(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107252489 A
(43)申请公布日 2017.10.17

(21)申请号 201710263195.2

(22)申请日 2009.07.24

(30)优先权数据
61/168,914 2009.04.13 US

(62)分案原申请数据
200980159856.0 2009.07.24

(71)申请人 法国健康和医学研究院
地址 法国巴黎
申请人 奥拉生物科学公司

(72)发明人 皮埃尔·L·库尔萨热
安托万·A·图泽
马克西姆·J·J·弗勒里
尼古拉斯·孔伯拉
伊丽莎白·德洛斯皮诺斯

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 尹玉峰

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61K 47/42(2017.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/025(2006.01)

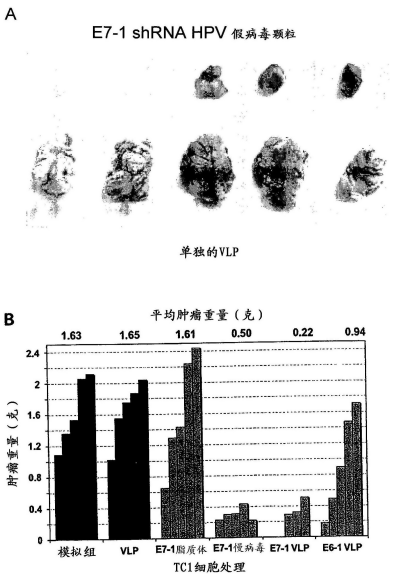
权利要求书1页 说明书50页
序列表19页 附图15页

(54)发明名称

HPV颗粒及其用途

(57)摘要

本发明涉及HPV颗粒及其用途。本发明涉及可在治疗上应用的修饰的HPV颗粒。修饰的HPV颗粒可用于递送包括siRNA分子在内的治疗剂。修饰的HPV颗粒可用于粘膜组织的疾病或病症的治疗,所述疾病或病症包括HPV(人乳头瘤病毒)感染和HPV相关肿瘤。



CN 107252489 A

1.一种递送一种或多种异源化合物至对象的方法,所述方法包括

给对象施用包含一种或多种异源化合物和经修饰人乳头瘤病毒(HPV)L1蛋白的纳米颗粒,所述HPV L1蛋白具有相对于野生型HPV16降低的免疫原性,其中所述经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列对应于包含氨基酸替换D273T、N285T和S288N的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

2.一种向对象施用一种或多种异源化合物的方法,所述方法包括:

在第一时间段中向对象施用包含一种或多种异源化合物的第一纳米颗粒,和

在第二时间段中向对象施用包含所述一种或多种异源化合物的第二纳米颗粒,其中所述第一和第二纳米颗粒具有不同的血清型,其中所述第一纳米颗粒和/或所述第二纳米颗粒包含经修饰人乳头瘤病毒(HPV)L1蛋白,所述HPV L1蛋白具有相对于野生型HPV16降低的免疫原性,其中所述经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列对应于包含氨基酸替换D273T、N285T和S288N的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

3.一种用于将一种或多种异源化合物递送给对象的组合物,所述组合物包含纳米颗粒,所述纳米颗粒包含一种或多种异源化合物和经修饰人乳头瘤病毒(HPV)L1蛋白,所述HPV L1蛋白具有相对于野生型HPV16降低的免疫原性,其中经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列对应于包含氨基酸替换D273T、N285T和S288N的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

4.权利要求3的组合物,其中所述经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列还包含氨基酸替换L260F、A264S、A266T和N270S。

5.权利要求1的方法,其中所述一种或多种异源化合物包含一种或多种治疗剂和/或诊断剂。

6.权利要求2的方法,其中所述化合物包含一种或多种治疗剂和/或诊断剂。

7.权利要求3的方法,其中所述一种或多种异源化合物包含一种或多种治疗剂和/或诊断剂。

8.权利要求1的方法,其中所述经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列还包含氨基酸替换L260F、A264S、A266T和N270S。

9.权利要求2的方法,其中所述经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列还包含氨基酸替换L260F、A264S、A266T和N270S。

10.权利要求1的方法,其中所述纳米颗粒是自组装纳米颗粒。

11.权利要求2的方法,其中所述第一和第二纳米颗粒是自组装纳米颗粒。

12.权利要求3的方法,其中所述纳米颗粒是自组装纳米颗粒。

13.一种递送一种或多种异源化合物至对象的方法,所述方法包括

给对象施用包含一种或多种异源化合物和经修饰人乳头瘤病毒(HPV)L1蛋白的纳米颗粒,所述HPV L1蛋白具有相对于野生型HPV16降低的免疫原性,其中所述经修饰HPV L1蛋白的氨基酸序列对应于包含FG环的SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述FG环具有由D273T、N285T和S288N组成的氨基酸替换。

HPV颗粒及其用途

[0001] 本申请是申请号为200980159856.0的中国专利申请的分案申请,原申请是2009年7月24日提交的PCT国际申请PCT/US2009/004299于2011年12月13日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2009年4月13日提交的美国临时专利申请USSN 61/168,914的优先权,其通过引用全文并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及人乳头瘤病毒样颗粒(virus like particle,VLP)及其作为治疗剂的用途。

背景技术

[0005] 在世界范围内,宫颈癌是女性主要癌症死亡原因之一,每年夺去超过233,000名女性的生命。20世纪以前,在女性中的发生率和死亡率上,宫颈癌都是最常见的恶性疾病。在发达国家中,宫颈癌发生率的降低是重大公共健康成就之一,主要归因于实施基于人群的筛查(population-based screening)以及侵入前疾病(pre-invasive disease)的检测和治疗计划。然而,虽然在发达国家中宫颈癌的发生率已降低,但在世界范围内该疾病仍然是女性中第二常见的癌。

[0006] 巴氏(Papanicolaou,Pap)涂片可检测宫颈中的宫颈癌或癌前病变(pre-cancerous change),其中很多与HPV相关。在实施广泛筛查措施的发达国家中,这些Pap涂片极大地降低了宫颈癌的发生率和死亡率。在筛查措施仍然十分有限的发展中国家中,宫颈癌是女性中最常报道的癌,并且其发生率持续升高。

[0007] 宫颈上皮内异常(cervical intraepithelial abnormalities)的所有现有治疗(包括冷冻疗法(cryotherapy)、激光消融(laser ablation)、子宫颈锥切除(excisional conization)和环形电切术(loop electrosurgical excision procedure,LEEP))都是侵入性的手术过程,常导致明显的副反应,包括分泌物过多、感染、出血、痉挛、子宫颈机能不全(cervical incompetence),可导致流产、宫颈完整性丧失和无法怀孕。此外,这些过程必须在门诊场所中进行,这增加了治疗的成本。

[0008] 子宫颈上皮内瘤形成(CIN,cervical intraepithelial neoplasia)是指宫颈癌的侵入前病理中间阶段。在子宫颈的细胞涂片或组织活检中观察到的异常表现代表了子宫颈内皮细胞分化程度的改变。这种细胞发育异常分为三个不同严重程度的组:CIN I是指局限于内皮的基部1/3的轻微发育异常;CIN II是指局限于内皮的基部2/3的病变;CIN III是指涵盖大于内皮厚度2/3的细胞发育异常。

[0009] 在美国,每年约350万女性会有异常的Pap涂片试验。这些女性中约120万患有鳞状上皮内病变(squamous intraepithelial lesion,SIL),其中的200,000至300,000人属于晚期。在拉丁美洲,严重CIN的发生率超过美国发生率的3倍。表1提供了世界范围内HPV感染

和CIN流行程度的总结。

[0010] 表1:世界范围内HPV和CIN的发病率

[0011]

	高风险HPV的发生率	CIN2/3的发生率
美国	1,750,000	250,000
欧洲	1,839,200	275,880
拉丁美洲	5,884,110	882,616
日本	1,173,480	176,022

[0012] HPV感染在性活跃的个体中流行。具有多个性伴侣的女性获得HPV的机会并因而获得HPV相关子宫颈感染的机会更高。高风险HPV类型的感染增加了女性罹患宫颈癌的可能性。在HPV感染的女性中筛查和随后治疗癌前宫颈病症对宫颈癌的预防高度有效。然而,当前的治疗常需手术介入并且需要替代性的治疗选择。

发明内容

[0013] 本发明的一些方面涉及基于HPV的颗粒及其用于治疗疾病和/或递送治疗剂的用途。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法可用于治疗粘膜疾病(例如,粘膜组织(例如粘膜内皮细胞)的疾病和/或感染)。

[0014] 在一些实施方案中,本发明的一些方面涉及经修饰的基于HPV的颗粒,所述颗粒能将治疗剂递送到粘膜组织(例如,表面施用)。在一些实施方案中,所述治疗剂可为抗病毒剂。所述抗病毒剂可用于治疗病毒感染,例如,人乳头瘤病毒、疱疹病毒或靶向粘膜组织的其他病毒。在一些实施方案中,所述治疗剂可为抗癌剂。所述抗癌剂可用于治疗例如宫颈癌或任何其他粘膜组织的癌症。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染的方法和用于治疗对象中的HPV相关疾病(包括但不限于宫颈癌)的方法。然而,应当理解,本发明的经修饰病毒颗粒可用于递送其他类型的治疗剂和/或医疗剂(例如,成像剂或造影剂)。

[0015] 在一些实施方案中,本发明的颗粒可局部递送(例如,以乳膏、泡沫、喷雾剂、气雾剂或其他适于表面递送(topical delivery)的形式)至任何粘膜组织(例如,子宫颈、鼻、口腔或其他粘膜组织)。然而,本发明的一些方面不限于表面递送,经修饰颗粒可皮下、静脉内、胃肠外和/或通过任何其他适合的递送途径递送。

[0016] 本文中提供的方法包括将通过基于病毒样颗粒(VLP)递送系统递送的一种或多种治疗剂施用于对象。在某些实施方案中,所述基于VLP的递送系统包含人乳头瘤病毒样纳米颗粒。在一些实施方案中,HPV纳米颗粒包含病毒L1蛋白。在一些实施方案中,HPV纳米颗粒包含病毒L1蛋白和病毒L2蛋白。在一些实施方案中,所述L1和/或L2蛋白可为野生型病毒蛋白。在一些实施方案中,L1和/或L2蛋白可通过突变和/或插入/缺失而改变。在某些实施方案中,包含L1和/或L2的HPV纳米颗粒的暴露于表面的环中的氨基酸发生突变、缺失和/或插入。在某些实施方案中,暴露于表面的环中的氨基酸的突变、缺失和/或插入导致HPV纳米颗粒的免疫原性的改变。在某些实施方案中,免疫原性可以这样的方式改变,使得某些血清型

的HPV纳米颗粒不再被对抗这种血清型的抗体所识别。在这些实施方案中，所述改变的HPV纳米颗粒在具有所述血清型特异性抗体的宿主中是免疫沉默的。

[0017] 因此，在一些实施方案中，可将本发明的基于HPV的颗粒进行修饰以使其具有降低或改变的免疫原性。可选择这样的颗粒递送给具有中和性抗HPV应答的患者。在一些实施方案中，出于治疗目的将一系列具有不同血清型的基于HPV的颗粒施用给对象，以降低中和性免疫应答对任一种所述血清型的作用。例如，可将第一血清型用于第一对象施用组(例如1、2、3、4、5、5-10或更多)。随后，可将第二血清型用于第二施用组(例如1、2、3、4、5、5-10或更多)以降低对象针对所述第一血清型产生的中和免疫应答的影响。应当理解的是，其他施用组可涉及第三、第四、第五等血清型。不同的血清型可为天然血清型、嵌合血清型、其他突变血清型，或其任何组合。应当理解的是，可将该系列或顺序施用用于特定化合物(例如每一种不同血清型中的同一个)或一系列不同的化合物在数月和/或数年时间段内的长期施用(例如，治疗)。

[0018] 在一些实施方案中，可以如下的方式向病毒衣壳蛋白L1和/或L2中引入氨基酸的突变、缺失和/或插入，使得所得的HPV纳米颗粒不失去向所述靶细胞递送治疗剂的能力。在一些实施方案中，所述HPV纳米颗粒未失去将核酸(例如，siRNA或shRNA)转移进靶细胞的能力。

[0019] 在一些实施方案中，可改变免疫原性以使某些血清型的HPV纳米颗粒诱导产生交叉特异性中和性抗体的免疫应答。在这些实施方案中，这样改变所述HPV纳米颗粒，以使得其在其表面上表现出多个血清特异性表位(例如，通过在表面暴露环中插入表位)或使得其表现出血清型之间更保守的表位(例如，通过在表面暴露环中插入L2蛋白的部分，或者通过将保守的表位与HPV纳米颗粒的表面相连)。在一些实施方案中，在HPV感染的个体中诱导交叉特异性中和性抗体的产生，其中所述HPV感染的个体已进行过治疗以消除或减少HPV感染细胞的数目。在一些实施方案中，所述HPV感染的个体已进行过治疗以消除或减少HPV相关肿瘤的大小。在这些实施方案中，可诱导交叉特异性中和性抗体的产生以产生足以对治疗后剩余的HPV感染细胞进行免疫监视的免疫应答。在一些实施方案中，所产生的免疫监视足以阻止新的HPV感染或HPV感染的细胞的复育(repopulation)，或HPV感染的肿瘤的复发。在一些实施方案中，交叉特异性中和性抗体可有效对抗一种或多种HPV血清型。

[0020] 在一些实施方案中，由基于VLP的递送系统递送的治疗剂为核酸。核酸治疗剂可以是例如siRNA或shRNA分子或编码它们的质粒。其他的治疗剂可以是例如小分子，如具有抗病毒或抗癌活性的小分子。

[0021] 在某些实施方案中，通过基于VLP的递送系统给具有HPV感染或HPV相关癌症(例如宫颈癌)或病变的对象施用一种或多种治疗剂，导致杀死和/或清除HPV感染细胞。HPV感染的转化细胞被认为是引起HPV相关癌症或病变的原因。在一些实施方案中，杀死和/或清除HPV感染的细胞导致HPV相关癌症的部分或完全缓解。

[0022] 在一些实施方案中，本文中描述的所述治疗方法可在用包含治疗剂的HPV纳米颗粒治疗之前、同时或之后，与其他治疗剂(例如，抗癌剂和/或抗病毒剂)和/或免疫调节剂和/或放射治疗或免疫治疗联合施用。在一些实施方案中，所述抗癌剂和/或抗病毒剂可通过HPV纳米颗粒递送。在一些实施方案中，所述HPV纳米颗粒和所述抗癌剂和/或抗病毒剂可一起施用或者可分别施用，例如，在不同时间或不同施用部位或者通过不同施用途径施用。

[0023] 在一些实施方案中，根据本文中描述的方法治疗的对象中大多数或全部HPV感染细胞被杀死或清除，并且在HPV感染的对象中不再检出HPV。在另一些实施方案中，对象中一些HPV感染的细胞被杀死或清除，并且在HPV感染的对象中仍可检出HPV。在一些实施方案中，具有HPV相关病变或癌症的对象可发生癌症或病变的部分或完全消退。在一些实施方案中，对象未发生病变或癌症或病毒感染的复发。在另一些实施方案中，对象经历病变或癌症或病毒感染的复发。在一些实施方案中，在用包含治疗剂的HPV纳米颗粒治疗期间和/或之后，将本文所述的治疗方法与抗病毒治疗进一步联合。可给予抗病毒治疗以防止例如HPV复制、病毒扩散和/或具有在首次治疗后存活的或已作为新感染进入对象身体的HPV之细胞的复育。

[0024] 在另一些实施方案中，在初次治疗方案结束时，施用改变的HPV颗粒。所述HPV纳米颗粒进行如下改变，使得其在其表面上表现出多个血清特异性表位，或其表现出血清型间更保守的表位。在一些实施方案中，施用这种改变的HPV纳米颗粒可诱导针对所施用表位的局部免疫应答，例如，诱导交叉特异性中和性抗体的增加，所述抗体足以使免疫监视能够检测并杀死新近被HPV感染的细胞。在一些实施方案中，阻止新病毒感染和/或扩散和复育足以抑制HPV相关癌症或病变的复发。

[0025] 在某些实施方案中，本文中描述的方法包括通过不同途径施用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒。在一些实施方案中，通过表面施用来施用HPV纳米颗粒。在一些实施方案中，靶向粘膜进行表面施用。例如，包含一种或多种治疗剂的所述HPV纳米颗粒可表面施用至内皮(例如子宫颈内皮)或其附近，或者局部施用至病变(例如子宫颈或肛门内皮癌)或其附近。

[0026] 在某些实施方案中，提供包含改变的病毒衣壳的HPV纳米颗粒，其中如本文描述的那样，通过野生型氨基酸的突变、额外氨基酸的插入和/或野生型氨基酸的去除来改变所述病毒衣壳蛋白。在某些实施方案中，所述改变的HPV纳米颗粒在对象中或多或少是免疫原性的，或者具有改变的免疫原性。在一些实施方案中，所述改变的HPV纳米颗粒保持将治疗剂递送或转移至靶细胞的能力。

[0027] 因此，本发明的一些方面涉及用于向对象递送一种或多种化合物的方法和组合物。在一些实施方案中，使用修饰的人乳头瘤病毒(HPV)样颗粒，其中所述颗粒包含一种或多种包装在HPV样颗粒中的异源化合物，所述颗粒包含免疫原性改变的表面蛋白。所述异源化合物为非HPV分子(例如，不是HPV基因组、不是HPV核酸和/或不是其他HPV分子的化合物)。这样的化合物可以是治疗剂或其他医药化合物。在一些实施方案中，所述治疗剂可以是下述中的一种或多种：治疗剂或医药剂、核酸或小分子，或者成像剂或造影剂。在一些实施方案中，所述治疗剂为siRNA、shRNA、反义核酸，或者编码siRNA、shRNA或反义核酸的核酸。在一些实施方案中，所述siRNA、shRNA或反义核酸靶向HPV-E6和/或HPV-E7。在一些实施方案中，所述小分子是抗病毒剂。在一些实施方案中，所述小分子是抗癌剂(例如吉西他滨)。

[0028] 应当理解，本发明的方法和组合物可以与一种或多种其他药剂(例如，抗病毒剂、抗癌剂(例如吉西他滨)，或其任何组合)一起提供。

[0029] 在本发明的方法和组合物的一些实施方案中，所述HPV样颗粒包含L1蛋白，或者包含L1蛋白与L2蛋白。在本发明的方法和组合物的一些实施方案中，所述表面蛋白是具有修

饰的FG环序列的修饰的L1蛋白。在一些实施方案中，所述L1蛋白具有HPV16、HPV31、HPV33、HPV34、HPV35、HPV52、HPV58、HPV73或HPV91血清型的序列，并且其中所述L1蛋白的所述FG环具有一个或多个氨基酸改变，所述改变使人对象中所述蛋白的免疫原性发生改变。在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸改变发生在SEQ ID NO:11的X_1-X_{17}的一个或多个位点上。在一些实施方案中，在位置X_{16}上的氨基酸没有改变。在一些实施方案中，SEQ ID NO:11的X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的一个或多个位置被修饰。在一些实施方案中，SEQ ID NO:11的X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的2-3个位置被修饰。在一些实施方案中，SEQ ID NO:11的X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的4-7个位置被修饰。在一些实施方案中，SEQ ID NO:11的X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的3个位置被修饰。在一些实施方案中，SEQ ID NO:11的X_6、X_{11}和X_{14}位置被修饰。在一些实施方案中，SEQ ID NO:11的X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}的所有位置均被修饰。在一些实施方案中，所述L1蛋白具有HPV16血清型的序列，其SEQ ID NO:11的X_6、X_{11}和X_{14}位置分别改变为T、T和N，SEQ ID NO:11的其余位置具有HPV16血清型的特征性氨基酸。在一些实施方案中，所述L1蛋白具有HPV16血清型的序列，其在位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}分别改变为F、S、T、S、T、T和N，并且SEQ ID NO:11的其余位置具有HPV16血清型的特征性氨基酸。

[0030] 应当理解，在一些实施方案中，向不具有针对表面蛋白血清型的中和免疫应答的对象施用HPV样颗粒，例如，当所述对象未针对所述表面蛋白的血清型进行过免疫时，或当所述对象未感染过与所述HPV样颗粒中表面蛋白血清型具有相同血清型的HPV时。在一些实施方案中，在选择供施用的HPV样颗粒之前，对所述对象的免疫应答进行评价。

[0031] 在一些实施方案中，将HPV样颗粒施用于粘膜组织。所述粘膜组织可在本文中描述的任何位置(例如，子宫颈、泌尿生殖道、口腔等)。此外，在一些实施方案中，将HPV样颗粒施用于表皮位置(例如，以治疗表皮癌或皮肤癌或感染)。

[0032] 应当理解，本发明的组合物可局部和/或通过任何其他合适的途径施用(例如，通过注射剂、气雾剂、喷雾剂或其他施用形式施用)。

[0033] 可将本发明组合物施用于被病毒、细菌和/或其他微生物或寄生虫感染的组织。在一些实施方案中，感染部位可被几种不同的有机体(例如，多种病毒和/或其他微生物，例如HPV和疱疹病毒(如HSV))所感染。因此，本发明的组合物可包含广泛靶向几种不同有机体的化合物，或包含各自靶向不同有机体的几种不同化合物，或者其组合。在一些实施方案中，同样的HPV样颗粒可包含不同的治疗化合物。在一些实施方案中，组合物或治疗方案可包含两种或多种不同的HPV样颗粒，其各自含有靶向特定感染的化合物。

[0034] 可将本发明的组合物施用给对象以治疗癌症(例如，在施用部位处或其附近)。在一些实施方案中，所述癌症可以与感染(例如，HPV或HSV感染)相关。在一些实施方案中，所述癌症可以与感染不相关。因此，本发明的一些方面可用于治疗皮肤癌(例如，非黑色素瘤皮肤癌)。

[0035] 在一些实施方案中，可将本发明组合物施用给具有免疫系统缺陷的对象，以治疗与免疫系统缺陷相关的病症(例如，感染、癌症或其他病症)。所述免疫系统缺陷可由感染(例如，HIV感染、AIDS)或其他病症(例如癌症)所引起。

[0036] 在一些实施方案中，本发明的HPV样颗粒可与促进非特异性免疫应答(例如，在施用部位或其附近)的组合物一起施用。所述非特异性免疫应答可有助于治疗感染和/或癌症或其他病症。在一些实施方案中，应答于施用具有不同血清型的多种HPV样颗粒的提高的免

疫应答可能是有益的。因此，本发明的一些组合物包含几种不同的血清型。

[0037] 在一些实施方案中，可通过在第一段时间给对象施用包含化合物的第一HPV样颗粒，并在第二段时间给所述对象施用包含所述化合物的第二HPV样颗粒，以实现组合物的长期施用，其中所述第一和第二HPV样颗粒具有不同的血清型。可使用其他血清型进行进一步施用。在一些实施方案中，所述第一和第二HPV样颗粒的血清型独立地为天然或改变的血清型。在一些实施方案中，所述第一和/第二HPV样颗粒的血清型是嵌合血清型。

[0038] 在一些实施方案中，本发明的组合物或方法可包括使用HPV样颗粒，所述颗粒通过包含融合在L1环中的L2序列而具有嵌合血清型。在一些实施方案中，所述L2序列连接在L1颗粒的表面上。在一些实施方案中，所述L2序列由HPV31 L2蛋白的13至88位残基构成。

[0039] 在以下非限定性的实施例和描述中，更详细地描述了本发明的这些和其他方面。

附图说明

[0040] 图1显示了HPV-16的E6和E7基因的siRNA的位置。

[0041] 图2显示的条形图表明$ZnCl_2$在生产编码萤光素酶的假病毒颗粒中的作用。在以未使用$ZnCl_2$的重新组装的假病毒颗粒转染的293FT细胞中评价了萤光素酶基因的表达，并且在存在$ZnCl_2$时产生的假病毒颗粒转染的293FT、TC1、C33和CaSki细胞中评价了萤光素酶基因的表达。

[0042] 图3显示了A)从以LacZ、E6-1、E6-2、E7-1和E7-2的shRNA转染的CaSki细胞中提取的逆转录mRNA。用E6和E7基因特异性引物和作为对照的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物PCR扩增了cDNA。B)以LacZ、E6-2、E6-1、E7-2和E7-1的shRNA转染的CaSki细胞(模拟组)的细胞提取物的western印迹的照片。使用p53和β-肌动蛋白抗体分析了提取物。

[0043] 图4显示的条形图表明了E6和E7的shRNA对C33(灰色柱)、CaSki(黑色柱)和TC1(白色柱)细胞生长的作用。细胞(C)是以LacZ、E6-1、E6-2、E7-1和E7-2的shRNA转染的。

[0044] 图5显示的照片表明C57BL6小鼠中TC1肿瘤生长的抑制。将TC1细胞体外转染。A)注射以单独的VLP(底部)和E7-1假病毒颗粒(顶部)处理的TC1细胞之后获得的肿瘤的比较。B)用shRNA假病毒颗粒和shRNA慢病毒(lentivirus)进行不同处理后肿瘤重量比较的定量柱形图。

[0045] 图6显示的图表明肿瘤内注射对照shRNA和E7-1shRNA假病毒颗粒(pseudovirion，Pv)后C57BL6小鼠中TC1肿瘤生长的抑制。A)第一次注射对照shRNA或E7-1shRNA假病毒颗粒之后肿瘤大小的(平均直径)的演变。B)以对照shRNA和E7-1shRNA假病毒颗粒处理的小鼠中3周时的肿瘤重量。

[0046] 图7(a)显示代表性的表面等离子体共振数据的图。(b)显示通过SPR进行的由15种构象表位识别的HPV31 MAb间相互作用研究中构建的表位图(epitope map)。中和内化抗体以黑色显示，中和细胞连接的以下划线显示。H31.D24抗体是非中和的(以方框显示)。(c)以下划线表示抑制VLP与肝素结合的AQ5抗体。

[0047] 图8显示HPV31 L1蛋白的表位，所述表位通过使用细菌呈示法被非中和性MAb(H31.D24)和四种中和性MAb(H31.B1、H31.F7、H31.F16和H31.H12)所识别。

[0048] 图9描述附着前和附着后的假病毒颗粒的MAb中和。(a)通过HPV31MAb抑制HPV31假病毒进入。以HPV31 MAb预先孵育HPV31假病毒颗粒，并随后加入细胞。(b)用HPV31 MAb抑制

HPV31假病毒颗粒的内化。预先附着HPV31假病毒颗粒至细胞，并随后添加HPV31 MAb。在图的右侧对使用细菌呈示方法研究的五种MAb进行分组。灰色柱，中和性类型特异性MAb；黑色柱，交叉中和的F7 MAb。

[0049] 图10描述VLP结合至HS和ECM：HPV31 MAb和L1C-末端缺失的作用。(a)用MAb预孵育VLP之后，肝素结合的抑制。(b)用MAb预孵育VLP之后，ECM结合的抑制。在图的右侧对使用细菌呈示法研究的五个MAb进行分组。灰色柱：中和性类型特异性MAb；黑色柱：F7交叉中和MAb；空心柱：D24非中和MAb。数值为抑制百分比和SD。大于50％的抑制被认为是阳性的。

[0050] 图11描述了具有或不具有C-末端缺失(D9和D31)的类型16和类型31的天然VLP(黑色柱)和变性的VLP(灰色柱)的肝素结合。

[0051] 图12描述了HPV31的FG环上被五种单克隆抗体识别的表位的位置。HPV31 L1蛋白的FG环上被四种MAb所识别的表位的位置。

[0052] 图13分别描述了HPV16和HPV31的FG环的序列比对，和插入HPV16FG环野生型序列中以产生嵌合体的突变(X和Y)。

[0053] 图14描述的图表显示提取自转染了wt HPV16和嵌合体HPV X和HPV Y的COS-7细胞的萤光素酶活性(计数/分钟，CPM，count per minute)。

[0054] 图15描述的表格显示以ELISA检测测量的来自免疫接种了HPV16、HPV31、HPV X或HPV Y的小鼠的HPV16、HPV31、HPV X和HPV Y特异性抗体的效价(几何平均效价)(geometric mean titer，GMT))。

[0055] 图16描述嵌合的VLP L1STII(A)和31L1-16L2(13-88)(B)的电镜照片(标尺条(bar)＝200nm)。

[0056] 图17描述的条形图显示通过ELISA对嵌合的HPV16 L1-STII、HPV16 L1STII L2 SA和HPV31 L1-16 L213-88 VLP颗粒的抗原性的分析。使用CamVir-1 Mab将结果针对L1反应性进行调节。结果表示为相对反应性，即用目的抗原获得的OD与用参比抗原(*)获得的OD之间的比值。使用针对构象(C)表位和StrepTagII或L2暴露的单克隆抗体在天然条件下分析颗粒。用H16.V5(C)、针对StrepTagII序列的单克隆抗体和多克隆的HPV 16 L2抗血清分析HPV16 L1 STII和HPV16 L1STII L2SA。使用HPV16 L1 VLP和L1L2 31 VLP为对照。使用H31.F16(C)和多克隆的HPV16 L2抗血清分析HPV31 L1-16 L213-88VLP。结果为两个重复的平均值。

[0057] 图18描述了L2蛋白表达的Western印迹分析图。1)纯化的L2SA融合蛋白，2)与L1STII VLP相互作用后和3)与L1 VLP相互作用后；在用4)编码GFP的HPV58假病毒和5)用编码L2的HPV58假病毒转导转导的Cos-7细胞中。

[0058] 图19描述的图表显示HPV31、HPV58和HPV18中和性抗体的检测。单个小鼠的中和效价为提供超过50％萤光素酶表达抑制的最后的倒数稀释度。以标尺条(bar)表示几何平均效价。

具体实施方式

[0059] 本发明的一些方面涉及基于HPV颗粒的方法和组合物及其用于医疗和/或治疗应用的用途。在一些实施方案中，使用基于HPV的颗粒递送一种或多种药剂(例如，治疗剂、成像剂和/或其他医疗剂)至靶细胞或组织(例如，粘膜组织，例如粘膜组织表面)。

[0060] 在一些实施方案中，本发明的一些方面涉及含有一个或多个天然HPV表面蛋白(例如，L1和/或L2蛋白)的HPV颗粒，并且其载有一种或多种医疗和/或治疗剂，或其二种或更多中的组合。在一些实施方案中，本发明的一些方面涉及含有一种或多种变体表面蛋白(例如，变体L1和/或L2蛋白)的以修饰HPV为基础的颗粒，其在对象中具有降低的或改变的免疫原性。所述修饰可为氨基酸序列的改变，以减少或避免被宿主的免疫系统所中和。在一些实施方案中，基于修饰的HPV的颗粒是含有重组HPV蛋白(例如，重组L1和/或L2蛋白)的颗粒，包括改变该蛋白在对象中(例如，在人类对象中)的免疫原性的一个或多个氨基酸改变。在一些实施方案中，基于修饰的HPV的颗粒具有改变的免疫原性，但保留了包装并递送分子至宿主的能力。因此，本发明的修饰的HPV颗粒可载有一种或多种药剂(例如，代替HPV核酸)。可递送这种颗粒至对象，而不诱导可被天然HPV颗粒所诱导的免疫应答。

[0061] 本发明的一些实施方案可用于递送一种或多种治疗剂至患病组织(例如，患病的粘膜组织)。在一些实施方案中，患病的组织(例如，粘膜组织、上皮组织或上皮内组织)可为感染的组织(例如，感染了病毒，例如HPV或HSV)。在一些实施方案中，所述粘膜组织是宫颈组织并且所述疾病是发育异常或癌(例如，子宫颈发育异常(cervical dysplasia)，宫颈癌，例如与持续HPV感染相关的)。然而，在一些实施方案中，基于HPV的颗粒可被用于递送组合物至其他组织(例如，表皮)。在一些实施方案中，基于HPV的颗粒可被用于治疗HPV。然而，在一些实施方案中，基于HPV的颗粒可被用于递送治疗剂以治疗其他疾病或状况。

[0062] 本发明的一些实施方案被用于递送一种或多种成像剂或造影剂至对象。例如，可递送量子点、金属和/或其他成像剂。在一些实施方案中，可使用药剂来追踪早期阶段的疾病(例如，早期阶段的转移)。在一些实施方案中，可使用放射敏感剂来增强放射治疗的作用。在一些实施方案中，可递送药剂以诱导肿瘤细胞在其膜上表达不同的受体或糖。例如，本发明的一些方面可被用于递送药剂，所述药剂促进肿瘤细胞中可增强免疫系统识别肿瘤的信号的表达(例如，可使肿瘤细胞看起来更像细菌或病毒的药剂)。在一些实施方案中，可递送药剂以阻断肿瘤细胞对糖的摄取。然而，应当理解的是，可递送根据本发明的一些方面的任何合适的治疗和/或其他医疗剂。

