M. Kast. 2003. Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particle vaccines. *Vaccine* 21:3219-3227.

[0219] 48. Warrino, D. E., W. C. Olson, M. I. Scarrow, L. J. D' Ambrosio-Brennan, R. S. Guido, D. M. Da Silva, W. M. Kast, and W. J. Storkus. 2005. Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Human immunology* 66:762-772.

[0220] 49. Kaufmann, A. M., J. D. Nieland, I. Jochmus, S. Baur, K. Friese, J. Gabelsberger, F. Giesecking, L. Gissmann, B. Glasschroder, T. Grubert, P. Hillemanns, R. Hopfl, H. Ikenberg, J. Schwarz, M. Karrasch, A. Knoll, V. Kuppers, M. Lechmann, R.

- J. Lelle, H. Meissner, R. T. Muller, M. Pawlita, K. U. Petry, H. Pilch, E. Walek, and A. Schneider. 2007. Vaccination trial with HPV16L1E7chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia(CIN2/3). *International journal of cancer. Journal international du cancer*121:2794-2800.
- [0221] 50. Carbone, F. R., and M. J. Bevan. 1990. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *The Journal of experimental medicine*171:377-387.
- [0222] 51. Hallez, S., J. M. Brulet, C. Vandooren, F. Maudoux, S. Thomas, M. Heinderickx, A. Bollen, R. Wattiez, and A. Jacquet. 2004. Pre-clinical immunogenicity and anti-tumour efficacy of a deleted recombinant human papillomavirus type16E7protein. *Anticancer Research*24:2265-2275.
- [0223] 52. Welters, M. J., D. V. Filippov, S. J. van den Eeden, K. L. Franken, J. Nouta, A. R. Valentijn, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, G. Lipford, R. Offringa, C. J. Melief, J. H. van Boom, S. H. van der Burg, and J. W. Drijfhout. 2004. Chemically synthesized protein as tumour-specific vaccine:immunogenicity and efficacy of synthetic HPV16E7in the TC-1mouse tumour model. *Vaccine*23:305-311.
- [0224] 53. Tobian, A. A., D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD1-dependent class I HC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*172:5277-5286.
- [0225] 54. Tobian, A. A., C. V. Harding, and D. H. Canaday. 2005. Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and-presentation by B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. :1950)*174 :5209-5214.
- [0226] 55. Salio, M., and V. Cerundolo. 2005. Viral immunity:cross-priming with the help of TLR3. *Current biology:CB*15:R336-339.
- [0227] 56. Zaks, K., M. Jordan, A. Guth, K. Sellins, R. Kedl, A. Izzo, C. Bosio, and S. Dow. 2006. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3or TLR9agonists complexed to cationic liposomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. :1950)*176:7335-7345.
- [0228] 57. Heng, B. et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br J Cancer*(2009).
- [0229] 58. Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews. Immunology*4, 46-54(2004).
- [0230] 59. Collins, S. et al. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *Bjog*109, 96-98(2002).
- [0231] 60. Cutts, F. T. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines:a review. *Bull World Health Organ*85, 719-726(2007).

- [0232] 61. Leggatt, G. R. & Frazer, I. H. HPV vaccines: the beginning of the end for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 19, 232-238 (2007).
- [0233] 62. Moscicki, A. B. HPV Vaccines: today and in the Future. *J Adolesc Health* 43, S26-40 (2008).
- [0234] 63. Monie, A., Tsen, S. W., Hung, C. F. & Wu, T. C. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8, 1221-1235 (2009).
- [0235] 64. Bermudez-Humaran, L. G. & Langella, P. Perspectives for the development of human papillomavirus vaccines and immunotherapy. *Expert Rev Vaccines* 9, 35-44 (2010).
- [0236] 65. Cid-Arregui, A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Open Virol J* 3, 67-83 (2009).
- [0237] 66. Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. Protective 'immunity' by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. *Immunol Rev* 211, 310-319 (2006).
- [0238] 67. Pantaleo, G. & Koup, R. A. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med* 10, 806-810 (2004).
- [0239] 68. Peng, S. et al. Cluster intradermal DNA vaccination rapidly induces E7-specific CD8⁺T-cell immune responses leading to therapeutic antitumor effects. *Gene Ther* 15, 1156-1166 (2008).
- [0240] 69. Murali-Krishna, K. et al. Counting antigen-specific CD8⁺T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8, 177-187 (1998).
- [0241] 70. Lu, S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol* 21, 346-351 (2009).
- [0242] 71. Radosevic, K., Rodriguez, A., Lemckert, A. & Goudsmit, J. Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. *Expert Rev Vaccines* 8, 577-592 (2009).
- [0243] 72. Ranasinghe, C. & Ramshaw, L. A. Genetic heterologous prime-boost vaccination strategies for improved systemic and mucosal immunity. *Expert Rev Vaccines* 8, 1171-1181 (2009).
- [0244] 73. Altschul, S. F. 1991. "Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective." *Journal of Molecular Biology*, 219:555-665.
- [0245] 74. Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., Orcutt, B. C. 1978. "A model of evolutionary change in proteins." In "Atlas of Protein Sequence and Structure" 5(3) M. O. Dayhoff (ed.), 345-352, National Biomedical Research Foundation, Washington;
- [0246] 75. States, D. J., Gish, W., Altschul, S. F. 1991. "Improved Sensitivity of Nucleic Acid Database Search Using Application-Specific Scoring Matrices" *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3(1):66-77;

- [0247] 76. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1992 "Amino acid substitution matrices from protein blocks." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89(biochemistry):10915-10919;
- [0248] 77. M. S. Johnson and J. P. Overington. 1993. "A Structural Basis of Sequence Comparisons: An evaluation of scoring methodologies." *Journal of Molecular Biology*. 233:716-738.
- [0249] 78. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1993. "Performance Evaluation of Amino Acid Substitution Matrices." *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 17:49-61;
- [0250] 79. Karlin, S. and Altschul, S. F. 1990. "Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:2264-2268.)
- [0251] 80. Eisenberg et al (*J. Mol. Bio.* 179:125-142, 184.
- [0252] 81. Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.
- [0253] 82. Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1994).
- [0254] 83. *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th edition), ed. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

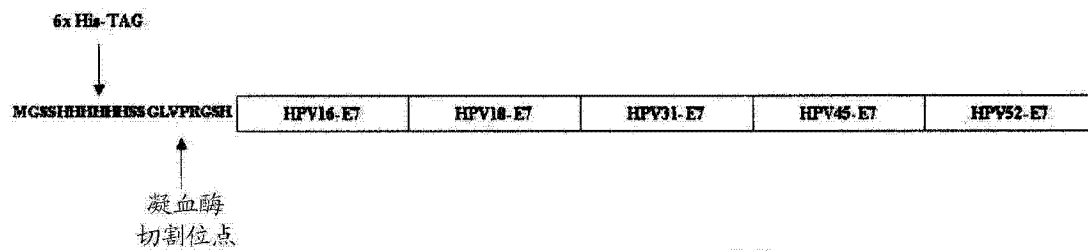
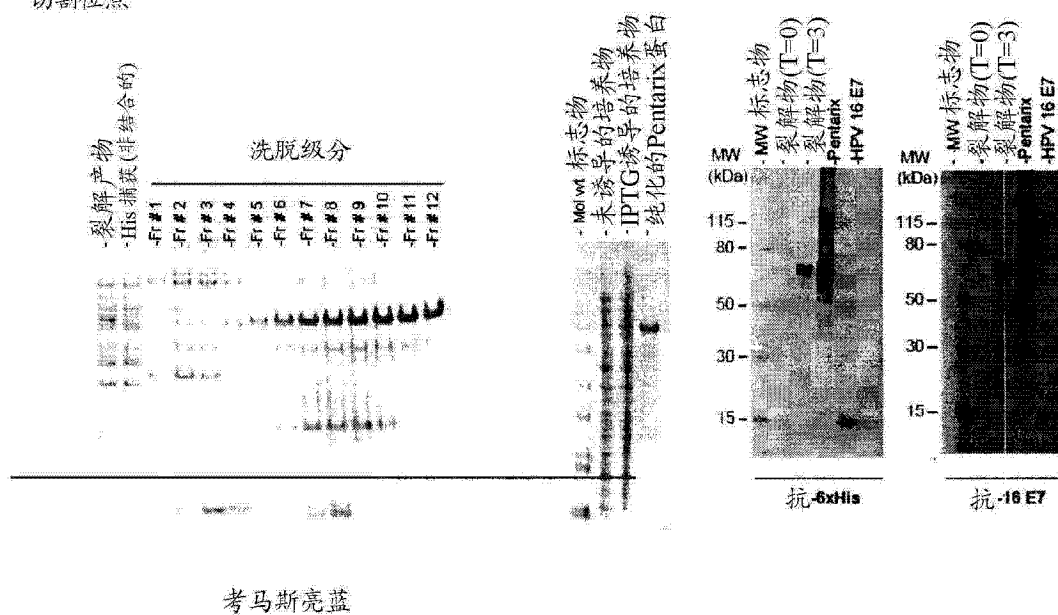
A**B****C**

