

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 023892

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.07.29

(51) Int. Cl. A61K 31/7052 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
201170965

(22) Дата подачи заявки
2010.01.22

(54) ИММУНОГЕННЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПАПИЛЛОМЫ И СПОСОБЫ
ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/146,942; 12/691,588

(56) US-A1-20050031638
MAHDAVI et al., Vaccines Against Human
Papillomavirus and Cervical Cancer Promises and
Challenges The Oncologist, August 2005, vol. 10, no
7, p. 528-538, pg. 533, right col., para 1, ln 16-23, pg.
534, left col., para 2, ln 16-21
WO-A1-2007119896

(32) 2009.01.23; 2010.01.21

(33) US

(43) 2012.01.30

(86) PCT/US2010/021869

(87) WO 2010/085697 2010.07.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:

Вейнер Дэвид Б., Янь Цзянь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты усовершенствованные иммуногены против ВПЧ и молекулы нуклеиновых кислот, которые их кодируют. Описанные иммуногены включают те, которые имеются у консенсусных ВПЧ 18 E6 и E7. Раскрыты фармацевтическая композиция, рекомбинантные вакцины и живые ослабленные вакцины, а также способы вызова иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума.

B1

023892

023892
B1

Область техники

Настоящее исследование относится к усовершенствованным вакцинам вируса человеческой папилломы (ВПЧ), усовершенствованным способам вызова иммунного ответа и профилактической и/или терапевтической иммунизации индивидуумов против ВПЧ.

Уровень техники

Заявлен приоритет предварительной заявки США № 61/146942, поданной 23 января 2009 г., и заявки на патент США № 12/691588, поданной 21 января 2010 г., полное описание которых включено в данное описание посредством ссылки.

Папилломавирусы - это маленькие ДНК-вирусы, содержащие семь ранних генов и два поздних гена. Обычно ранние гены папилломавируса обозначаются как E1-E7, а поздние гены - как L1 и L2. Некоторые виды животных могут инфицироваться представителями семейства папилломавирусов.

Инфекция вирусом человеческой папилломы (ВПЧ) широко распространена и может передаваться половым путем. На основании гомологичных последовательностей ДНК различают 56 или более типов ВПЧ. ВПЧ 16 и 18 типов, вызывающие эпителиальную дисплазию и другие болезни, часто связаны с повышенным риском рака, особенно *in situ* и инвазивных карцином шейки матки, влагалища, вульвы и анального прохода.

ДНК-вакцины обладают многими концептуальными преимуществами перед более традиционными способами вакцинации, такими как живые ослабленные вирусы и рекомбинантные вакцины на основе белка. ДНК-вакцины безопасны, стабильны, легко производятся и хорошо переносились людьми при доклинических исследованиях, показавших мало доказательств плазмидной интеграции [Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther.* 1999. 10(5):p. 759-68; Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 1995, 772:p. 30-9]. Кроме того, ДНК-вакцины хорошо подходят для повторных введений благодаря тому, что эффективность вакцины не зависит от титров предсуществующих антител к вектору [Chattergoon, M., J. Boyer, and D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J.* 1997, 11(10):p. 753-63]. Однако одним из основных препятствий для клинического выбора ДНК-вакцин остается снижение платформы иммуногенности при переходе к более крупным животным [Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet.* 2005. 55:p. 25-40]. Последние технологические достижения в разработке иммуногенных ДНК-вакцин, такие как оптимизация кодонов, РНК-оптимизация и добавление лидерных последовательностей иммуноглобулина усиливают экспрессию и иммуногенность ДНК-вакцин [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gpl20 sequence with optimized codon usage. *J. Virol.*, 1998. 72(2):p. 1497-503; Demi, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Virol.*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther.*, 2004. 11(6):p. 522-33], а также недавно разработанная технология системы доставки плазмид, такая как электропорация [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J. Virol.*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J. Immunol.*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. Кроме того, исследования подтверждают, что использование консенсусных иммуногенов может обладать способностью увеличивать распространность клеточного иммунного ответа по сравнению с естественными антигенами. [Yan., J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol. Ther.*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J. Virol.*, 2007. 81(16): p. 8507-14].

Следовательно, остается потребность в усовершенствованных вакцинах и способах для предотвращения и лечения инфекции ВПЧ.