[0063] 在一些实施方案中，本发明的一些方面涉及基于HPV的颗粒，所述颗粒被修饰以展示来自两种或更多种不同天然HPV变体的表位。所述修饰的颗粒可用来提供针对任何两种或更多种天然HPV变体感染的免疫。

[0064] 在一些实施方案中，本发明的一些方面涉及施用一种或多种用于治疗应用的不同HPV颗粒的方案。所述不同的HPV颗粒可以是不同的HPV变体、含有不同药剂的基于HPV的颗粒和已在免疫原性方面经修饰的HPV颗粒的任何组合。

[0065] 在某些实施方案中，可使用HPV纳米颗粒来将一种或多种治疗剂递送至粘膜细胞(例如，HPV感染的细胞)。在另一些实施方案中，可以使用改变的HPV纳米颗粒来将一种或多种治疗剂递送至靶细胞。在某些实施方案中，所述改变的HPV纳米颗粒在具有血清型特异性抗体的宿主中是免疫沉默的。例如，感染了第一HPV血清型(例如，HPV-16)的对象产生出针对该血清型的抗体。在这样的对象中，具有第一血清型(例如，基于野生型HPV16的VLP)的病毒颗粒可诱导免疫应答，所述免疫应答降低基于VLP的药物递送的效率。

[0066] 在另一个实施方案中，可对对象针对HPV进行免疫(例如，用GARDASIL和CERVARIX)且所述对象已产生出针对第一和/或第二血清型(例如，HPV-16和HPV18)的中和性抗体。在

这样的对象中，具有所述第一和/或第二血清型的病毒颗粒(例如，基于野生型HPV-16和HPV18的VLP)可诱导免疫应答，所述免疫应答显著降低基于VLP的药物递送的效率。

[0067] 然而，可通过本文中所述的方法改变HPV纳米颗粒，以使所述改变的HPV纳米颗粒在宿主中不被所述第一血清型特异性抗体(例如，宿主中的HPV-16血清型特异性抗体)和/或宿主中所述第二血清型特异性抗体(例如，宿主中的HPV-18血清型特异性抗体)所识别。这种包含来自不同血清型的L1和/或L2蛋白的改变的HPV或HPV纳米颗粒可用于治疗。例如，所述改变的HPV纳米颗粒或基于不同血清型的VLP可用于将一种或多种治疗剂递送至经HPV免疫或HPV感染的宿主，而不诱导血清型特异性的免疫应答和/或不被宿主应答所中和，并且不失去效力。这种改变的HPV纳米颗粒或基于不同血清型的VLP可重复使用(例如，施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次)以递送治疗剂。在某些实施方案中，所述对象会产生出识别改变的HPV纳米颗粒或基于不同血清型的VLP的新抗体。此外，未感染HPV的对象可产生针对基于以治疗目的施用给对象的HPV颗粒血清型的免疫应答。在这些情况下，可使用包含来自其他不同血清型的L1和/或L2蛋白的第二种不同的改变的HPV纳米颗粒或第二HPV纳米颗粒，以将治疗剂继续递送至对象(例如，至HPV感染的细胞或者已被免疫接种针对HPV或用本发明的基于HPV的组合物治疗的对象中细胞)，而不诱导针对初始的HPV血清型和第二种改变的HPV纳米颗粒的特异性免疫应答(例如，中和免疫应答)。在对象产生出针对含有第二种L1和/或L2蛋白的第二种改变的HPV纳米颗粒或第二种VLP的免疫应答的情况下(或者为防止发生免疫应答)，可使用含有第三种L1和/或L2蛋白的第三种改变的HPV纳米颗粒或第三种VLP。可使用含有一系列不同的L1和/或L2蛋白的一系列不同的改变的HPV纳米颗粒和/或不同的LVP重复该过程几次。应当理解，在一些实施方案中，当在对象中检测针对所述第一套的免疫应答时或在治疗开始后的预定时间(例如，在施用第一组预定次数之后或预定时间之后)时第一组在对象中失去疗效时，可从一组颗粒转换到不同组的颗粒。

[0068] 在某些实施方案中，根据HPV的基因型和/或血清型相似性来选择基于不同血清型的VLP。在一些实施方案中，基于抗体的中和性交叉反应性选择基于不同血清型的VLP。在一些实施方案中，基于与已在对象中产生中和性抗体的第一和/或第二血清型相关性最远的不同血清型来选择基于不同血清型的VLP。例如，HPV 18与HPV 45密切相关，并且表现出针对所述中和性抗体的高度交叉保护作用。HPV 16与HPV 31密切相关，并且表现出针对中和性抗体的高度交叉保护作用。HPV58与HPV 16和HPV18的相关性更远，没有或几乎没有观察到中和性抗体的交叉保护作用。

[0069] 因此，治疗系列可涉及施用本发明的一系列VLP组合物(例如，含有一种或多种治疗剂)，其中每种连续的VLP组合物均基于来自不同HPV血清型的VLP，例如，来自关系较远的血清型。例如，在针对HPV16和HPV18免疫接种的对象中，基于不同血清型的适宜VLP可以是包含来自野生型HPV 58的L1和/或L2蛋白的颗粒。

[0070] 在另一个实施方案中，与已在对象中产生中和性抗体的所述第一和/或第二血清型关系很远的VLP可选自不是HPV的乳头瘤病毒。在一些实施方案中，VLP可包含来自感染非人的哺乳动物的乳头瘤病毒的衣壳蛋白，例如，牛乳头瘤病毒(bovine papilloma virus，BVP)或棉尾兔乳头瘤病毒(cottontail rabbit papilloma virus，CRVP)或Shope乳头瘤病毒。应当理解，治疗系列可涉及基于不同HPV血清型和/或感染其他非人宿主的不同乳头瘤病毒的一系列VLP。

[0071] 可使用不同地改变的HPV纳米颗粒或不同血清型的HPV纳米颗粒来递送治疗剂，直到宿主产生出针对所述不同地改变的HPV纳米颗粒或不同血清型的HPV纳米颗粒的抗体。在某些实施方案中，使用上文中所述的方法，基于血清型差异和/或免疫应答改变突变来改变VLP，可用治疗剂对对象进行多轮治疗，而不会因对象的免疫应答而失去递送系统的效力。在一些实施方案中，这种方案允许重复或持续治疗HPV感染和/或HPV相关癌症，直到基本上全部HPV感染细胞被清除和/或已发生癌症或病变的缓解(部分或完全)。然而，应当理解，根据本发明的一些方面，所述方案可用于重复或连续治疗其他病症。

[0072] 在一些实施方案中，使用HPV疫苗(例如，可商购的疫苗，例如GARDASIL和CERVARIX)对对象进行疫苗接种。在这些实施方案中，所述免疫可保护对象免受疫苗所靶向的病毒的感染(例如，对象在疫苗接种后已产生针对其的免疫应答的病毒)和发生这些疫苗特异性的病毒所引起的HPV相关疾病。然而，应当理解，当前可获得的疫苗不会保护全部HPV基因型和/或血清型的感染。在一些实施方案中，HPV疫苗接种的对象会被不被所述疫苗所靶向的HPV(例如，高风险HPV)感染，例如，接种的对象尚未对其产生免疫应答的那些。在一些实施方案中，所述疫苗接种的对象经历不同HPV类型感染的多次发生。在一些实施方案中，对象可被1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的HPV类型感染，所述HPV类型感染并停留于所述对象的不同细胞中。在一些实施方案中，被高风险HPV感染的已接种对象可发生由高风险HPV(所述接种患者尚未针对其产生免疫应答)引起的HPV相关疾病，例如，HPV相关发育异常或癌症。在这些实施方案中，可利用本文中所述的VLP，使用本文中所述的方法来治疗所述对象。

[0073] 例如，用可商用疫苗之一免疫接种过的对象可产生针对HPV16和18的中和性抗体，并且还可产生针对HPV6和11的中和性抗体。该免疫接种的对象受到保护而不发生这些HPV类型(HPV 16、18(癌症)和HPV6、11(疣)所引起的宫颈前癌和/或生殖器疣。免疫接种后已产生针对HPV16和18的中和性抗体的对象可产生与其他HPV类型表现出交叉反应性的一些中和性抗体(例如，HPV31(针对HPV16产生的中和性抗体)和HPV45(针对HPV18产生的中和性抗体))。然而，免疫接种的对象仍然会易感其他高风险HPV类型，因为对象并不针对这些类型产生交叉中和性抗体(例如，HPV58等)。可感染所述免疫接种对象的其他高风险HPV类型可以是例如HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-59、HPV-68和HPV-69。如果所述免疫接种对象尚未产生出交叉中和性抗体，或者尚未产生出足够特异性的交叉中和性抗体，或者尚未产生出足够效价的交叉中和性抗体，则当对象被一种或多种高风险HPV类型(所述对象对其没有产生足够的保护)感染时，所述免疫接种对象仍处于发生HPV相关疾病(例如发育异常或癌症)的风险中。

[0074] 在这样的对象中，可给对象施用本文中所述的修饰的VLP或包含一种或多种治疗剂(例如E7siRNA)的不同(关系更远的)血清型(例如，基于HPV58的野生型VLP)的病毒颗粒，以治疗对象的持续高风险HPV感染(所述对象对其没有产生足够的保护)引发的早期阶段疾病。在该实例中，所述治疗使得可消除早期发育异常，并且额外地可对对象提供更广泛的针对其他额外HPV类型感染的交叉保护。

[0075] 在一些实施方案中，HPV纳米颗粒包含病毒L1蛋白。在一些实施方案中，HPV纳米颗粒包含病毒L1蛋白和病毒L2蛋白。在一些实施方案中，所述L1和/或L2蛋白可以是野生型病毒蛋白。在一些实施方案中，L1和/或L2蛋白可通过突变和/或缺失而改变，从而所产生的L1

和/或L2蛋白仅包含用于组装纳米颗粒的最“小”结构域。在一些实施方案中，L1和/或L2蛋白还可与提供额外功能的其他蛋白质和/或肽相融合。这些其他蛋白可以是病毒或非病毒蛋白，并且在一些实施方案中，可以是例如宿主特异性或细胞类型特异性蛋白。应当理解，VLP可基于含有一个或多个重组蛋白或其片段(例如，一个或多个HPV膜和/或表面蛋白或其片段)的颗粒。在一些实施方案中，VLP可基于天然颗粒，所述颗粒被加工以整合本文中所述的一种或多种药剂，但本发明的方面并不限于所述方面。在某些实施方案中，可使用包含一种或多种靶向肽的颗粒。可以使用HPV蛋白或肽的其他组合，其作为本发明的一些方面，但本发明并不限于所述方面。

[0076] 在一些实施方案中，通过突变、插入和缺失改变病毒野生型衣壳蛋白。迄今为止，所鉴定的全部构象依赖性类型特异性表位都发现于高变环中的HPV-VLP表面上，所述高变环中的氨基酸序列在HPV类型间高度多样化，其被称为BC、DE、EF、FG和HI环。多数中和性抗体是针对这些多变环上的表位产生的并且是类型特异性的，其具有有限的交叉反应性、交叉中和和交叉保护作用。不同的HPV血清型诱导针对不同类型特异性表位和/或不同环的抗体。

[0077] 本文中提供的方法将针对HPV特异性血清型而产生的抗体的有限交叉反应性用于治疗。在某些实施方案中，病毒衣壳蛋白、HPV L1和/或L2在位于一个或多个高变环和/或表面暴露的环中的一个或多个氨基酸位置上，发生突变。在HPV血清型间不保守的环内的氨基酸位置上发生所述突变。这些位置可以是完全不保守的，即在该位置上可以是任何氨基酸，或所述位置可以是保守的，仅可进行保守氨基酸的改变。

[0078] 可根据功能、化学或结构方面的考虑因素来进行保守氨基酸的改变。例如，可根据下述化学相似性进行保守氨基酸的改变：酸性(D/E)、脂肪族(A/G/I/L/V)、酰胺(N/Q)、芳香族(F/W/Y)、碱性(R/H/K)、羟基(S/T)、亚胺基(P)、硫(C/M)；或功能相似性：酸性(D/E)、碱性(R/H/K)、疏水性(A/I/L/M/F/P/W/V)、极性(N/C/Q/G/S/T/Y)；或电荷相似性：酸性、碱性、中性；或结构相似性：兼性(ambivalent)(A/C/G/P/S/T/W/Y)、外部(R/N/D/Q/E/H/K)、内部(I/L/M/F/V)，其中括号中一组氨基酸中的任何氨基酸均可改变为本组中的其他氨基酸，并且，根据所用的考虑因素(例如结构、功能或化学)，这样的改变可被认为是保守改变。在一些实施方案中，可考虑一种或多种因素。

[0079] 在某些实施方案中，可在一个或多个环中的一个或多个位置上引入氨基酸改变，所述改变在一个或多个氨基酸位置上和在一个或多个环中将一种血清型的野生型氨基酸序列改变为可见于其他HPV血清型中的氨基酸序列。例如，如果血清型X的一个环的氨基酸序列是ABCDEFG，而在不同血清型Y的相同环中的氨基酸序列是ABHIJG(其中ABCDEFG和ABHIJFG是不同的氨基酸序列)，那么AB和FG是保守的，而CDE可能是突变的。可在血清型Y的C或D或E，或者在CD或DE或CE，或者在CDE上引入突变。在这些实施方案中，C可突变为H，D可突变为I，并且E可突变为J。在这些实施方案中，所述一个或多个环可具有一种血清型的氨基酸序列(例如Y)，而蛋白的其余部分和(未改变的环)的其余部分是不同血清型的(例如X)。在这些实施方案中，仅一小部分的病毒衣壳蛋白突变。

[0080] 表2显示不同HPV类型的FG环比对的实例：

[0081]

256-FVRHLFNRAGAVGENVPDDLYIKGS--GSTANLASSNYFPT-294 HPV16 (SEQ ID NO: 1)

257-FVRHFFNRSGTVGESVPTDLYIKGS--GSTATLANSTYFPT-295 HPV31 (SEQ ID NO: 2)

256-FVRHFFNRAGKLGEAVPDDLYIKGS--GTTASIQSSAFFPT-294 HPV33 (SEQ ID NO: 3)

279-FVRHLFNRAGTVGDAIPDDLMIKGT--GNTASPSSCVFYPT-317 HPV34 (SEQ ID NO: 4)

259-FVRHLFNRAGTVGETVPADLYIK----GTTGTLPSTSYFPT-295 HPV35 (SEQ ID NO: 5)

285-FVRHFFNRAGTLGDPVPGDLYIKGSNSGNTATVQSSAFFPT-325 HPV52 (SEQ ID NO: 6)

282-FVRHFFNRAGKLGEAVPDDLYIKGS--GNTAVIQSSAFFPT-320 HPV58 (SEQ ID NO: 7)

254-FVRHLFNRAGDTGDKIPDDLMIKGT--GNTATPSSCVFYPT-292 HPV73 (SEQ ID NO: 8)

346-FVRHFFNRAGTTGDAVPKDLYIAGT--GNRANIAGSIYYST-384 HPV91 (SEQ ID NO: 9)

FVRHFFNRAG-VGE-VP-DLYIKGS--GNTA---SS-FFPT Consensus (SEQ ID NO: 10)

L S L D I M A TNS TRG GC YYS
T S NT

[0082] 共有序列：

[0083] $FVRHX_1FNRX_2GX_3X_4G(E/D)X_5(V/I)PX_6DLX_7IX_8G(S/T)-GX_9X_{10}(A/G)$

[0084] $X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}(F/Y)(F/Y)X_{17}T$

[0085] (SEQ ID NO:11)

[0086] 表2中的例子显示可在任何位置'X'引入突变，并可在括号中标记的任何位置引入保守突变，而保留相同的保守氨基酸(黑体)。根据表2中的例子，本领域普通技术人员可对任何数目的HPV病毒的HPV序列对任何表面暴露的高变环进行比对，并且使用公知的比对软件得出保守氨基酸和不保守的氨基酸，而无需过多的实验。

[0087] 在某些实施方案中，可对一个或多个氨基酸环进行一个或多个氨基酸改变，将一种血清型的非保守野生型氨基酸改变为其他血清型的等同野生型氨基酸。例如，根据表2的例子，HPV16的FG环的野生型氨基酸260位(L)可改变为(F)，其等同于HPV31 261位的等同野生型氨基酸。此外，HPV16的FG环的野生型氨基酸的264位(A)可改变为(S)，其为HPV31 265位的等同野生型氨基酸，等等。以这种方式，一种血清型的病毒衣壳蛋白的一个或多个环(例如，HPV16的L1的FG环)可改变，以或多或少精确模拟其他血清型相同病毒衣壳蛋白的环的氨基酸序列(例如，HPV31的L1的FG环)，而保持衣壳蛋白的所有其他氨基酸为野生型(例如，HPV16的L1)。在一些实施方案中，以本文中所述的方式，将含有特异性血清型主要表位的一个或多个环的氨基酸改变为位于不同血清型中相同环的等同位置处的氨基酸，降低了HPV感染个体的免疫系统的HPV特异性抗体对病毒颗粒的识别。在一些实施方案中，所述改变的HPV纳米颗粒是免疫沉默的，并且不被HPV感染的对象所产生的针对HPV的HPV特异性抗体所识别。例如，以HPV16免疫接种或感染的对象产生HPV16特异性的抗体。如果所述免疫系统遇到包含源自HPV16的野生型L1蛋白的VLP，则将发生免疫应答。然而，如果所述免疫系统遇到包含源自以本文中所述方法改变的HPV16的L1蛋白的VLP，则将不会(首先)发生HPV16特异性免疫应答。用改变的VLP重复攻击后，接受所述改变的VLP的对象会产生针对所述颗粒的新免疫应答。在这种情况下，可使用不同地改变的VLP和/或来自其他血清型的VLP用于

本文中所述的治疗方法。

[0088] 出乎意料的是，在一些实施方案中，在一种血清型的病毒衣壳蛋白的一个或多个环被改变以模拟其他血清型病毒衣壳蛋白的环的表位结构的情况下，包含所述改变的衣壳蛋白的VLP不被针对两种血清型中任一种的中和性抗体所识别。根据本发明的一些方面，即使所述环(例如，FG环)含有主要表位，所述血清型也是由病毒衣壳蛋白的其余部分的表位所决定的。当仅有环被修饰而不改变病毒衣壳蛋白其余部分的序列时，获得了新的血清型，其出乎意料地不被针对初始血清型(或当所述环的序列从第一血清型的序列改变为第二血清型的序列时的血清型)的抗体所识别。在一些实施方案中，可改变一个或多个位置以产生新的血清型，同时保留包装和递送药剂(例如核酸(如RNA或DNA)，例如重组核酸，例如本文中所述的治疗性核酸)的能力。

[0089] 在一些实施方案中，可改变FG环的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和$X1_4$中的一个或多个以产生新的血清型，所述血清型仍能够包装和递送药剂(例如，不同于HPV核酸的异源核酸(例如核酸如RNA或DNA，例如重组核酸，例如本文中所述的治疗性核酸)。在一些实施方案中，第一L1蛋白的这些位置中的一个或多个从第一血清型的氨基酸改变为第二血清型的氨基酸。例如，在一些实施方案中，在所述第一(例如，HPV16)L1序列的情形下，X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的所有位置可从第一HPV血清型序列(例如，HPV16血清型序列)改变为第二HPV血清型序列(例如，HPV31血清型序列)。在一些实施方案中，在所述第一(例如，HPV16)L1序列的情形下，仅X_6、X_{11}和X_{14}从第一HPV血清型序列(例如，HPV16血清型序列)改变为第二HPV血清型序列(例如，HPV31血清型序列)。在一些实施方案中，X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}的任何组合(例如，所述位置中的任何1、2、3、4、5、6或7个)可从第一血清型的氨基酸改变为第二血清型的氨基酸，而不改变L1序列的其余部分。应当理解，所述第一和第二血清型可以是任何合适的血清型(例如，HPV16、HPV31、HPV33、HPV 34、HPV35、HPV52、HPV58、HPV73、HPV91，或具有特异性FG环序列的任何其他血清型)。还应当理解，在一些实施方案中，在L1序列或其部分未改变而保持包装和递送药剂(例如，不同于天然HPV核酸的核酸，或本文中所述的任何其他药剂)的能力的情况下，这些位置中的任何一个或多个可改变为任何保守或不保守的氨基酸(无论这种改变是否对应于其他天然血清型的氨基酸)。

[0090] 在一些实施方案中，仍可包装和递送药剂的经修饰HPV颗粒在L1蛋白的位置X16上没有改变。例如，经修饰的HPV_{16}可在其他位置上具有一个或多个改变，但在位置X_{16}上保留精氨酸。

[0091] 应当理解，中和性MAb的主要表位已在HPV血清型间不同的一个或多个环上被鉴定。例如，对于HPV11在DE环中，对于HPV6在BC环和EF环中以及对于HPV33在BC、DE和FG环中，对于HPV16在FG环中和对于HPV31在EF环(例如，如Fleury等Prot.Sci.2009中所述)。使用本文中所述的策略，本领域普通技术人员可比对已表明包含主要表位的其他环的序列，以产生其它的经修饰VLP。

[0092] 还应当理解，在病毒衣壳蛋白中的任何氨基酸位置上(在一个或多个表面环中，在包含具有朝向内部的基团的氨基酸的位置上，或在衣壳蛋白中的任何其他位置上)，可进行任何数目的氨基酸改变(突变、缺失、添加)，以修饰或改变免疫原性或者出于任何其他原因(例如，诱导或阻断构象改变、增加或降低带电荷的氨基酸基团、改变靶向、增加生物利用度、诱导特异性修饰以增加通过特异性施用途径的吸收)，保持所述改变的衣壳蛋白形成

VLP的能力,并且保持所得的VLP将治疗剂转移至靶细胞的能力。

[0093] 还应当理解,可按本文中教导的和本领域中已知的关于位于环中的线性和构象表位的技术内容引入氨基酸修饰。构象表位可以是例如中和性抗体的识别位点,或者可以是对于细胞靶向而言有重要性的位点,或者可通过已经鉴定的VLP协助进入细胞(例如,如Fleury等Prot.Sci.2009和Sadeyen等Virology,2002,309:32-40中所述,其内容通过引用全文并入本文)。可根据构象表位来设计环中一个或多个氨基酸的修饰,并且,除了非保守的氨基酸外,可包含一个或多个保守氨基酸的修饰。

[0094] 在一些实施方案中,可将氨基酸序列插入环中。例如,可将短氨基酸序列插入一个或多个表面暴露的环中。所述短氨基酸序列插入片段可以是4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、150、200或250个氨基酸的长度,或4个氨基酸至250个氨基酸之间的任何长度。在某些实施方案中,所述插入片段的长度在4至50、5至25或5至15个氨基酸之间。所述插入片段可插入到环中的任何地方。在一些实施方案中,所述插入片段被插入到环的大致中间处。应当理解,如果已知某些环呈现某些基序,并且需要维持所述基序,则要将所述插入片段置于所述基序(无论是N端基序还是C端基序)之外。另外,如果需要破坏存在于某些环中的某些基序,则将所述插入片段置于所述基序中。所述基序可以是线性基序或结构基序,即其可以是基于一级氨基酸序列或其二级(或三级)结构。所述基序可以是可促进VLP摄取和/或靶细胞识别的细胞识别基序,或其可以是被某些抗体识别的表位,或其已知是抗原性的。在使用插入片段促进靶向或细胞吸收的一些实施方案中,所述插入片段可包含例如病毒靶向结构域。应当理解,这些结构域不限于HPV。病毒靶向结构域可源自靶向任何所需细胞的任何病毒。所述插入片段还可包含例如宿主特异性细胞识别基序,例如受体识别基序。在一些实施方案中,插入片段可包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含用作亲和标签的表位,例如Strep Tag™(STII,WSHPQFEK,SEQ ID NO:12)。

[0095] 在一些实施方案中,使用插入片段来激发免疫应答。在这些实施方案中,所述插入片段可包含病毒来源(例如,来自多种HPV血清型)的一个或多个表位(例如,多表位(polytope))。例如,可构建包含多种HPV血清型L1蛋白抗原区(表位)的多表位,例如,HPV16、18、31、33和45。在一些实施方案中,可插入蛋白L2的区域。

[0096] 在一些实施方案中,一个或多个表位的插入将在对象中产生针对所述一个或多个表位的免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫应答赋予针对病毒(例如HPV)再感染和/或病毒复育(例如,源自抗病毒治疗后剩余的病毒)和/或病毒相关癌症复发(例如,抗癌治疗后源自剩余的病毒转化癌细胞)的保护。

[0097] 在一些实施方案中,可将肽连接于VLP表面,以诱导改变的或增强的免疫应答(例如,如果所述肽包含一个或多个表位),或者以改变或增强VLP的靶向和/或细胞摄取(例如,如果所述肽包含一个或多个细胞受体)。例如,所述VLP可具有白蛋白结合结构域以增强其通过血管的转运,或者具有肽的增强跨细胞作用(transcytosis)(例如,增强底部-顶部跨细胞作用的整合素结合(RGD)部分;硫酸肝素部分或其他部分)和/或受体特异性的结合结构域,以增强其被靶向细胞的吸收(例如EGFR结合肽),和/或增强内体(endosome)和/或核转运的肽。

[0098] 在一些实施方案中,可使用合适的接头(linker)通过化学交联连接所述肽,所述

接头例如戊二醛、亚氨酸酯和BS(PEG)9、BS(PEG)5、DTSSP、EDC、SM(PEG)2、SMCC和磺基SMCC(sulfoSMCC)(Thermo scientific)。

[0099] 在一些实施方案中,所述肽可通过亲和力标签连接,例如StrepTagTM。

[0100] 在一些实施方案中,所述肽为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个氨基酸的长度。

[0101] 在某些实施方案中,可重组地生产L1蛋白和L1+L2蛋白。在某些实施方案中,重组生产的L1蛋白和LI+L2蛋白可自组装形成病毒样颗粒(VLP)。重组生产可发生于细菌、昆虫、酵母或哺乳动物宿主系统中。在所述宿主系统中,可表达L1蛋白或共表达L1+L2蛋白。

[0102] 用于在宿主系统中表达和纯化L1和L2重组病毒蛋白的方法,用于拆开和重新组装HPV纳米颗粒或VLP的方法,以及对L1和L2的氨基酸序列进行修饰、将VLP给施用对象的实例,和包含VLP的药物组合物,是本领域中公知的,并且在本文中教导。例如,美国专利No:6,416,945;6,991,795和7,205,126,其通过引用并入本文。然而,应当理解,本文中提供的方法和模式并不限于上述美国专利中的描述。还可以采用本领域中已知的其他方法和模式。

[0103] 在某些实施方案中,HPV纳米颗粒或VLP载有一种或多种治疗剂。如本文所述,可通过拆解和重新组装L1或L1与L2病毒颗粒来加载HPV纳米颗粒。可用于协助将病毒衣壳蛋白拆解/重新组装为VLP的盐包括Zn、Cu和Ni、Ru和Fe盐。可使用其他加载方法,因为本发明不限于这一方面。在一些实施方案中,HPV纳米颗粒可在于一种或多种治疗剂。

[0104] 在一些实施方案中,包含L1蛋白或L1与L2蛋白的HPV纳米颗粒还包含一种或多种治疗剂。在某些实施方案中,所述治疗剂包含一种或多种siRNA分子,或者一种或多种核酸(例如质粒或其他载体),其每一种均能够表达一种或多种siRNA分子。在一些实施方案中,所述治疗剂包含一种或多种反义核酸(例如anti-E6和/或anti-E7)、一种或多种核酸(例如质粒或其他载体),其每一种均能够表达一种或多种反义核酸。在某些实施方案中,所述HPV纳米颗粒包含两种或更多种治疗剂的组合。

[0105] 在一些实施方案中,所述治疗剂为RNA干扰的诱导剂或基因沉默的其他诱导剂。RNA干扰的诱导剂可以是siRNA、shRNA、杂交核酸分子,其包含第一部分和第二部分,所述第一部分包含双链核糖核酸(RNA)分子,所述第二部分包含单链脱氧核酸(DNA)分子、更长的双链RNA或DNA构建体(用于表达siRNA或更长RNA序列)。基因沉默的其他诱导剂包括DNA甲基化诱导剂、或核酶、或适体(aptamer)。在另一些实施方案中,所述治疗剂可以是基因表达的调节子,例如PNA(肽核酸)。

[0106] RNA干扰(RNA interference,RNAi)是将双链RNA(double stranded RNA,dsRNA)引入细胞,以序列依赖的方式抑制翻译后基因表达的过程。RNAi可由短的(例如19至25个核苷酸)dsRNA或小干扰RNA(siRNA)介导。在细胞中,dsRNA被切割产生siRNA,所述siRNA被整合进RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)中,引导所述复合物至同源的内源性mRNA,切割所述mRNA转录本,并导致所述mRNA的破坏。

[0107] 为了在细胞中诱导RNA干扰,可将dsRNA作为分离的核酸片段或通过转基因、质粒或病毒引入细胞。在某些实施方案中,使用VLP将dsRNA递送至靶细胞。

[0108] 在一些实施方案中,细胞中表达短发卡RNA(shRNA,short hairpinRNA)分子。shRNA包含由小环序列分隔的短反向重复序列。一个反向重复序列与所述目标基因互补。随后,将shRNA加工成为降解所述目标基因mRNA的siRNA。可在具有DNA构建体的细胞内生产

shRNA,所述构建体在RNA聚合酶III启动子(例如,人H1或7SK启动子)的控制下编码所述shRNA序列。或者,可外源性合成shRNA并直接引入细胞中,例如,通过VLP递送。在某些实施方案中,shRNA序列的长度在40至100个碱基之间,或者长度在40至70个碱基之间。所述发卡的茎(stem of the hairpin)为例如19至30个碱基对的长度。所述茎可含有G-U配对,以稳定所述发卡结构。

[0109] 根据siRNA序列与目标基因的同源性来对其进行选择。可使用多种程序,包括BLAST程序(Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-10)或BestFit(Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wisconsin,USA,Wisconsin 53711)来确定两个核苷酸序列之间的同源性。可使用FASTA和FASTP(见Pearson&Lipman,1988.Methods in Enzymology 183:63-98)进行序列对比。siRNA、shRNA和/或miRNA的设计工具和质量是本领域中已知的。用于设计siRNA序列和乱序siRNA序列的基于网络的在线软件系统有例如siDirect、siSearch、SEQ2SVM、Deqor、siRNA Wizard(InvivoGen)。可使用例如SpecificityServer,miRacle来预测特异性。可用例如HuSiDa(人siRNA数据库,Human siRNA Database)和siRNAdb(siRNA序列的数据库)来研究目标序列。可在相关序列的全长范围内进行序列对比,或者可更优选地在约10、15、20、25或30碱基的连续序列内进行对比。在某些实施方案中,siRNA与所述目标基因之间同源性的程度为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、或者至少99%或100%。所述siRNA的长度可在10bp至30bp之间,或者在20bp至25bp之间,或者所述siRNA的长度为20、21或22bp。

[0110] 可通过用siRNA转染培养的细胞,继之以目标mRNA的RT-PCR来检测RNAi的发生。其中在siRNA诱导RNAi时,与对照细胞相比,转染的细胞中目标mRNA的水平将降低。可通过细胞裂解液的Western印迹,继之以用对目的蛋白有反应性的抗体进行探测来确证蛋白产生的降低。

[0111] 在一些实施方案中,要沉默的基因是HPV E6或E7基因。所述siRNA序列可以是来自E6或E7基因序列中任何一个的10至30bp的任何连续序列,例如诱导RNAi的HPV16或HPV18的序列。或者,可使用包含源自这些序列的连续序列的更长dsRNA片段,因为其将在细胞内被切割形成siRNA。

[0112] 可使用本领域中已知的标准的固相或溶液相合成技术来合成siRNA。可商业上获得针对分别编码HPV-16E6和HPV-18E6的mRNA的合成siRNA(例如,来自Dharmacon Research,Lafayette,USA)。

[0113] 在一些实施方案中,所述siRNA在一端或两端具有一个或多个脱氧胸苷碱基的突出端(overhang),以通过降低对核酸酶降解的敏感性来增加所述siRNA在细胞内的稳定性。

[0114] 在一些实施方案中,所述siRNA为杂交的核酸分子,其包含第一部分和第二部分,所述第一部分包含双链核糖核酸(RNA)分子,所述第二部分包含单链脱氧核酸(DNA)分子。

[0115] 核苷酸之间的连接可以是磷酸二酯键或替代物,例如如下分子式的连接基团:P(O)S,(硫酯(thioate));P(S)S,(二硫酯(dithioate));P(O)NR′2;P(O)R′;P(O)OR6;CO;或CONR′2,其中R是H(或盐)或烷基(1-12C),R6是通过-O-或-S-连接到邻近核苷酸上的烷基(1-9C)。

[0116] 除了天然碱基之外,还可以使用经修饰的核苷酸碱基。例如,经修饰的碱基可提高所述siRNA分子的稳定性,因而降低沉默所需的量。术语经修饰的核苷酸碱基包括具有共价