图 1

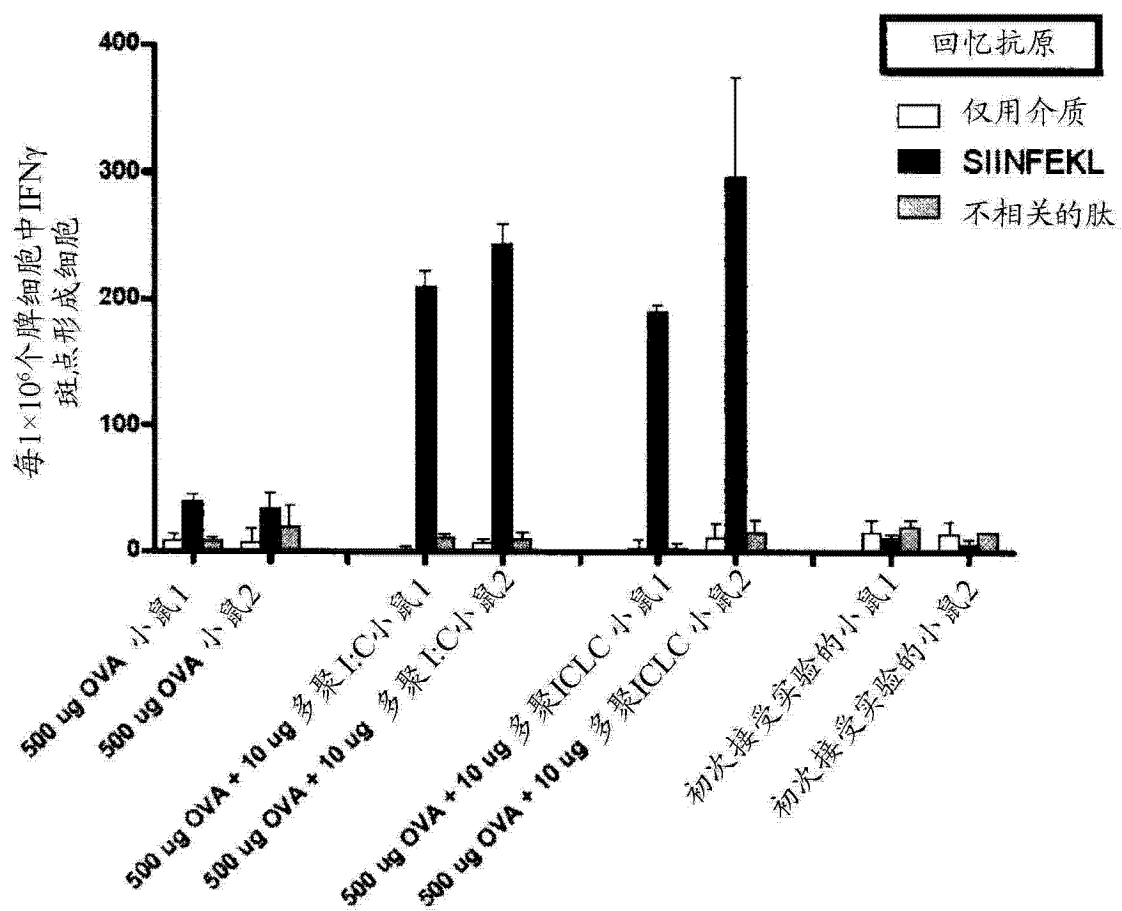


图 2A

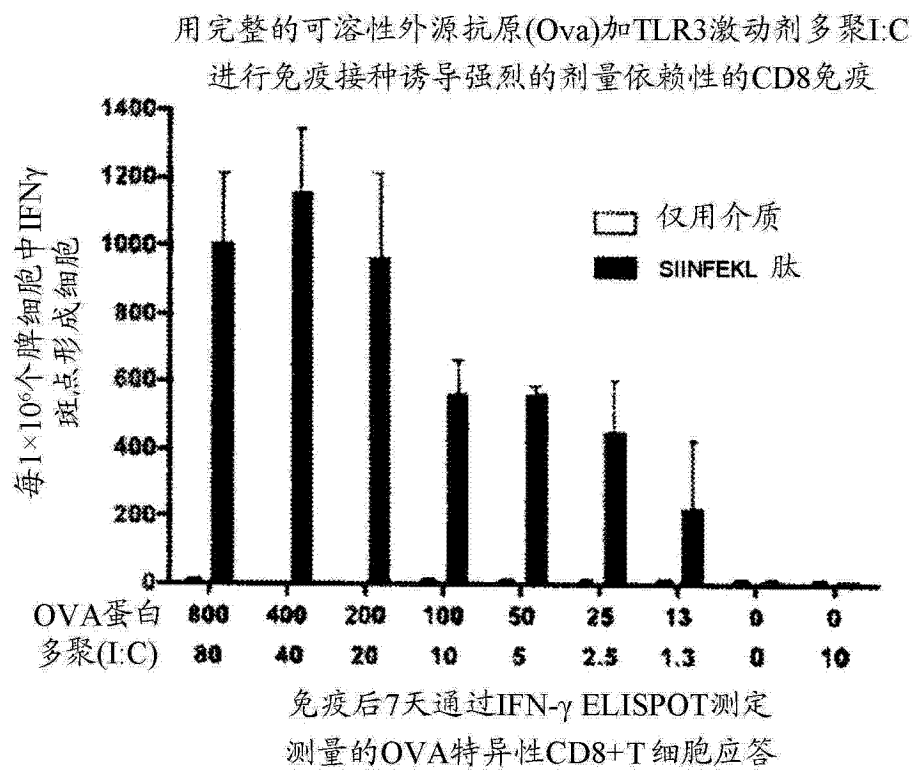


图 2B

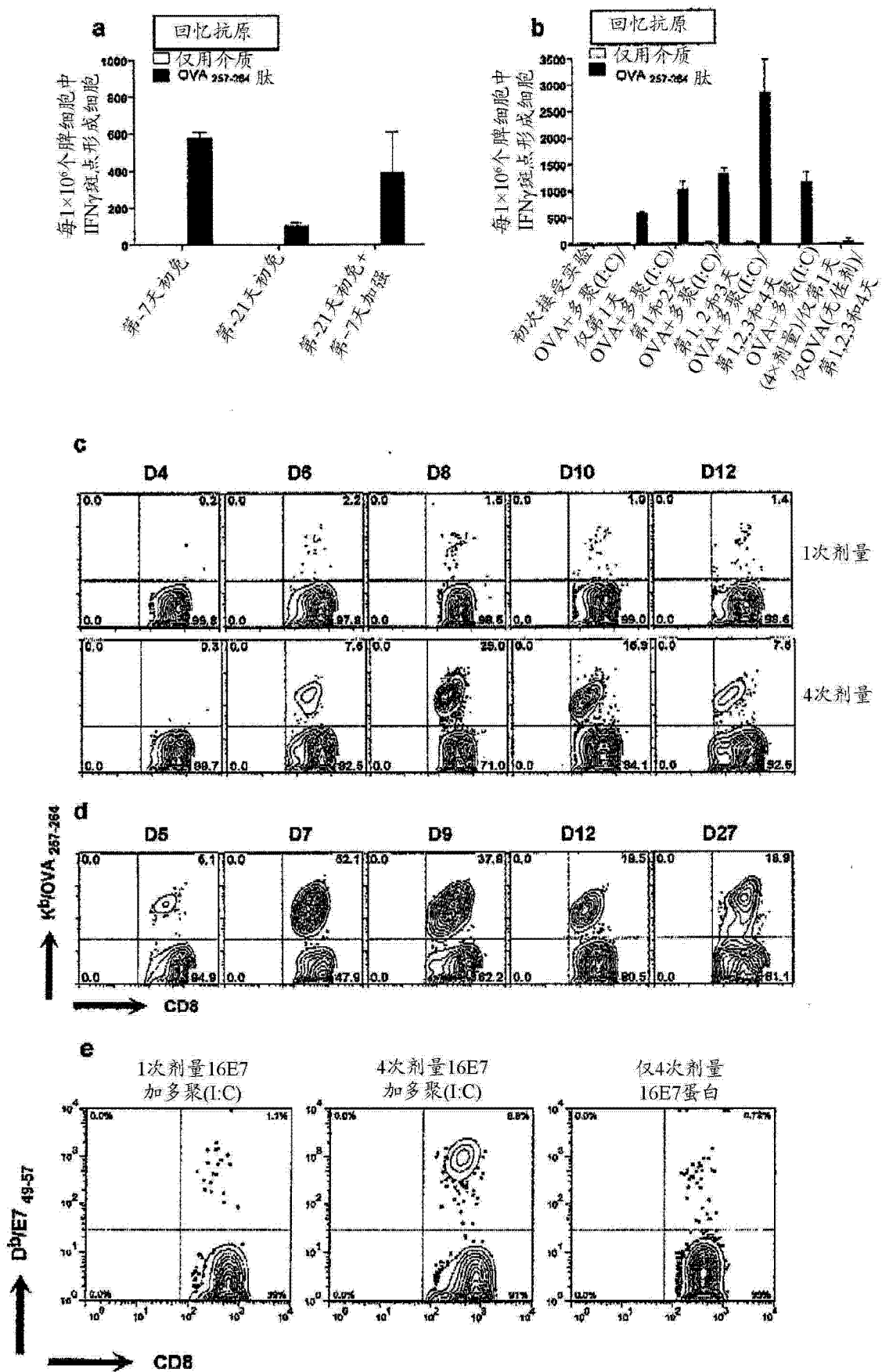


图 3

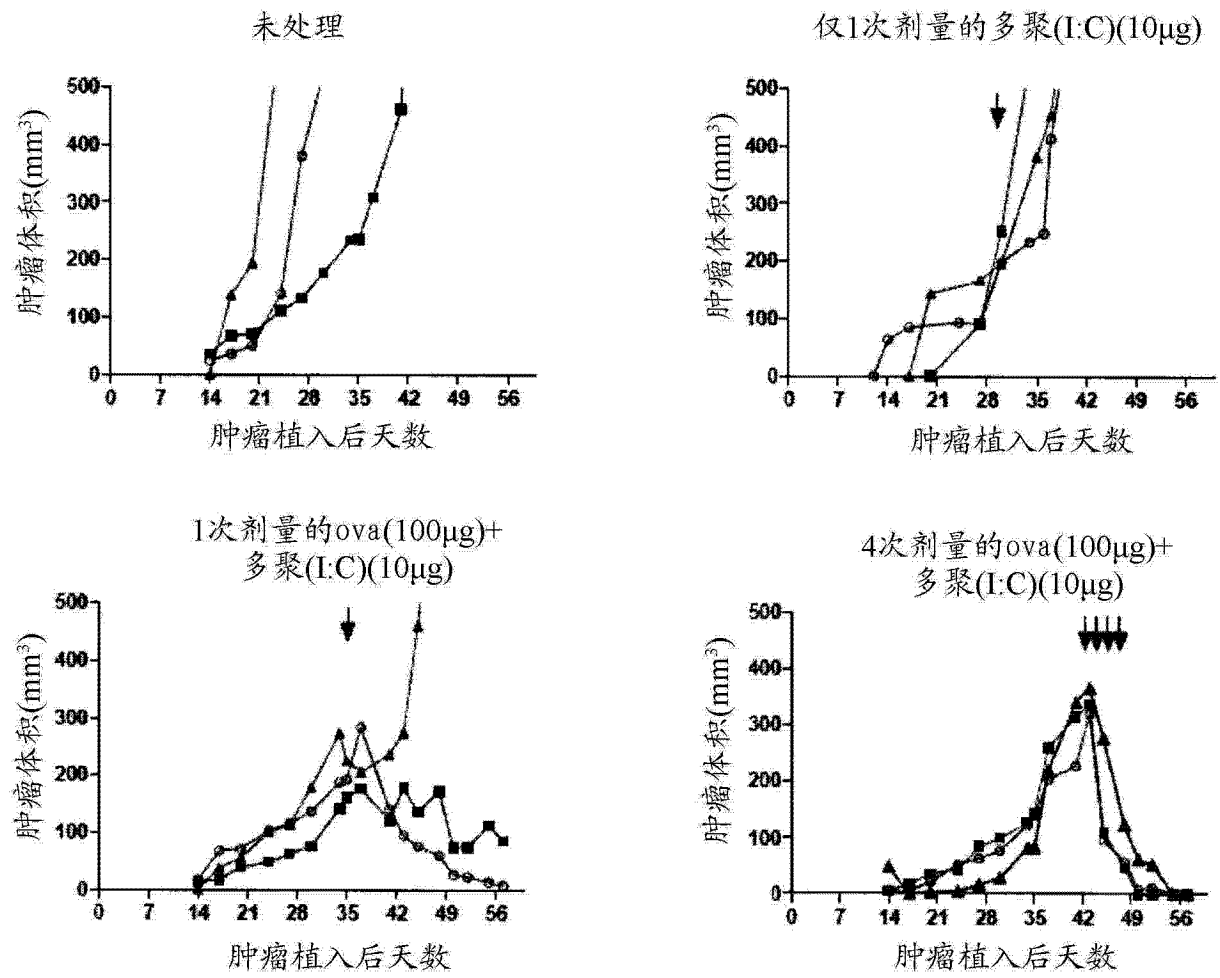


图 4

081004DW: 响应于用1次剂量的Pentarix(100 μ g)加多聚I:C(10 μ g)进行免疫接种而诱导的I类MHC限制性E7₄₉₋₅₇特异的T细胞的频数