修饰的碱基和/或糖的核苷酸。例如，经修饰的核苷酸包括含有糖的核苷酸，所述核苷酸共价连接至3’位置上的非羟基的低分子量有机基团和至5’位置上的非磷酸基团。因此，经修饰的核苷酸还可包括2’取代的糖，例如2’-O-甲基-；2-O-烷基；2-O-烯丙基；2’-S-烷基-；2’-S-烯丙基-；2’-氟-；2’-卤代-或2叠氮-核糖，碳环糖类似物a-异头糖；差向异构的糖，例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖和景天庚酮糖。

[0117] 经修饰的核苷酸是本领域已知的，并且包括烷基化的嘌呤和嘧啶、乙酰化的嘌呤和嘧啶，以及其他杂环。这些类的嘧啶和嘌呤是本领域中已知的，并包括伪异胞嘧啶、N4，N4-乙胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊基-腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、2甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、-D-甘露糖基Q核苷(-D-mannosylqueosine)、5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5甲氧基尿嘧啶、2甲硫基-N6-异戊基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、伪尿嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2硫脲嘧啶、2-硫脲嘧啶、4-硫脲嘧啶、5甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶5-氧基乙酸、Q核苷(queosine)、2-硫胞嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-丙基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、5乙基胞嘧啶、5-丁基尿嘧啶、5-戊基尿嘧啶、5-戊基胞嘧啶和2,6，二氨基嘌呤、甲基伪尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基胞嘧啶。

[0118] 在一些实施方案中，通过核酸序列(例如包含在本文中所述载体中的序列)的转录，可重组地制造siRNA分子或更长的dsRNA分子。所述载体可以是任何RNA或DNA载体。

[0119] 所述载体可以是表达载体，其中所述核苷酸序列可操作地连接至与细胞相容的启动子。适合在各种脊椎动物系统中使用的启动子是本领域中公知的。例如，合适的启动子包括病毒启动子，例如哺乳动物逆转录病毒，或DNA病毒启动子，例如MLV、CMV、RSV、SV40IEP(立即早期启动子)和腺病毒启动子和金属硫蛋白启动子。还可使用强哺乳动物启动子。应当理解，还可使用基本保持相似转录活性的所述启动子的变体。

[0120] 在一些实施方案中，所述载体可具有至少两个启动子，一个指导dsRNA有义链的表达，一个指导dsRNA反义链的表达。在另一些实施方案中，可使用两种载体，一种用于有义链，另一种用于反义链。或者，所述载体可编码形成茎环结构的RNA，其随后被细胞切割产生dsRNA。

[0121] 所述核酸构建体可含有基因表达的特异性的细胞的、病毒的或其他启动子或抑制子。所述启动子或抑制子可被设计用于反映其中引入了构建体的细胞的环境。例如，所述构建体可含有病毒启动子，因此，从所述构建体的表达有赖于病毒蛋白的存在，从而所述构建体仅在病毒感染的细胞中表达。类似地，所述构建体可具有某些细胞类型特异性的或某些发育阶段特异性的启动子或抑制子。例如，在所述载体是用在病毒感染的细胞中的情况下，例如HPV感染的细胞，应当使用与所述致病病毒相匹配的病毒启动子，例如HPV启动子(例如引起HPV16E6/E7表达的启动子)用于HPV感染的细胞。在这样的实施方案中，载体将仅在病毒感染的细胞中表达。

[0122] 在某些实施方案中，siRNA治疗剂靶向促进或介导细胞死亡或靶细胞凋亡的靶标。在某些实施方案中，所述siRNA治疗剂靶向HPV病毒蛋白。在一些实施方案中，siRNA分子所

靶向的所述病毒蛋白是病毒E6和/或E7。已发现E6 siRNA强烈抑制病毒癌基因的表达，并且E6 siRNA表现出强效生长抑制活性(Yoshinouchi等，2003)。siRNA产生的E7沉默诱导凋亡性细胞死亡。不想受任何特别理论的限制，已描述合成的小干扰(small interfering，si)RNA，特别是针对抗凋亡HPV E7癌基因的siRNA，在HPV阳性癌细胞中恢复休眠的肿瘤抑制子途径(否则其在E7存在下失活)，导致凋亡和细胞死亡。在一些实施方案中，siRNA引起的E7沉默可足以导致感染的宿主细胞凋亡，而无需抑制E6(Milner等)。描述了病毒E6和E7的siRNA，例如在Butz等(Oncogene(2003)22，5938-5945)和Milner等(专利申请0117359.0和0216929.0以及WO 2005/051431)，其通过引用并入本文。

[0123] 在某些实施方案中，HPV-16E6和HPV-18E6可特异性地被siRNA所靶向。在某些实施方案中，HPV-16E6的各靶标序列是

[0124] 5′-UACAACAAACCGUUGUGUG(SEQ ID NO:13，377-395位核苷酸)。

[0125] 在某些实施方案中，HPV-18E6的各靶标序列是

[0126] 5′-CUAACUAACACUGGGUUAU(SEQ ID NO:14，381-399位核苷酸)(如Butz等中所述)。

[0127] 在另一些实施方案中，E6和E7siRNA构建体是：

[0128] E6(正向)：5′GAGGUAUAUGACUUUGCUUTT(SEQ ID NO:15)；

[0129] E6(反向)：TTCUCCAUAUACUGAAACGAA 5′(SEQ ID NO:16)

[0130] 和

[0131] E7(正向)：5′AGGAGGAUGAAAUAGAUGGTT(SEQ ID NO:17)；

[0132] E7(反向)：TTUCCUCCUACUUUAUCUACC 5′(SEQ ID NO:18)

[0133] (如Milne，WO 2005/051431中所述)。

[0134] 在另一些实施方案中，E6和E7shRNA构建体为：

[0135] 表3

[0136]

shRNA		寡核苷酸序列 (5'-3')
对照	正向	CACCAGAGTTCAAAAGCCCTTCATCGAAATGAAGGGCTTTTGAACTC (SEQ ID NO: 19)
	反向	AAAAAGAGTTCAAAAGCCCTTCATTTCGATGAAGGGCTTTTGAACTC (SEQ ID NO: 20)
LacZ	正向	CACCGCTACACAAATCAGCGATTTCGAAAAATCGCTGATTTGTGTAG (SEQ ID NO: 21)
	反向	AAAACTACACAAATCAGCGATTTTTCGAAATCGCTGATTTGTGTAGC (SEQ ID NO: 22)
shE7-1	正向	CACCAGGAGGATGAAATAGATGGTTCGAAAACCATCTATTTCATCCTCC (SEQ ID NO: 23)
	反向	AAAAGGAGGATGAAATAGATGGTTTTCGAACCATCTATTTCATCCTCCT (SEQ ID NO: 24)
shE7-2	正向	CACCGCCCATTACAATATTGTAACCCGAAGGTTACAATATTGTAATGGGC (SEQ ID NO: 25)
	反向	AAAAGCCCATTACAATATTGTAACCTTCGGGTTACAATATTGTAATGGGC (SEQ ID NO: 26)
shE6-1	正向	CAACGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGAAAAAAGCAAAGTCATATACCTC (SEQ ID NO: 27)
	反向	AAAAGAGGTATATGACTTTGCTTTTTTCGAAAAGCAAAGTCATATACCTC (SEQ ID NO: 28)
shE6-2	正向	CACCGGTCGATGTATGTCTTGTTGCCGAAGCAACAAGACATACATCGACC (SEQ ID NO: 29)
	反向	AAAAGGTCGATGTATGTCTTCTTGCTTCGGCAACAAGACATACATCGACC (SEQ ID NO: 30)

[0137] (如在Bousarghin等，Mol Cancer Ther，2009，8:357-365中所述，其通过引用并入本文)。

[0138] 在某些实施方案中，组装成HPV纳米颗粒的病毒野生型蛋白(例如，L1和/或L1+L2)的氨基酸发生突变和/或替换和/或缺失。在某些实施方案中，这些氨基酸被修饰以增强VLP内部的正电荷。在某些实施方案中，引入修饰以允许siRNA分子与面向VLP内部的一种或多种氨基酸更强的静电相互作用和/或避免siRNA漏出所述HPV纳米颗粒。

[0139] 核酸是高度带电的并且不能通过自由扩散穿过细胞膜。此外，siRNA的亲水特征和阴离子骨架降低了其被细胞的摄取。在某些实施方案中，治疗性抗病毒siRNA可被递送至施

用了HPV纳米颗粒的对象以增加siRNA的细胞摄取(在体内通过生物膜屏障)和/或生物利用度。

[0140] 应当理解,包含仅促进HPV感染细胞之凋亡的药剂的VLP组合物在一些实施方案中特别有用,因为它们靶向被HPV感染的细胞(例如,VLP表面组分靶向天然感染的HPV所靶向的相同细胞类型)并递送杀死所述HPV感染细胞的药剂。在一些实施方案中,这些组合物可用于治疗HPV感染。在一些实施方案中,不需要长期治疗,前提是施用合适的剂量(例如,单剂量或预定治疗阶段的疗程,但不是长期治疗)来杀所述HPV感染的细胞。然而,在一些实施方案中,本发明的组合物可能不足以杀全部的HPV感染细胞,并需要不只一个疗程的治疗和/或长期治疗。在一些实施方案中,可使用包含抗病毒剂(而不是促凋亡剂)的VLP组合物用于长期治疗。

[0141] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗癌剂。在一个优选的实施方案中,所述抗癌剂是吉西他滨。

[0142] 在某些实施方案中,所述治疗剂是化疗剂,例如,甲氨蝶呤、长春新碱、阿霉素、顺铂、不含糖的氯乙基亚硝基脲、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素C、博来霉素、多柔比星、达卡巴嗪、紫杉醇(taxol)、fragyline、葡甲铵GLA、戊柔比星、卡莫司汀和聚苯丙生(poliferposan)、MMI270、BAY 12-9566、RAS法尼基转移酶抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、MMP、MTA/LY231514、LY264618/洛美曲索(Lometexol)、Glamolec、CI-994、TNP-470、和美新(Hycamtin)/拓扑替康、PKC412、伐司朴达(Valspodar)/PSC833、诺安托(Novantrone)/米托蒽醌、Metaret/苏拉明(Suramin)、巴马司他、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、Incel/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN 698、TA 2516/马立马司他(Marmistat)、BB2516/马立马司他(Marmistat)、CDP 845、D2163、PD183805、DX8951f、乳杆菌制剂(Lemonal)DP 2202、FK 317、Picibanil/OK-432、AD 32/戊柔比星、Metastron/锶衍生物、Temodal/替莫唑胺、Evacet/脂质体多柔比星、Yewtaxan/紫杉醇、Taxol/紫杉醇、Xeload/卡培他滨、Furtulon/脱氧氟尿苷(Doxifluridine)、Cyclopax/口服紫杉醇、口服紫杉烷(Oral Taxoid)、SPU-077/顺铂、HMR 1275/夫拉平度(Flavopiridol)、CP-358(774)/EGFR、CP-609(754)/RAS癌基因抑制剂、BMS-182751/口服铂类、UFT(Tegafur/尿嘧啶)、Ergamisol/左旋咪唑、Eniluracil/776C85/5FU增强剂、Campto/左旋咪唑、Camptosar/伊立替康、Tumodex/雷替曲塞(Ralitrexed)、Leustatin/克拉立平(Cladribine)、Paxex/紫杉醇、Doxil/脂质体多柔比星、Caelyx/脂质体多柔比星、Fludara/氟达拉滨、Pharmarubicin/表柔比星、DepoCyt、ZD1839、LU 79553/双萘亚胺(Bis-Naphtalimide)、LU 103793/多拉司他汀(Dolastain)、Caetyx/脂质体多柔比星、Gemzar/吉西他滨、ZD 0473/Anormed、YM 116、碘粒(Iodine seeds)、CDK4和CDK2抑制剂、PARP抑制剂、D4809/Dexifosamide、Ifes/Mesnex/Ifosamide、Vumon/替尼泊苷、Paraplatin/卡铂、Plantinol/顺铂、Vepeside/依托泊苷、ZD 9331、Taxotere/多西紫杉醇(Docetaxel)、阿糖鸟苷的前药、紫杉烷类似物、亚硝基脲类、烷化剂例如美法仑(melphelan)和环磷酰胺、氨鲁米特(Aminoglutethimide)、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、盐酸阿糖胞苷、放线菌素D、盐酸柔红霉素、雌氮芥磷酸钠、依托泊苷(VP16-213)、氟尿苷(Floxuridine)、氟尿嘧啶(5-FU)、氟他胺、羟基脲(羟基尿素)、异环磷酰胺(Ifosfamide)、干扰素α-2a、α-2b、醋酸亮丙瑞林(LHRH-释放因子类似物)、洛莫司汀(CCNU)、盐酸氮芥(氮芥)、巯嘌呤、美司钠、米托坦(o.p′-DDD)、盐酸米托蒽醌、奥曲肽

(Octreotide)、光神霉素、盐酸甲基苄肼、链脲霉素、柠檬酸他莫昔芬、硫鸟嘌呤、塞替派、硫酸长春碱、安沙可林(AmSRcrine(m-AMSA))、阿扎胞苷、促红细胞生成素(Erthropoietin)、六甲三聚氰胺(Hexamethylmelamine,HMM)、白介素2、米托胍腙(Mitoguazone)(甲基-GAG;甲基乙二醛双-丙咪腙;MGBG)、喷司他丁(Pentostatin)(2'脱氧助间型霉素)、司莫司汀(Semustine)(甲基-CCNU)、替尼泊苷(VM-26)或硫酸长春地辛,但并不限于这些。

[0143] 在某些实施方案中,所述治疗剂是免疫治疗剂,例如,Ributaxin、赫赛汀(Herceptin)、Quadramet、Panorex、IDEC-Y2B8、BEC2、C225、Oncolym、SMART M195、ATRAGEN、Ovarex、百克沙(Bexxar)、LDP-03、ior t6、MDX-210、MDX-11、MDX-22、OV103、3622W94、抗VEGF、赛尼哌(Zenapax)、MDX-220、MDX-447、MELIMMUNE-2、MELIMMUNE-1、CEACIDE、Pretarget、NovoMAb-G2、TNT、Gliomab-H、GNI-250、EMD-72000、LymphoCide、CMA 676、Monopharm-C、4B5、ior egf.r3、ior c5、BABS、抗FLK-2、MDX-260、ANAAb、SMART1D10Ab、SMART ABI 364Ab或ImmuRAIT-CEA,但不限于这些。

[0144] 在某些实施方案中,所述治疗剂为抗病毒剂。抗病毒剂的实例为:多硫酸盐/酯(Polysulfate,PVAS)、多磺酸盐/酯(Polysulfonate,PVS)、多羧酸盐/酯(Polycarboxylate)、多金属氧酸盐/酯(Polyoxometalates)、菊苣酸(Chicoric acid)、津特韦(zintevir)、cosalane衍生物、双环拉胺类(Bicyclams)(即AMD3100)、T-22、T-134、ALX-40-4C、CGP-64222、TAK-779、AZT(叠氮胸苷)、ddI、ddC、d4T(二脱氢二脱氧胸苷)、3TC(3′-硫代二脱氧胸苷,3′-thiadideoxycytidine)、ABC及其他ddN(2′,3′-二脱氧核苷酸)类似物、奈韦拉平、地拉夫定、依法韦仑、乙米韦林(MKC-442)、卡普韦林、对称二苯硫脲(thiocarboxanilide)UC-781、阿昔洛韦、伐昔洛韦(valaciclovir)、喷西洛维、泛西洛维、溴乙烯去氧尿苷(bromovinyldeoxyuridine,BVDU,溴呋啶(brivudin))、西多福韦、阿德福韦二匹伏酯(Adefovir dipivoxil)、替诺福韦二匹伏酯(Tenofovir disoproxil)、利巴韦林、伐昔洛韦、更昔洛韦、福米韦生、膦甲酸(foscarnet)、EICAR(5-乙炔基-1-β-D-呋喃核糖基咪唑-4-甲酰胺,5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide)、霉酚酸、Neplanocin A、3-deazaneplanocin A、6′-C-methylneplanocin A、DHCeA(9-(反式-2′,反式-3′-二羟基环戊-4′-炔基)腺嘌呤,或c^3DHCeA((9-(反式-2′,反式-3′-二羟基环戊-4′-炔基)-3-脱氮杂腺嘌呤),例如如De Clercq J Pharmacol Exp Ther 2001,297:1-10中所述,其通过引用并入本文,但并不限于这些。

[0145] 在一些实施方案中,本文中所述的RNAi处理还包括用西多福韦(Cidofovir)处理。西多福韦是用于治疗例如HVP诱导的喉乳头状瘤病的抗病毒药。西多福韦在宫颈癌细胞中也有活性。西多福韦可在基于VLP的RNAi处理(例如,E6或E7特异性的siRNA或shRNA)之前、同时或之后施用。在一些实施方案中,西多福韦与RNAi分子同时施用,并用本文中所述的VLP递送。

[0146] 其它的治疗剂是例如信号转导抑制剂,例如,丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂、Ras/MAPK抑制剂、胰岛素生长因子受体抑制剂、EGFR和/或PDGFR抑制剂、抗血管生成剂如VEGF和/或VEGFR的抑制剂、PARP调节剂和抑制剂、Hedgehog通路抑制剂、与代谢通路的抑制相关的药剂、β-干扰素、TDF或cPrPMEDAP。

[0147] 在某些实施方案中,以足以治疗对象的量给对象施用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒。在某些实施方案中,用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒治疗具有HPV感

染的对象还包括施用抗癌剂和/或抗病毒剂。这些药剂可同时或在不同时间共同施用，例如在施用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒之前或之后。

[0148] 在某些实施方案中，将包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒表面施用给感染HPV的对象。表面施用可包括以合适的药物组合物或制剂的形式施用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒。在某些实施方案中，所述适合表面施用的药物组合物或制剂可以是凝胶或乳膏。在某些实施方案中，可将所述凝胶和乳膏施用于粘膜。

[0149] 在某些实施方案中，将包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒施用于粘膜表面的上皮组织，例如，用于治疗宫颈癌或结肠直肠癌。在这些实施方案中，包含HPV纳米颗粒的药物组合物还包含粘膜附着物质，例如聚合物。粘膜附着物质是粘着于体腔粘膜表面层或表面的任何制剂，所述表面包括胃肠道表皮的腔表面、结肠直肠上皮的腔表面和子宫颈的腔表面。粘膜上皮细胞层富含粘性分泌物(粘液)。粘膜附着聚合物具有附着至潮湿或湿润的粘膜组织表面的能力，所述表面例如结肠直肠上皮或子宫颈上皮的粘膜组织表面。

[0150] 可使用多种聚合物来形成凝胶、乳膏或其他附着物质，例如凝胶，如水凝胶、有机凝胶或热可逆凝胶。其他可用的聚合物类型包括但不限于热塑性塑料和膜。所述聚合物可以是例如，聚(环氧乙烷)、聚(乙二醇)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(丙烯酸)、聚(羟基乙基甲基丙烯酸酯)、羟乙基乙基纤维素、羟乙基纤维素和壳聚糖及其混合物、多糖(琼脂)或羧甲基纤维素。在一些实施方案中，所述凝胶、乳膏或其他附着物质可含有提供粘膜附着作用的其他物质。这样的材料包括二氧化钛、二氧化硅和粘土。

[0151] 可直接施用所述药物组合物，例如作为凝胶施用，或其可被包含于预先组装的贴剂或其他能使所述凝胶附着于所靶向的组织或细胞的装置中(例如，如Milner等WO 2005/051431中所述)。例如，可采用附着于具有合适柔韧性的背衬层(例如，包含聚(氯乙烯)或羟丙基纤维素))以适应子宫颈表面组织结构的含有生物附着层或粘膜附着层的贴剂，以将包含治疗剂和任选地额外治疗剂(例如抗癌剂和/或抗病毒剂)的HPV纳米颗粒治疗性递送至宫颈组织。所述贴片的物理特性应当理想地保持几小时至一天或更多天，而不会使患者不适并且在正常的身体运动中不会移位。

[0152] 在某些实施方案中，可以凝胶(例如，用于施用至所期望的靶区域的丙二醇甲基纤维素的制剂)的形式提供包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒。所述凝胶可提供在管中，例如50ma活性成分混悬于凝胶中。这些凝胶特别方便地用于施用于至皮肤或其他上皮表面(例如，子宫颈或肛门生殖器区域)。

[0153] 在一些实施方案中，从长的施用器管(例如直肠或阴道施用器)中释放所述凝胶，例如将其进行直肠或阴道内应用。然而，应当理解，本发明的组合物可以任何合适的形式施用，以到达HPV感染的细胞或其他靶细胞，因为本发明不限于这一方面。例如，可以以栓剂、胶囊剂、乳膏剂、凝胶剂、泡沫剂、喷雾剂、气雾剂的形式提供本发明的组合物，和/或提供于材料的表面或浸渍于材料内，所述材料可与目标区域(例如，口腔、喉、子宫颈、阴道、肛门等)或其中两种或更多种的任意组合相接触。

[0154] 在一些实施方案中，所述包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒还可以以乳膏或单晶或球丸(pellet)的形式施用，其可被施用于上皮表面或皮肤上，或者用16号套管针插入到上皮表面或皮肤内用于短期治疗。

[0155] 应当理解，可将本发明组合物施用于感染有HPV的对象(例如，诊断或已知具有持

续性高风险HPV感染的对象)，以治疗发育异常或癌症和/或防止发育异常或癌症或其他与HPV感染相关疾病的发生。然而，在一些实施方案中，可将本发明的组合物施用(例如，预防性施用)给具有持续高风险HPV感染的对象，所述对象怀疑有被其他血清型高风险HPV感染的风险。

[0156] 在将本文中所述组合物施用给个体的情况下，所述施用为“预防有效量”或“治疗有效量”。根据需要施用最终组合物，其取决于所要治疗的疾病和受影响面积的大小。例如，可以每天、每周或每月一次进行施用。

[0157] 术语组合物的“有效量”是指组合物单独或与其它给药一起实现所需生物学作用的必要量或足够量。当然，所需要的应答取决于所要治疗的具体疾病。结合本文中提供的教导，通过在多种活性化合物中选择并权衡多种因素(例如，效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的严重程度和优选的施用方式)，可设计有效的预防性或治疗性治疗方案，所述方案不引起明显毒性，但却完全有效地治疗所述具体对象。对于任何具体施用而言的有效量可根据所治疗的疾病或不良状况、对象体重或者疾病或不良状况的严重程度等因素而改变。通常，优选使用各个组份或其组合的最大剂量，即依据合理医学判断的最高安全剂量。然而，本领域普通技术人员应当理解，出于医疗上的原因、心理学原因或任何实际其他原因，患者可能坚持较低剂量或耐受剂量。本领域普通技术人员可以凭经验确定有效量，而无需过多实验。

[0158] 对于本文中所述的任何化合物，可首先由动物模型确定治疗有效量。治疗有效剂量还可由已知表现出类似药理学活性的化合物的数据来确定，例如其他纳米颗粒。可基于所施用化合物的相对生物利用度和效力来调节所施用的剂量。根据上文中所述方法和本领域中公知的其他方法调节所述剂量以达到最大效力是在普通技术人员能力范围之内的。

[0159] 在某些实施方案中，提供了治疗对象的方法。所述对象可以是任何哺乳动物。当用于不良状况，例如病症或疾病(例如癌症、发育异常或肿瘤)时，本文中使用的术语“治疗”是指预防性治疗(其增加对象对发生所述不良状况的抵抗力，或者，换句话说，降低所述患者发生所述不良状况的可能性)以及在所述对象已经发生所述不良状况后针对所述疾病的治疗，或阻止所述不良状况的恶化。

[0160] 在某些实施方案中，本文中所述的治疗方法适合于任何HPV感染对象。在某些实施方案中，提供了用于治疗生殖器疣和/或寻常疣(verruca vulgaris)的方法。在某些实施方案中，提供了用于治疗早期发育异常、CIN(II、III)和/或原位癌的方法。在某些实施方案中，提供了用于治疗宫颈癌和所有其他HPV相关发育异常(例如，唇癌、阴茎癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌或非黑素瘤皮肤癌)的方法。在某些实施方案中，提供了用于治疗HPV感染后继发感染的方法，例如单纯疱疹病毒感染。在某些实施方案中，所述对象是人。在某些实施方案中，所述对象为雌性。

[0161] 类似地，本发明的一些方面涉及治疗一种或多种组织(例如，唇、阴茎、口腔、阴道、子宫颈、皮肤或其他组织感染)的感染。

[0162] 在某些实施方案中，在HPV感染的对象中，包含L1或者L1与L2并且还包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒可靶向有变为癌细胞可能的HPV感染细胞。在某些实施方案中，包含L1或者L1与L2并且还包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒可靶向HPV感染的对象作为癌细胞的HPV感染细胞。

[0163] 在某些实施方案中，给感染有HPV的对象施用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒，在所述对象中杀死HPV感染的癌细胞。在某些实施方案中，给感染有HPV的对象施用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒，引发所述对象中HPV感染的癌细胞的凋亡。

[0164] 宫颈癌通常随时间缓慢发展。在子宫颈中出现癌之前，子宫颈细胞经历称为发育异常的变化，其中不正常的细胞开始在宫颈组织中出现。随后，癌细胞开始生长并更深入扩散进子宫颈和周围区域中。

[0165] 提供了在需要治疗的对象中进行治疗的方法。需要治疗的对象优选为有HPV感染的对象。在一些实施方案中，所述对象处于感染的早期阶段。在一些实施方案中，所述对象表现出早期子宫颈发育异常。在一些实施方案中，所述对象表现出CIN。在一些实施方案中，所述对象表现出宫颈癌。

[0166] 在一些实施方案中，所述方法包括以足以治疗HPV感染的量将包含L1或L1与L2并且还包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒施用给HPV感染的对象。在某些实施方案中，将HPV纳米颗粒表面施用于粘膜。在某些实施方案中，所述方法还包括施用抗癌剂和/或抗病毒剂。在一些实施方案中，所述一种或多种治疗剂为siRNA分子或siRNA编码分子。在某些实施方案中，所述siRNA针对病毒E6和/或E7。在一些实施方案中，所述抗癌剂是吉西他滨。

[0167] 在一些实施方案中，可使用VLP将抗癌剂至递送患有癌症的对象。

[0168] 在某些实施方案中，可将所述包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒表面施用于上皮或其附近，所述上皮例如子宫颈上皮;或者表面施用于上皮病变处或其附近，所述病变例如宫颈癌或肛门上皮癌。在一些实施方案中，所述一种或多种治疗剂为siRNA分子或siRNA编码分子。

[0169] 在一些实施方案中，所述包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒被置于用于上皮表面的表面用制剂中，例如，通过施用于恶性上皮，例如泌尿生殖系统肿瘤，例如肛门、阴道或子宫颈肿瘤，例如子宫颈CIN。

[0170] 在一些实施方案中，所述包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒制备成用于施用于上皮的表面制剂，例如，用于非黑素瘤皮肤癌的治疗。

[0171] 在一些实施方案中，所述一种或多种治疗剂为siRNA分子或siRNA编码分子。

[0172] 在一些实施方案中，本发明的一种或多种HPV组合物或方法可与现有的用于HPV感染和/或宫颈癌的治疗联合使用。例如，可在使用表4中概括的治疗技术之前和/或之后使用本发明的治疗方法和/或组合物。

[0173] 表4概括了当前用于CIN治疗的常见技术。

[0174]

技术	描述	优势	劣势
冷冻疗法	使用一个或多个冻融循环，直接将超冷探头（一氧化氮或二氧化碳）应用于子宫颈病变处。	使用方便，成本低，并发症发生率低。	侵入性的。导致大量阴道排出物，持续数周，缺乏用于组织学的组织，使用不容易按照病变和子宫颈尺寸调节的探头。
CO_2 激光消融术	组织汽化处理至少7mm深，以确保破坏最深的腺体基层。	精准、灵活。	侵入性。轻度痉挛，治疗后持续一至两周的阴道排出物。该技术昂贵，需要大量培训并且需要应注意安全问题，并且不能通过组织学评价检测隐匿侵入。
锥形切除术（冷刀）	使用手术刀切除子宫颈的圆锥形部分	标本中的结果避免了可能使来自激光或电切除技术的标本的组织学评价复杂化的热边缘伪影（thermal marginal artifact）。对于延伸进入子宫颈内管的病变和疑似的原位腺癌来说很重要。	侵入性。需要全身麻醉，术后并发症（例如，出血、感染、子宫颈狭窄、子宫颈机能不全）发生率更高。
环形电切术（LEEP）	使用线环，其中通过可变功率设置的电流。所切除标本的几何形状是由环的形状决定的，所述环可被定制以适合病变。	用于治疗CIN II和III的供选方法，因为其容易使用、成本低并且成功率高。可使用局部麻醉在办公环境中方便地进行。	侵入性。可能导致感染和出血。对子宫颈基质的病变可导致子宫颈狭窄或机能不全。LEEP技术在全部所切除的标本中导致一些热边缘伪影，尽管这一般不会使组织学评价无法进行。

[0175] 这些治疗具有范围在60至90％间的不同有效率。然而，所有这些治疗都是侵入性的操作，其摘除或破坏宫颈组织并经常伴有并发症。

[0176] 宫颈癌的发病机制与持续的人乳头瘤病毒感染密切相关(在zur Hausen等中2002综述)。乳头瘤病毒是小的无包膜DNA病毒，其二十面体衣壳由L1和L2蛋白构成，所述衣壳包封约8kb的闭合环状双链DNA。直径为50至60nm的病毒衣壳含有72个L1大蛋白五聚体和12至72个的L2小衣壳蛋白拷贝。

[0177] 包括类型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68和HPV-69的15种HPV的亚群被指定为高风险。高风险HPV基因几乎见于100％的宫颈癌组织样品中(Walboomers等，1999)。在这种特定癌症的发生中，病毒基因组的整合和随后两个主要病毒癌基因(E6和E7)的表达被认为是关键步骤。E6与p53肿瘤抑制蛋白结合，并将其靶向泛素介导的降解(Münger和Howley，2002)。p53指挥对多种应激刺激(例如电离辐射或化学治疗药物所引起的遗

传毒性损伤)的细胞应答。根据损伤的广泛程度,p53的激活可导致细胞周期阻滞、DNA修复机制的激活或细胞凋亡(Vousden和Lu,2002)。无功能的p53或p53不存在使得细胞分裂速率加快,并促进遗传不稳定性,促进恶性转化(Attardi,2005)。高风险人乳头瘤病毒(HPV)的E6和E7mRNA的恒定表达分别消除了53和pRb的功能,并且是宫颈癌发生所必需的。

[0178] 此外,HPV 16与一小亚类的头颈部肿瘤相关,主要是瓦尔代尔环(Waldeyer ring)的组织。已证明,头颈部其他部位的恶性病变(包括口腔癌和食管癌)中存在一系列HPV类型,包括低风险HPV类型(de Villers等)。

[0179] 世界范围内,非黑素瘤皮肤癌(基底细胞癌和鳞状细胞癌)是迄今白种人最常见的癌。这些癌症主要发生于暴露于阳光的部位,表明UV辐射是该疾病发病中的主要环境因素。此外,还与几种遗传学变化相关,包括细胞基因p53中的突变。β-乳头瘤病毒属中几种HPV类型似乎与皮肤的鳞状细胞癌有关。这包括皮肤HPV类型(HPV 20、HPV 38和HPV 27),其被UV激活或抑制。

[0180] 因此,本发明的一些方面可用于治疗与HPV感染相关的除宫颈癌以外的其他疾病。例如,本发明的一些方面可用于治疗HPV感染相关的头颈癌(例如口腔癌和/或食管癌)。然而,应当理解,本发明的基于HPV的颗粒可用作治疗粘膜疾病或病症(无论其是否是由HPV感染所引起的)的一般递送载体。因此,可使用本发明的方法和组合物治疗其他感染,例如HSV或HIV感染,和/或例如细菌感染,如阴道加德纳菌(Gardnerella vaginalis)、淋球菌(Neisseria gonorrhoeae);真菌感染,如白色念珠菌(Candida Albicans)感染;或寄生虫感染,如寄生虫阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis);或生殖道中常见的其他感染。

[0181] 在一些实施方案中,可使用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒来治疗持续的高风险HPV感染、子宫颈发育异常、前癌病变CIN I,II,III(CIN2/3,VIN2/3)和/或原位癌。