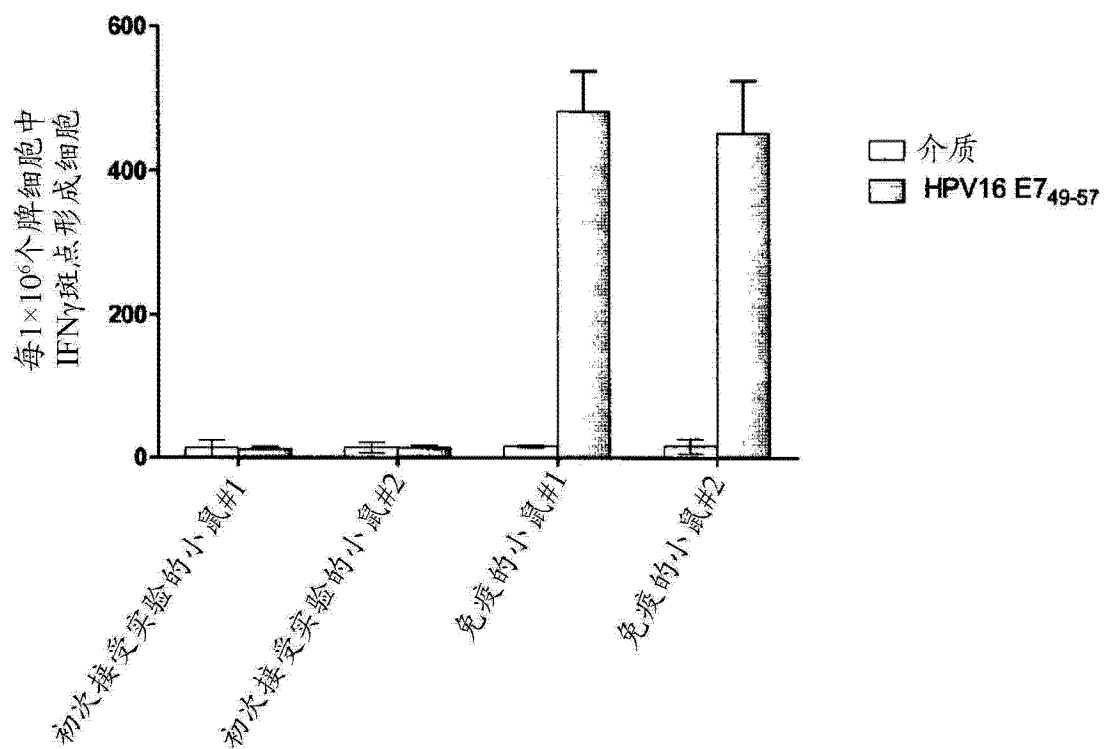


图 5A

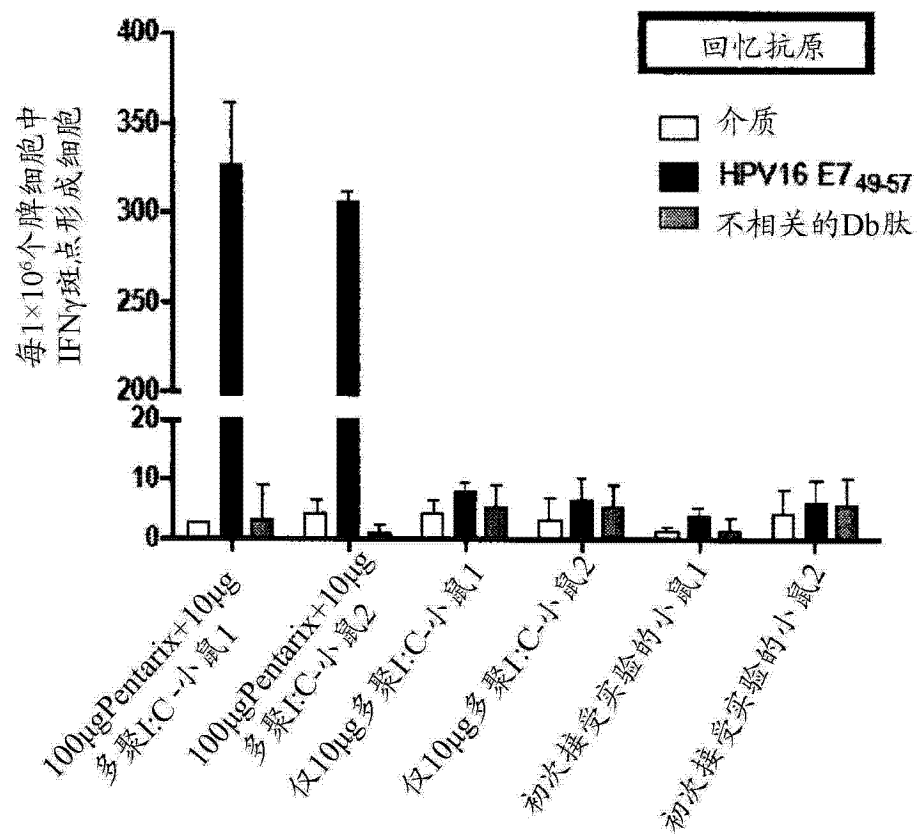


图 5B

09A004DW: 响应于用1次剂量的Pentax(100 μ g)加CpG-2395(10 μ g)进行免疫接种而诱导的I类MHC限制性E7₄₉₋₅₇特异的T细胞的频数

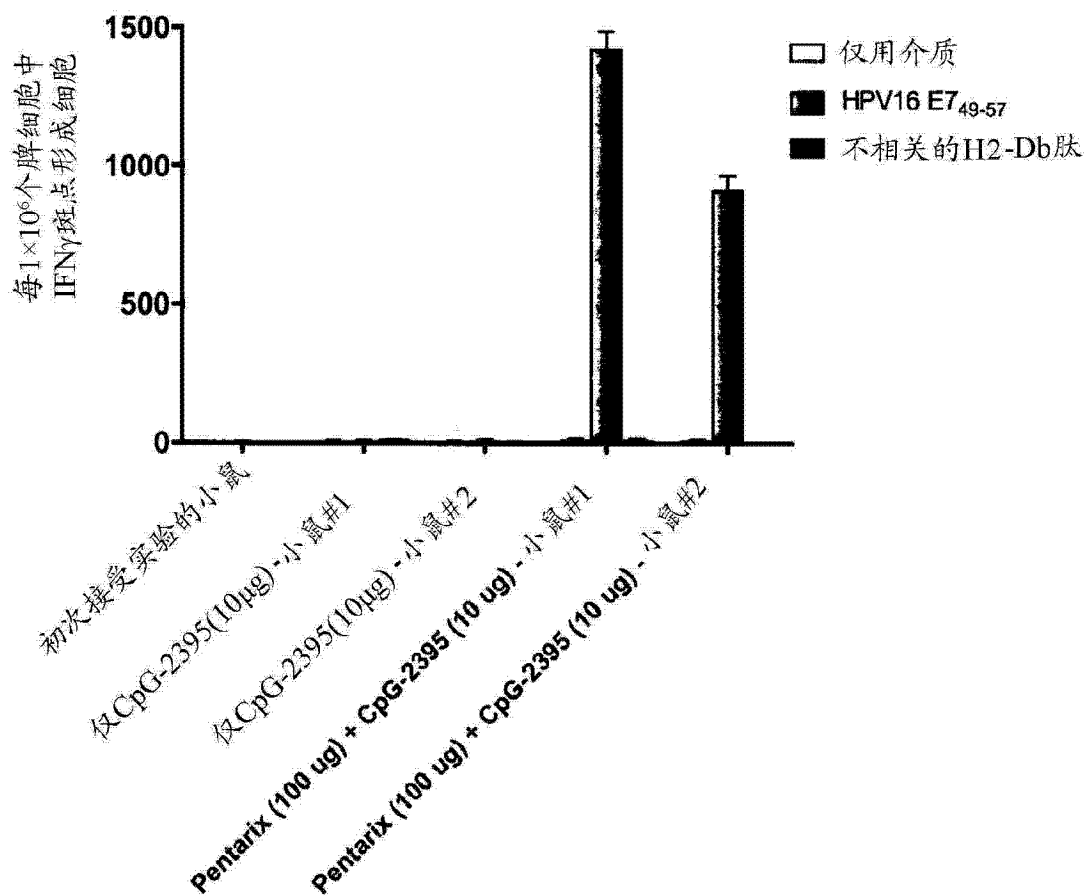


图 6A

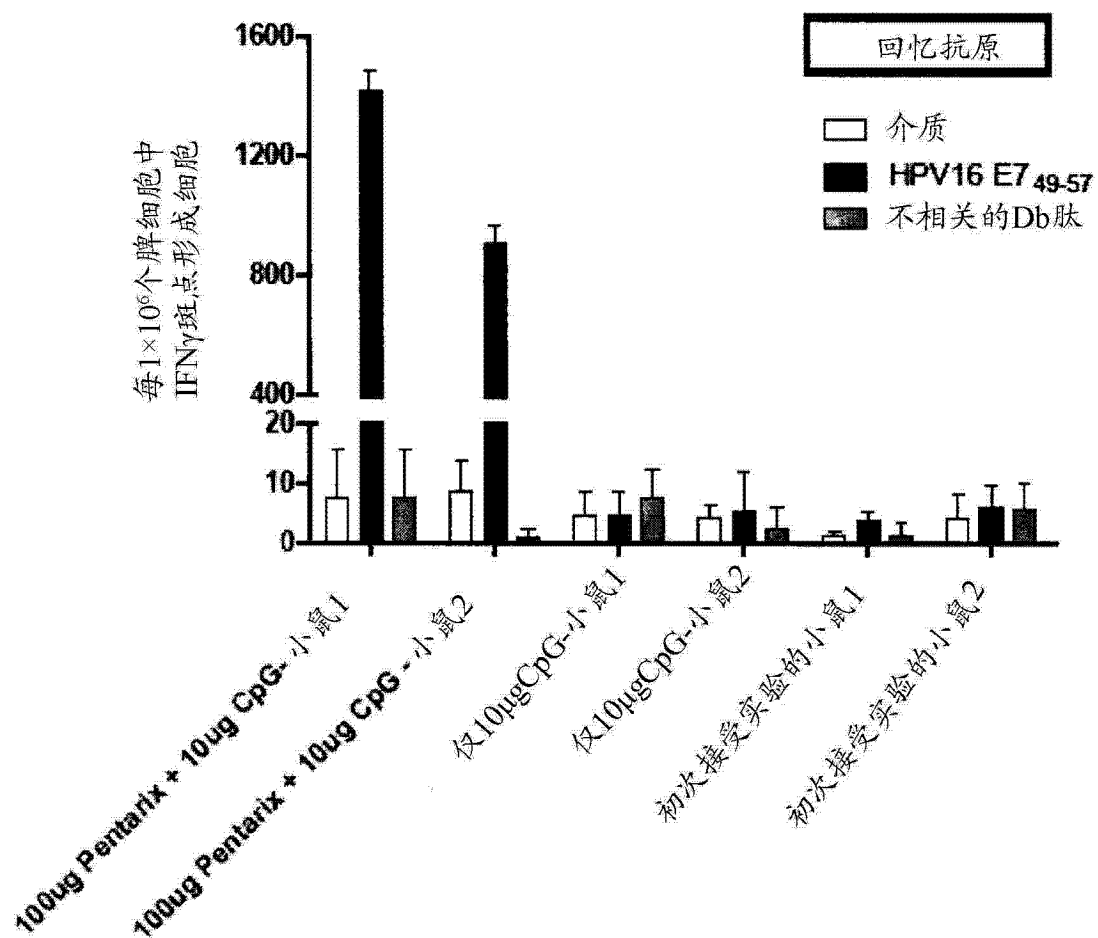


图 6B

081004DW: 响应于用4次剂量的Pentaxin(100 μ g)加多聚I:C(10 μ g)进行免疫接种而诱导的I类MHC限制性E7₄₉₋₅₇特异的T细胞的频数(初次免疫后7天测量)