[0182] 在一些实施方案中,可使用包含一种或多种治疗剂的HPV纳米颗粒来治疗生殖器疣、非黑素瘤皮肤癌、头颈癌、口咽癌、外阴癌、阴道癌、阴茎癌和/或肛门癌。

[0183] 根据治疗部位,可将本发明的组合物施用给女性或男性对象。

[0184] 在一些实施方案中,可使用包含基于HPV的VLP组合物将治疗剂递送至上皮细胞,例如皮肤。在一些实施方案中,可使用所述组合物治疗革兰氏阳性细菌引起的表皮感染,所述细菌包括例如葡萄球菌(Staphylococcus)、微球菌(Micrococcus)和棒状杆菌(Corynebacterium)属、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)以及化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes),其引起例如皮肤疾病,如脓疱疮(impetigo)和臁疮(ecthyma)。在一些实施方案中,包含基于HPV的VLP的组合物可用于治疗非黑素皮肤癌。

[0185] 在一些实施方案中,如本文中所述,可全身施用(例如静脉内注射(i.v.))包含一种或多种治疗剂的经修饰HPV颗粒来治疗肿瘤,例如卵巢癌、乳腺癌、口腔鳞状细胞癌、头颈癌、NSCLC、SCLC、膀胱癌或前列腺癌。在一些实施方案中,如本文中所述,癌细胞呈示出HPV VLP和修饰的HPV颗粒的受体,可用于靶向这些癌细胞。在一些实施方案中,还可额外地改变经修饰的HPV颗粒以呈示出肿瘤细胞特异性的靶向剂。

[0186] 本发明的一些方面在其应用上不限于在上文的说明书中提出的,或者在实施例或附图中举例说明的构建细节和组成安排。本发明的一些方面能够以多种方式实施其他实施或施行方案。另外,本文中使用的用语和术语仅是为了说明的目的,而不应当认为是限制性的。本文中使用的术语“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”及其变化形式旨在包括其

后列出的项目及其等同物以及额外的项目。

[0187] 实施例

[0188] 实施例1:包装了HPV癌蛋白shRNA的HPV-VLP对宫颈癌细胞生长的抑制

[0189] 本研究的主要目的是构建基于HPV的shRNA表达系统并探究利用HPV介导的RNA干扰进行有效的E6和E7基因沉默。我们在此表明,在宫颈癌细胞中表达E6和E7shRNA的HPV假病毒颗粒导致E6和E7表达的消除和癌细胞生长的抑制,提示HPV VLP可用于递送编码用于治疗宫颈癌之shRNA的质粒。

[0190] 材料和方法

[0191] 细胞系、细胞培养物和细胞转染

[0192] 在37℃下,在含有5%CO_2的加湿气氛中,将人宫颈癌细胞系CaSki(ATCC CRL-150)和C33-A(ATCC HTB-31,美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection))培养于添加有10%FCS(Invitrogen)、1%青霉素/链霉素和1%丙酮酸钠的DMEM中。用HPV-16转染CaSki细胞并表达E6和E7,而C33-A细胞为HPV阴性。以HPV-16E6/E7癌蛋白和c-Has-Ras共转染小鼠细胞系TC1(ATCC CRL-2785)。这些细胞生长于添加有2mmol/L非必需氨基酸和10%FCS的含有10mmol/L HEPES、1mmol/L丙酮酸钠的RPMI 1640中。小鼠293FT细胞(Invitrogen)源自293T细胞系(ATCC CRL 11268)。其表达SV40大T抗原,并在500μg/mL遗传霉素(Invitrogen)存在下进行培养。

[0193] 转染前一天,将细胞用胰酶消化并接种进六孔板中。随后使用Lipofectamine 2000(Invitrogen),用编码shRNA的质粒转染细胞,或用HPV-31假病毒颗粒或编码shRNA的慢病毒转染细胞。收获细胞,以在结果中标出的不同时间进行分析。

[0194] 设计和生产表达E6和E7特异性shRNA的质粒

[0195] 为生产pENTR/U6进入克隆(entry clone),使用了BLOCK-iT U6进入载体(entry vector)。我们首先设计并合成了互补DNA寡核苷酸(Invitrogen),每个含有定向克隆所必需的4个核苷酸突出端(overhang)。图1B中描述了对应于E6和E7shRNA的互补序列。使用Invitrogen的“shRNA designer”软件选择E6-2和E7-2序列。E6-1和E7-1序列是Jiang和Milner(Oncogene 2002;21:6041-8)描述的序列。我们使用Jiang和Milner(Oncogene 2002;21:6041-8)所描述的LacZ和对照shRNA序列作为对照。用BLAST确认了所有序列的特异性。

[0196] 在95℃时,通过在退火缓冲液中孵育4分钟,使等量的正向和反向链寡核苷酸退火生成双链寡核苷酸。生成双链寡核苷酸之后,将其连接进入pENTER/U6载体(Invitrogen)中。将所述质粒测序、扩增并使用Qiagen质粒小提试剂盒(Qiagen,France)纯化。将进入克隆用于瞬时RNA干扰分析。

[0197] 生产表达E6和E7 shRNA的HPV假病毒颗粒HPV-引

[0198] 在以重组杆状病毒(baculovirus)转染的Sf21细胞中表达VLP,所述杆状病毒编码密码子优化的HPV-31L1和L2基因(Fleury等,Clin Vaccine Immunol 2008;15:172-5)。在27℃下孵育细胞72小时(Touze等,Nucleic Acids Res 1998;26:1317-23;Bousarghin等,J Clin Microbiol 2004;40:926-32)。离心收集细胞,将其重悬于含有0.5%NP40的PBS中,并使其在室温下静置30分钟。随后,将细胞裂解液在4℃下以14,000×g离心15分钟。将核酸级分进一步重悬于PBS中并超声处理。随后将所述片段上样至预制的氯化铯梯度的顶部并在

Beckman SW28转子中平衡离心(24h,27,000rpm,4℃)。将L1阳性级分合并于PBS中并离心(SW28转子,3h,28,000rpm,4℃)。将VLP重悬在0.15mol/L的NaCl中。

[0199] 如前所述(Touze等,Nucleic Acids Res 1998;26:1317-23),并做了一些修改,生成了假病毒颗粒。简而言之,在室温下,将1μg of HPV-31 VLP在含有20mmol/L DTT和1mmol/L EGTA的50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)中孵育30分钟。在该阶段,向破坏的VLP中添加编码shRNA、萤光素酶或绿色荧光蛋白的表达质粒(100ng)。随后用有或没有$ZnCl_2$(10nmol/L)的$CaCl_2$不断增加的浓度(最高达5mmol/L终浓度)稀释该制备物。使用$ZnCl_2$是因为据报道$ZnCl_2$可促进HPV壳粒(capsomer)组装成VLP(Hanslip等,Biotechnol Prog 2006;22:554-60)。随后,将假病毒颗粒用1×PBS透析过夜,并在使用前存储于4℃。

[0200] 用电子显微镜分析壳粒、VLP和假病毒颗粒的存在。为此,将样品应用于碳包网格(carbon-coated grid),用1.5%乙酸铀酰(uranyl acetate)负染色,并使用JEOL 1010电子显微镜在×50,000标称放大倍数下观察。

[0201] 生产表达E6和E7hRNA的慢病毒

[0202] 使用BLOCK-iT慢病毒RNA干扰表达系统(Invitrogen)进行慢病毒的生产。简而言之,进行编码E7shRNA的pENTR/U6质粒和plenti6/BLOCK-iTDEST之间的LR重组反应,生成plenti6/BLOCK-iT-DEST表达构建体。通过使用LipofectAMINE 2000(Invitrogen)以9μg的ViraPower Packaging Mix和3μg的plenti6/BLOCK-iT-DEST表达质粒DNA转染293FT细胞来生产慢病毒。转染后48小时收集细胞培养上清液。通过用系列稀释的慢病毒感染TC1细胞来测定表达E7shRNA的慢病毒的效价。所述慢病毒储备液效价为1×10^6TU/mL。通过将细胞进行杀稻瘟菌素(10μg/mL)选择来选择稳定转导的TC1细胞。

[0203] 通过逆转录PCR分析E6和E7m RNA的水平

[0204] 用1×PBS清洗shRNA假病毒颗粒转染的CaSki细胞(10^6),随后根据制造商的说明书,使用Dynabeads mRNA direct试剂盒(Dynal France SA)分离mRNA。在42℃下,在含有250μmol/L每种脱氧核苷三磷酸、5μmol/L寡核苷酸(dT)20、25单位的RNA酶抑制剂和20单位的禽成髓细胞血症(myeloblastosis)病毒逆转录酶(Roche Diagnostics)的1×孵育缓冲液中,通过逆转录1小时由mRNA合成单链cDNA。使用HPV-16E6、E7或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)特异性的正向和反向引物,对cDNA样品进行PCR扩增。使用的引物为

[0205] E6正向,5'CACCAAAAGAGAACTGCAATGT3'(SEQ ID NO:31);和反向,TTGCTGTTCTAATGTT GTTCCA(SEQ ID NO:32);E7正向,5'GGAGATACACCTACATTGCATGA 3'(SEQ ID NO:33);和反向GGGGCACACAATTCCTAGTG(SEQ ID NO:34);甘油醛-3-磷酸脱氢酶正向,5'ACAGTCCATGCCATCACTGCC 3'(SEQ ID NO:35);和反向,5'GCCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'(SEQ ID NO:36)。在GeneAmp 9700温度循环器(Pekin Elmer Applied Biosystems,France)中,以200μmol/L的脱氧核苷酸三磷酸、2μmol/L的每种特异性引物和1单位Taq聚合酶(Invitrogen)进行PCR,对于E7、E6和GAPDH,程序分别为在50℃、55℃或62℃下进行25个循环。在2%的琼脂糖凝胶上使PCR产物可视化并用GelDoc系统(Bio-Rad)进行分析。

[0206] p53的检测

[0207] 将细胞(2×10^5)用PBS 1×清洗,直接溶于50μL SDS凝胶加样缓冲液中,并在95℃下孵育10分钟。将15微升每种样品在12%SDS-PAGE凝胶上分离。将分离的蛋白电转印到硝酸纤维素膜上用于抗体检测。使用单克隆抗体DO-1(Santa Cruz Biotechnologies)检测人

p53蛋白，并使用多克隆抗体(Sigma)检测内源性β-肌动蛋白。使用碱性磷酸酶缀合的抗小鼠IgG抗体(Sigma)，以硝基蓝四氮唑(nitroblue tetrazolium)和磷酸溴氯吲哚(bromochloroindolylphosphate)(Sigma)为底物使结合的抗体可视化。

[0208] β-半乳糖苷酶和萤光素酶活性的检测

[0209] 在用PBS1×清洗过并用含有2％甲醛和0.2％戊二醛的PBS固定过的细胞中，用β-半乳糖苷酶质粒和LacZ shRNA转染的CaSki、C33-A和TC1进行β-半乳糖苷酶的检测。室温下10分钟后，清洗细胞，并与β-半乳糖苷酶呈现溶液(β-galactosidase revelation solution)(2mmol/L $MgCl_2$、4mmol/L亚铁氰化钾、4mmol/L铁氰化钾和1mg/mL X-gal)一起孵育。对显示β-半乳糖苷酶活性的蓝色细胞进行计数。通过发光检测测量萤光素酶基因表达(萤火虫萤光素酶测定试剂盒;Interchim)。在10s范围内对发光进行积分(Victor2，Wallac;Perkin-Elmer)，结果表示为计数/秒(cps)/孔。

[0210] 细胞活力测定

[0211] 将转染和未转染的细胞用胰酶消化并随后接种进96孔板中。向加有100μL无FCS的DMEM的细胞中加入3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(0.5mg/mL)并在37℃下孵育。2小时后，添加100μL异丙醇和0.4mmol/L HCl，并在540nm测量吸光度。细胞活力测定为测试孔中获得的吸光度与未处理细胞中获得的吸光度之间的比值。

[0212] 细胞凋亡测定

[0213] 使用抗ssDNA/APOSTAIN(Abcys)检测细胞凋亡。简而言之，用含有1μg E6-1、E6-2、E7-1、E7-2shRNA和对照shRNA的10μg假病毒颗粒转导生长在六孔板中的TC1细胞(2×10^5个)。转染2天后，收获上清液，将细胞用冰冷的乙醇固定。离心之后，室温下将5×10^5个固定的细胞重悬于250μL甲酰胺中5分钟，随后在75℃下孵育10分钟。在该步骤后，添加2mL含有1％脱脂奶粉的PBS。15分钟后，将细胞离心，并将滤饼重悬于100μL含有抗ssDNA单克隆抗体F7-26的PBS中。在15分钟的孵育和离心之后，将滤饼重悬于100μL含有荧光缀合的抗小鼠IgM(20μg/mL，在PBS和1％脱脂奶粉中)的PBS中。孵育15分钟后，将细胞清洗、离心并重悬于500μL含有1μg/mL碘化丙锭的PBS中。用小鼠IgM而不是特异性的一抗处理阴性对照。随后使用Coulter XL流式细胞仪并利用Expo32软件(Beckman Coulter,France)分析细胞。

[0214] 还使用Caspase-Glo 3/7检测试剂盒(Promega)研究了细胞凋亡。如前所述，利用不同shRNA转导细胞。转导后两天，将2×10^5个细胞转移至白色壁的96孔板(Perkin-Elmer)的每个孔中，并添加100μL半胱天冬酶(caspase)发光底物。室温孵育1小时后，在Luminoscan Ascent发光仪(Thermo Electron)上读取板的发光。

[0215] 小鼠模型中抗肿瘤作用的评价

[0216] 为了研究E6和E7shRNA假病毒对TC1细胞致瘤性的作用，给6组(5只小鼠/组)6周龄的雌性C57BL6小鼠(CERJ,Le Genest St Isle,France)皮下接种TC1细胞(2×10^5个)。在施用于小鼠之前，用假病毒颗粒(10μgVLP/1μgE6-1或E7-1shRNA)、用编码E7-1shRNA的慢病毒(复数感染,50)或使用含有Lipofectamine的1μg E7-1shRNA转染TC1细胞。对照组接受未处理的TC1细胞(模拟组)，而一个对照组接受HPV VLP处理的TC1细胞。3周之后，处死小鼠，切除肿瘤并称重。

[0217] 还在具有TC1细胞肿瘤的小鼠中研究了编码E7shRNA的假病毒颗粒的抗肿瘤效力。用TC1细胞(2×10^5)皮下(s.c.)接种两组(10只小鼠/组)6周龄的雌性C57BL6小鼠。接种后

七天，全部小鼠中均已形成明显的肿瘤，以20μgVLP/2μg E7-1或20μgVLP/2μg对照shRNA的剂量，将含有shRNA的假病毒颗粒直接注射进每个肿瘤中，每2天一次，注射2周。3周后，处死小鼠，取出肿瘤并称重。所有动物研究都经过地区动物伦理委员会(regional animal ethics committee，CREEA)的批准。

[0218] 统计学分析

[0219] 数据表示为均值±SE。使用t检验进行统计学分析，P＜0.05认为是有显著性。

[0220] 结果

[0221] 设计导向HPV-16的E6和E7蛋白的shRNA

[0222] 设计6个序列以促进特异性的沉默。这些序列中的两个，即siE6-1(138-159)和siE7-1(101-119)已经作为siRNA在Jiang和Milner(Oncogene 2002;21:6041-8)中描述，分别对应于E6和E7的两个其他序列siE6-2(421-441)和siE7-2(148-167)是通过使用Invitrogen shRNA设计器软件选择的，并且两个序列(LacZ shRNA和Jiang的对照shRNA)用作对照(图1和表3)。将这些序列退火并插入pENTR/U6中。

[0223] 为了研究假病毒颗粒系统用于递送shRNA的有效性，使用或不使用编码LacZ shRNA的pENTR/U6LacZ质粒，用编码h半乳糖苷酶的质粒转染TC1、CaSki和C33-A细胞。在LacZ shRNA存在下，在所研究的全部细胞系中均观察到了h-半乳糖苷酶表达的降低，在TC1、CaSki和C33-A细胞中分别为80％、83％和81％抑制。

[0224] 在$ZnCl_2$存在下通过将L1壳粒组装成VLP来生产编码shRNA的假病毒颗粒

[0225] 使用HPV VLP来包封编码E6和E7shRNA的质粒。为了生成这些假病毒，我们使用了前述的拆解-重新组装法，只是在重新组装过程中添加了$ZnCl_2$作为修改。简而言之，在含有EGTA和DTT的缓冲液中孵育纯化的VLP，在这些条件下，VLP完全解体为组装成壳粒的结构。随后添加E7-1shRNA质粒，并在有或没有$ZnCl_2$(10nmol/L)存在下，用含有1％DMSO和5mmol/L $CaCl_2$的缓冲液稀释该制备物，以重新折叠所述VLP。$ZnCl_2$的存在促进了颗粒重新组装为类似假病毒颗粒的结构。在$ZnCl_2$存在下，所述壳粒还组装成为直径为24nm的管状结构，长度从120至280nm不等。通过比较使用或不使用$ZnCl_2$所获得的所述假病毒颗粒制备物转导293FT细胞的能力来评价$ZnCl_2$在生产含有编码萤光素酶之质粒的假病毒颗粒中的作用。在$ZnCl_2$存在下生成的假病毒颗粒获得了9,981cps的萤光素酶活性，而没有$ZnCl_2$时获得的假病毒颗粒则为仅845cps。因此，当L1颗粒在$ZnCl_2$存在下重新组装进VLP时，观察到了萤光素酶活性增加了12倍(图2)。此外，研究了所述HPV假病毒颗粒转导CaSki、C33-A和TC1细胞的能力。该假病毒颗粒转导了所研究的全部细胞系(图2)。然而，与在CaSki细胞(5,232cps)或C33细胞(4,016cps)中的相比，在TC1细胞(7,990cps，计数每秒，counts per second)中观察到了更高水平的萤光素酶表达。在不存在假病毒颗粒时，在293FT、TC1、CaSki和C33细胞中观察到的萤光素酶活性分别为57、84、51和41cps。

[0226] E6和E7shRNA假病毒颗粒对CaSki细胞的转导诱导了基因沉默和细胞生长抑制的提高

[0227] 使用含有编码绿色荧光蛋白之质粒的假病毒颗粒来研究假病毒颗粒在细胞中基因转移的效力。通过流式细胞术检测到80％的TC1细胞表达绿色荧光蛋白(未显示数据)。通过测定其干扰蛋白质表达的能力，我们评价了E6和E7shRNA的效力。为此，我们首先通过逆转录PCR获得了E6和E7的全长cDNA(以及作为对照的GAPDH)。结果显示，在针对E7的shRNA存

在时，E7mRNA降低，Jiang的序列获得了高水平的干扰，而E7-2序列观察到了较低水平的降低，对照shRNA没有降低(图3A)。在用E6shRNA处理的细胞中检测E6mRNA获得了类似的结果。当用E7shRNA处理细胞时，观察到了E6mRNA的轻微降低。

[0228] 由于E6在CaSki细胞中的表达水平太低，以至于不能如Gu等(Cancer Gene Ther 2006;13:1023-27)和Yamato等(Cancer Gene Ther2008;15:140-53)所报道的那样使用可获得的抗体通过Western印迹分析进行检测，因此根据E6shRNA恢复p53表达的能力对其活性进行了筛选。我们的结果表明，在表达E6-1shRNA 24小时后，Western印迹所检测的p53水平增加(图3B)，并随时间而降低。在E7-1、E7-2和E6-2shRNA存在下，p53表达的增加低于E6-1shRNA中观察到的增加。当用LacZ shRNA处理细胞时，未检出p53的表达。这些结果提示，通过shRNA处理，E6蛋白水平降低，并且p53不仅积累，并且在功能上还是有活性的。

[0229] 为了验证E6和E7表达的抑制是否可诱导细胞活力的降低，培养5天后，在shRNA转染和未转染的CaSki和TC1细胞中，使用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基、)-2,5-二苯基四唑溴化物测试测量540nm的吸光度。我们的结果显示，E6和E7沉默诱导细胞活力的降低(图4)。该降低对E7shRNA来说更大(70％细胞生长抑制)。当用相同的shRNA转染HPV阴性的子宫颈细胞(例如C33-A)时，未观察到细胞生长的抑制，表明E6和E7shRNA引起的细胞生长抑制是特异性的。对于E6-1和E6-2，以及对于E7-1和E7-2shRNA而言，细胞生长的降低是相似的。

[0230] 用E6和E7shRNA假病毒颗粒转导TC1细胞未诱导凋亡

[0231] 基于凋亡细胞中DNA对热变性敏感度的增加来进行细胞凋亡测定，以研究细胞死亡是否是由于细胞凋亡所引起的。在该测定中，通过在甲酰胺存在下加热使DNA变性，并用ssDNA特异性的单克隆抗体F7-26染色。与对照shRNA转染的细胞相比，流式细胞术未显示E6-1、E6-2、E7-1和E7-2shRNA转染的TC1细胞的凋亡细胞数目的显著增加。为了进一步评价凋亡的存在或不存在，在E6和E7shRNA假病毒颗粒转导的TC1细胞中进行了测量半胱天冬酶(caspase)3和7酶活性的半胱天冬酶测定。在使用E6和E7shRNA时都没有观察到半胱天冬酶活性的增加。该结果提示，E6和E7shRNA诱导TC1细胞生长的降低，但这不是通过凋亡性细胞死亡诱导的。

[0232] 用E6和E7shRNA假病毒颗粒体外转染TC1细胞在小鼠中诱导肿瘤生长的降低

[0233] 还使用TC1/小鼠模型体内研究了E6和E7shRNA假病毒颗粒的效力。使用编码E6-1和E7-1shRNA的HPV假病毒颗粒、单独的HPV VLP和编码E7-1shRNA的慢病毒体外转导TC1细胞。24小时之后，皮下注射未转染和转染的TC1细胞进C57BL6小鼠中。

[0234] 21天后，处死小鼠，切除肿瘤并称重。在对照小鼠中(模拟组和单独VLP组)，肿瘤重量的范围是1.09至2.12g(均值，1.64g)。对于用E7-1shRNA和Lipofectamine转染的TC1细胞，未观察到肿瘤重量的降低(均值，1.61g)。对于E6-1HPV假病毒颗粒，观察到了平均肿瘤重量降低42％(P＜0.10)，对于E7-1慢病毒和E7-1HPV假病毒颗粒，平均大小分别降低70％至80％(P＜0.05和P＜0.001;图5)。

[0235] 在小鼠中用E7shRNA假病毒颗粒瘤内转导TC1细胞肿瘤诱导肿瘤生长摩低

[0236] 还研究了编码E7 shRNA的假病毒颗粒的体内效力，以确定其在带有TC1细胞肿瘤的小鼠中降低肿瘤生长的能力。根据其体外效力，选择E7-1shRNA用于这些研究。将E7-1shRNA假病毒颗粒直接注射进肿瘤中，每2天一次，共2周。1周之后，与对照小鼠相比，在E7-1 shRNA处理的小鼠中未观察到肿瘤生长的降低(图6A)。随后，在处理的第二周，清楚地观

察到了肿瘤生长的降低，在第二周结束时，在用对照shRNA处理的小鼠中平均肿瘤重量为1.05g，而在用E7-1shRNA假病毒颗粒处理的小鼠中为0.49g(P＝0.045)。

[0237] 实施例2:在HPV31大壳粒蛋白上的中和构象表位的鉴定和功能意义

[0238] 本研究的主要目的是表征HPV31假病毒颗粒中和的抗原结构与机制。其中一个问题是诱导HPV中和性抗体的精确表位位置，以及由于与病毒壳粒相互作用而对抗感染保护作用的贡献。

[0239] 现已公认，构象表位决定中和性抗体的产生(Christensen等，Virology1994;205:329-35;Rose等，J Gen Virol 1994;75:2075-79;White等，J Virol1998;72:959-64;White等J Virol 1999;73:4882-89;Giroglou等J Virol2001;75:1565-70)。因为HPV的中和表位是构象依赖性的，所以其氨基酸组成和表面位置还未被完全表征。

[0240] 这些研究可用于疫苗设计和病毒-细胞相互作用。此外，对HPV抗原结构的理解对于设计来源于HPV的、具有降低的免疫原性的基因治疗载体而言是至关重要的。生成这样载体的一个先决条件是对激发中和免疫应答的病毒决定簇的更多理解，以设计假病毒颗粒载体，所述载体在其负责产生中和性抗体的构象表位中具有缺失或突变。这些具有降低的免疫原性的突变载体允许再施用这些载体时，不会因为诱导了针对所述载体的中和性抗体而引起显著的转基因效力损失。

[0241] 材料和方法

[0242] HPV31单克隆抗体

[0243] 如前所述生产和表征本研究中使用的HPV31 MAb(Fleury等，Arch Virol 2006;151:1511-23;Fleury等，Clin Vaccine Immunol 2008;15:172-75)。H31.D24MAb识别已在FG环(271-279位氨基酸)中鉴定的共有线性表位，而H31.F7 MAb识别已在FG环的N末端部分中鉴定的构象交叉中和表位(crossneutralizing epitope)(Fleury等，Arch Virol2006;151:1511-23)。13种其他MAb识别特异性的构象中和表位。此外，使用CamVir-1单克隆抗体(CV)作为对照，所述抗体识别DE环上的共有线性表位(Carpentier等，J Med Virol 2005;77:558-65)。通过用硫酸铵(33％终浓度)盐析，随后用磷酸缓冲盐(PBS，phosphate-buffered saline)透析，继之以蛋白AG/琼脂糖凝胶(Pierce;免疫纯IgG纯化试剂盒)亲和层析，使用细菌细胞表面展示法(bacterial cell surface display method)从未加工的腹水中纯化所研究的MAb。

[0244] 假病毒的中和

[0245] 如前确定每种单克隆抗体的中和能力(Fleury等，Arch Virol 2006;151:1511-23;Fleury等，Clin Vaccine Immunol 2008;15:172-5)。此外，我们研究了假病毒颗粒细胞表面结合之前或之后是否发生中和。用293FT细胞中产生的HPV31假病毒颗粒进行了测试，并且使用在完全Dulbecco's改良Eagle's培养基(Invitrogen，补充有10％FCS、100IU/mL青霉素和100μg/mL链霉素的DMEM)中培养的、接种于96孔板中的并且在37℃下孵育24小时的Cos-7细胞进行中和测定。通过在37℃下将预先与MAb一起孵育过的HPV31假病毒颗粒加入到细胞(100μL)中1小时来进行假病毒颗粒细胞表面结合之前的测量中和的测定。通过在37℃下将HPV31假病毒颗粒加入到Cos-7细胞中1小时来进行假病毒颗粒细胞表面结合之后的测量中和的测定。清洗三次以除去未结合的假病毒颗粒后，将MAb添加到100μL DMEM中。对于每个测定而言，在37℃下3小时后除去上清液，并添加200μL完全DMEM。37℃下进一步孵育

48小时之后,通过使用萤火虫萤光素酶测定试剂盒(Interchim,Montlucon,France)测量转染的细胞所表达的萤光素酶来对感染性进行评分,使用多扫描微板发光计(Thermo-Fisher Scientific,Courtaboeuf,France)对萤光素酶表达进行定量。如果萤光素酶活性降低>80%,则认为MAb是中和性的。如果MAb仅在病毒颗粒结合至细胞之前添加时中和假病毒,则对假病毒与细胞结合的抑制进行评分。如果抗体在其添加至Cos-7细胞之前和之后中和假病毒颗粒,则认为MAb通过细胞附着后机制(postcell attachment mechanism)中和假病毒颗粒。

[0246] 重组L1蛋白的生成和VLP的纯化

[0247] 使用Bac-to-Bac系统(Invitrogen,Fisher-Scientific,Illkirch,France),在草地夜蛾(Spodoptera frugiperla)(St21)细胞中表达HPV L1蛋白。预先生成了编码HPV16、HPV31、HPV16 DC9和HPV16 DC31(分别具有9或31个氨基酸C末端缺失)的L1基因的杆状病毒(Baculovirus)(Touze等,FEMS Microbiol Lett 2000;189:121-7;Touze等,J Clin Microbiol 1998;36:2046-51)。用PCR从全长HPV31 L1密码子优化的基因65扩增HPV31DC9和HPV 31 DC31截短基因,分别使用正向引物(GGATCCCACCATGAGCCTGTGGAGACCCAGC,SEQ ID NO:37)和反向引物(对DC9而言)(GGAAGCTTATGTGGTGG TGCTGGCGCTGGGGGC,SEQ ID NO:38)以及对DC31而言(GCAAGCTTAGGCCTGCAGCAGGAACTTTCTGCCC.SEO ID NO:39)。通过TA克隆将PCR产物克隆进pCR TOPO 2.1中。对阳性克隆进行测序以验证不存在不需要的突变。随后将HPV L1基因克隆进之前用BamHI和HindIII消化过的pFastBac1质粒中。根据制造商的建议,使用Bac-to-Bac系统(Invitrogen)生成编码不同L1缺失基因的重组杆状病毒。将维持在补充有10%胎牛血清(FCS,Invitrogen)的Grace昆虫培养基(Invitrogen,Cergy Pontoise,France)中的Sf21细胞用各重组杆状病毒感染,并在27℃下孵育。感染后3天,收获细胞,并按照之前的描述纯化VLP,29,40。简而言之,将细胞重悬于含有Nonidet P40(0.5%)、抑肽素A和亮肽素(leupeptin)(各自均为1μg/mL,Sigma Aldrich,Saint Quentin Fallavier,France)的PBS中,并使其在4℃下静置30分钟。随后将核裂解液离心并将沉淀重悬于含有抑肽素A和亮肽素的冰冷PBS中,然后进行超声处理。随后,将样品加载到CsCl梯度上,并离心至平衡(22小时,27,000rpm,SW28转子,4℃)。通过折光检查法研究CsCl梯度片段的密度,并通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳和考马斯亮蓝染色(Coomassie blue staining)来研究L1蛋白的存在。合并阳性级分,在PBS中稀释并在Beckman SW 28转子(3小时,28,000rpm,4℃)中离心。离心之后,将VLP重悬于0.15mol/L的NaCl中并用最大功率的60%,以一次5秒脉冲进行超声处理。使用MicroBCA试剂盒(Pierce,Ozyme,France)测定总蛋白含量。

[0248] 在293FT细胞中产生HPV31 L1HBc 263/264突变体VLP。使用两步PCR方案,通过密码子优化的HPV31 L1基因的诱突变来获得编码嵌合L1蛋白的DNA。进行重叠PCR以在HPV31 L1蛋白的263/264位获得HBc蛋白的DPASRE序列。在第一步中,使用优化的HPV31 L1 DNA序列作为模板,并用5'L1-NheI

[0249] (CC GCTAGCCACCATGAGCCTGTGGAGACCC.SEQ ID NO:40)与3'L1-DPASRE(CTCTCTGCTGGCGGGGTCGTTGAAGAAGT GCCGCACGAA,SEQ ID NO:41)作为引物生成一个片段。使用优化的HPV31 L1 DNA序列作为模板,并用3'L1-EcoRI(CGGAATTCT ATCACTTCTTGGTTTTCTTCC,SEQ ID NO:42)和5'L1-DPASRE

(GACCCCGCCAGCAGAGAGAGAAGCGGCACCGTGGGC GAG,SEQ ID NO:43)作为引物扩增另一片段。在第二PCR步骤中,使用这两个重叠的片段作为DNA模板,使用5'L1-NheI和3'L1-EcoRI为引物。所产生的DNA序列L1碱基263/264之间具有HBc78-83编码序列,并在5'端具有NheI限制性位点并在3'端具有EcoRI限制性位点。对于蛋白表达而言,将HPV31 L1HBc 263/264基因克隆进pIRES哺乳动物表达载体(BDbiosciences,Clontech)中。通过经典的碱裂解法和酚/氯仿抽提制备该DNA质粒(HPV31 L1HBc 263/264-pIRES),并根据制造商的说明书使用Fugene6(Roche Diagnostic,Meylan,France),将该DNA质粒用于转染293FT细胞。用总共0.5μg DNA和1μL Fugene6/cm^2培养面积转染细胞。转染后44小时收获293FT细胞,并如前所述纯化VLP。

[0250] 通过电子显微镜研究了VLP中表达的不同HPV-L1蛋白的自组装。为此目的,将VLP制备物应用于碳包网格(carbon-coated grid),用1.5%乙酸铀酰(uranyl acetate)负染,并使用JEOL 1010电子显微镜在×50,000的标称放大倍数下观察。所有的电子显微镜照片都是在30,000×或50,000×下拍摄的。