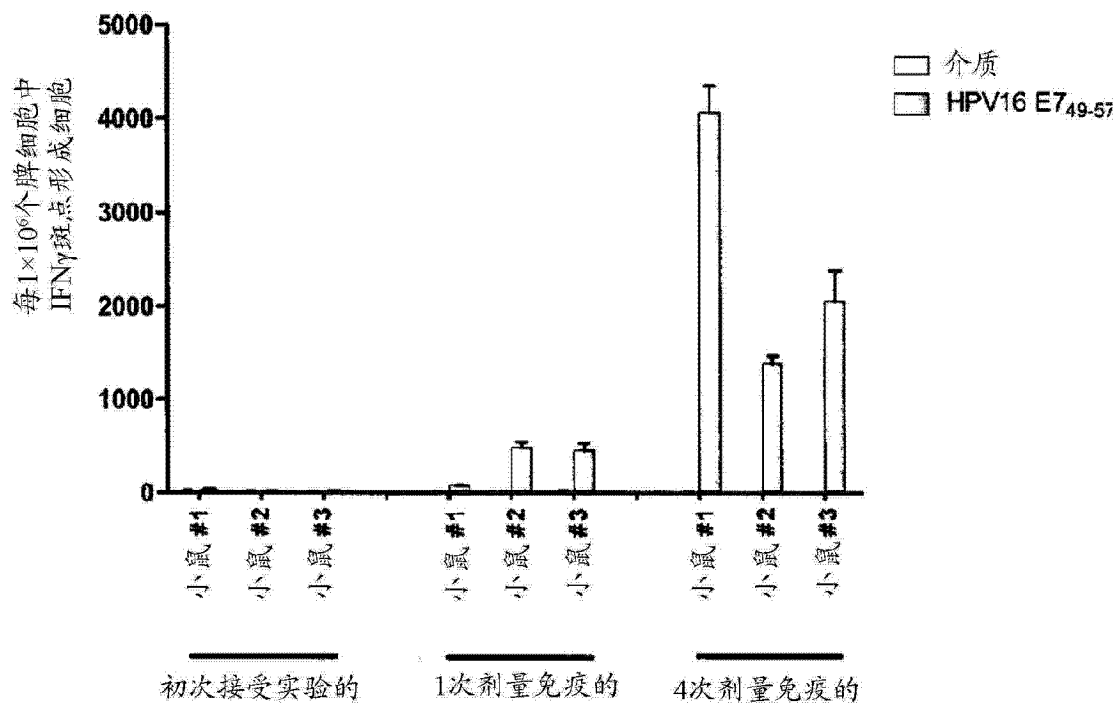


图 7A

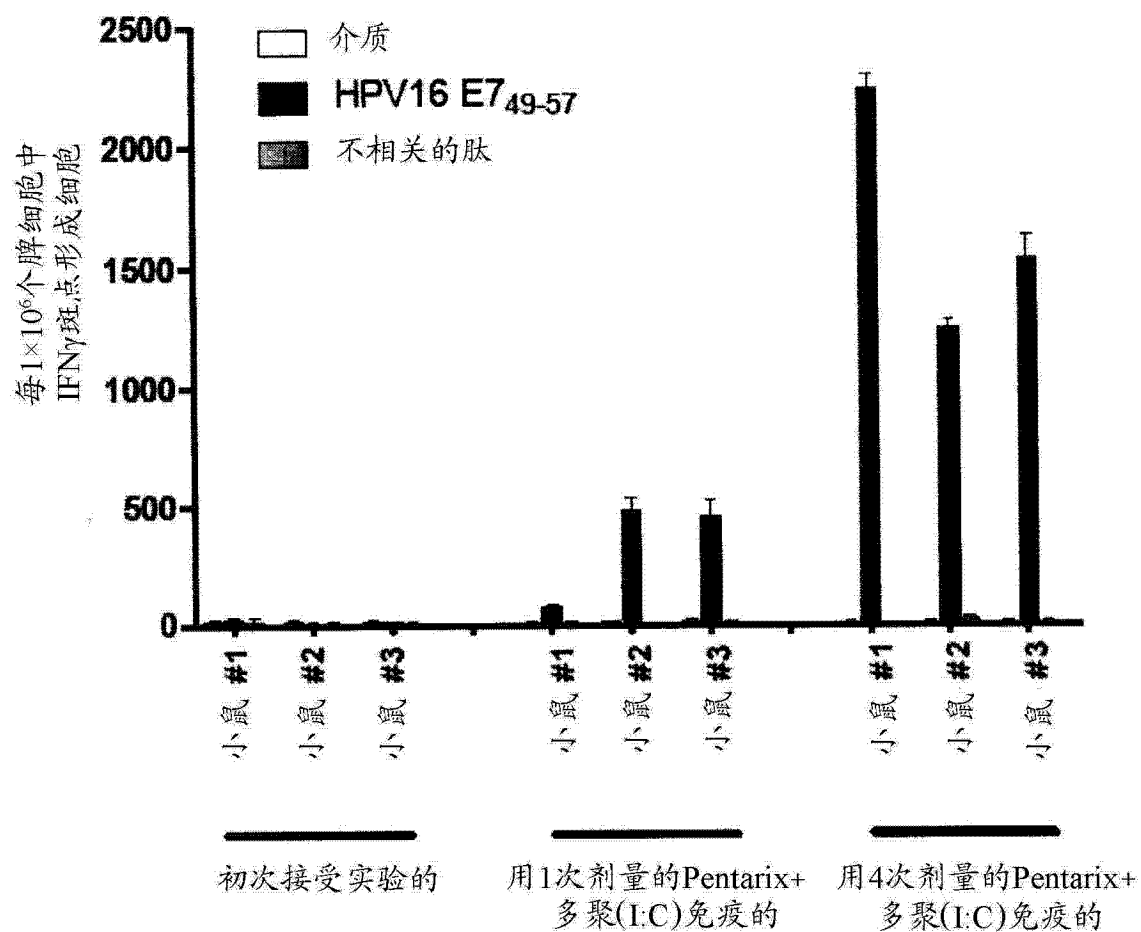


图 7B

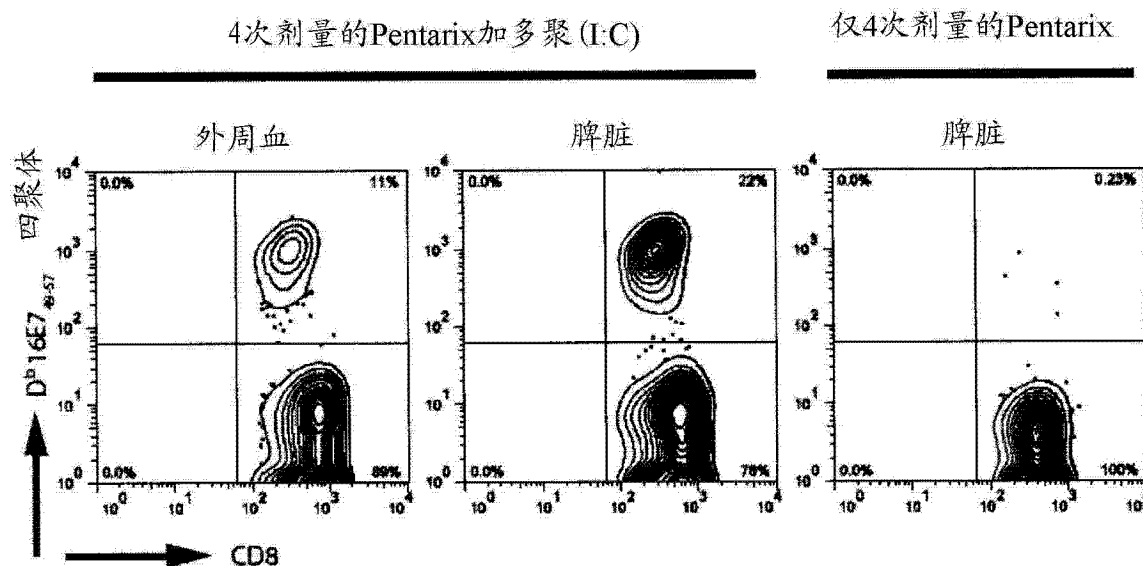


图 7C

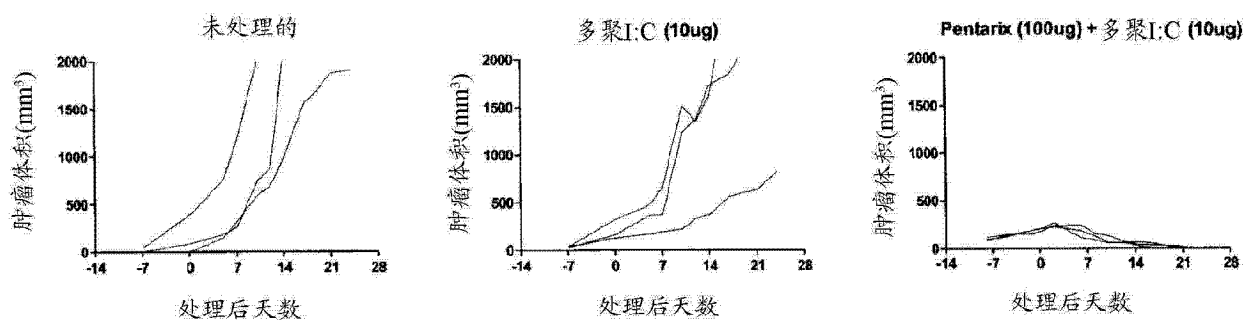


图 8A

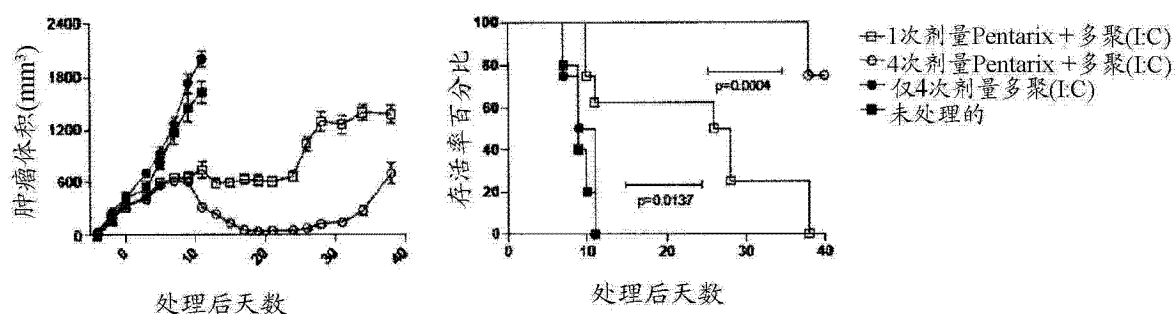


图 8B

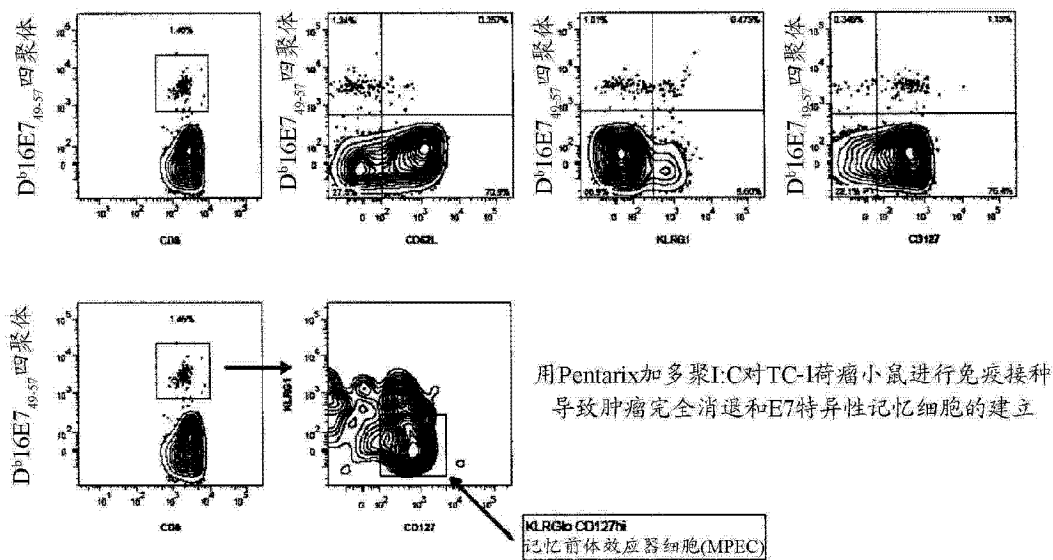


图 8C

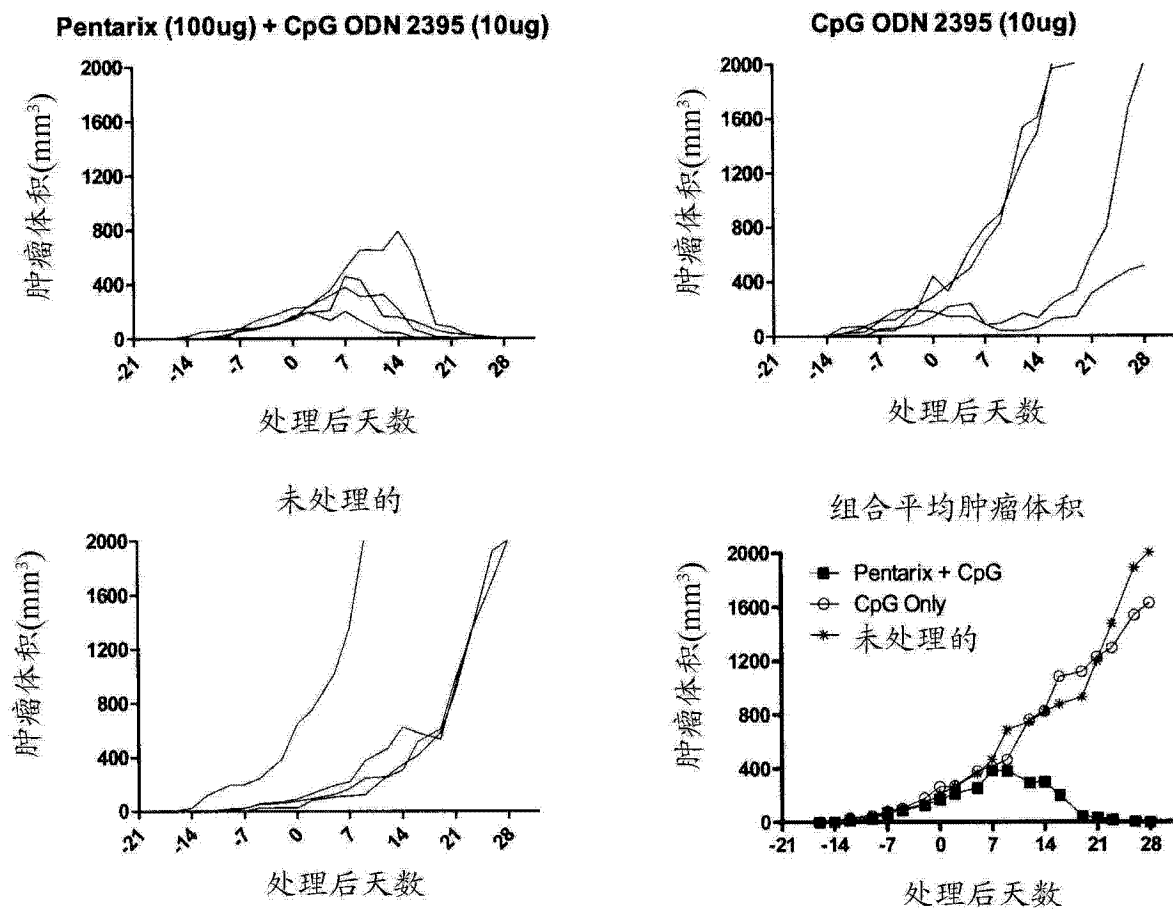


图 9A

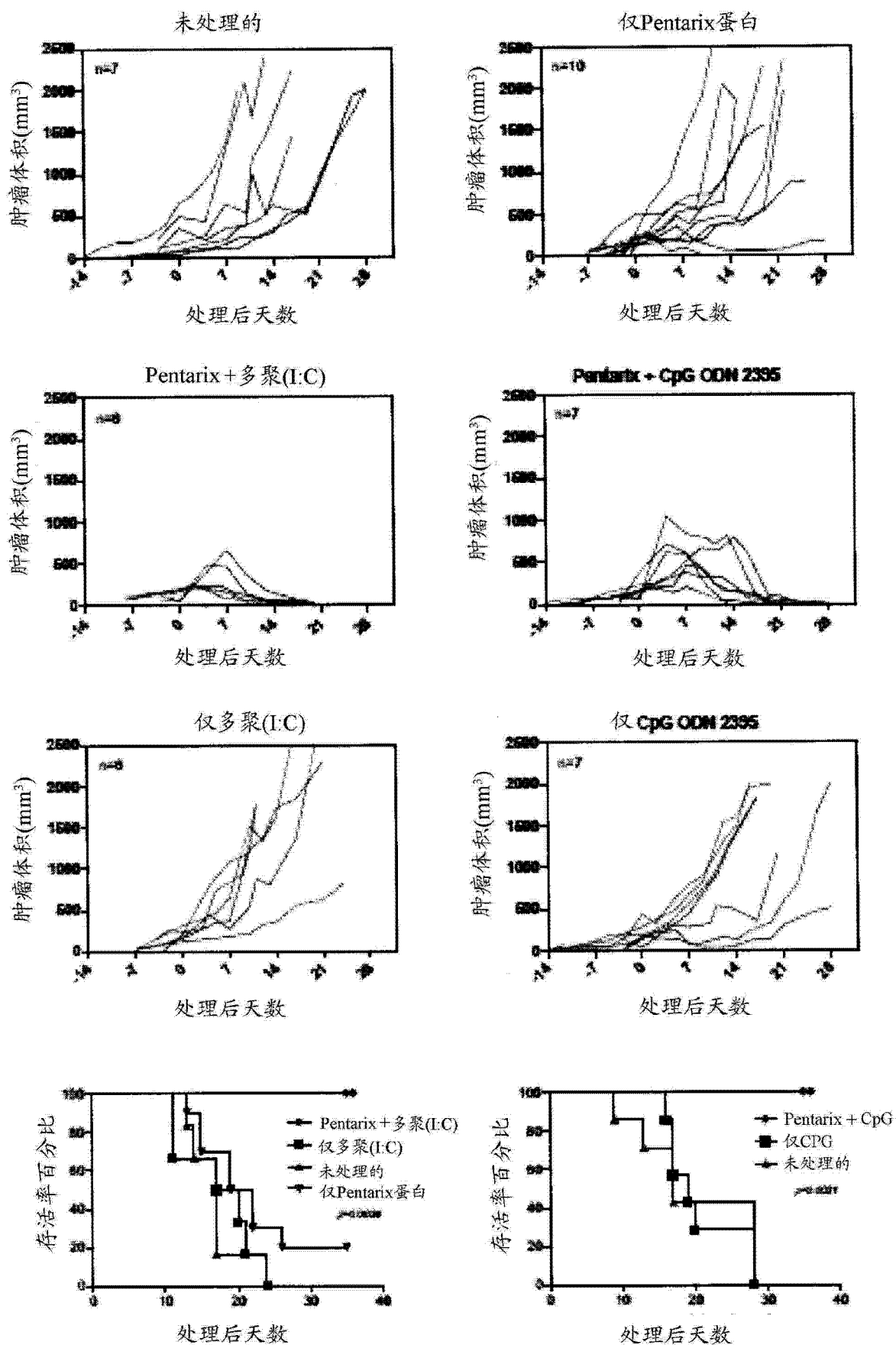


图 9B

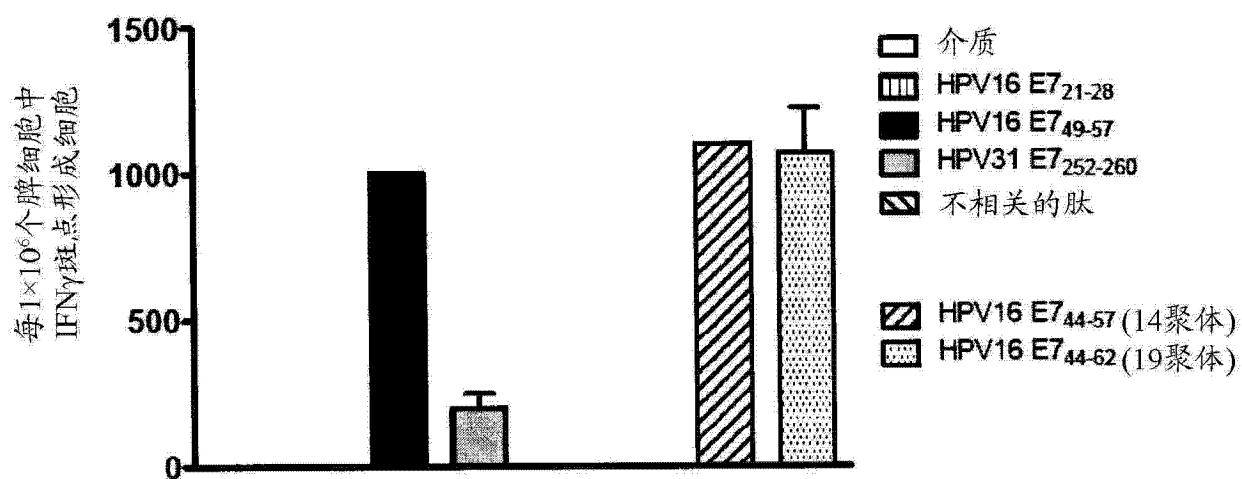


图 10A

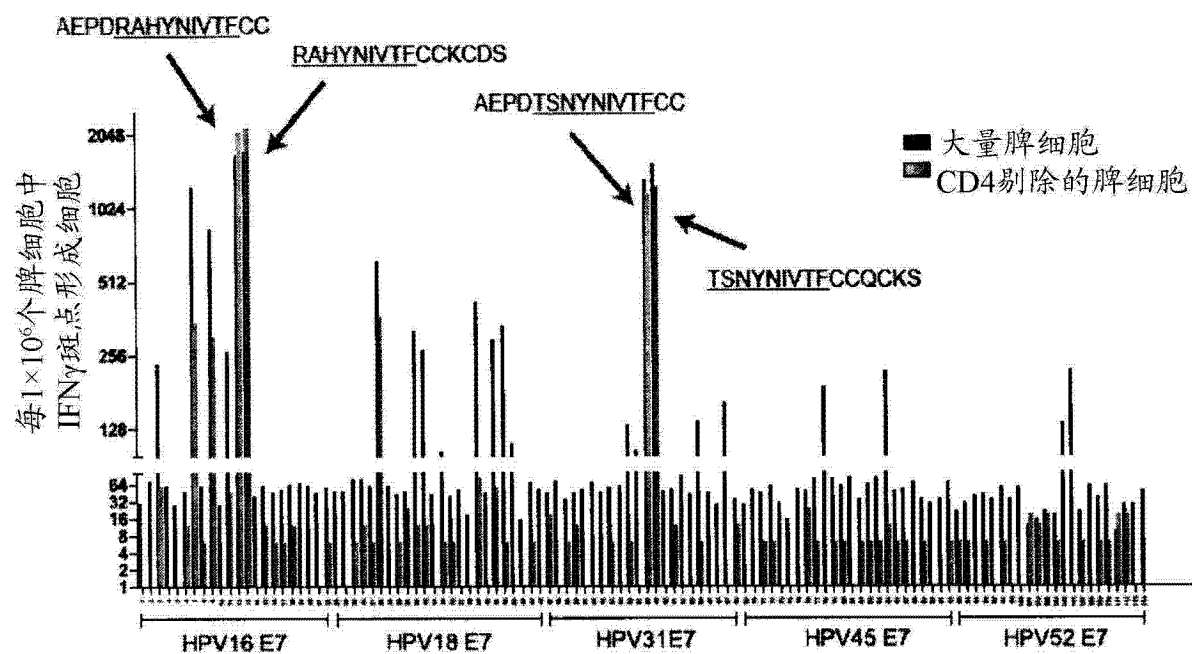


图 10B

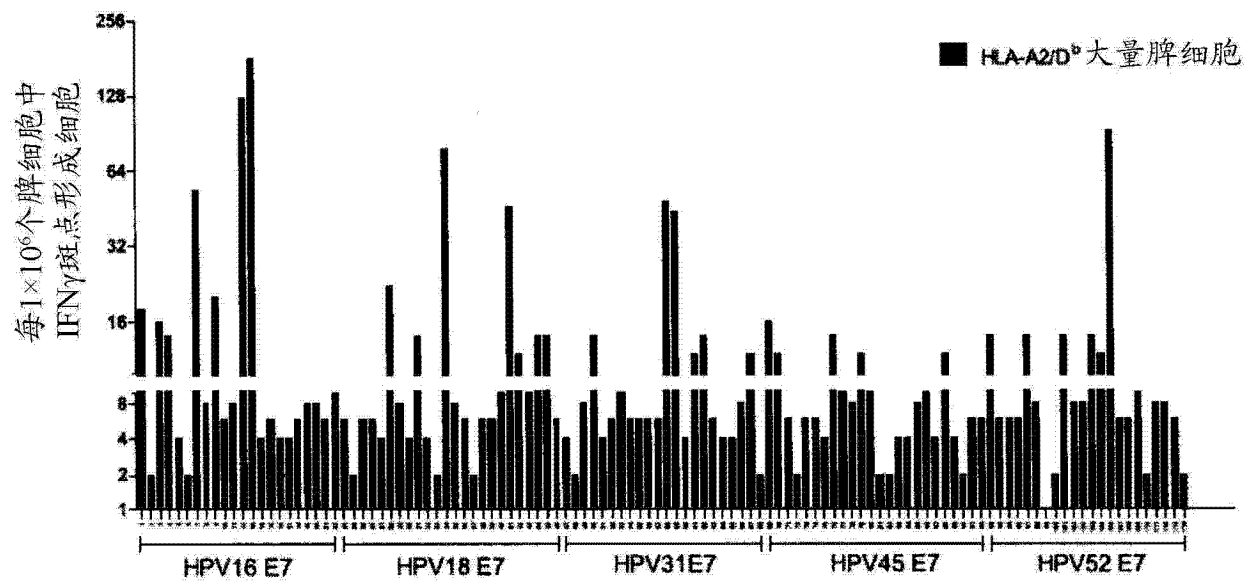


图 10C

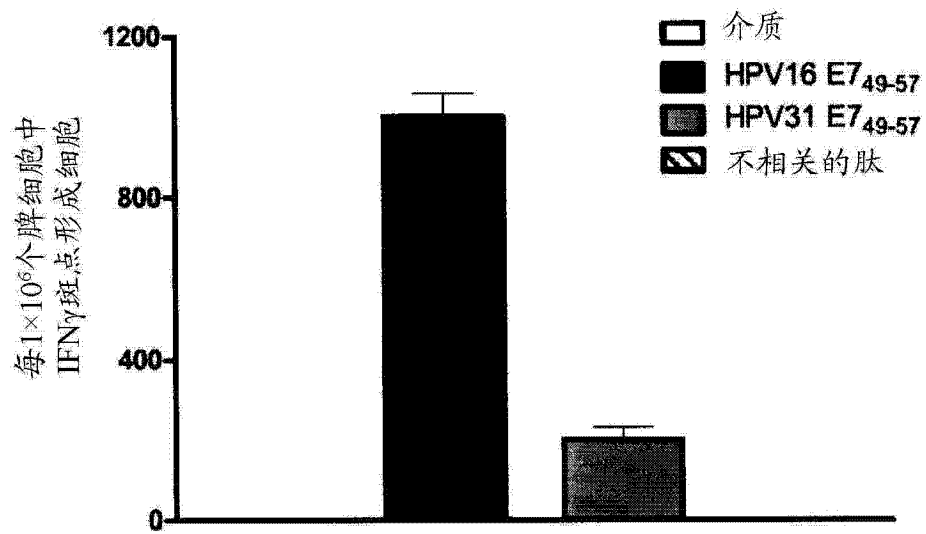


图 10D

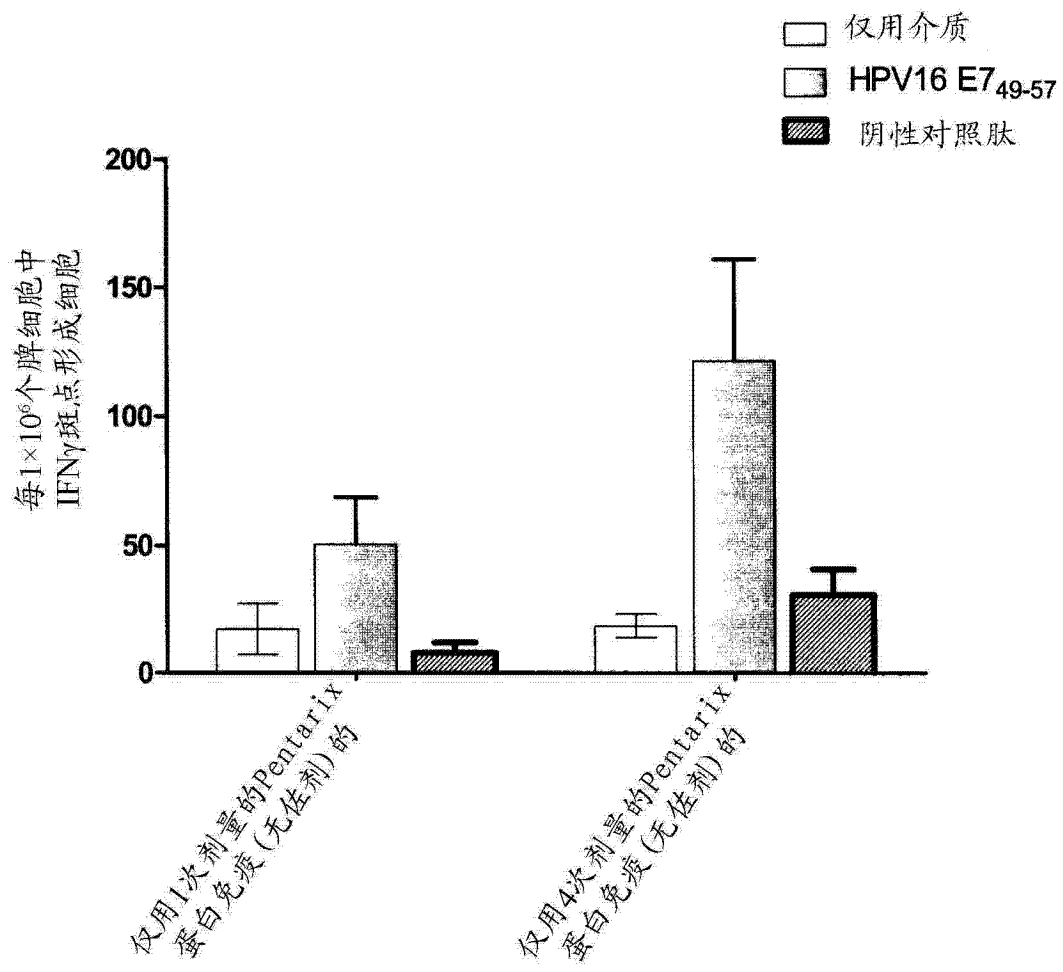


图 11

A. HPV16 E7**NP_041326**

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLRLCVQ
STHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 1)