[0251] 通过表面等离子共振研究HPV31 MAb的VLP结合竞争

[0252] 用配备有CM3(羧甲基化葡聚糖)传感器芯片的Biacore 1000(Biacore AB,Uppsala,Sweden)进行分析。以5μL/分钟的流速,用35μL的0.05mol/L1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐和0.2mol/L N-羟基琥珀酰亚胺处理CM3传感器芯片,然后以5μL/分钟的流速,将HPV31 L1 VLP(32μg/mL,在35μL PBS缓冲液中)进行共价偶联。随后,以10μL/分钟的流速,用50μL 1mol/L乙醇胺-HCl(pH 8.5)封闭残余的羧基。通过以10μL/分钟的流速注射5μL HCl-甘氨酸(10mmol/L,pH 2.2)来消除未结合的VLP。所有在室温下进行的相互作用分析均采用20μL/分钟的流速。对于每个MAb,通过三次注射30μL以PBS稀释10倍的腹水来获得结合的HPV31 L1 VLP的抗体饱和。通过注射30μL以PBS稀释4倍的相同MAb的杂交瘤上清液来验证MAb饱和。随后,通过连续注射五次以PBS稀释4倍的不同杂交瘤上清液(每次30μL)建立竞争。随后,通过三次注射10μL的30mmol/L HCl来使生物传感器再生,并对同样的VLP偶联的流动室进行另一个饱和-竞争循环。研究了几种其他的再生缓冲液(包括2mol/L NaCl、10mmol/L NaOH和20、25、30和50mmol/L HCl)。所选择的缓冲液(30mmol/L HCl)显示除去100%的结合抗体,但不从传感器芯片上除去VLP,并且不影响VLP构象,因为针对构象表位的抗体仍然如再生处理之前一样有效地与VLP结合。

[0253] 利用细菌细胞表面展示进行表位做图

[0254] 使用pFliTrx载体的细菌细胞表面展示法使用插入有硫氧还蛋白(thioredoxin)结构域(TrxA)的12mer肽文库来限制肽。该硫氧还蛋白结构域自身被插入到大细菌鞭毛蛋白(FliC)中,以展示于大肠杆菌(E.coli)的表面(Lu等,Biotechnology(NY)1995;13:366-72;James等,Science 2003;299:1362-1367)。通过将1mL肽文库储备液接种进50mL含有100μg/mL氨苄西林的IMC培养基(6g/L Na_2HPO_4,3g/L KH_2PO_4,0.5g/L NaCl,1g/L NH_4Cl,0.2%酪蛋白氨基酸(casamino acid),0.5%葡萄糖,1mmol/L $MgCl_2$)中而获得pFliTrx随机肽展示文库(Invitrogen,Cergy Pontoise,France),并随后在25℃下振荡(225-250rpm)过夜。通过将100μg/mL色氨酸添加到来自过夜培养于50mL含有100μg/mL氨苄西林的IMC培养基的1010细菌中来诱导肽表达,随后在25℃下振荡6小时。

[0255] 对于针对抗HPV31抗体的文库筛选而言,通过用定轨摇床以50rpm轻度摇动将1mL

无菌水中的20μg MAb包被到60mm板(Nunclon D,Nunc,ATGC,Marne-la-Valle′e,France)上1小时。用10mL无菌水清洗后,添加10mL封闭溶液(含有100μg/mL氨苄西林、1%低脂奶粉、150mmol/L NaCl、1%a-甲基甘露糖苷的IMC培养基)并在摇动下孵育1小时。倾出封闭溶液后,将10mL细菌细胞培养物与0.1g奶粉、300μL 5moI/L NaCl、500μL 20%a-甲基甘露糖苷(终浓度:1%脱脂奶粉、150mmol/L NaCl、1%a-甲基甘露糖苷)一起加入。在以50rpm轻度摇动1分钟并在室温下孵育1小时后,用10mL含有100μg/mL氨苄西林和1%a甲基甘露糖苷的IMC培养基将所述板清洗五次(50rpm,5分钟)。随后,通过震荡所述板30秒将结合的细菌细胞洗脱进残余体积的清洗溶液中。将其转移至50mL培养瓶中,并在25℃和摇动(225-250rpm)下培养过夜。将该淘洗循环(panning cycle)再重复4次,并将来自第五次淘洗的过夜培养物在含有100μg/mL氨苄西林的RMG板(6g/L Na_2HPO_4、3g/L KH_2PO_4、0.5g/L NaCl、1g/L NH_4Cl、2%酪蛋白氨基酸、0.5%葡萄糖、1 mmol/L $MgCl_2$、1.5%琼脂)上划线,并在30℃下孵育过夜。将来自RMG/氨苄西林板上的24至30个克隆中的每一个接种进2mL含有100μg/mL氨苄西林的RM培养基(6g/L Na_2HPO_4、3g/L KH_2PO_4、0,5g/L NaCl、1g/LNH_4Cl、2%酪蛋白氨基酸、1%甘油、1mmol/L $MgCl_2$)中。30℃下摇动孵育过夜后,通过经典的碱裂解酚/氯仿DNA小量制备法提取DNA。使用FliTrx正向测序引物对核苷酸序列进行分析。在ABI PRISM 3100Avant DNA测序仪(PerkinElmer,Courtaboeuf,France)上运行序列。使用Dialign2(Morgenstern等,Gioinformatics 1999;15∶211-18)分析序列。

[0256] 通过ELISA检测MAb对野生型和突变VLP的反应性

[0257] 用VLP包被微板孔(Maxisorp,Nunc)。在4℃下孵育过夜并用PBS-吐温20(0.1%)清洗两次后,在37℃下将各孔用补充有1%FCS的PBS饱和1小时。在37℃下,用在PBS 5×-吐温(1%)-FCS(10%)中稀释的MAb将各孔一式两份地孵育(两个测试和一个对照)。清洗4次后,将以PBS-吐温(1%)-FCS(10%)稀释1000倍的过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠Ig Fc(Sigma Aldrich)添加至孔中并在37℃下孵育1小时。随后,清洗4次后,添加在25mmol/L柠檬酸钠和50mmol/L Na_2HPO_4中的0.4mg/mL邻苯二胺和0.03%过氧化氢。30分钟后,用H_2SO_4(4N)终止反应,并在490nm读取吸光度。为进行数据分析,从受试样品的OD值中减去在无一抗时获得的光密度(OD)值。显示的数据是三至四次测定的平均值。

[0258] 基于肝素和ECM的酶联免疫吸附测定

[0259] 使用源自Giroglou等(J Virol 2001;75:1565-70)描述的用于HPV33VLP的肝素结合测定的测定方法测试了VLP与肝素间的相互作用。在4℃下,用每孔200ng肝素-BSA(Sigma)或MatrigelVR(BD Biosciences,Le pont de Claix,France)涂布位微滴定板(Maxisorp,Nunc)过夜。在用含有0.1%吐温20的PBS清洗4次后,通过在37℃下用PBS加1%FCS孵育1小时封闭非特异性结合位点。清洗后,添加200ng/孔的在PBS中稀释的VLP。在37℃下孵育60分钟并清洗4次之后,添加在PBS、0.1%吐温20和10%FCS中按1∶1000稀释的抗HPV31VLP MAb并在37℃下孵育60分钟。在37℃下孵育1小时并清洗4次后,使用共价连接辣根过氧化物酶的小鼠抗IgG抗体检测结合的抗体。在37℃下孵育1小时并清洗4次后,添加100μL含有邻苯二胺和H_2O_2的底物溶液。30分钟后,通过添加100μL 2mol/LH_2SO_4终止反应,并用自动板检测仪读取492nm下的吸光度。从测试孔的值中减去没有VLP的对照孔的吸光度。同时,用肝素-BSA或MatrigelVR涂布第二板。孵育并清洗后,添加200ng/孔的VLP(其在37℃下与在PBS、0.1%吐温20和10%FCS中稀释1000倍的MAb预孵育1小时)。如前所述,使用

共价连接辣根过氧化物酶的小鼠抗IgG抗体检测结合抗体。按照所观察到的在VLP与肝素相互作用之前和之后添加MAb之间OD的降低来计算VLP与肝素或Matrigel结合的抑制。结果表示为OD降低的百分比。

[0260] VLP与HS和ECM结合的测定

[0261] 如前所述，用肝素-BSA包被微滴定板(Maxisorp,Nunc)。封闭步骤后，添加用PBS稀释的VLP。在37℃下孵育60分钟并清洗之后，添加在PBS、0.1％吐温20和10％FCS中按1:5000稀释的CanVir1 MAb，并在37℃下孵育60分钟。清洗四次之后，使用共价连接辣根过氧化物酶的小鼠抗IgG抗体检测结合抗体，并随后如前所述进行肝素与MAb相互作用的检测。结果表示为OD值。

[0262] 通过HPV31 L1蛋白的同源性建模(homology modeling)使HPV31表位可视化

[0263] 将HPV31 L1蛋白的序列(Genbank ID,P17388)作为输入值提交给Swiss-Model建模工具(swissmodel.expasy.org)。基于序列相似性的模板检索鉴定了HPV16 L1(PDB编码1DZL和2R5H)、HPV-35 L1(2R5J)，HPV-11 L1(2R5K)和HPV-18 L1(2R5I)作为可能的3D模板。因为HPV31L1与HPV16和HPV35 L1序列更相似，所以我们选择了相应的3D模板(1DZL、2R5H和2R5J)来模拟HPV31的L1结构。使用ANAOLEA(swissmodel.expasy.org/anolea/)评价了HPV31 L1的模型，发现其正确地用于进一步的表位位置结构分析。使用SwissPDBViewer，利用HPV31L1模型和HPV16 VLP(1DZL)的非晶体学对称性(变换矩阵)(Chen等,Mol Cell 2000;5:557-67)，重新构建了HPV31的L1五聚体。以PDB格式存储了HPV31 L1 VLP五聚体的原子坐标并用PYMOL程序显示，所述PYMOL程序是一种用于大分子结构的分子图形可视化工具(pymol.org)。

[0264] 结果

[0265] 使用表面等离子体共振对HPV31 L1 MAb进行表位做图

[0266] 使用针对HPV31 L1蛋白的15种MAb进行表位做图。测试这些MAb之间的所有竞争。例如[图7(a)]，通过用H31.F16MAb(未加工的腹水)使偶联的HPV31 L1 VLP饱和来建立表位竞争，并通过注射相同MAb(杂交瘤上清液)来验证MAb饱和。发生在添加H31.F16MAb之后的低共振单位(low-resonance unit,RU)(-52RU)证明达到了饱和。饱和之后，由于饱和MAb的解离导致RU降低，并且这是负RU的原因。随后，通过连续注射H31.B18、H31.D7、H31.E16、H31.E17和H31.F7 MAb(杂交瘤上清液)来建立MAb结合竞争。H31.E16和H31.F7 MAb不结合HPV31 L1 VLP(分别为-1和-13RU)，提示这两个MAb所识别的表位与H31.F16MAb所识别的表位是相似的或非常接近的。与此相反，使用H31.B18、H31.D7和H31.E17MAb观察到了显著的VLP结合(分别为171、523和69RU)，提示这些抗体所识别的表位与H31.F16MAb所识别的不同。随后，通过三次注射30mmol/L HCl使生物传感器再生。该方法用于所有其他竞争性测定。

[0267] 所研究的15种MAb中的每一种都与至少3种其他MAb竞争，但没有一种MAb与所有其他MAb竞争。使用这些结果建立了表位图[图7(b)]，H31.F7 MAb所识别的表位在该图中为中心位置。该MAb所识别的表位已在L1FG环上鉴定(Carpentier等,J Med Virol 2005;77:558-65;Fleury等,Arch Virol 2006;1511-23)。与其他MAb(H31.B18、H31.B1和H31.H9)竞争较小的MAb位于所述表位图的外围。

[0268] HPV31 MAb与HPV31/HBc VLP的结合

[0269] 使用HPV31 L1/HBc 263/264突变体和HPV31 L1 wt VLP分析了MAb的反应性,以鉴定一些中和表位是否位于FG环上。除了以前产生的HPV31 L1 VLP以外,我们还通过在位置263-264插入乙型肝炎核心(HBc)DPASRE而构建了HPV31 L1突变体。所有类型特异性MAb的VLP结合都受到在263/264位插入HBc的影响。应当指出,非中和性H31.D24MAb(其识别位于271-279位的线性表位(SVPTDLYIK,SEQ ID NO:44))的反应性不受所述插入的影响。CamVir-1 MAb(其识别在FG环以外鉴定的线性表位)的结合也不受所引入的突变的影响。交叉中和性MAb H31.F7类似地与HPV16和HPV31 wt VLP均有反应,但受到在位置263/264插入HBc的影响。

[0270] 利用细菌表面展示对5种MAb进行表位做图

[0271] 利用细菌展示肽文库进行表位做图提供了进行单克隆和多克隆抗体表位做图的新方法(Rockberg等,Nat Methods 2008;5:1039-45)。使用一种此类系统(pFliTrx细菌展示系统)鉴定L1表位。使用pFliTrx载体的细菌细胞表面展示利用插入到硫氧还蛋白结构域中的12mer肽文库来限制所述肽,允许构象表位的展示。该硫氧还蛋白结构域自身插入到大肠杆菌的大细菌鞭毛蛋白中,以展示在细菌表面。将从腹水中纯化的高效价MAb包被到Nuclon D板上,用于抗HPV31抗体的文库筛选,并且对结合到板上的MAb进行体外筛选轮次,以选择与所述MAb相互作用的细菌展示肽。对于每个轮次,将细菌文库添加至细胞培养皿中进行阳性选择。洗掉未结合的细菌,并回收结合的细菌。五个轮次之后,选出单克隆并分离DNA用于测序。首先使用Dialign2程序分析序列。选出高评分的匹配的肽,随后使用Dialign2与全长HPV31 L1蛋白序列进行比对。将与选出的所有肽相匹配的HPV31 L1序列保留。我们首先将该系统用于H31.D24MAb,其识别以前鉴定的HPV31 L1的FG环中271-279位的线性表位(SVPTDLYIK,SEQ ID NO:44)。在进行细菌展示选择后,将24个阳性克隆进行测序和分析。用H31.D24MAb选出的24个肽中的六个彼此F2匹配,并与HPV31 L1蛋白匹配(参见图8),所鉴定的共有序列位于275-279位(DLIYK,SEQ ID NO:46)。

[0272] 因而,使用细菌展示来研究MAb H31.F7所识别的中和构象表位,MAb H31.F7与HPV16、18和58具有交叉反应活性,并弱中和HPV类型16和31。使用H31.F7 MAb通过细菌展示选出了24个阳性克隆。所选出的24个肽中5个彼此匹配,并与HPV31 L1蛋白序列259-266位(RHFFNRSG,SEQ ID NO:47)相匹配。还研究了三种类型特异性的识别构象表位的中和性MAb(H31.F16、H31.H12和H31.B1)。选出每种MAb的阳性克隆。用H31.F16 MAb选出的五种肽、用H31.H12 MAb选出的五种肽以及用H31.B1 MAb选出的六种肽彼此匹配,并且与用于H31.F16 MAb的HPV31 L1蛋白序列SGTVGESVP(265-273位)(SEQ ID NO:48)、用于H31.H12 MAb的RSGTVG序列(264-269位)(SEQ ID NO:49)和用于H31.B1 MAb的RSGTVGESV序列(264-272位)(SEQ ID NO:50)相匹配。

[0273] 假病毒颗粒附着前和附着后的MAb中和

[0274] HPV16和HPV33特异性抗体已显示出在附着至靶细胞之前或之后进行中和(Selinka等,J Virol 2003;77:12961-67;Day等,J Virol 2007;81:8784-92)。通过抗HPV31 MAb的病毒中和机制是通过中和测定确定的,其中在添加F3假病毒颗粒至COS-7细胞之前[图9(a)]或细胞附着后1小时[图9(b)]添加MAb。六种MAb[H31.B1、H31.C24、H31.G5、H31.E16、H31.F7和H31.D7,图9(b)]通过抑制细胞附着中和了HPV31假病毒,因为其在病毒附着之前中和,而不是在假病毒与细胞结合之后[图9(b)]。其他8种MAb通过细胞附着后机

制中和了HPV31假病毒，因为其在细胞附着之前和之后中和假病毒。应当指出，通过表面等离子体共振分析获得的表位图[图7(c)]提示，这六种MAb中的5种通过抑制细胞附着中和HPV31假病毒。

[0275] VLP与HS和ECM的结合:HPV31 MAb和L1 C末端缺失的作用

[0276] 使用ELISA研究了HPV31 MAb对VLP与肝素之结合的抑制作用，其中在VLP与ELISA板上包被的肝素结合之前向VLP添加MAb。结果表明，识别线性表位的非中和性H31.D24 MAb强烈抑制VLP与肝素的结合，因为14种MAb中仅6种识别F4构象中和表位[图10(a)]。通过表面等离子体共振分析获得的表位图表明，MAb中的一些抑制VLP与肝素结合[图7(c)]。在附着至细胞之前中和假病毒颗粒的MAb与抑制与HS之结合的MAb之间没有明显的相关性。然而，三种中和性抗体(H31.G5、H31.E16和H31.D7)表现出了这两种能力(参见图10)。使用MatrigelVR作为ECM的替代物，通过ELISA研究了对VLP与ECM蛋白之结合的抑制作用。结果[图10(b)]显示，除了H31.C24(37％抑制)之外，全部的中和性抗体均抑制VLP与ECM蛋白的结合(>50％)。非中和性抗体H31.D24不抑制VIP与ECM蛋白的结合。

[0277] 为进一步研究VLP与HPSG的相互作用，我们使用了4种C末端缺失的突变体用于分析肝素与L1蛋白的结合。已生产了分别具有C末端9个和31个氨基酸缺失的HPV16 D9和HPV16 D31突变体，类似地生产了44和HPV31D9和HPV31D31 L1突变体用于本研究的目的。如前边在相应的HPV16缺失突变体44中观察到的那样，这些HPV31缺失突变体自组装成为VLP(参见图7)，并且这4种C末端缺失的VLP以与wt VLP相似的结合方式与肝素结合。然而，当这些VLP变性时，失去与肝素的结合，确证了肝素与VLP构象基序结合，而该基序不存在于L1蛋白的C末端部分(参见图11)。因为HPV感染靶细胞是多步骤的过程，涉及HSPG、ECM和未知的二级受体，所以我们研究了HPV31 MAb对ECM HPV VLP结合之中和的作用。

[0278] H31.D24识别的表位是线性表位，三种中和性MAb(H31.B1、H31.F16和H31.H12)识别的表位是构象表位，而H31.B1 MAb是部分交叉中和性的和交叉反应性的。

[0279] H31.F7 MAb识别的表位(即交叉反应性的和部分交叉中和性的MAb)是在HPV31 L1蛋白FG环的N末端部分的259-268位鉴定的(RHFFNRSGTV，SEQ ID NO:45)[图12，利用SwissPDBViewer，使用HPV31 L1模型和HPV16 VLP的AQ6非结晶对称信息，重新构建了3D壳体结构[PDB编码:1DZL，(Chen等，Mol Cell 2000;5:557-67)]]，且根据HPV31模型，其大多数是来自所述壳体表面的不可接近的F6。这与FG环的早期区域证明的HPV类型之间的相同结构的事实和Bishop等的基于L1蛋白结构的假说是一致的。该假说提出，FG环的该区域必须能够在类型之间诱导交叉反应性，但是抗原性较差和/或是不可接近的。

[0280] 对于HPV16和HPV33来说，已表明多种L1蛋白表面暴露的环对于表位的中和性抗体的诱导有贡献，所述表位仅在一个环中被鉴定，或者几个环对结合位点15、46、47有贡献，有人提出L1的非连续区域可对MAb识别的中和表位有贡献。我们的结果支持HPV31中和性抗体主要针对FG环，而FG环仅对与中和性抗体的结合有贡献。L1高变环彼此紧密临近的事实并没有排除其他环中的突变或插入影响FG构象表位的的可能性，如Roth等47所观察到的那样。我们观察到识别DLYIK(SEQ ID NO:44)序列(275-279)的交叉反应性的H31.D24 MAb显著降低HPV31与肝素结合的能力，因此证实了赖氨酸278在HS结合中的作用。然而，该抗体对HPV31假病毒颗粒41、65和识别构象表位(所述表位已知与位于FG环N末端部分的序列相结合)的三种其他中和性抗体与肝素的结合没有作用或作用有限。H16.V5和H16.E70 MAb已表

明不阻断与细胞表面的相作用。然而，这些中和性抗体抑制病毒与HaCaT细胞产生的ECM相结合，并通过细胞附着后机制中和假病毒颗粒43。与此相一致的是，我们观察到三种类型特异性的中和性抗体不与HS竞争与VLP的结合，并且其中仅一种(H31.B1)被VLP与细胞的结合所抑制。然而，与非中和性的H31.D24 MAb不同，所有这些抗体均竞争与ECM的结合。这些结果提示，这些抗体识别HPV16 VLP与HS35结合中所涉及的赖氨酸的构象碱性簇的邻近表位。应当指出，该簇最重要的赖氨酸存在于H31.D24 MAb所识别的表位中。此外，对于MAb对HPV31假病毒颗粒的附着前和附着后中和的研究表明，HPV31中和性抗体中的6种通过阻止病毒颗粒与细胞表面结合而发挥作用，另外8种中和性MAb通过阻止其内化而干扰假病毒颗粒。我们的结果表明，对于整体的MAb而言，中和与MAb结合HS之能力之间没有相关性。Lopez等66最近报道，在天然感染中检测到的抗HPV抗体抑制HPV16与HS的结合，并且其观察到具有最高中和效价的那些抗体是那些抑制HS结合的抗体。总之，我们的结果证明HPV31中和性MAb识别位于HPV31 L1蛋白FG环上的构象表位，并且其通过阻断与靶细胞的附着，或通过细胞附着后的中和来发挥作用。通过细菌表面展示对三种类型特异性中和表位的精确确定证明了其在FG环中央部分的定位，并鉴定了在相对保守的FG环N末端部分的交叉反应性和部分交叉中和性的构象表位。FG环的溶剂暴露的氨基酸残基分布在沿着由Pro 273至Leu 287所界定的轴而形成的沟的两侧[图12]。我们的结果表明，所述沟的右侧部分含有被H31.D24MAb所识别的线性非中和性表位。这也是硫酸肝素结合的热点，因而解释了为什么H31.D24和HS竞争对该区域的结合。所鉴定的构象中和性表位均位于FG环沟的左侧(参见图12)。如以前对于针对BPV L1蛋白的MAb所描述的那样，可通过MAb结合模式上的差异来解释针对这些表位的抗体不与HS强烈竞争这一事实67。然而，一些其他HPV31中和性MAb确实与HS竞争结合，这提示当其与其各自的表位结合时，这些MAb具有不同的倾斜(tilt)，因而干扰HS更大或更小程度的结合，或是其针对来自沟两侧的氨基酸残基。H31.D24 MAb与VLP的尖端结合，这支持了这样的假说，即非中和表位还存在于HPV颗粒的表面上。所获得的结果表明，HPV31的FG高变环中中和性表位密集，提示HPV31 MAb与FG环中央部分上的重叠但不同的表位结合，这与HPV VLP表面上的FG环的暴露相一致，因而证实了中和性抗体主要位于壳粒的尖端和冠。该结果还支持并证实了阻断病毒与ECM的附着(而不是阻断病毒与HS的附着)是重要的中和机制。

[0281] 实施例3:HPV16/31 L1突变体的生成

[0282] 乳头瘤病毒是小的无包膜DNA病毒，其二十面体衣壳由L1和L2蛋白构成，所述衣壳包封约8kbp的闭合环状双链DNA。直径50-60nm的病毒衣壳含有72个L1大蛋白的五聚体和12至72拷贝的L2小衣壳蛋白。用自组装成病毒样颗粒(VLP)的L1蛋白进行了免疫接种诱导产生高水平的中和性抗体，并赋予类型特异性的长期保护，如在动物模型中证明的那样(Breitburd等，J Virol 1995;69:3959-63;Suzich等，PNAS 1995;92:11553-57;Christensen等，J Virol 1996;70:960-65)。抗体应答通常是针对VLP外表面上存在的病毒衣壳L1蛋白的外环上发现的表位而产生的(Christensen等，Virology 2001;291:324-34;Sadeyen等，Virology 2003;309:32-40;Orozco等，J Virol 2005;79:9503-14;Yaegashi等，J Virol 1991;65:1578-83)。中和性衣壳表位是抗体介导的针对HPV的免疫保护作用的重要决定簇，并且线性和构象表位均被鉴定位于HPV L1 VLP和假病毒颗粒的表面上(Yaegashi等，J Virol 1991;65:1578-83;Volpers等，J Gen Virol 1995;76:2661-67;

Heino等,J Gen Virol 1995;76:1141-53;Christensen等,Virology 1996;224:477-86)。

[0283] 据报道HPV16L1的FG环和HPV31 L1的EF环中的L1残基涉及中和性抗体的结合(Sadeyen等,Virology 2003;309:32-40;White等,J Virol 1999;73:4882-89;Combita等,J Virol 2002;76:6480-86;Carter等,J Virol 2003;77:11625-32)。

[0284] 本研究的目标是研究嵌合HPV颗粒的免疫原性。我们将含有HPV16主要表位(aa256-294)的L1衣壳蛋白FG外环的氨基酸替换为HPV31(aa257-295)的L1 FG环的对应氨基酸,生成嵌合L1HPV纳米颗粒,所述纳米颗粒维持HPV16 L1的整体野生型序列,仅在FG环中有3个HPV31样替换(HPV-VLP X)或7个HPV31样替换(HPV-VLP Y)(图13)。

[0285] 从感染了重组杆状病毒的Sf21昆虫细胞中产生和纯化所述嵌合L1蛋白。Sf21昆虫细胞产生大量的嵌合L1蛋白(2.5-3mg/升)。L1HPV X和L1HPV Y嵌合蛋白与HPV16野生型L1类似地组装成为VLP。含有除了HPV-VLP Y中的7个交换之外的突变的嵌合构建体不组装成为VLP。

[0286] 为了测试嵌合VLP的感染性,测定了其将遗传物质转移进细胞的能力。将HPV-VLP X和HPV-VLP Y以及作为对照的HPV16野生型VLP解离,添加萤光素酶报告质粒,并在重新结合时包封到VLP中。将COS-7细胞(非洲绿猴肾细胞,ATCC CRL-1651)与VLP体外接触并孵育。孵育后,除去培养基,在萤光素酶裂解缓冲液中清洗并裂解细胞。如图14所示,嵌合的HPV-VLP X和Y保留了野生型HPV-16 VLP的感染能力。

[0287] 为检测嵌合VLP的免疫原性,用HPV16、HPV31和两种嵌合HPV X和Y免疫小鼠(每组10只)。如图15所示,HPV-VLP嵌合体的免疫反应性与HPV16和HPV31之间的交叉反应性是同一数量级的,其是最小的(至少比实际免疫应答低2个对数)。在用HPV16免疫接种的小鼠中,用ELISA测量的HPV16特异性抗体的效价可预期地为约2000GMT。出乎意料的是,在HPV-VLP X和Y感染的小鼠中基本上没有发现HPV16特异性抗体,尽管L1HPV-VLP X和Y几乎完全维持HPV16野生型氨基酸序列这一事实。因此,这些嵌合体不产生HPV16特异性抗体。如所预期的,在HPV31感染的小鼠中,基本上没有发现HPV-16特异性抗体。甚至更出乎意料的结果是,在HPV-VLP X和Y感染的小鼠中基本上没有发现HPV31特异性抗体,尽管嵌合体的FG环类似于HPV31的这一事实,尤其是对于L1HPV Y的FG环(其与野生型HPV31的FG环的不同仅在于一个氨基酸(HPV 31291T-N290HPV16))来说。如所预期的,在HPV16感染的小鼠中基本上没有发现HPV31特异性抗体,而在HPV31中则发现可靠的应答(约1900GMT)。有趣的是,在HPV16或HPV31免疫的小鼠中也未检测到X和Y特异性抗体,提示基本上没有交叉反应性。对于X和Y,在X或Y免疫的小鼠中,可检测到中等的交叉反应性(对于X和Y而言,分别为538和857GMT)。

[0288] 数据表明,可以设计带有突变的假病毒载体,其在所述假病毒载体来源的物种之间基本没有交叉反应。这一大大降低的免疫原性将允许重新施用这些载体,而不会因为在HPV感染的个体中诱导针对所述载体的中和性抗体而明显损失转基因效力。

[0289] 实施例4:通过用包封了L2基因的HPV假病毒颗粒进行免疫来诱导针对异HPV的中和性抗体

[0290] 用自组装成病毒样颗粒(VLP)的L1进行的免疫诱导了高效价的中和性抗体,并赋予动物针对同源的实验性感染的保护作用[Breitburd等,JVirol 1995;69(6):3959-63;Suzich等,PNAS 1995;92(25):11553-7]。还已经表明,保护作用是由针对构象表位的中和性抗体介导的。这些结果已经导致了针对生殖器HPV类型的疫苗的产业开发。临床前研究已

表明,L1VLP所诱导的中和性抗体主要是类型特异性的[Roden等,J Virol 1994;68(11):7570-4;Roden等,J Virol 1996;70(9):5875-83]。然而,已报道了HPV6和11以及HPV 16和31之间低水平的交叉中和[Christensen等,Virology 1994;205(1):329-35;White等,J Virol 1998;72(2):959-64;Giroglou等,Vaccine 2001;19(13-14):1783-93;Combita等,J Virol 2002;76(13):6480-6]以及HPV18和45之间较高水平的交叉中和[McLaughlin-Drubin等,Virology 2003;312(1):1-7]。临床试验已表明,免疫应答与针对HPV16和HPV18的感染以及相关的病变相关[Ault等,Lancet 2007;369(9876):1861-8;Paavonen等,Lancet 2007;369(9580):2161-70]。当前含有L1 VLP的HPV疫苗促进强烈的、主要是类型特异性的中和性抗体应答。用HPV16和18疫苗的临床试验也已揭示了针对HPV类型的交叉保护作用限于密切相关的类型。对两种疫苗明显建立了针对HPV31的保护作用,仅对一种疫苗建立了针对HPV45的保护作用[Paavonen等,Lancet 2007;369(9580):2161-70;Brown等,J InfectDis 2009;199(7):926-35]。因为批准的HPV疫苗仅靶向15种高风险HPV类型中的两种,所以需要另外的策略来阻止其他高风险HPV类型的感染。

[0291] L2蛋白已作为候选的预防性疫苗出现,因为在乳头瘤病毒感染的动物模型中用L2免疫接种诱导能够介导比L1 VLP更宽范围保护作用的交叉中和性抗体[Roden等,J Virol 1994;68(11):7570-4;Christensen等,Virology 1991;181(2):572-9;Yin等,Virology 1992;187(2):612-9;Chandrachud等,Virology 1995;211(1):204-8;Gaukroger等,J Gen Virol1996;77(7):1577-83;Campo等,Virology 1997;234(2):261-6;Roden等,Virology 2000;270(2):254-7;Embers等,J Virol 2002;76(19):9798-805],并且临床前和临床发现[Gambhira等,Cancer Res 2006;66(23):11120-4;Alphs等,PNAS 2008;105(15):5850-5;Karanam等,Vaccine 2009;27(7):1040-9]已经证明L2疫苗诱导广谱交叉中和性抗体。然而,L2蛋白和L2肽的免疫原性低于LVLP,并且将L2蛋白整合进L1 VLP中由于L1的免疫显性而不提高抗L2应答[Roden等,Virology 2000;270(2):254-7]。这提示,如果这样的基于L2的疫苗是有效的,那么必须研究新的疫苗策略。

[0292] 本研究的目的是研究提高L2蛋白与免疫系统的接触以产生广谱HPV疫苗的可能性。

[0293] 材料和方法

[0294] 抗体

[0295] CamVir-1单克隆抗体(BD Biosciences,Le Pont de Claix,France)与已定位于HPV-16 L1蛋白的203至209位氨基酸之间的线性表位相结合[Fleury等,Arch Virol 2006;151(8):1511-23]。H16.V5MAb针对HPV16L1蛋白的构象中和表位[Christensen等,Virology 1996;223(1):174-84]。兔抗HPV16L2免疫血清由Richard Roden惠赠。使用StrepTag II抗体(HRP缀合的)检测HPV VLP上StepTagII肽的存在(Novagen,VWR,Fontenay Sous Bois,France)。

[0296] 细胞系

[0297] COS-7细胞(非洲绿猴肾细胞,ATCC CRL-1651)生长于补充有10%热灭活的胎牛血清(FCS)、100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素以及1mmol/L丙酮酸钠的Dulbecco改良Eagle培养基(Invitrogen,Illkirch,France)中。293FT细胞系(Invitrogen)是稳定表达SV40标签和来自pCMVPORT6AT.neo质粒的新霉素抗性基因的293细胞系的快速生长变体。293FT细

胞系生长于Dulbecco改良Eagle培养基中，所述培养基除了补充有上述成分外，还补充有1％非必需氨基酸和500μg/ml G418。细胞系生长在37℃下的含有5％CO_2的加湿气氛中。

[0298] 在昆虫细胞中生产HPV18、HPV31和HPV58 VLP

[0299] 按照以前的描述[Touze等，J Clin Microbiol.1998;36(7):2046-51;Combita等，FEMS Microbiol Lett 2001;204(1):183-8]，从感染了重组杆状病毒的Sf21昆虫细胞中生产和纯化HPV58L1/L2VLP、HPV31 L1/L2 VLP和HPV18 L1/L2 VLP，所述杆状病毒编码L1和L2基因。

[0300] L2 Streptactin融合蛋白(L2SA)的生产和纯化

[0301] 包含上游(BamHI和SalI)和下游(HindIII)限制性位点的不含起始密码子的Streptactin(SA)序列[Voss等，Protein Eng 1997;10(8):975-82]是由Geneart(Regensburg，Germany)使用用于在草地夜蛾中表达的经调整密码子使用而合成的。将SA序列克隆到pFastBacDual表达载体(Invitrogen)的SalI和HindIII位点之间，以获得pFastBacDual SA质粒。随后将HPV16 L2 ORF融合在SA OFR的5’末端。为此，使用HPV16L2 F和HPV16 L2Δ R，通过PCR从含有野生型L2基因(FN297862)的人密码子改编形式的质粒中扩增HPV16 L2ΔNLS ORF(氨基酸12至442)。设计正向引物以引入BamHI位点和起始密码子上游的Kozak序列，以及含有SalI限制性位点的反向引物。随后，通过TA克隆将PCR产物克隆进pCR2.1载体(Invitrogen)。随后，通过测序来验证不存在不想要的PCR诱导的突变。将pCR2.1-16 L2ANLS和pFastBacDual SA质粒用BamHI和SaII限制性酶切，并将L2基因与Streptactin基因融合，以生成pFastBacDual-16 L2ΔNLS(L2SA)。

[0302] 根据制造商的推荐，使用Bac-to-Bac系统(Invitrogen)生成了编码L2SA的重组杆状病毒。在27℃下，使Sf21昆虫细胞生长于补充有青霉素、链霉素和两性霉素B(Invitrogen)的SF900II培养基中。以m.o.i.10感染细胞并使之生长4天。刮下细胞，以300×g离心并随后重悬于含有0.5％Nonidet P40和抗蛋白酶混合物(Roche，Meylan，France)的PBS 1×中，并在冰上孵育30分钟。将裂解液在4℃以12,000×g离心10分钟，上清液代表细胞质级分。将代表核部分的沉淀进行超声处理(3次脉冲，15秒，Vibracell，Fischer Scientific，France)。通过Western印迹分析L2SA蛋白的表达。为此，将蛋白质通过12.5％SDS PAGE分离并转移至硝酸纤维素膜(Protran BA83，Schleicher and Schuell，Mantes la Ville，France)。在4℃下，将该膜在含有5％低脂奶粉的TNT(15mmol/L Tris，140mmol/L NaCl，0.05％吐温20)中饱和过夜，并随后用TNT-5％奶清洗3次。室温下将膜与在TNT-5％奶中按1/1000稀释的兔多克隆抗L2抗体一起孵育1小时，随后清洗三次并添加碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠IgG Fc(Sigma Aldrich)(1/2,500，在TNT-5％奶中)。在室温下孵育1小时并在TNT-5％奶中清洗三次以及在TNT中清洗两次后，使用BCIP/NBT液体底物系统(Sigma-Aldrich，Saint Quentin Fallavier，France)使免疫斑点显色。根据制造商的说明书(Pierce，Ozyme，Montigny le Bretonneux，France)，将L2SA蛋白在固定的亚氨生物素上通过亲和进行纯化。

[0303] L1L2SA VLP的生产

[0304] 按照以前的描述[Sadeyen等，Virology 2003;309(1):32-40]，在使用允许在野生型HPV16衣壳基因140-141位插入StepTagII肽(STII，WSHPQFEK，SEQ ID NO:12)[Schmidt等，Nat Protoc 2007;2(6):1528-35]的引物的两个PCR步骤后，构建L1 16-StepTagII基

因。在第一个PCR步骤中，使用表现人化密码子使用的L1基因作为模板，并使用正向L116 STII/反向STII和正向STII/反向L116 STII。第二个PCR步骤中，使用正向L116 STII/反向L116 STII引物，以将如此获得的两个重叠片段融合，以便产生L116StrepTagII序列(L1STII)。如上文所述将最终的PCR产物克隆和测序，并最终克隆到pFastBacDual质粒的BamHI和HindIII之间，以产生重组的杆状病毒。

[0305] 通过CsCl梯度超离心从感染的昆虫细胞中纯化VLP。通过在相互作用缓冲液(100mmol/L Tris HCl pH 8,1M Nacl,0.25％Triton X100)中将L1STII VLP与L2SA融合蛋白混合而获得与L1STII VLP结合的L2SA蛋白。为了分析所获得的嵌合VLP(L1L2SA VLP)，在SW-60转子(Beckman)中通过超离心(60,000rpm,1小时)使VLP沉淀，随后通过上文中的Western印迹法分析L2和Strep-Tag的存在。

[0306] 生产具有插入到DE环中的HPV31 L2肽(13-88位)的HPV31 VLP

[0307] 选择HPV31 L2蛋白的交叉中和表位(13-88位氨基酸)用于插入L1蛋白中[Pastrana等,Virology 2005;337(2):365-72;Gambhira等,J Virol 2007;81(21):11585-92;Richards等,PNAS USA 2006;103(5):1522-7]。通过两个PCR步骤[Fleury,Clin Vaccine Immunol 2008;15(1):172-5]构建在140-141位含有限制性位点XhoI和SmaI的HPV31 L1基因序列，以使用pIRES31L1L2h插入HPV 31 L2肽序列13-88位(L213-88)中。在第一个PCR步骤中，使用正向-L1h31/反向-L1和反向-L1h31/正向-L1为引物，扩增HPV L131的5’和3’部分。在第二个PCR步骤中，将这两个片段用作模板，使用正向-L1h31/反向L1h31作为引物。随后将该PCR产物克隆进pCR TOPO 2.1中，测序并亚克隆进之前用BamHI和HindIII酶切的pFastBac1质粒中。从pIRES31L1L2h和L213-88正向和反向引物扩增编码13-88位HPV 31 L2基因片段的DNA，并按上文克隆。用XhoI/SmaI消化pCR 2.1TOPO/L213-88和pFastBac1/L1，以插入编码HPV L2肽的序列。生成编码L1-L213-88蛋白的重组杆状病毒，并按上文所述3感染昆虫细胞。

[0308] 表5.使用的寡核苷酸序列

[0309]

名称	引物(5'→ 3')	限制性位点
for L116 STII	GGATCCCACCATGAGCCTGTGGAGACCCAGC (SEQ ID NO: 51)	BamHI
rev L116 STII	AAGCTTTCACTTCTTGGTTTTCTTCCGCTTG (SEQ ID NO: 52)	HindIII
Rev STII	CTTCTCGAACTGGGGGTGGCTCCAGTTCTCGGTGTCGTCCAGCTTGTTC (SEQ ID NO: 53)	
For STII	TGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAGGCCAGCGCCTACGCCGCCAACGCC (SEQ ID NO: 54)	
Rev-L1h31	AAGCTTTCACTTCTTGGTTTTCTTCCGCTTG (SEQ ID NO: 55)	HindIII
For-L1h31	GGATCCCACCATGAGCCTGTGGAGACCCAGC (SEQ ID NO: 56)	BamHI
rev-L1	CGGGTCTAGAGAATTCTCGAGAGGGCCTCCGGCGTATCTGTTGC SEQ ID NO: 57)	SmaI
for-L1	CTCGAGAATTCTCTAGACCCGGGCACCGATAACAGGGAGTGC (SEQ ID NO: 58)	XhoI
rev-L2	CCCGGGGGCCAGGGTGTCGGTGGCGGT (SEQ ID NO: 59)	SmaI
for-L2	CTCGAGGCCAGCGCCACCCAGCTGTACAAG (SEQ ID NO: 60)	XhoI
HPV16 L2Δ R	GTCGACCATGTAGTAGCTGGGGTGCAGGATG (SEQ ID NO: 61)	SalI
HPV16 L2 F	CCGGATCCGCCACCATGGCCAGCGCCACCCAGCTG (SEQ ID NO: 62)	BamHI
for L231ΔNLS	CCCTCTAGAGCCACCATGGCCAGCGCCACCCAGCTGTAC (SEQ ID NO: 63)	XbaI
rev L231ΔNLS	GCGGCCGCTATCACAGGATGTAGTAGCTGGGGTGCAG (SEQ ID NO: 64)	NotI

[0310] HPV58和HPV31假病毒颗粒的生成

[0311] 使用密码子改变的HPV衣壳基因的细胞系统获得了HPV31和58假病毒颗粒[Bucki等,Methods Mol Med 2005;119:445-62]。简而言之,设计HPV 58L1和L2基因,使其含有在人类中高度表达的基因中最频繁使用的密码子(分别为FN178626和FN178627)。将L1和L2基因克隆进哺乳动物双顺反子表达载体pIRES(BDBiosciences,Clontech)中。将L1基因克隆到CMV IE启动子下游的MCS A的NheI和EcoRI限制性位点之间。随后将L2基因克隆至pIRES-L1的MCS B的XbaI和NotI限制性位点之间。通过经典的酚/氯仿DNA制备法制备了用于生成假病毒颗粒的编码萤光素酶的DNA质粒(pGL3luc,Promega,Charbonnières-les-Bains,France)或pIRES L2ΔNLS。后一种质粒在XbaI和NotI限制性位点之间含有改编HPV31L2的12至442位氨基酸的DNA序列。该序列是从含有人类密码子改编的HPV31全长L2基因的质粒中通过PCR扩增的[Fleury等,Clin Vaccine Immunol 2008;15(1):172-5]。对于293FT细胞中假病毒颗粒的生成,用0.5μg DNA(0.25μg pGL3-Luc,或pCMV-GFP或pIRES-L2质粒,0.25μg L1L2质粒)和1μl Fugene6(Roche)每cm^2培养面积转染细胞。转染后两天收获细胞,并按照以前的描述纯化假病毒颗粒[Fleury等,Clin Vaccine Immunol 2008;15(1):172-5],并在-80℃下保存待用。使用CamVir-1抗体,通过与已知浓度的同源类型的VLP相比较,以western印迹测定假病毒颗粒的量。

[0312] HPV16和18假病毒颗粒的生产

[0313] 通过以前发表的拆分-重新组装法[Touze等,Nucleic Acids Res 1998;26(5):

1317-23]并做一些修改[Bousarghin等,Mol Cancer Ther 2009;8(2):357-65],生产了HPV16和18假病毒颗粒。在室温下,将L1/L2VLP(100μg)在含有20mmol/L DTT和1mmol/L EGTA的50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)中孵育30分钟。在此阶段,向所述破坏的VLP中添加pGL3luc(10μg)。随后在10nM $ZnCl_2$存在下,用递增浓度的$CaCl_2$(高至5mmol/L的终浓度)稀释该制备物。随后,用PBS 1×过夜透析假病毒颗粒并储存在4℃下备用。

[0314] 免疫方案

[0315] 将6周龄的BALB/c小鼠(CERJ Janvier,Le Genest St Isle,France)用不同的疫苗制备物进行肌内免疫。组1的小鼠接受盐水,组2至5的小鼠分别接受有或没有氢氧化铝的10μg HPV 16L2-SA蛋白(L2SA)、L1STII-L2SA(L1L2SA VLP)、HPV16 L1L2(L1L2 VLPs)。组6和7的小鼠分别接受1或10μg pIRES-HPV31 L2ΔNLS质粒(DNA L2)。组8至10的小鼠分别接受HPV31 L1、HPV31 L1-31L213-88VLP(L1/L2(13-88)VLP)、HPV31 L1L2VLP(31L1L2VLP)。组11的小鼠接受10μg含有HEV ORF2108-660表达质粒(HEV PsV)的HPV31假病毒颗粒。组12和13的小鼠分别接受含有GFP表达质粒(GFP PsV)的HPV58假病毒颗粒和包封有HPV31L2ΔNLS质粒(L2PsV)的HPV58假病毒颗粒。通过Western印迹分析在不同的L1L2VLP和假病毒颗粒之间调节L1蛋白的量。在第0、7和21天对小鼠进行免疫。最后一次注射后两周收集血清样品并储存于-20℃。所有动物操作都是按照批准的方案进行的,并且遵从实验动物合理使用和照顾的推荐标准,实验由地区动物伦理委员会(CREEA Centre Limousin)批准。

[0316] 通过ELISA测定抗HPV血清效价

[0317] 将200纳克的VLP分配到96孔板(Maxisorp,Nunc,ATGC,Marne-la-Vallée,France)的一半孔中,并在4℃下孵育过夜。用PBS-吐温(0.1%)清洗两次后,在37℃下用补充有1%FCS的PBS饱和1小时。在45℃下,将孔一式两份(一个测试和一个对照)用以稀释缓冲液(PBS5X,1%吐温,10%FCS)两倍稀释(始于1:25)的小鼠血清孵育1小时。清洗4次后,将在PBS-吐温(1%)-FCS(10%)中按1:1000稀释的过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG(Fc特异性的)(Sigma Aldrich)添加至孔中,并在45℃下孵育1小时。清洗4次后,添加在25mmol/L柠檬酸钠和50mmol/L Na_2HPO_4中的0.4mg/ml邻苯二胺和0.03%过氧化氢。30分钟之后,用$H_2SO_4$4N终止反应并在492nm读取光密度(OD)。对于数据分析,从测试抗原的OD值中减去在L2不存在下获得的OD值。当测试孔与对照孔之间OD差异大于0.2时,结果被认为是阳性的。各效价代表给出OD差异大于0.2的最终稀释度的倒数。各小鼠的值为一式两份的平均值。计算每个组的几何平均效价(geometric mean titer,GMT)。将没有可检出抗体效价(<25)的动物的效价指定为1,以计算GMT。对于抗L2抗体的检测而言,进行与上文中所述相同的ELISA,不同之处是将纯化的L2SA蛋白添加至VLP所在的Nunc板的每个孔中。

[0318] 通过ELISA检测L1、L2和Strep-Tag基序

[0319] 通过ELISA分析了嵌合VLP的L1抗原性和L2或Strep-Tag模体在VLP表面上的存在。在4℃下,用200ng VLP将微滴定板的孔包被过夜。按照上文中的描述,使用抗StrepTagII的单克隆抗体或多克隆的抗L2抗体进行ELISA,用来分别研究VLP表面上的StrepTagII基序和L2蛋白的存在,或使用H16.V5和H31.F16单克隆抗体,以分别研究HPV 16和HPV 31 L1蛋白的构象表位的存在。

[0320] HPV16、18、31和58假病毒颗粒的中和测定

[0321] 通过抑制用含有pGL3-luc质粒的假病毒颗粒对COS-7细胞的假感染来进行中和测

定。在96孔板(TPP,ATGC)中接种COS-7细胞(104/孔)。在37℃下孵育24小时之后,清洗细胞两次,之后加入假病毒颗粒/稀释的血清混合物。调节假病毒颗粒的量以获得0.2RLU的相对萤光素酶活性(Luminoskan Ascent,Thermo scientific,Courtaboeuf,France)(HPV16为1:500、HPV 18为1:50、HPV31为1:800和HPV 58为1:10000),并且将50μl的稀释的假病毒颗粒与50μl以不完全DMEM两倍稀释(从1:25至1:51,200)的小鼠血清混合。在37℃下孵育1小时之后,将所述混合物添加至孔中。37℃下3小时后,添加100μl完全DMEM。

[0322] 在37℃下孵育48h之后,测量萤光素酶的基因表达(萤火虫萤光素酶一步测定试剂盒,Fluoprobes,Interchim,**Montluçon,**France)。结果表示为萤光素酶活性抑制的百分比[Rich ards等,PNAS USA 2006;103(5):1522-7]。表示的数据为以一式两份进行的2至3个测定的均值。中和效价定义为诱导萤光素酶活性降低至少50%的小鼠血清的最高稀释度的倒数。计算每组的几何平均效价。将没有可检测中和性抗体的动物的效价指定为1,以计算GMT。仅在组10、12和13中研究了HPV16中和性抗体。

[0323] 统计学分析

[0324] 比较各抗体效价和几何平均效价,以评价ELISA和中和性应答。使用XLStat软件(Addinsoft,Paris,France)通过t检验比较组的结果(每组10只动物)。

[0325] 结果

[0326] HPV31 L2和HPV16 L2嵌合颗粒以及编码L2的HPV58假病毒颗粒的生产

[0327] 我们生产了两种嵌合L1-L2颗粒,以研究L2疫苗针对广谱HPV类型的保护潜力。为了用L2修饰衣壳的外侧,第一种是基于HPV16L1修饰的VLP蛋白与融合至streptactin的HPV16 L2蛋白之间的相互作用,所述streptactin为链霉亲和素的工程化形式。为实现这一目的,将模拟生物素结合环的序列StrepTagII肽(WSHPQFEK,SEQ ID NO:12)插入到L1蛋白的DE环位置140/141之间,以避免生物素与L1 VLP化学偶联,生物素具有与L1中和表位偶联的风险。当使用重组杆状病毒在Sf-21昆虫细胞中表达和在CsCl梯度上纯化时,L1STII重组蛋白自组装成为与野生型L1蛋白具有相同外观和类似产量的病毒样颗粒(图16)。将载玻片用乙酸铀酰负染并用透射电镜以50000×放大倍数观察(标尺条=200nm)。

[0328] 第二种嵌合型L1/L2蛋白含有插入到HPV31 L1蛋白的DE环中的HPV31L2肽(aa 13-88)。当使用重组杆状病毒在昆虫细胞中表达时,L1L2(13-88位)重组蛋白不允许产生形状良好的VLP,而是主要导致蛋白和/或壳粒的聚集(图16)。

[0329] 通过ELISA,使用针对构象和线性表位的抗L1Mab研究了这两种嵌合VLP的L1抗原性(图17)。结果表明,嵌合型HPV16 L1STII VLP上H16.V5所识别的构象L1表位不受影响。然而,与所观察到的与HPV31L1 VLP的结合相比,观察到了H31.F16Mab与HPV31 L1-L213-88 VLP的结合的明显降低。还通过ELISA,使用分别针对StrepTagII序列或多克隆的抗L2抗体的Mab研究了VLP表面上的StrepTagII或L2肽(13-88)的存在。所获得的结果(图17)显示,StrepTagII和L2序列存在于嵌合VLP的表面上。

[0330] 此外,通过将5μg VLP与对应于1/1质量比(一个L2SA蛋白/一个L1蛋白)的10μg L2SA融合蛋白混合而测定了L1STII VLP与L2SA蛋白结合的能力。通过复合VLP的超离心继之以用western印迹检测L2SA分析了L2SA与L1STII VLP的结合。在超离心沉淀中检测到L2SA和L1STII VLP(图18),表明L2SA蛋白与VLP有效地结合。当L2SA与野生型HPV16 VLP混合时,未观察到结合。ELISA也证明了L2蛋白在L1L2SA VLP中的存在(图17)。在293FT细胞中

生产了包封有编码HPV-31 L2ΔNLS基因的质粒的HPV 58假病毒颗粒。通过感染COS-7细胞研究了其转导L2基因的能力。L2蛋白表达的Western印迹分析表明，转导后两天检测到了L2(图18)。为了排除在COS-7细胞中检出的L2是因为存在输入的假病毒颗粒的可能性，用包封了GFP基因的类似假病毒颗粒转导了COS-7细胞。在这些情况下，未证明L2的存在(图18)。

[0331] 用嵌合VLP和假病毒颗粒免疫的小鼠中的抗HPV16-L2免疫应答

[0332] 在未免疫的小鼠中未检测到抗HPV16L2抗体(组1)。在接受L2SA蛋白的小鼠(组2)中，观察到了348的抗L2 GMT(表6)。在用HPV16L1L2SA VLP和HPV16 L1L2 VLP免疫的小鼠(组3和4)中，观察到了抗L2抗体水平的增加，GMT分别为1160和1055(p＝0.035和p＝0.05)。向HPV16 L1L2 VLP中添加氢氧化铝作为佐剂(组5)进一步以非显著性的方式(p＝0.247)增加了同源性的抗L2抗体的水平。

[0333] 在用HPV31 L1 VLP免疫的小鼠(组8)中未检测到抗L2抗体，但在L1L213-88VLP免疫的所有小鼠(组9)中，GMT为730，而在以LIL2VLP免疫的小鼠(组10)中水平更高，GMT为1100(p＝0.189)。在以对照假病毒颗粒免疫接种的小鼠(组11和12)中，检测到了类似水平的抗L2抗体，GMT为855和1212(p＝0.459)。通过比较这些对照假病毒颗粒，在以编码L2的假病毒颗粒免疫的小鼠中，抗L2GMT(2600)更高(分别为p＝0.001和p＝0.101)。

[0334] 表6：

[0335]

批号	名称	疫苗 L1	疫苗 L2	抗L2	中和滴度 HPV18	中和滴度 HPV31	中和滴度 HPV58
1	盐水	-	-	-	-	-	-
2	L2SA	-	16	348	-	-	-
3	L1L2SA VLPs	16	16	1,600	-	-	-
4	L1L2 VLPs	16	16	1,055	-	-	-
5	L1L2 VLPs +Adj.	16	16	2,064	-	85	-
6	DNA L2 (1μg)	-	31	-	-	-	-
7	DNA L2 (10μg)	-	31	-	-	-	-
8	L1 VLPs	31	-	-	-	2,800	-
9	$L1L2_{(13-88)}$ VLPs	31	31	730	-	-	-
10	L1L2 VLPs	31	31	1,100	-	3,400	65
11	HEV PsV	31	31	855	-	5,198	54
12	GFP PsV	58	58	1,212	-	50	4,650
13	L2 PsV	58	58/31	2,600	400	733	5,382

[0336] 诱导针对HPV18、HPV31和HPV58的中和性抗体

[0337] 用HPV16 L2SA蛋白或HPV16L1L2 VLP免疫的小鼠(组3至5)中均未产生针对异源HPV类型(HPV18、HPV31和HPV58)的中和性抗体(表6)。当向通过L1和L2蛋白的自组装获得的HPV16VLP中添加氢氧化铝时,仅仅检测到针对HPV31的低水平的中和性抗体(GMT85)(组5)。

[0338] 在以HPV31 L1或HPV31 L1L2 VLP和HPV31 HEV PsV免疫的小鼠(组8、10和11)中检测到了同源性的HPV31中和性抗体,GMT分别为2800、3400和5198(图19)。低效价的HPV58中和性抗体仅在接受HPV31 L1L2 VLP(组10)和含有HEV ORF2无关基因的HPV31假病毒颗粒(组11)的小鼠中观察到。在接受HPV31疫苗制备物的来自组8至11的小鼠中,未检测到针对HPV18的中和性抗体。

[0339] 在以HPV58假病毒颗粒免疫接种的小鼠(组12和13)中检测到了高水平的同源中和性抗体,GMT分别为4650和5382。在以编码GFP的假病毒颗粒免疫的小鼠中检测到了低水平的针对HPV31(GMT＝50)的中和性抗体,并且在以编码HPV31L2蛋白的HPV58假病毒颗粒免疫的小鼠中观察到了显著增加的抗HPV31中和性抗体(GMT为733)。仅在用HPV58L2PsV免疫的小鼠中,仅仅检测到针对HPV18的中和性抗体,GMT为400。还研究了来自组10、12和13的小鼠的HPV16中和性抗体。以HPV31 L1L2 VLP免疫接种的小鼠产生了低水平的HPV16中和性抗体,GMT为40。在以编码GFP的HPV58PsV免疫的小鼠(组12)中未检测到HPV16中和性抗体,但在以编码L2的HPV58PsV免疫的小鼠(组13)中检测到了HPV16,GMT为60。

[0340] 专利、专利申请和科学出版物以及参考文献通过引用全文并入本文。

[0341] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0342] 1.一种递送化合物至对象的方法,所述方法包括

[0343] 给对象施用经修饰人乳头瘤病毒(HPV)样颗粒,其中所述颗粒包含一种或多种包封在HPV样颗粒中的异源化合物,所述颗粒包含免疫原性改变的表面蛋白。

[0344] 2.项1的方法,其中所述表面蛋白为具有经修饰FG环序列的经修饰L1蛋白。

[0345] 3.项2的方法,其中所述L1蛋白具有HPV16、HPV31、HPV33、HPV34、HPV35、HPV52、HPV58、HPV73或HPV91血清型的序列,并且其中所述L1蛋白的FG环具有一个或多个氨基酸改变,所述改变使所述蛋白在人对象中的免疫原性发生改变。

[0346] 4.项3的方法,其中所述一个或多个氨基酸改变是在SEQ ID NO:11的X_1-X_{17}中的一个或多个位置上。

[0347] 5.项4的方法,其中在位置X_{16}的氨基酸没有改变。

[0348] 6.项5的方法,其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X11和$X1_4$中的一个或多个是经修饰的。

[0349] 7.项6的方法,其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的2-3个是经修饰的。

[0350] 8.项6的方法,其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的4-7个是经修饰的。

[0351] 9.项6的方法,其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的3个是经修饰的。

[0352] 10.项6的方法,其中SEQ ID NO:11的位置X_6、X_{11}和X_{14}是经修饰的。

[0353] 11.项6的方法，其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}全部都是经修饰的。

[0354] 12.项10的方法，其中所述L1蛋白具有HPV16血清型的序列，其中SEQ ID NO:11的位置X_6、X_{11}和X_{14}分别改变成T、T和N，并且SEQID NO:11的其余位置具有HPV16血清型的特征性氨基酸。

[0355] 13.项10的方法，其中所述L1蛋白具有HPV16血清型的序列，其中位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}分别改变成F、S、T、S、T、T和N，并且SEQ ID NO:11的其余位置具有HPV16血清型的特征性氨基酸。

[0356] 14.前述项中任一项的方法，其中所述一种或多种化合物是治疗剂或医疗剂。

[0357] 15.前述项中任一项的方法，其中所述治疗剂是核酸或小分子。

[0358] 16.项15的方法，其中所述治疗剂是siRNA、shRNA或者编码siRNA或shRNA的核酸。

[0359] 17.项16的方法，其中所述siRNA或shRNA靶向HPV-E6和/或HPV-E7。

[0360] 18.项15的方法，其中所述小分子是抗病毒剂。

[0361] 19.项15的方法，其中所述小分子是抗癌剂。

[0362] 20.项15的方法，其中所述小分子是吉西他滨。

[0363] 21.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒与其它药剂一起施用。

[0364] 22.项21的方法，其中所述其它药剂是抗病毒剂。

[0365] 23.项21的方法，其中所述其它药剂是抗癌剂。

[0366] 24.项21的方法，其中所述其它药剂是吉西他滨。

[0367] 25.前述项中任一项的方法，其中所述医疗化合物是成像剂或造影剂。

[0368] 26.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒施用给对所述表面蛋白的血清型没有中和免疫应答的对象。

[0369] 27.项26的方法，其中所述对象未针对所述表面蛋白的血清型进行过免疫。

[0370] 28.项26的方法，其中所述对象未感染过具有与所述HPV样颗粒中所述表面蛋白的血清型相同血清型的HPV。

[0371] 29.项26的方法，其中所述对象的所述免疫应答是在选择用于施用的HPV样颗粒之前评价的。

[0372] 30.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒施用于粘膜组织。

[0373] 31.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒施用于上皮部位。

[0374] 32.项30的方法，其中所述粘膜组织是宫颈组织。

[0375] 33.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒被表面施用。

[0376] 34.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒被静脉施用。

[0377] 35.前述项中任一项的方法，其中所述HPV样颗粒施用于感染了病毒的组织。

[0378] 36.项35的方法，其中所述病毒是HPV。

[0379] 37.项35的方法，其中所述病毒是疱疹病毒。

[0380] 38.项37的方法，其中所述病毒是HSV。

[0381] 39.项35-38中任一项的方法，其中所述化合物是抗病毒化合物。

[0382] 40.项35-38中任一项的方法，其中所述化合物是靶向病毒RNA的siRNA、hnRNA或反义RNA。

[0383] 41.项35-38中任一项的方法,其中所述化合物是表达靶向病毒RNA之siRNA、hnRNA或反义RNA的质粒。

[0384] 42.前述项中任一项的方法,其中所述HPV样颗粒施用于患有与HPV感染相关的癌的对象。

[0385] 43.前述项中任一项的方法,其中所述HPV样颗粒施用于患有与HPV感染相关病毒感染的对象。

[0386] 44.项43的方法,其中所述病毒感染是HSV感染。

[0387] 45.前述项中任一项的方法,其中所述HPV样颗粒施用于患有与HPV感染相关之细菌或寄生虫感染的对象。

[0388] 46.一种在有免疫系统缺陷的对象中治疗皮肤病症的方法,

[0389] 所述方法包括将前述项中任一项的组合物施用于有免疫系统缺陷的对象的皮肤感染部位,

[0390] 其中所述组合物包含用于治疗皮肤感染的药剂。

[0391] 47.项46的方法,其中所述免疫系统缺陷与HIV感染相关。

[0392] 48.项46的方法,其中所述皮肤感染为病毒、细菌、微生物或寄生虫感染。

[0393] 49.一种方法,包括给患有癌的对象施用前述项中任一项的表面组合物,其中所述组合物包含有效降低癌的生长或发育的化合物,并且其中所述组合物与用于促进施用部位的非特异性免疫应答的组合物一起施用。

[0394] 50.一种方法,包括给患有癌的对象施用前述项中任一项的表面组合物,其中所述组合物包含有效降低癌的生长或发育的化合物,并且其中施用两种或更多种具有不同血清型的不同HPV表面蛋白,以促进施用部位的免疫应答。

[0395] 51.一种向对象施用化合物的方法,所述方法包括:

[0396] 在第一时间段中向对象施用包含化合物的第一HPV样颗粒,和

[0397] 在第二时间段中向对象施用包含所述化合物的第二HPV样颗粒,其中所述第一和第二HPV样颗粒具有不同的血清型。

[0398] 52.项51的方法,其中所述第一和第二HPV样颗粒的血清型独立地为天然或改变的血清型。

[0399] 53.项52的方法,其中所述第一和/或第二HPV样颗粒的血清型是嵌合的血清型。

[0400] 54.一种治疗对象中HPV相关宫颈癌的方法,所述方法包括:

[0401] 给患有HPV相关宫颈癌的对象施用HPV样颗粒,所述颗粒包含一种或多种治疗剂,其量足以治疗所述HPV相关宫颈癌。

[0402] 55.项54的方法,其中所述HPV样颗粒表面施用。

[0403] 56.项54的方法,其中所述HPV样颗粒表面施用于上皮或其附近,所述上皮例如宫颈上皮;或者表面施用于上皮病变处或其附近,所述病变例如宫颈癌或肛门上皮癌。

[0404] 57.一种用于将化合物递送给对象的组合物,所述组合物包含经修饰人乳头瘤病毒(HPV)样颗粒,其中所述颗粒包含包封于HPV样颗粒中的一种或多种异源化合物,所述颗粒包含免疫原性改变的表面蛋白。

[0405] 58.项57的所述组合物,其中所述衣壳蛋白是L1蛋白。

[0406] 59.项58的所述组合物,其中所述L1蛋白具有经修饰FG环序列。

[0407] 60.项59的所述组合物，其中所述L1蛋白具有HPV16、HPV31、HPV33、HPV34、HPV35、HPV52、HPV58、HPV73或HPV91血清型的序列，并且其中所述L1蛋白的FG环具有一个或多个氨基酸改变，所述改变使该蛋白在人对象中的免疫原性发生改变。

[0408] 61.项60的所述组合物，其中所述一个或多个氨基酸改变是在SEQ ID NO:11的X_1-X_{17}中的一个或多个位置处。

[0409] 62.项59-61中任一项的组合物，其中位置X_{16}的氨基酸没有改变。

[0410] 63.项59-61中任一项的组合物，其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的一个或多个是经修饰的。

[0411] 64.项63的组合物，其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的2-3个是经修饰的。

[0412] 65.项63的组合物，其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的4-7个是经修饰的。

[0413] 66.项63的组合物，其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}中的3个是经修饰的。

[0414] 67.项63的组合物，其中SEQ ID NO:11的位置X_6、X_{11}和X_{14}是经修饰的。

[0415] 68.项63的组合物，其中SEQ ID NO:11的位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}全部是经修饰的。

[0416] 69.项67的组合物，其中所述L1蛋白具有HPV16血清型的序列，其中SEQ ID NO:11的位置X_6、X_{11}和X_{14}分别改变成T、T和N，并且SEQ ID NO:11的其余位置具有HPV16血清型的特征性氨基酸。

[0417] 70.项68的组合物，其中所述L1蛋白具有HPV16血清型的序列，其中位置X_1、X_2、X_3、X_5、X_6、X_{11}和X_{14}分别改变成F、S、T、S、T、T和N，并且SEQ ID NO:11的其余位置具有HPV16血清型的特征性氨基酸。