NC_001526

1 atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgcaacc agagacaact
61 gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt
121 ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag
181 tgtgactcta cgcttcgggt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa
241 gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accataa (SEQ ID
NO: 18)

B. HPV18 E7**NP_040311**

MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEA
RIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQ (SEQ ID NO: 2)

NC_001357

1 atgcatggac ctaaggcaac attgcaagac attgtattgc atttagagcc ccaaaatgaa
61 attcoggttg accttctatg tcacgagcaa ttaagcgact cagaggaaga aaacgatgaa
121 atagatggag ttaatcatca acatttacca gcccgacgag ccgaaccaca acgtcacaca
181 atgtttgtgta tgtgttgtaa gtgtgaagcc agaattgagc tagtagtaga aagctcagca
241 gacgaccttc gagcattcca gcagctgttt ctgaacaccc tgtcctttgt gtgtccgtgg
301 tgtgcacccc agcagtaa (SEQ ID NO: 19)

图 12-1

C. HPV31 E7**AAA46951**

MRGETPTLQDYVLDLQPEATDLHCYEQLPDSSDEEDVIDSPAGQAEFDTSNYNIVTFCCQCKSTLRLCVQ
STQVDIRILQELLMGSFGIVCPNCSTRL (SEQ ID NO: 3)

PPH31A

1 atgcgtggag aaacacctac gttgcaagac tatgtgttag atttgcaacc tgaggcaact
61 gacctccact gttatgagca attaccogac agctcagatg aggaggatgt catagacagt
121 ccagctggac aagcagaacc ggacacatcc aattacaata tcgttacctt ttgttgtag
181 tgtaagtcta cacttcgttt gtgtgtacag agcacacaag tagatattcg catattgcaa
241 gagctggtta tgggctcatt tggaatcgtg tgccccaact gttctactag actgttaa (SEQ ID
NO: 20)

D. HPV45 E7**P21736**

MHGPRETLQEIIVLHLEPQNELDPVDLLCYEQLSESEEEENDEADGVSHAQLPARRAEPQRHKILCVCKCD
GRIELTVESSAEDLRTLQQLFLSTLSFVCPWCATNQ (SEQ ID NO: 4)

X74479

1 atgcatggac cccgggaaac actgcaagaa attgtattgc atttggaacc tcagaatgaa
61 ttagatectg ttgacctgtt gtgttacgag caattaagcg agtcagagga ggaaaacgat
121 gaagcagatg gagttagtea tgcacaacta ccagcccgac gagccgaacc acagcgteac
181 aaaattttgt gtgtatgttg taagtgtgac ggcagaattg agcttacagt agagagctcg
241 gcagaggacc ttagaacact acagcagctg tttttgagca ccttgctcctt tgtgtgtccg
301 tgggtgtgcaa ctaaccaata a (SEQ ID NO: 21)

图 12-2

E. HPV52 E7**P36831**

MRGDKATIKDYILDLQPETTDLHCYEQLGDSSDEEDTDGVDRPDGQAEQATSNNYYIVTYCHSCDSTLRLC
IHSTATDLRTLQQLLGLTLQVVCPGCARL (SEQ ID NO: 5)

X74481

1 atgcgtggag acaaagcaac tataaaagat tatatatattag atctgcaacc tgaacaact
61 gacctacact gctatgagca attaggtgac agctcagatg aggaggatac agatgggtgtg
121 gaccggccag atggacaagc agaacaagcc acaagcaatt actacattgt gacatattgt
181 cacagttgtg atagcacact acggctatgc attcatagca ctggcagcga ccttcgtact
241 ctacagcaaa tgctgttggg cacattacaa gttgtgtgcc ccggtgtgc acggctataa
(SEQ ID NO: 22)

F. HPV33 E7**AAA46959**

MRGHKPTLKEYVLDLYPEPTDLYCYEQLSDSSDEDEGLDRPDGQAQPATADYYIVTCCHTCNTTVRLCVN
STASDLRTIQQLLMGTVNIVCPTCAQQ (SEQ ID NO: 6)

PPH33CG

1 atgagaggac acaagccaac gttaaaggaa tatgttttag atttatatcc tgaaccaact
61 gacctatact gctatgagca attaagtgac agctcagatg aggatgaagg ctgggaccgg
121 ccagatggac aagcacaacc agccacagct gattactaca ttgtaacctg ttgtcacact
181 tgtaacacca cagtctgttt atgtgtcaac agtacagcaa gtgacctacg aaccatacag
241 caactactta tgggcacagt gaatattgtg tgccctacct gtgcacaaca ataa (SEQ ID NO:
23)

图 12-3

G. HPV35 E7**AAA46967**

MHGEITTLQDYVLDLPEATDLYCYEQLCDSSEEEEDTIDGPAGQAKPDTSNYNIVTSCCKCEATLRLCV
QSTHIDIRKLEDLLMGTFGIVCPGCSQRA (SEQ ID NO: 7)

PPH35CG

1 atgcatggag aaataactac attgcaagac tatgttttag atttgaacc cgaggcaact
61 gacctatact gttatgagca attgtgtgac agctcagagg aggaggaaga tactattgac
121 ggtccagctg gacaagcaaa accagacacc tccaattata atattgtaac gtccgtgtgt
181 aaatgtgagg cgacactacg totgtgtgta cagagcacac acattgacat acgtaaattg
241 gaagatttat taatgggcac atttgaata gtgtgccccg gctgttcaca gagagcataa (SEQ
ID NO: 24)

H. HPV39 E7**AAA47051**

MRGPKPTLQEIVLDELCPYNEIQPVOLVCHQLGESEDEIDEPDHAVNHQHQLLARRDEPQRHTIQCSCK
CNNTLQLVVEASRDTLRQLQLFMDSLGFVCPWCATANQ (SEQ ID NO: 8)

PPHT39

1 atgcgtggac caaagccac cttgcaggaa attgtattag atttatgtcc ttacaatgaa
61 atacagccgg ttgaccttgt atgtcagag caattaggag agtcagagga tgaaatagat
121 gaaccogacc atgcagttaa tcaccaacat caactactag ccagacggga tgaaccacag
181 cgtoacacaa tacagtgttc gtgttgtaag tgtaacaaca cactgcagct ggtagtagaa
241 gcctcacggg atactctgcg acaactacag cagctgttta tggactcact aggatttgtg
301 tgtccgtggt gtgcaactgc aaaccagtaa (SEQ ID NO: 25)

图 12-4

I. HPV51 E7**P26558**

MRGNVPQLKDVVLHLTPQTEIDLQCYEQFDSSEEEDEVNMRDQLPERRAGQATCYRIEAPCCRCSSVVQ
LAVESSGDTLRVVQQMLMGELSLVCPCCANN (SEQ ID NO: 9)

M62877 (部分)

a tgtaccacaa ttaaaagatg tagtattgca ttaaacacca cagactgaaa ttgacttgca
atgctacgag caatttgaca gctcagagga ggaggatgaa gtagataata tgcgtgacca
gctaccagaa agacgggctg gacaggctac gtgttacaga attgaagctc cgtgttgacg
gtgttcaagt gtagtacaac tggcagtggg aagcagtggg gacacccttc gcgttgtaca
gcagatgtta atggggcgaac taagcctggt ttgcccggtg tgtgcgaaca actagcaacg gc (SEQ
ID NO: 26)

J. HPV56 E7**P36833**

MHGKVP TLQDVVLELTPQTEIDLQCNELDSSSEDEDEVDHLQERPQQARQAKQHTCYLIHVPCCCECKF
VVQLDIQSTKEDLRVVQQLLMGALTVCPLCASSN (SEQ ID NO: 10)

X74483

1 atgcatggta aagtaccaac gctgcaagac gtgtatttag aactaacacc tcaaacagaa
61 attgacctac agtgcaatga gcaattggac agctcagagg atgaggatga ggatgaagta
121 gaccatttgc aggagcggcc acagcaagct agacaagcta aacaacatac gtgttacota
181 atacacgtac cttgttgtga gtgtaagttt gtgggtgcagt tggacattca gactacaaa
241 gaggacctgc gtgttgtaca acagctgctt atgggtgcgt taacagtaac gtgcccactc
301 tgcgcaccaa gtaactaa (SEQ ID NO: 27)

图 12-5

P26557

MRGNNPTLREYILDHLPEPTDLFCYEQLCDSSDEDEIGLDGPDGQAQPATANYIIVTCCYTCGTTVRLCI
NSTTTDVRTLQQLMGTCIVCPSCAQQ (SEQ ID NO: 11)

PPH58

1 atgagaggaa acaacccaac gctaagagaa tatatatttag atttaccatcc tgaaccaact
61 gacctattct gctatgagca attatgtgac agctcagacg aggatgaaat aggccttgac
121 gggccagatg gacaagcaca accggccaca gotaattact acattgtaac ttgttggttac
181 acttggtggca ccacggttcg tttgtgtatc aacagtacaa caaccgacgt acgaacccta
241 cagcagctgc ttatgggcac atgtaccatt gtgtgccta gctgtgcaca gcaataa (SEQ ID
NO: 28)

L. HPV59 E7**CAA54850**

MHGPKATLCDIVLDLEPQNYEEVDLVLCYEQLPDSSENEKDEPDGVNHPLLLARRAEPQRHNIVCVCKC
NNQLQLVVETSQDGLRALQQLFMDTLFVCPCLCAANQ (SEQ ID NO: 12)

X77858

1 atgcatggac caaaagcaac accttgtgac attgttttag atttggaacc acaaaattat
61 gaggaagttg accttgtgtg ctacgagcaa ttacctgact ccgactccga gaatgaaaaa
121 gatgaaccag atggagttaa tcacctttg ctactagcta gacgagctga accacagcgt
181 cacaacattg tgtgtgtgtg ttgtaagtgt aataatcaac ttcagctagt agtagaaacc
241 tcgcaagacg gattgcgagc cttacagcag ctgttttatgg acacaotatc ctttgtgtgt
301 cctttgtgtg cagcaaacca gtaa (SEQ ID NO: 29)

图 12-6

M. HPV68 E7**P54668**

MHGPKPTVQEIVLELCFYNEIQPVDLVCHEQLGDSDDDEIDEPDHAVNHHQHLLLRDEQQRHRIQCLCC
KCNKALQLVVEASRDNLRTLQQLFMDSLNFVCPWCATETQ (SEQ ID NO: 13)