[0418] 71.项57的组合物，其中所述一种或多种化合物是治疗剂或医疗剂。

[0419] 72.项71的组合物，其中所述治疗剂是核酸或小分子。

[0420] 73.项72的组合物，其中所述治疗剂是siRNA、shRNA或者编码siRNA或shRNA的核酸。

[0421] 74.项73的组合物，其中所述siRNA或shRNA靶向HPV-E6和/或HPV-E7。

[0422] 75.项72的组合物，其中所述小分子是抗病毒剂。

[0423] 76.项75的组合物，其中所述小分子是抗癌剂。

[0424] 77.项75的组合物，其中所述小分子是吉西他滨。

[0425] 78.项57的组合物，其中所述HPV样颗粒包含L1蛋白，或者包含L1蛋白与L2蛋白。

[0426] 79.项57的所述组合物，其中所述表面蛋白是嵌合的，并且包含融合进L1环中的L2序列。

[0427] 80.项57的组合物，其中所述L2序列附着至L1颗粒的表面。

[0428] 81.项79或80的组合物，其中所述L2序列是HPV31L2蛋白的13至88位残基。

序列表

<110> INSERM, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale
Aura Biosciences
Coursaget, Pierre L.
Touze, Antoine A.
Fleury, Maxime J.J.
Combelas, Nicolas
Muniz, Edmundo
de los Pinos, Elisabet

<120> HPV颗粒及其用途

<130> A0915.70002WO00

<150> US 61/168914

<151> 2009-04-13

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 1

Phe Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val
1 5 10 15
Pro Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala
20 25 30
Ser Ser Asn Tyr Phe Pro Thr
35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 2

Phe Val Arg His Phe Phe Asn Arg Ser Gly Thr Val Gly Glu Ser Val
1 5 10 15

Pro Thr Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Ala
20 25 30
Asn Ser Thr Tyr Phe Pro Thr
35

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 3

Phe Val Arg His Phe Phe Asn Arg Ala Gly Lys Leu Gly Glu Ala Val
1 5 10 15
Pro Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ala Ser Ile Gln
20 25 30
Ser Ser Ala Phe Phe Pro Thr
35

<210> 4
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 4

Phe Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Asp Ala Ile
1 5 10 15
Pro Asp Asp Leu Met Ile Lys Gly Thr Gly Asn Thr Ala Ser Pro Ser
20 25 30
Ser Cys Val Phe Tyr Pro Thr
35

<210> 5
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 5

Phe Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Pro Ala Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Thr Thr Gly Thr Leu Pro Ser Thr
20 25 30
Ser Tyr Phe Pro Thr
35

<210> 6
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 6

Phe Val Arg His Phe Phe Asn Arg Ala Gly Thr Leu Gly Asp Pro Val
1 5 10 15
Pro Gly Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
20 25 30
Val Gln Ser Ser Ala Phe Phe Pro Thr
35 40

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 7

Phe Val Arg His Phe Phe Asn Arg Ala Gly Lys Leu Gly Glu Ala Val
1 5 10 15
Pro Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Asn Thr Ala Val Ile Gln
20 25 30
Ser Ser Ala Phe Phe Pro Thr
35

<210> 8
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 8

Phe Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Asp Thr Gly Asp Lys Ile
1 5 10 15

Pro Asp Asp Leu Met Ile Lys Gly Thr Gly Asn Thr Ala Thr Pro Ser
20 25 30
Ser Cys Val Phe Tyr Pro Thr
35

<210> 9
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 9
Phe Val Arg His Phe Phe Asn Arg Ala Gly Thr Thr Gly Asp Ala Val
1 5 10 15
Pro Lys Asp Leu Tyr Ile Ala Gly Thr Gly Asn Arg Ala Asn Ile Ala
20 25 30
Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Thr
35

<210> 10
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(27)
<223> X = 任何氨基酸或无氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(34)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> X = 任何氨基酸
<400> 10

```
Phe Val Arg His Phe Phe Asn Arg Ala Gly Xaa Val Gly Glu Xaa Val
1               5                  10                  15
Pro Xaa Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Xaa Xaa Gly Asn Thr Ala Xaa
            20                  25                  30
Xaa Xaa Ser Ser Xaa Phe Phe Pro Thr
        35                  40
```

<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(12)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X = E or D
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X = V or I
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X = S or T
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(27)
<223> X = 任何氨基酸或无氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(30)
<223> X = 任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> X = A or G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(37)
<223> X = 任何氨基酸
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(39)
<223> X = F or Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> X = 任何氨基酸
<400> 11
Phe Val Arg His Xaa Phe Asn Arg Xaa Gly Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Pro Xaa Asp Leu Xaa Ile Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
35 40
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 12
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5
<210> 13
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 13
uacaacaaac cguugugug 19
<210> 14
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 14
cuaacuaaca cuggguuau 19

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = t
<400> 15
gagguauaug acuuugcuun n 21
<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> n = t
<400> 16
nncuccauau acugaaacga a 21
<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n = t
<400> 17
aggaggauga aauagauggn n 21
<210> 18
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> n = t
<400> 18
nnuccuccua cuuuaucuac c 21
<210> 19
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 19
caccagagtt caaaagccct tcatcgaaat gaagggcttt tgaactc 47
<210> 20
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 20
aaaaagagtt caaaagccct tcatttcgat gaagggcttt tgaactc 47
<210> 21
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 21
caccgctaca caaatcagcg atttcgaaaa atcgctgatt tgtgtag 47
<210> 22
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 22
aaaactacac aaatcagcga tttttcgaaa tcgctgattt gtgtagc 47
<210> 23
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 23
caccaggagg atgaaataga tggttcgaaa accatctatt tcatcctcc 49
<210> 24
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 24
aaaaggagga tgaaatagat ggttttcgaa ccatctattt catcctcct 49
<210> 25
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 25
caccgcccat tacaatattg taacccgaag gttacaatat tgtaatgggc 50
<210> 26
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 26
aaaagcccat tacaatattg taaccttcgg gttacaatat tgtaatgggc 50
<210> 27
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的寡核苷酸
<400> 27
caacgaggta tatgactttg cttttcgaaa aaagcaaagt catatacctc 50
<210> 28
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 28
aaaagaggta tatgactttg ctttttttcga aaagcaaagt catatacctc 50
<210> 29
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 29
caccggtcga tgtatgtctt gttgccgaag caacaagaca tacatcgacc 50
<210> 30
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 30
aaaaggtcga tgtatgtctt cttgcttcgg caacaagaca tacatcgacc 50
<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 31
caccaaaaga gaactgcaat gt 22
<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 32
ttgctgttct aatgttgttc ca 22
<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 33
ggagatacac ctacattgca tga 23
<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 34
ggggcacaca attcctagtg 20
<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 35
acagtccatg ccatcactgc c 21
<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 36
gcctgcttca ccaccttctt g 21
<210> 37
<211> 31
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 37
ggatcccacc atgagcctgt ggagacccag c 31
<210> 38
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 38
ggaagcttat gtggtggtgc tggcgctggg ggc 33
<210> 39
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 39
gcaagcttag gcctgcagca ggaactttct gccc 34
<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 40
ccgctagcca ccatgagcct gtggagaccc 30
<210> 41
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 41
ctctctgctg gcggggtcgt tgaagaagtg ccgcacgaa 39
<210> 42
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 42
cggaattcta tcacttcttg gttttcttcc 30
<210> 43
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 43
gaccccgcca gcagagagag aagcggcacc gtgggcgag 39
<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 44
Ser Val Pro Thr Asp Leu Tyr Ile Lys
1 5
<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 45
Arg His Phe Phe Asn Arg Ser Gly Thr Val
1 5 10
<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 46

Asp Leu Ile Tyr Lys
1 5
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 47
Arg His Phe Phe Asn Arg Ser Gly
1 5
<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 48
Ser Gly Thr Val Gly Glu Ser Val Pro
1 5
<210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 49
Arg Ser Gly Thr Val Gly
1 5
<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 50
Arg Ser Gly Thr Val Gly Glu Ser Val
1 5
<210> 51

<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 51
ggatcccacc atgagcctgt ggagacccag c 31
<210> 52
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 52
aagctttcac ttcttggttt tcttccgctt g 31
<210> 53
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 53
cttctcgaac tgggggtggc tccagttctc ggtgtcgtcc agcttgttc 49
<210> 54
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 54
tggagccacc cccagttcga gaaggccagc gcctacgccg ccaacgcc 48
<210> 55
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 55
aagctttcac ttcttggttt tcttccgctt g 31

<210> 56
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 56
ggatcccacc atgagcctgt ggagacccag c 31
<210> 57
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 57
cgggtctaga gaattctcga gagggcctcc ggcgtatctg ttgc 44
<210> 58
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 58
ctcgagaatt ctctagaccc gggcaccgat aacagggagt gc 42
<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 59
cccgggggcc agggtgtcgg tggcggt 27
<210> 60
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的寡核苷酸
<400> 60

ctcgaggcca gcgccaccca gctgtacaag 30

<210> 61

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 61

gtcgaccatg tagtagctgg ggtgcaggat g 31

<210> 62

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 62

ccggatccgc caccatggcc agcgccaccc agctg 35

<210> 63

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 63

ccctctagag ccaccatggc cagcgccacc cagctgtac 39

<210> 64

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 64

gcggccgcta tcacaggatg tagtagctgg ggtgcag 37

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 65

Asp Pro Ala Ser Arg Glu
1 5

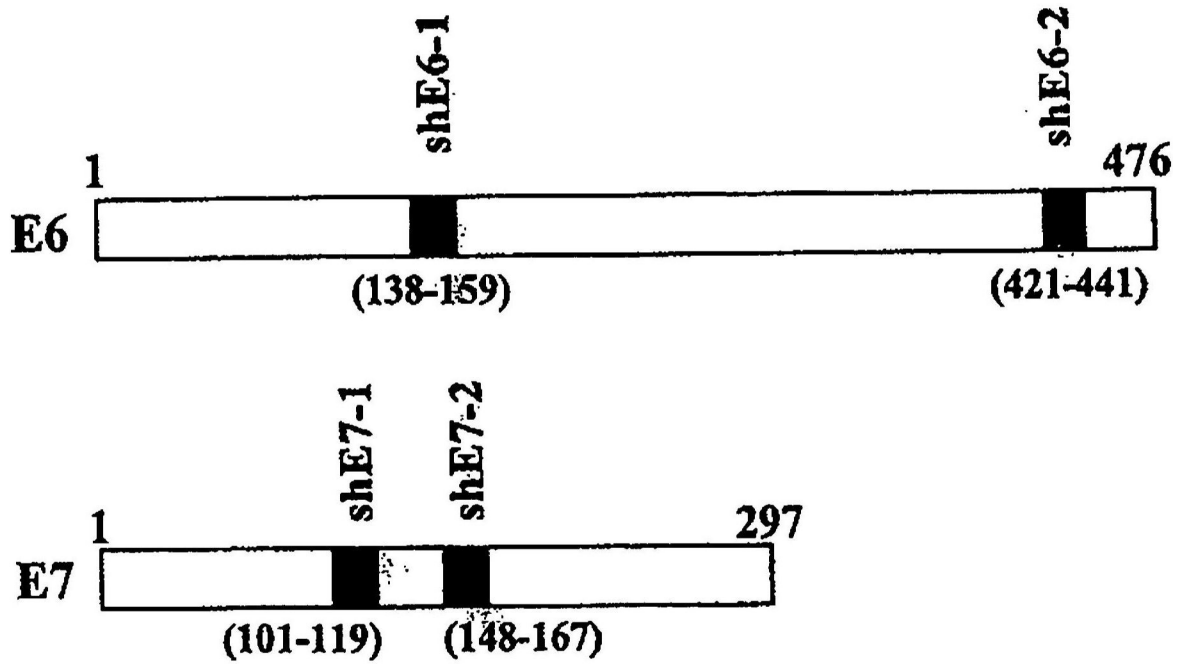

shE6-1
shE6-2
1
476
E6
(138-159)
(421-441)
shE7-1
shE7-2
1
297
E7
(101-119)
(148-167)

图1

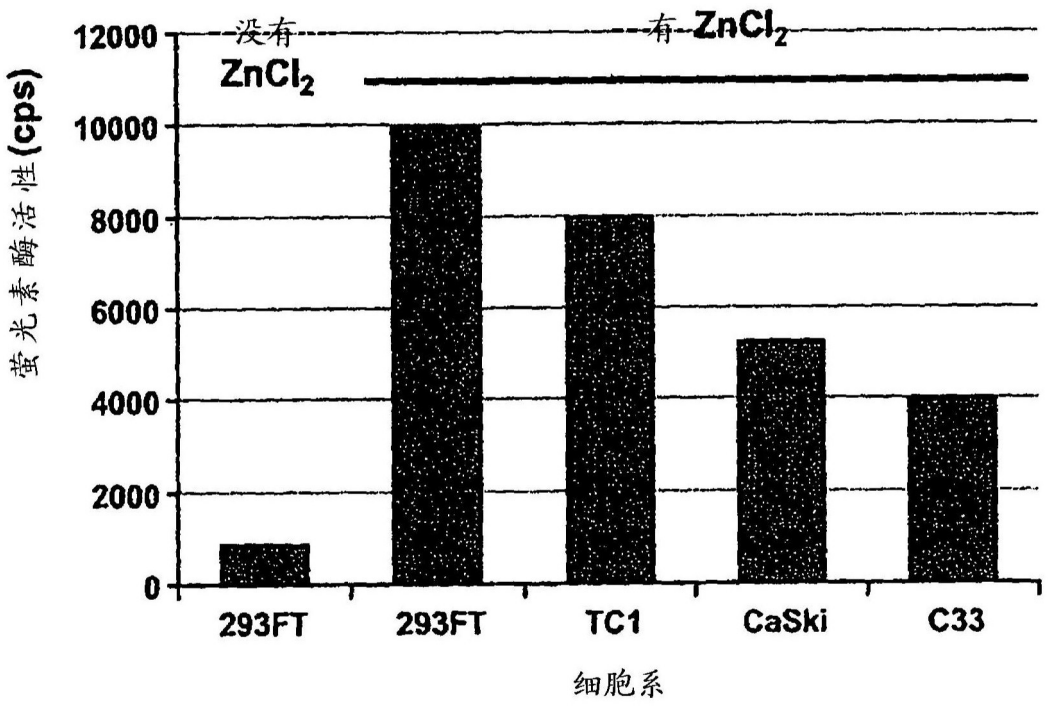

没有 ZnCl2
有 ZnCl2
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
萤光素酶活性(cps)
293FT
293FT
TC1
CaSki
C33
细胞系

图2

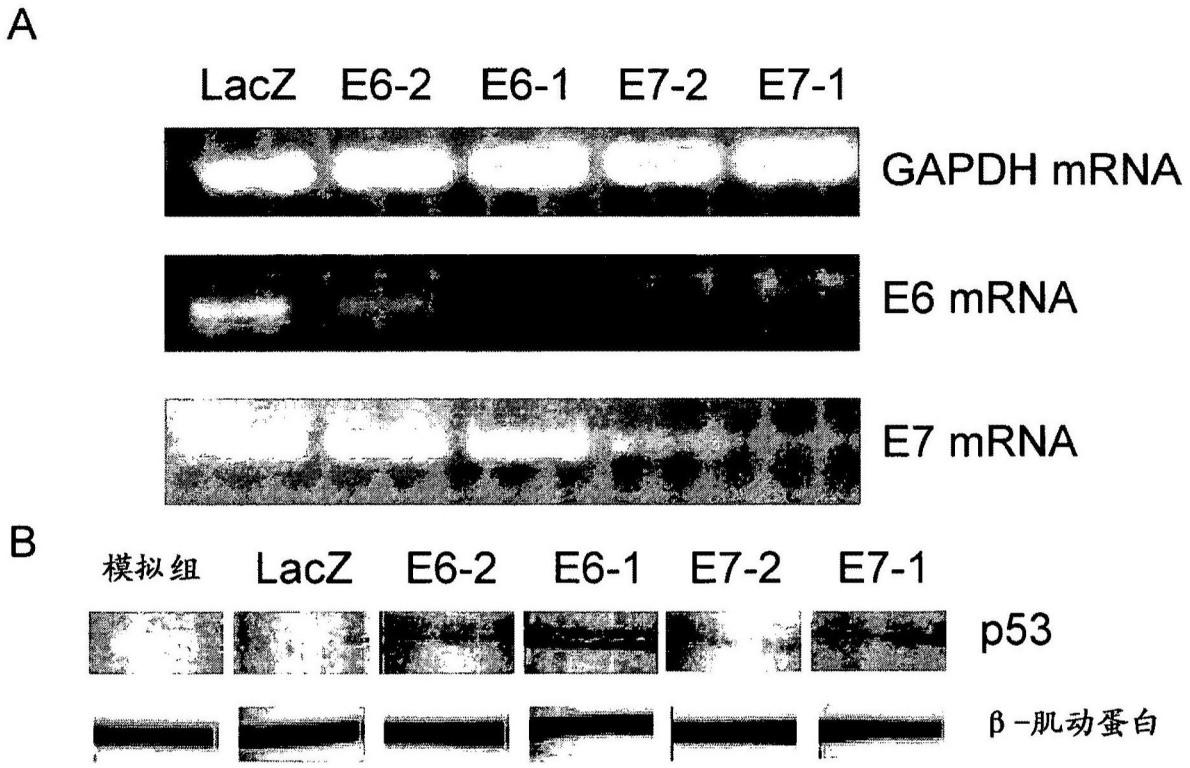

A
LacZ
E6-2
E6-1
E7-2
E7-1
GAPDH mRNA
E6 mRNA
E7 mRNA
B
模拟组
LacZ
E6-2
E6-1
E7-2
E7-1
p53
β-肌动蛋白

图3

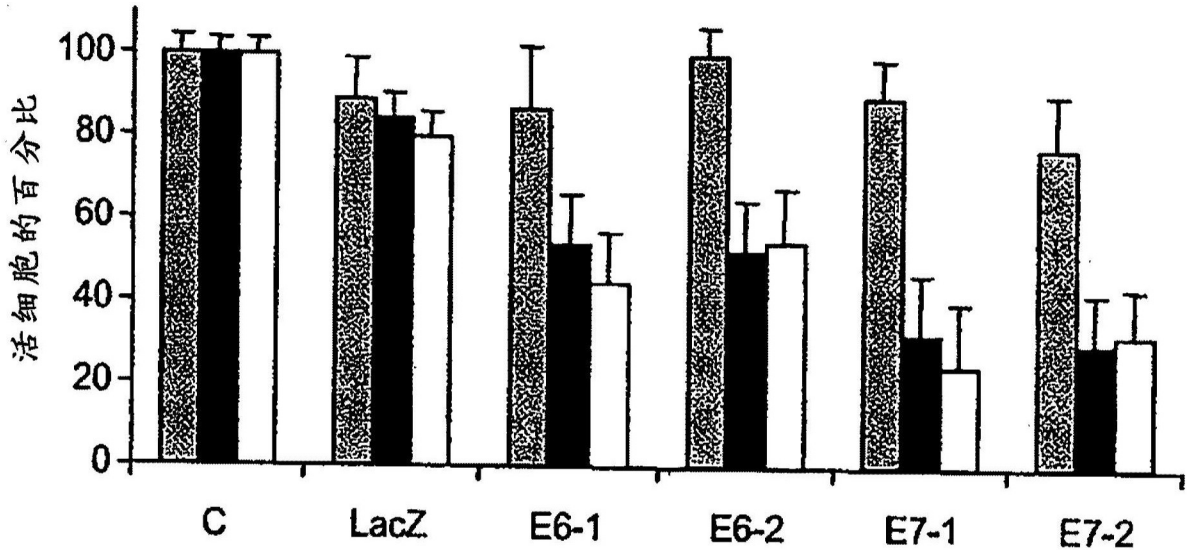
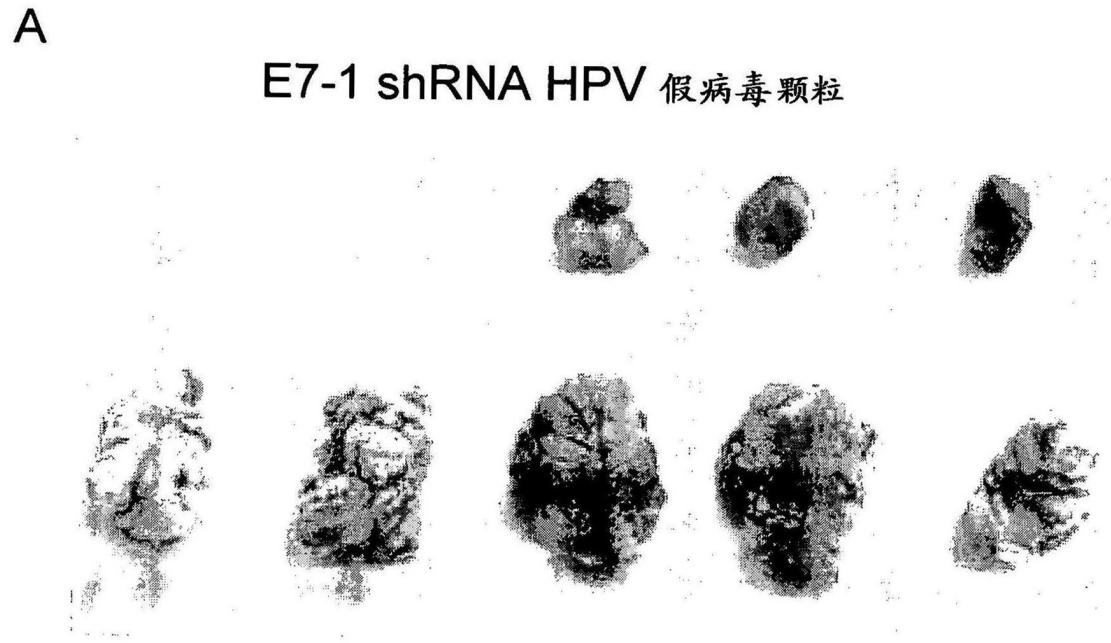

活细胞的百分比
100
80
60
40
20
0
C
LacZ
E6-1
E6-2
E7-1
E7-2

图4


A
E7-1 shRNA HPV 假病毒颗粒
单独的VLP

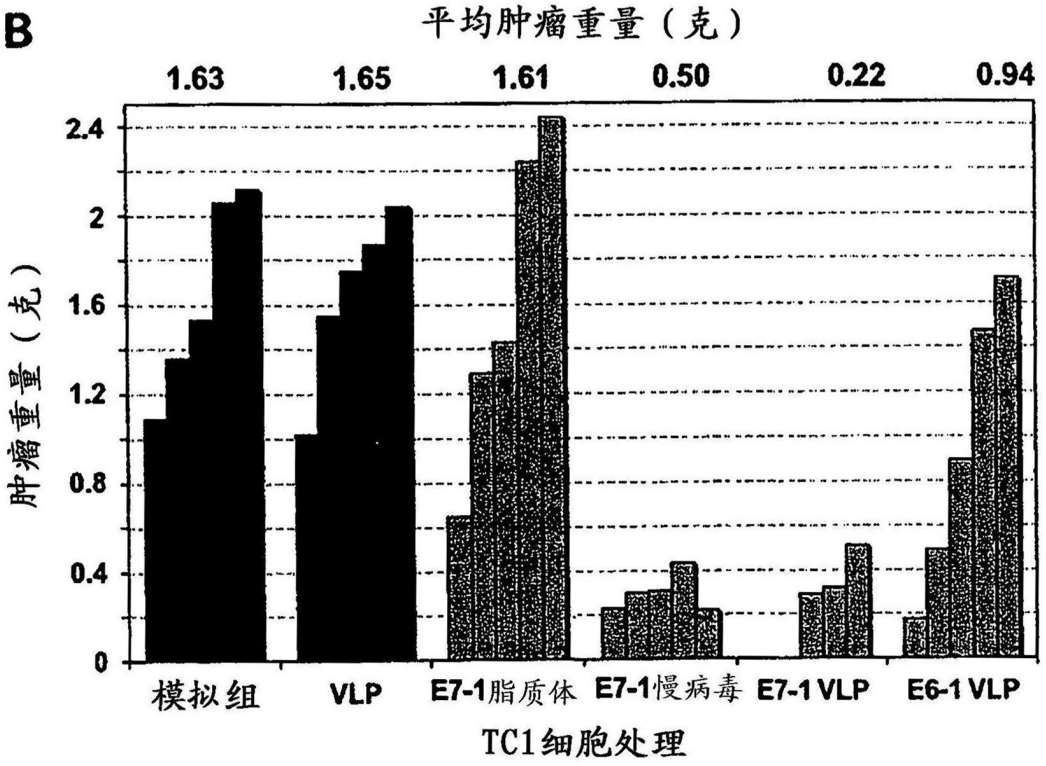
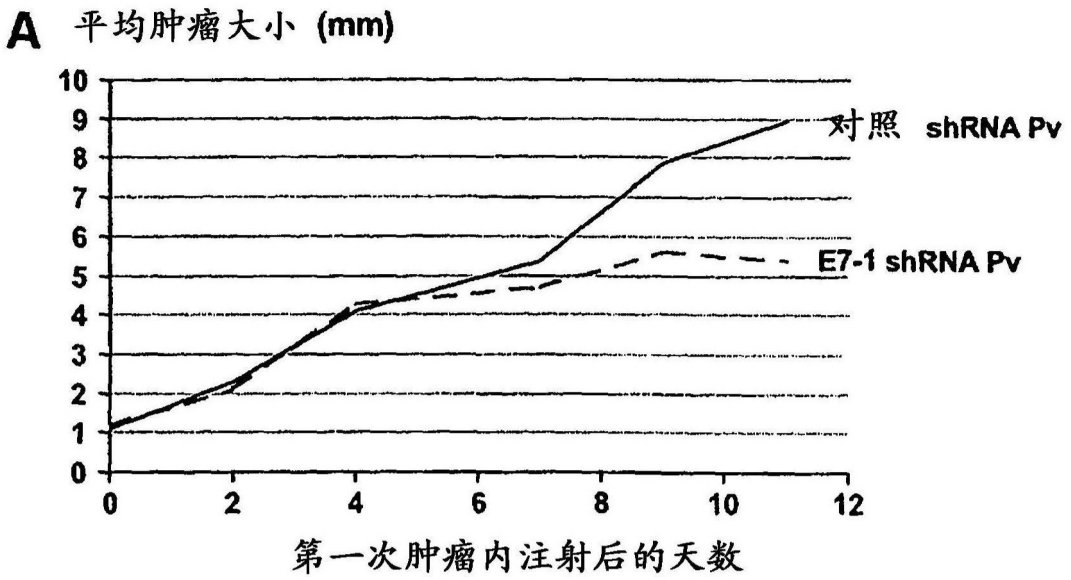

B
平均肿瘤重量（克）
1.63
1.65
1.61
0.50
0.22
0.94
肿瘤重量（克）
2.4
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
模拟组
VLP
E7-1脂质体
E7-1慢病毒
E7-1 VLP
E6-1 VLP
TC1细胞处理

图5


A 平均肿瘤大小 (mm)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
10
12
对照 shRNA Pv
E7-1 shRNA Pv
第一次肿瘤内注射后的天数

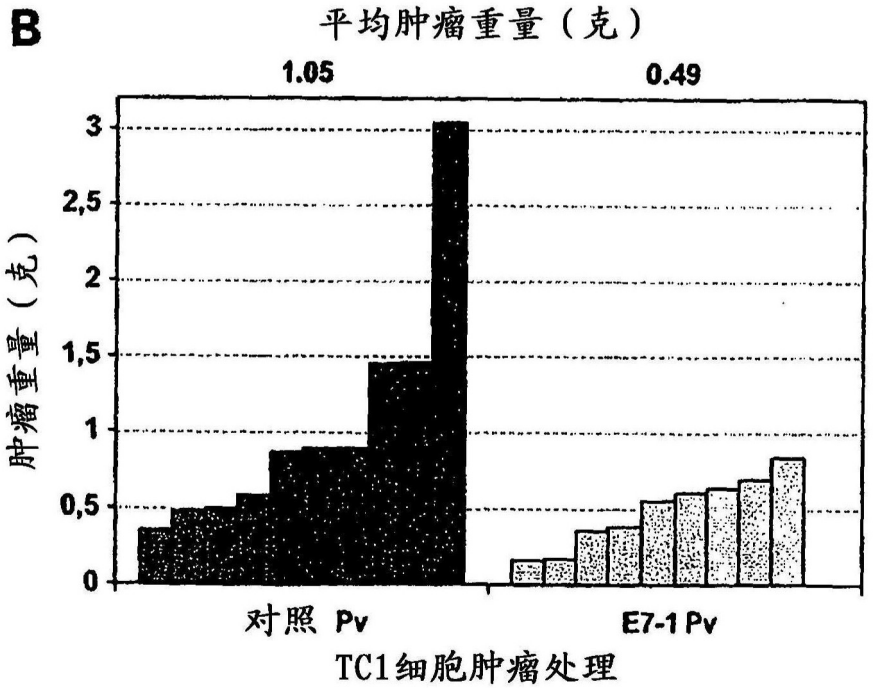

B
平均肿瘤重量（克）
1.05
0.49
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
肿瘤重量（克）
对照 Pv
E7-1 Pv
TC1细胞肿瘤处理

图6

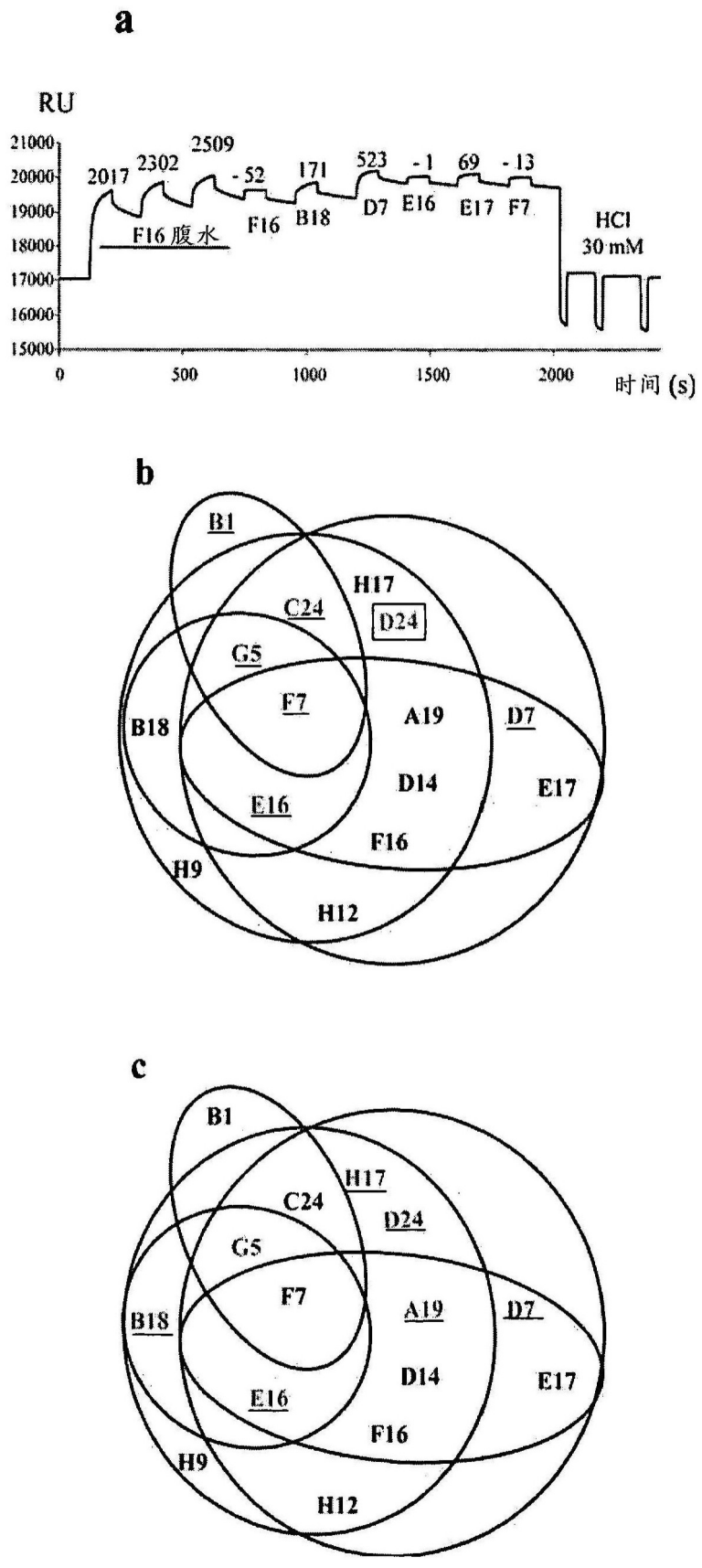

a
RU
21000
20000
19000
18000
17000
16000
15000
2017
2302
2509
-52
171
523
-1
69
-13
F16 腹水
F16
B18
D7
E16
E17
F7
HCl
30 mM
0
500
1000
1500
2000
时间 (s)
b
B1
H17
C24
D24
G5
F7
A19
D7
B18
D14
E17
E16
F16
H9
H12
c
B1
H17
C24
D24
G5
F7
A19
D7
B18
D14
E17
E16
F16
H9
H12