X67160

1 atgcatggac caaagccac cgtgcaggaa atttgtttag agctatgtcc atacaatgaa
61 atacagccgg ttgaccttgt atgtcacgag caattaggag attcagacga tgaaatagat
121 gaaccgcacc atgcagttaa tcaccaccaa catctactac tagccagacg ggacgaacaa
181 cagcgtcaca gaattcagtg tctgtgttgt aagtgtatac aggcactgca actagtagta
241 gaagcgtcgc gggacaacct gggacacta caacagctgt ttatggactc actaaatttt
301 gtgtgtccgt ggtgtgcaac tgaaaccag taa (SEQ ID NO: 30)

N. HPV73 E7**CAA63883**

MHGKKTTLQDITLIDLKPTTEIDLTCTYESLDNSEDEDETDSHLDRQAERECYRIVTDCTKCQCTVCLAIES
NKADLRVIEELLMGTLGIVCPNCSRNL (SEQ ID NO: 14)

X94165

1 atgcatggaa aaaaaacaac cttgcaggac attacttttag acctgaaacc aacaaccgaa
61 attgacctta catgttaaga gtcattggac aactcagagg atgaggatga aacagacagc
121 catctagaca gacaagctga acgagagtgt tacagaatag ttactgactg cacgaagtgt
181 cagtgcacag tatgcottgc cattgaaagc aacaaagctg atttaagagt gatagaagag
241 ttgcttatgg gtacactagg tattgtgtgc cccaaactgt ccagaaacct ataa (SEQ ID NO:
31)

图 12-7

O. HPV82 E7**AAK28450**

MRGNVPQVKDIVLELTPQPEIDLQCYEQFDSSDEEDEVDNMRDQPARQAGQATCYRIKVQCCRCSSLLQL
AVESSGDNLRIFQQLMGDLSLVGPCCANN (SEQ ID NO: 15)

AF293961

1 atgcggtgga atgtaccaca agtaaaggac atagtgttgg agttaacacc acaacctgaa
61 attgacttgc aatgctacga gcaatttgac agctcagacg aggaggatga agtagataat
121 atgcggtgacc agccagccag acaagctgga caggctacgt gttacagaat taaagtgcag
181 tgttgccaggt gttcaagttt gctacagttg gcagtggaaa gcagtggaga caacottcgc
241 atatttcagc aactgttaat ggggtgacct agcctgggtg gcccggtgtg cgcgacaac
301 taa (SEQ ID NO: 32)

P.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNIV
TFCCCKDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLS
DSEEEDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQMR
GETPTLQDYVLDLQPEATDLHCYEQLPDSSDEEDVIDSPAGQAEPDTSNYNIVTFCCQCKSTLRLCVQSTQVDIR
ILQELLMGSGFIVCPNCSTRLMHGPRATLQEIVLHLEPQNELDPVDLLCYEQLSESEEEENDEADGVSHAQLPARR
AEPQRHKILCVCKCDGRIELTVESSADDLRTLQQLFLSTLSFVCPWCATNQMRGDKATIKDYILDLQPETTDLH
CYEQLGDSSDEEDTDGVDRPDGQAEQATSNNYIVTYCHSCDSTLRLCIHSTATDLRTLQQLLGTQVVCPCAR
LTT (SEQ ID NO: 16)

Q.

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVD
IRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEEDEIDGVNHQHLPAR
RAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQMRGETPTLQDYVLDLQPEATDL
HCYEQLPDSSDEEDVIDSPAGQAEPDTSNYNIVTFCCQCKSTLRLCVQSTQVDIRILQELLMGSGFIVCPNCSTR
LMHGPRATLQEIVLHLEPQNELDPVDLLCYEQLSESEEEENDEADGVSHAQLPARRAEPQRHKILCVCKCDGRIE
LTVESSADDLRTLQQLFLSTLSFVCPWCATNQMRGDKATIKDYILDLQPETTDLHCYEQLGDSSDEEDTDGVDRP
DGQAEQATSNNYIVTYCHSCDSTLRLCIHSTATDLRTLQQLLGTQVVCPCARLTT (SEQ ID NO: 17)

图 12-8

R.

ATGCATGGCGACACCCCGACGCTGCACGAATACATGCTGGATCTGCAACCGGAGACGACGGATCTGTATTGCTAT
GAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAAGAGGAAGATGAGATCGACGGTCCGGCGGGTCAGGCGGAGCCGGATCGTGCG
CACTACAATATCGTTACCTTTTGTGTAAATGCGATAGCACCTGCGTCTGTGTGTTTCAGAGCACGCACGTGGAT
ATTCGTACCTTGGAGGACCTGCTGATGGGTACCTGGGTATCGTTTGCCCGATTGTAGCCAGAAGCCGATGCAT
GGTCCGAAAGCGACGCTGCAGGATATCGTGCTGCACCTGGAACCGCAGAATGAGATCCCGGTGGATCTGCTGTGT
CATGAGCAGCTGAGCGACAGCGAAGAGGAAAACGATGAAATCGATGGTGTGAATCACCAGCATCTGCCGGCGCGC
CGCGCGGAACCGCAACGCCATACGATGCTGTGTATGTGCTGTAAATGTGAAGCGGTATCGAGCTGGTGGTTGAA
AGCAGCGCCGATGACCTGCGTGCGTTCCAGCAGCTGTTCCCTGAACACCCCTGAGCTTCGTGTGCCCGTGGTGTGCC
AGCCAACAGATGCGTGCGGAAACCCCGACCTGCAGGACTATGTGCTGGATCTGCAGCCGAGGCCACCGATCTG
CACTGTTACGAACAACCTGCCGACAGCAGCGATGAGGAAGACGTGATCGATAGCCCGCGGGCCAAGCCGAACCG
GACACCAGCAATTATAATATTGTGACCTTTTGTGTGCCAGTGCAAGAGCACCTGCGTCTGTGTGTTTCAGAGCACG
CAAGTTGACATTTCGTATCCTGCAGGAACCTGCTGATGGGTAGCTTCGGTATTGTGTGTCCGAATTGCAGCACCCGC
CTGATGCACGGTCCGCGTGCCACGCTGCAAGAGATCGTTCTGCATCTGGAACCGCAGAACGAACCTGGATCCGGTT
GATCTGTGTGTTATGAACAACCTGAGCGAGAGCGAAGAAGAGATGATGAGGCGGATGGCGTTAGCCACGCCCAA
CTGCCGCGCGCCGCGCGGAACCGCAGCGCCATAAAATCCTGTGCGTTTGTGTTGCAAGTGCGATGGCCGTATTGAA
CTGACCGTTGAAAGCAGCGCCGATGACCTGCTACGCTGCAGCAGCTGTTTCTGAGCACGCTGAGCTTCGTTTGT
CCGTGGTGTGCGACGAATCAGATGCGCGGCGACAAAGCCACGATTAAGGATTATATTCTGGATCTGCAGCCGGAA
ACGACCGACCTGCATTGTTACGAACAGCTGGGCGATAGCAGCGACGAAGAAGATACCGACGGCGTTGACCGCCCG
GACGGTCAAGCGGAACAAGCCACCAGCAACTATTATATCGTTACGTACTGCCATAGCTGTGATAGCACCTGCGC
CTGTGTATCCACAGCACGGCGACCGACCTGCGCACCTGCAGCAGATGCTGCTGGGCACCCCTGCAAGTTGTGTGC
CCGGGTTGCGCGCGTCTGACAACCTGA (SEQ ID NO : 33)

S.

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCATGGCGACACC
CCGACGCTGCACGAATACATGCTGGATCTGCAACCGGAGACGACGGATCTGTATTGCTATGAGCAGCTGAACGAC
CCGACGGAAGAGGATGAGATCGACGGTCCGGCGGGTCAGGCGGAGCCGGATCGTGCGCACTACAATATCGTT
ACCTTTTGTGTAAATGCGATAGCACCTGCGTCTGTGTGTTTCAGAGCACGCACGTGGATATTTCGTACCTTGGAG
GACCTGCTGATGGGTACCTTGGGTATCGTTTGCCCGATTGTGTAGCCAGAAGCCGATGCATGGTCCGAAAGCGACG
CTGCAGGATATCGTGCTGCACCTGGAACCGCAGAATGAGATCCCGGTGGATCTGCTGTGTCTGAGCAGCTGAGC
GACAGCGAAGAGGAAAACGATGAAATCGATGGTGTGAATCACCAGCATCTGCCGGCGCGCCGCGCGGAACCGCAA
CGCCATACGATGCTGTGTATGTGCTGTAAATGTGAAGCGCGTATCGAGCTGGTGGTTGAAAGCAGCGCCGATGAC
CTGCGTGCGTTCCAGCAGCTGTTCCCTGAACACCCCTGAGCTTCGTGTGCCCGTGGTGTGCCAGCCAACAGATGCGT
GGCGAAACCCCGACCTGCAGGACTATGTGCTGGATCTGCAGCCGGAGGCCACCGATCTGCACTGTTACGAACAA
CTGCCGGACAGCAGCGATGAGGAAGACGTGATCGATAGCCCGCGGGCCAAGCCGAACCGGACACCAGCAATTAT
AATATTGTGACCTTTTGTGTGCCAGTGCAAGAGCACCTGCGTCTGTGTGTTTCAGAGCACGCAAGTTGACATTTCGT
ATCCTGCAGGAACCTGCTGATGGGTAGCTTCGGTATTGTGTGTCCGAATTGCAGCACCCGCCCTGATGCACGGTCCG
CGTGCCACGCTGCAAGAGATCGTTCTGCATCTGGAACCGCAGAACGAACCTGGATCCGGTTGATCTGCTGTGTTAT
GAACAACCTGAGCGAGAGCGAAGAAGAGAATGATGAGGCGGATGGCGTTAGCCACGCCCAACTGCCGCGCGCCCG
GCGGAACCGCAGCGCCATAAAATCCTGTGCGTTTGTGTTGCAAGTGCGATGGCCGTATTGAACCTGACCGTTGAAAGC
AGCGCCGATGACCTGCGTACGCTGCAGCAGCTGTTTCTGAGCACGCTGAGCTTCGTTTGTCCGTGGTGTGCGACG
AATCAGATGCGCGGCGACAAAGCCACGATTAAGGATTATATTCTGGATCTGCAGCCGGAAACGACCGACCTGCAT
TGTTACGAACAGCTGGGCGATAGCAGCGACGAAGAAGATACCGACGGCGTTGACCGCCCGACGGTCAAGCGGAA
CAAGCCACCAGCAACTATTATATCGTTACGTACTGCCATAGCTGTGATAGCACCTGCGCCTGTGTATCCACAGC
ACGGCGACCGACCTGCGCACCTGCAGCAGATGCTGCTGGGCACCCCTGCAAGTTGTGTGCCCGGGTTGCGCGCGT
CTGACAACCTGA (SEQ ID NO : 34)

图 12-9