图7

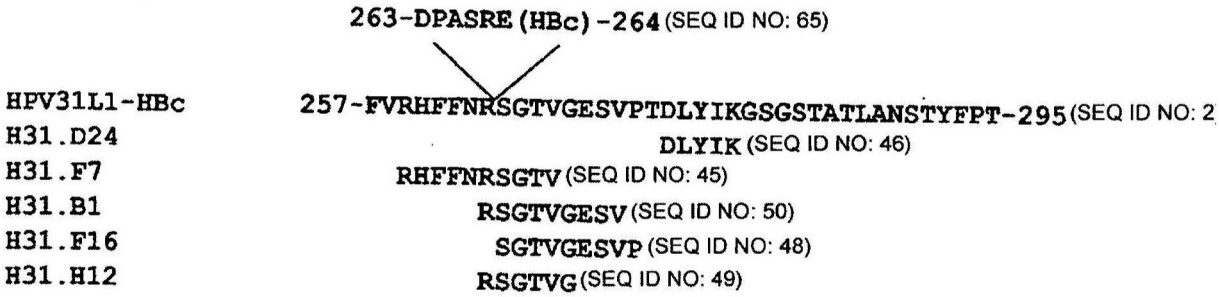

263-DPASRE (HBc) -264 (SEQ ID NO: 65)
HPV31L1-HBc
257-FVRHFFNRSGTVGESVPTDLYIKGSGSTATLANSTYFPT-295 (SEQ ID NO: 2
H31.D24
DLYIK (SEQ ID NO: 46)
H31.F7
RHFFNRSGTV (SEQ ID NO: 45)
H31.B1
RSGTVGESV (SEQ ID NO: 50)
H31.F16
SGTVGESVP (SEQ ID NO: 48)
H31.H12
RSGTVG (SEQ ID NO: 49)

图8

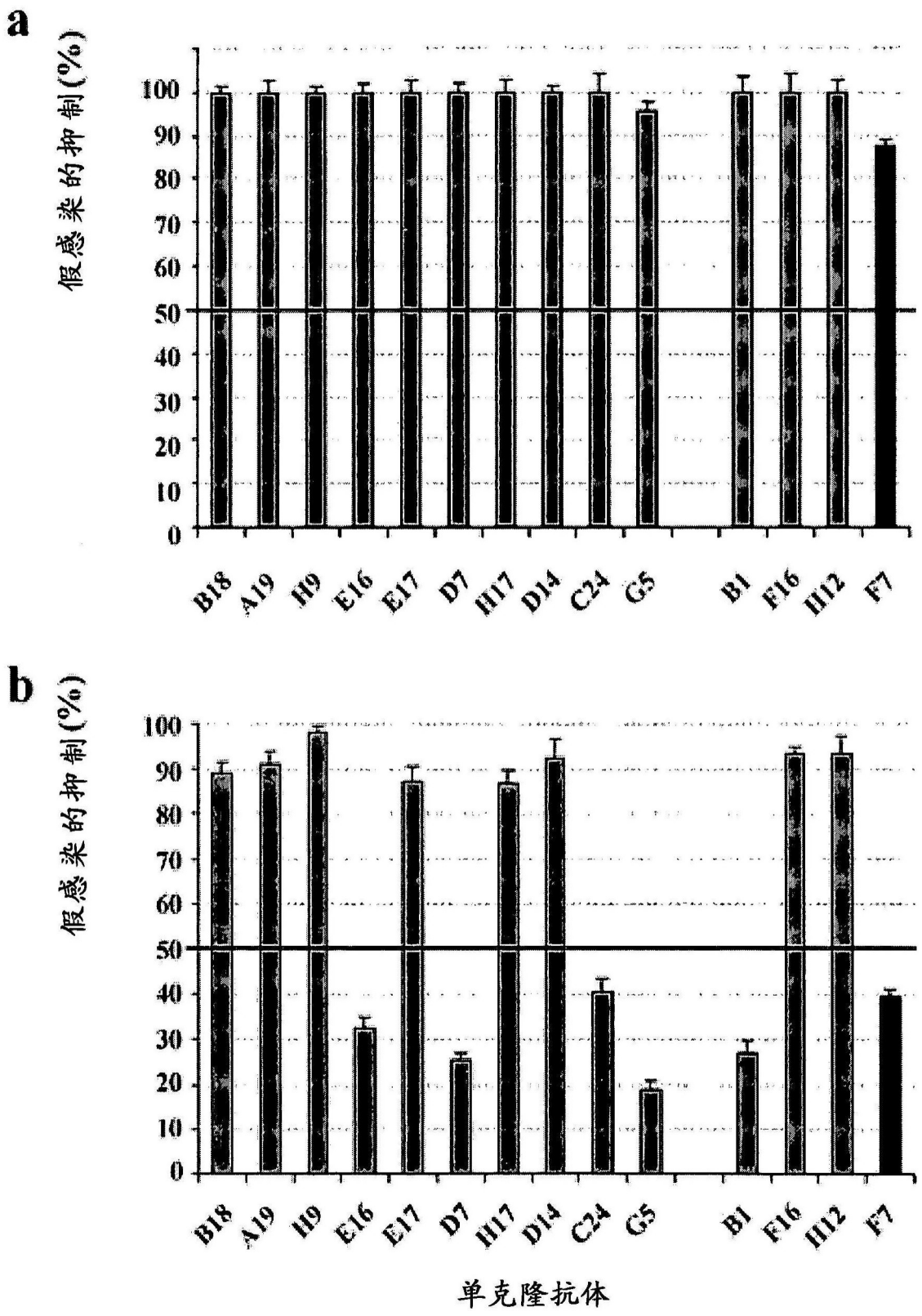

a
假感染的抑制(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B18
A19
H9
E16
E17
D7
H17
D14
C24
G5
B1
F16
H12
F7
b
假感染的抑制(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B18
A19
H9
E16
E17
D7
H17
D14
C24
G5
B1
F16
H12
F7
单克隆抗体

图9

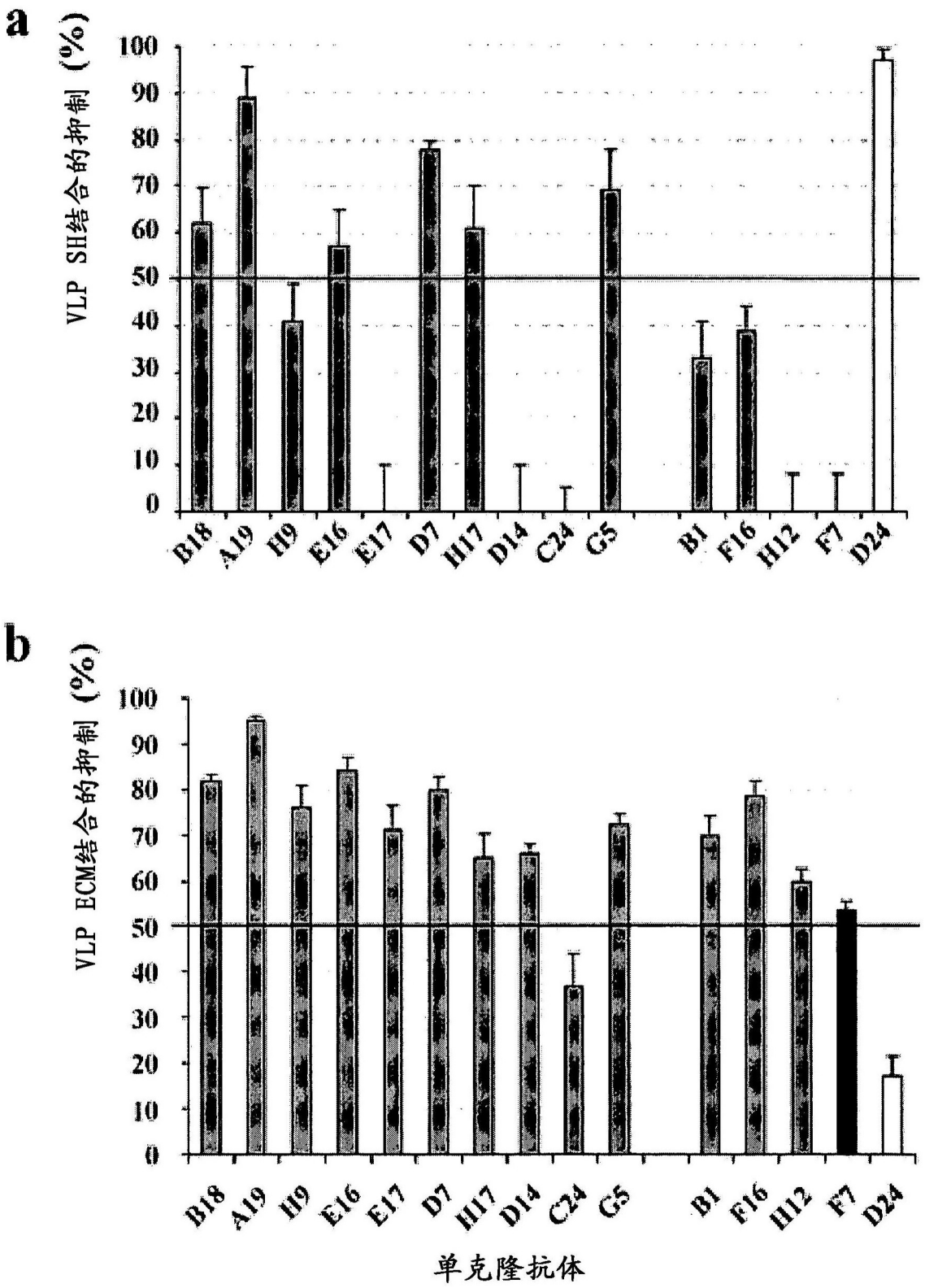

a
VLP SH结合的抑制 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B18
A19
H9
E16
E17
D7
H17
D14
C24
G5
B1
F16
H12
F7
D24
b
VLP ECM结合的抑制 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B18
A19
H9
E16
E17
D7
H17
D14
C24
G5
B1
F16
H12
F7
D24
单克隆抗体

图10

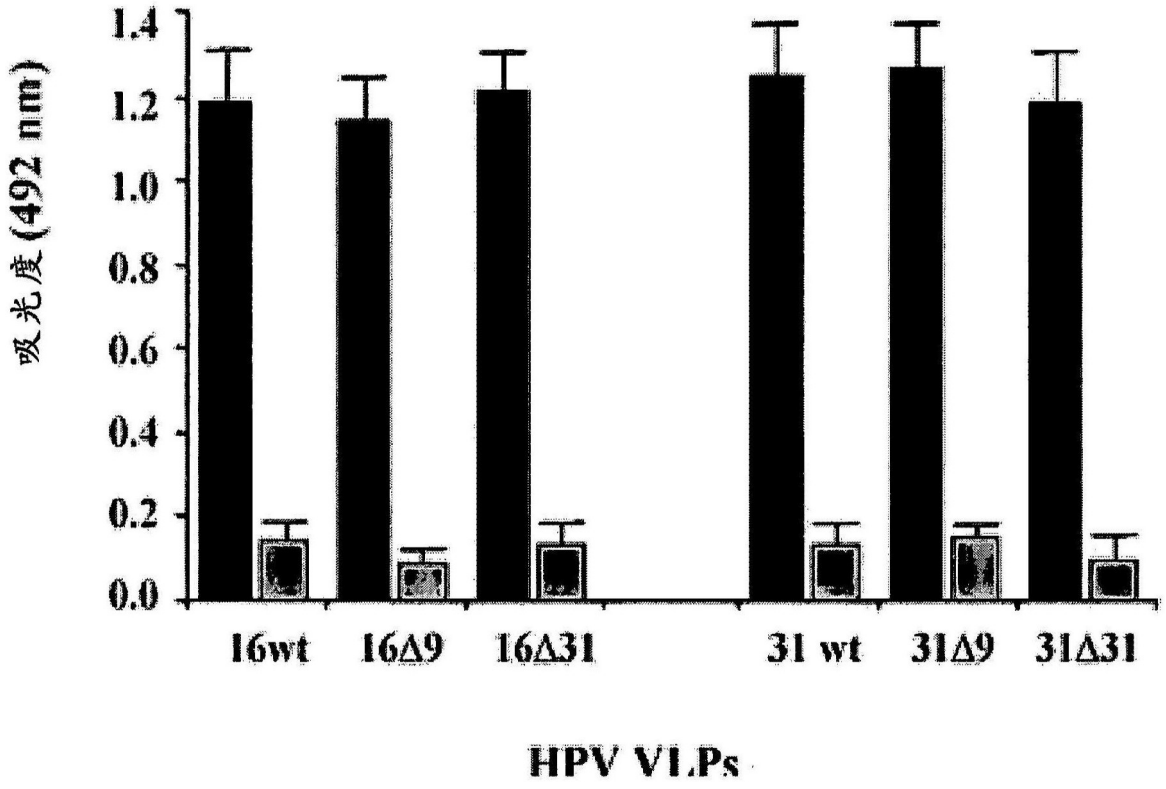

吸光度(492 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
16wt
16Δ9
16Δ31
31 wt
31Δ9
31Δ31
HPV VLPs

图11

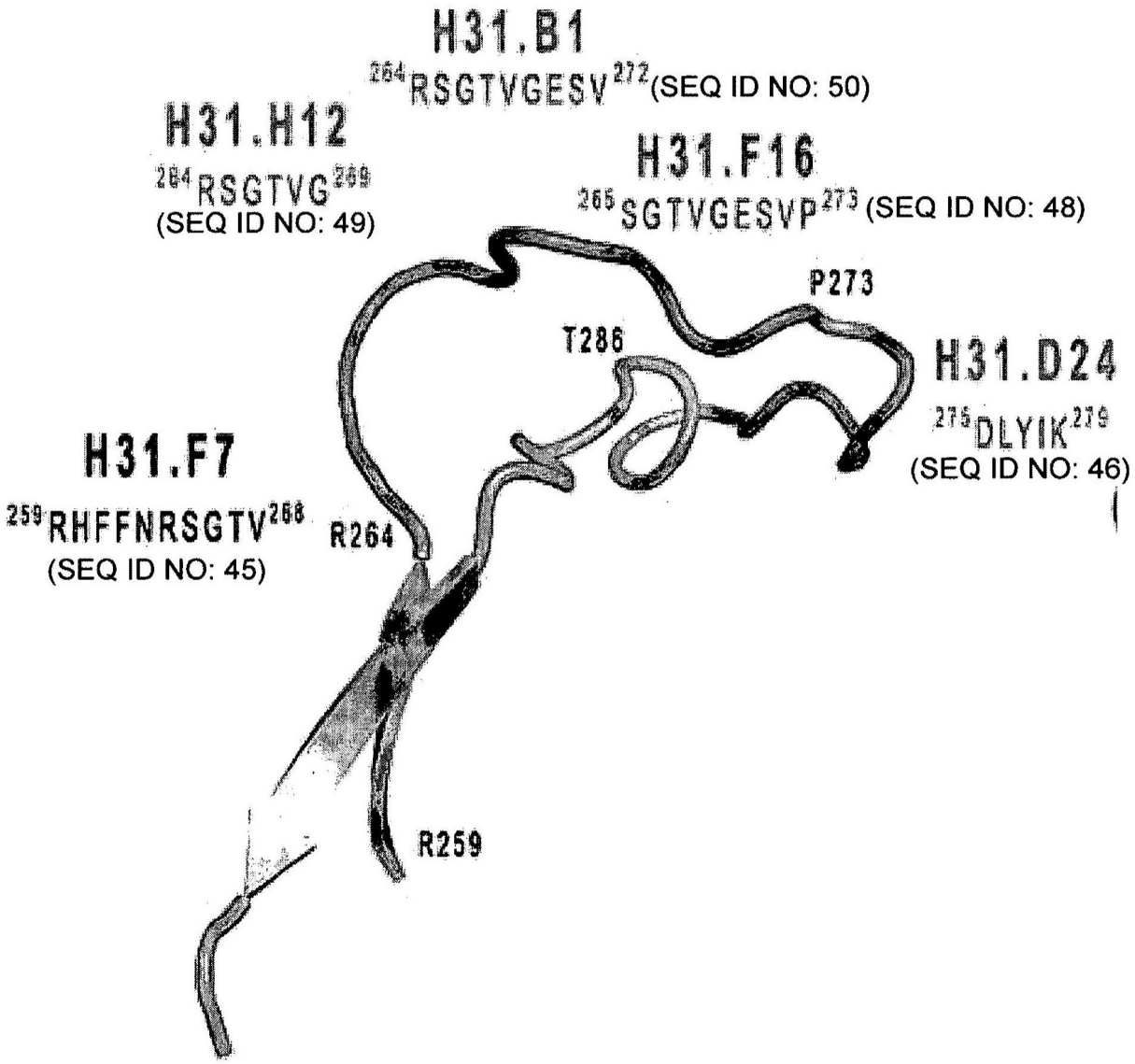


图12

```
16  256-FVRHLFNRAGAVGENVPDDLYIKGSGSTANLASSNYFPT-294 (SEQ ID NO: 1)
X       -----------------T-----------T--N------
Y       ----F---S-T---S--T-----------T--N------
31  257-FVRHFFNRSGTVGESVPTDLYIKGSGSTATLANSTYFPT-295 (SEQ ID NO: 2)
```

图13

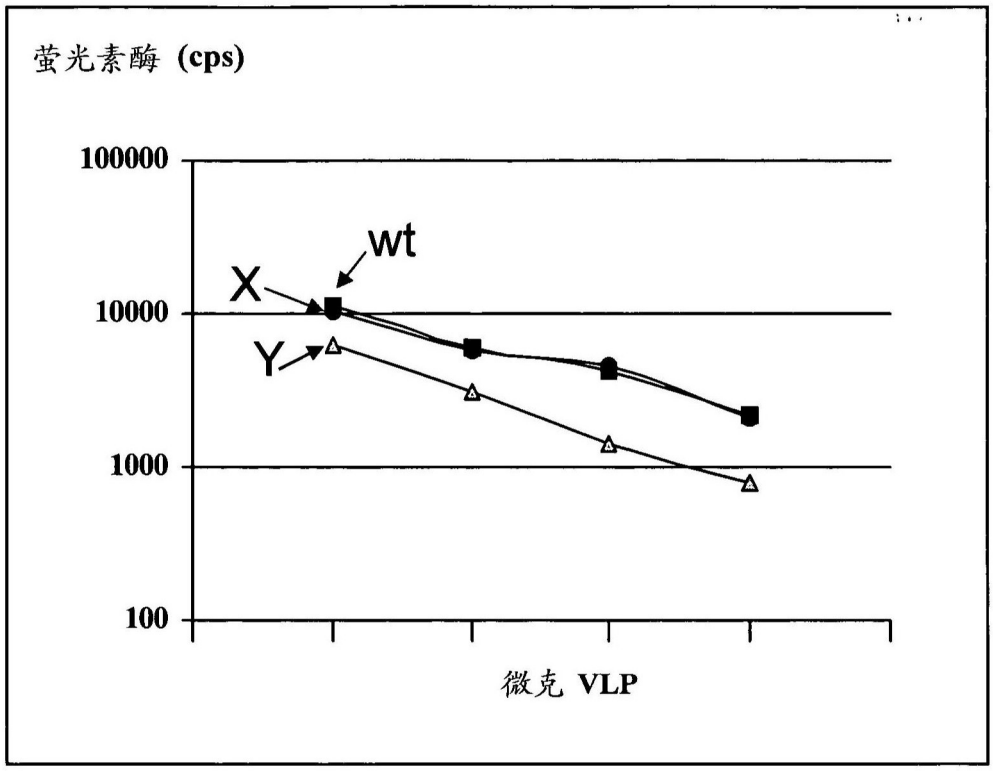


图14

在免疫接种的小鼠中观察到的抗体滴度 (GMT)

HPV的ELISA	用HPV免疫接种的小鼠			
	16	31	X	Y
16	2,016	11	28	32
31	13	1,903	<10	<10
X	18	<10	1,838	538
Y	36	<10	857	2,111

图15

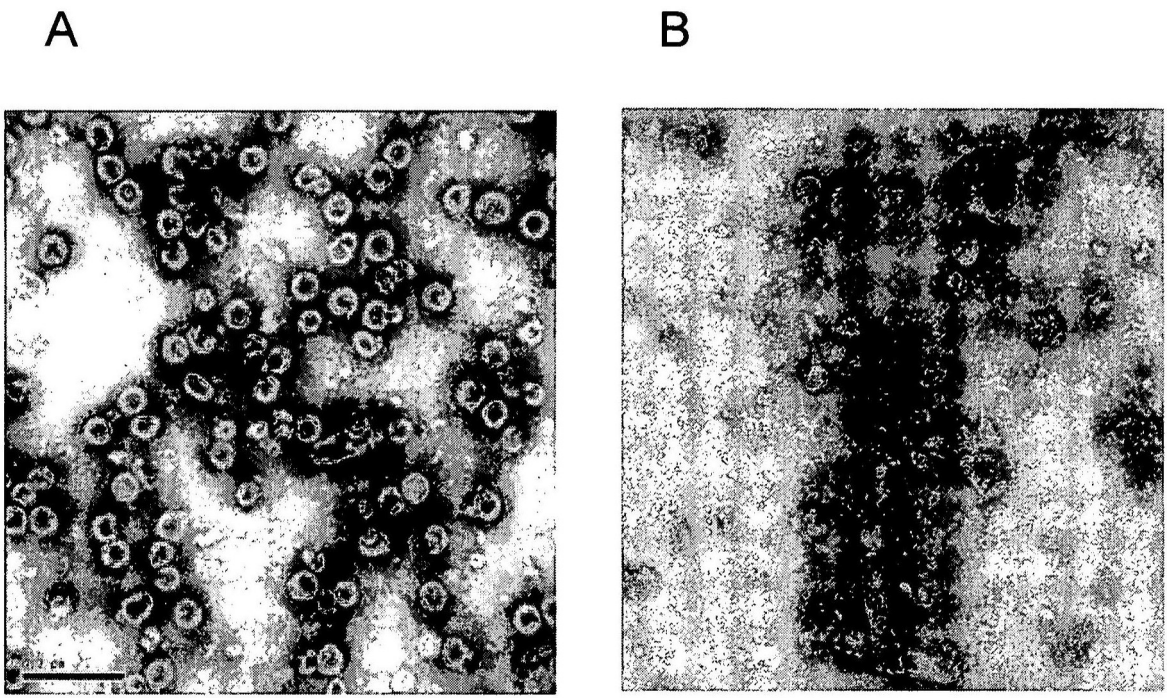
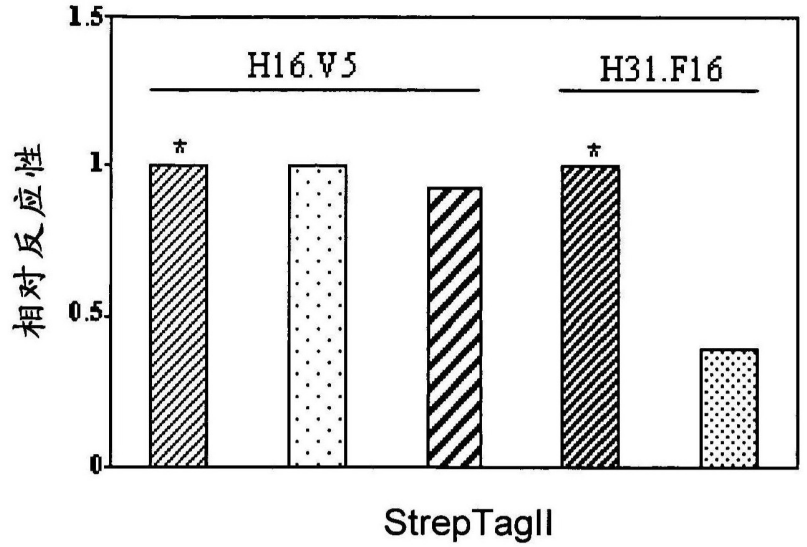
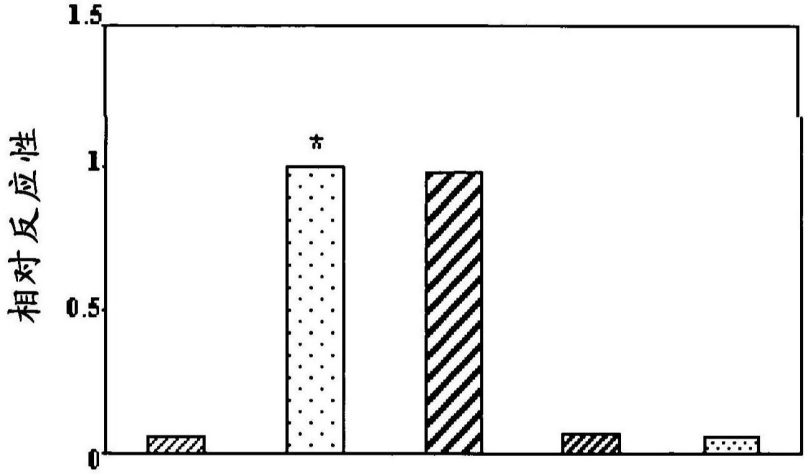


图16

构象



StrepTagII



L2 反应性

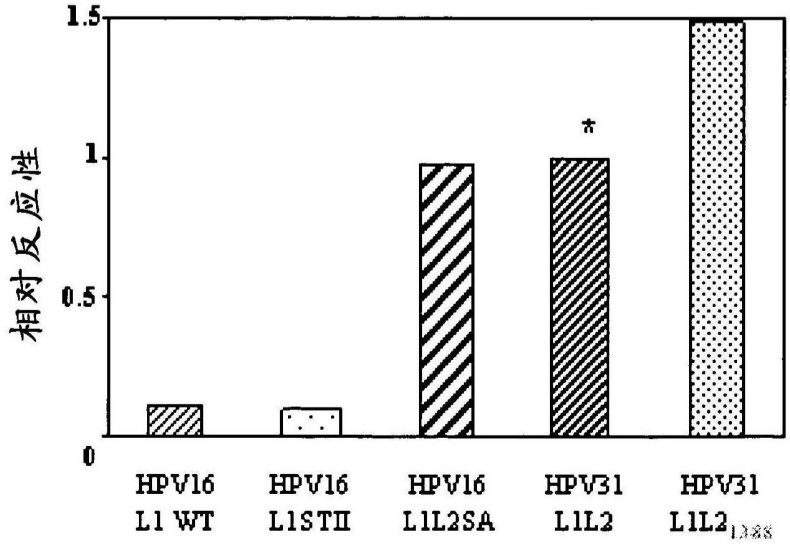


图17

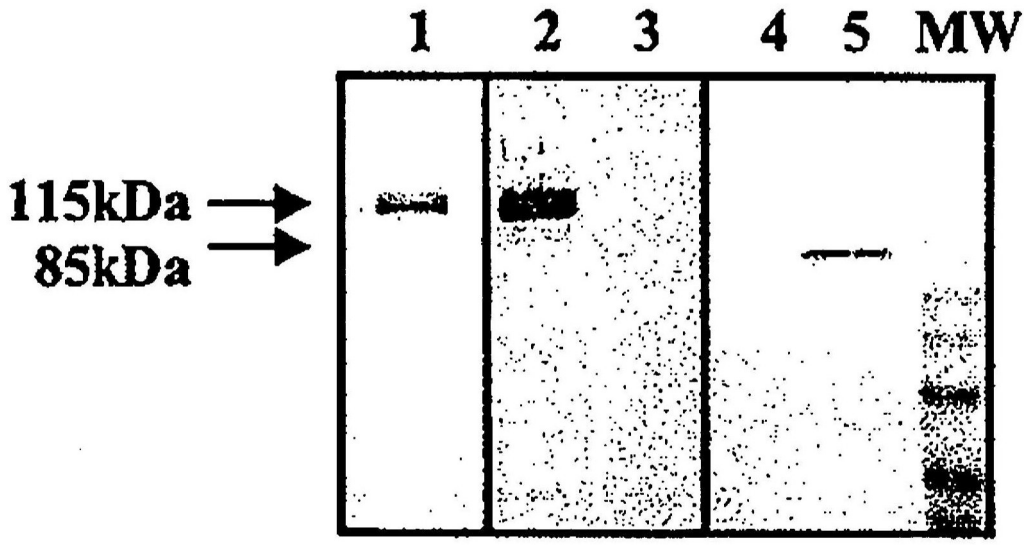


图18

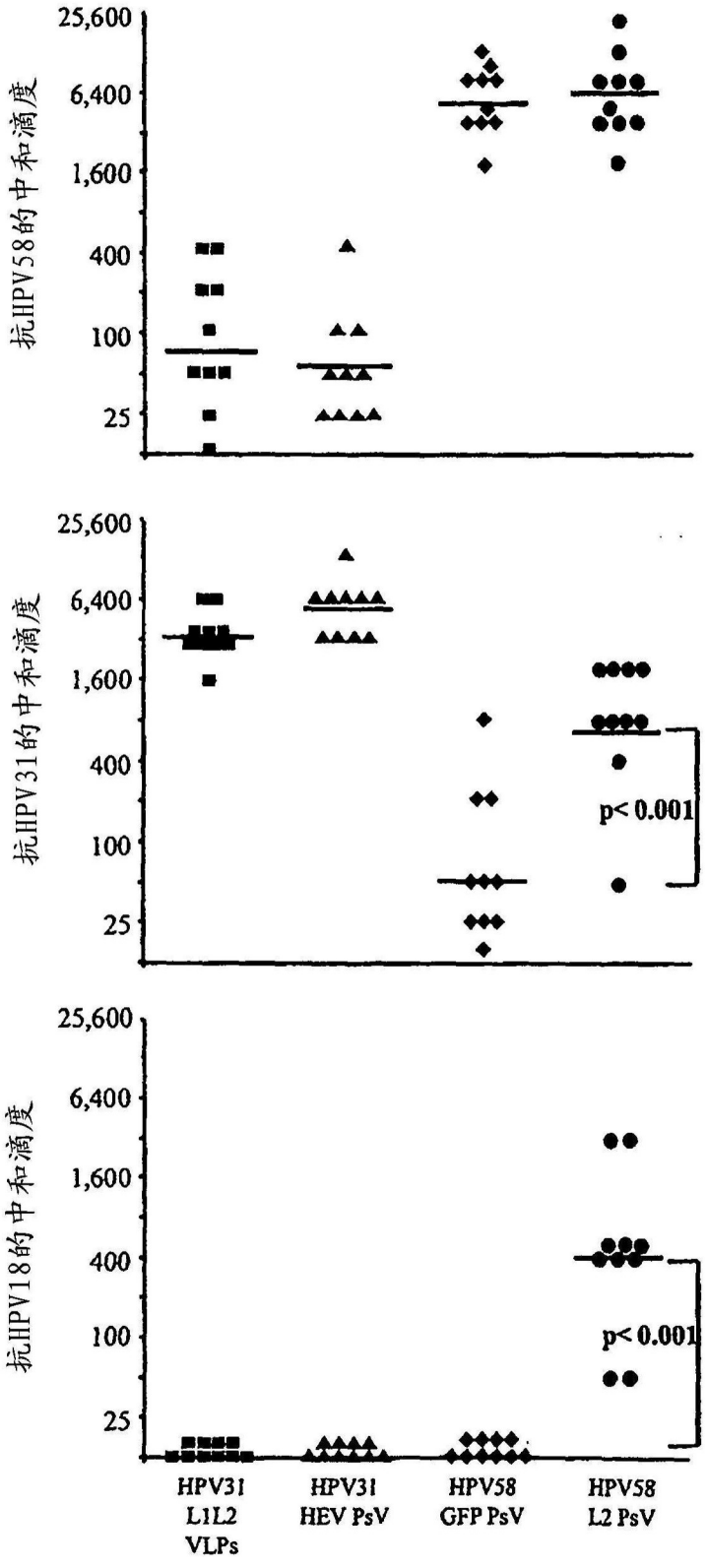

抗HPV58的中和滴度
抗HPV31的中和滴度
抗HPV18的中和滴度
25,600
6,400
1,600
400
100
25
p< 0.001
p< 0.001
HPV31 L1L2 VLPs
HPV31 HEV PsV
HPV58 GFP PsV
HPV58 L2 PsV

图19

Abstract

The invention relates to HPV particles and uses thereof. The invention relates to modified HPV particles that can be used therapeutically. Modified HPV particles may be used to deliver therapeutic agents, including siRNA molecules. Modified HPV particles may be used for the treatment of diseases or conditions of mucosal tissue, including HPV (human papilloma virus) infection and HPV-related tumors.