Сущность изобретения

Представляются белки, включающие консенсусные последовательности аминокислот ВПЧ типа 18 (ВПЧ 18) E6 и E7, и молекулы нуклеиновых кислот, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие такие белки. Эти конструкты нуклеиновых кислот и кодируемые ими белки, в свою очередь, представляют собой усовершенствованные иммуногенные мишени, на которые может быть выработан иммунный ответ анти-ВПЧ.

Также представляются конструкты, которые кодируют такие белки, вакцины, которые содержат такие белки, вакцины, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют такие белки, и способы вызова иммунных ответов анти-ВПЧ.

Аспекты изобретения включают молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидную после-

довательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1; фрагментов SEQ ID NO: 1; последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 1; фрагментов последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 5; фрагментов SEQ ID NO: 5, включающие кодирующие последовательности ВПЧ; последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 5; и фрагментов последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 5, включающих кодирующие последовательности ВПЧ; SEQ ID NO: 7; фрагментов SEQ ID NO: 7, включая кодирующие последовательности ВПЧ; последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 7; и фрагментов последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 7, включая кодирующие последовательности ВПЧ.

Настоящее исследование связано с молекулами нуклеиновых кислот, содержащими нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, кодирующих SEQ ID NO: 2; нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 2; нуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты SEQ ID NO: 2; нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% гомологией с фрагментами SEQ ID NO: 2; нуклеотидных последовательностей, кодирующих SEQ ID NO: 6; нуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты SEQ ID NO: 6, включая последовательности ВПЧ; нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 6, включая последовательности ВПЧ; и нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% гомологией с фрагментами SEQ ID NO: 6, включая последовательности ВПЧ.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет фармацевтические композиции, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот, и их использование в способах вызова у индивидуумов иммунного ответа на ВПЧ, которое включает введение индивидуумам композиции, содержащей такие молекулы нуклеиновых кислот.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет рекомбинантную вакцину, содержащую такие молекулы нуклеиновых кислот, и ее использование в способах вызова у индивидуумов иммунного ответа на ВПЧ, которое включает введение индивидуумам такой рекомбинантной вакцины.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет живые ослабленные патогены, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот, и их использование в способах вызова у индивидуумов иммунного ответа на ВПЧ, которое включает введение индивидуумам таких живых ослабленных патогенов.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет белки, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 2; фрагментов SEQ ID NO: 2, фрагментов последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 6; последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 6; фрагментов SEQ ID NO: 6 и фрагментов последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией SEQ ID NO: 6.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет фармацевтические композиции, содержащие такие белки, и их использование в способах вызова у индивидуумов иммунного ответа на ВПЧ, которое включает введение индивидуумам композиции, содержащей такие белки.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет рекомбинантные вакцины, содержащие такие белки, и их использование в способах вызова у индивидуумов иммунного ответа на ВПЧ, которое включает введение индивидуумам такой рекомбинантной вакцины.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет живые ослабленные патогены, содержащие такие белки, и их использование в способах вызова у индивидуумов иммунного ответа на ВПЧ, которое включает введение индивидуумам таких живых ослабленных патогенов.

Краткое описание фигуры

На фигуре представлено описание конструкта плазмида.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Используемое здесь выражение "точные условия гибридизации" или "точные условия" относится к условиям, при которых молекула нуклеиновой кислоты гибридизуется с другой молекулой нуклеиновой кислоты, но не с другими последовательностями. Точные условия зависят от последовательности и будут различны при разных обстоятельствах. Более длинные последовательности специфично гибридизуются при более высоких температурах. Обычно точные условия выбираются примерно на 5°C ниже, чем температура точки плавления (Т.пл.) для специфической последовательности при определенной ионной силе и pH. Т.пл. - температура (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% проб, комплементарных последовательности-мишени, равновесно гибридизуются с последовательностью-мишенью.

Поскольку последовательности-мишени обычно присутствуют в избытке, при Т.пл. 50% проб находятся в равновесии. Обычно точными условиями будут те, при которых концентрация солей меньше чем 1,0 М ионов натрия, обычно от 0,01 до 1,0 М ионов натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и тем-

пературе по меньшей мере примерно 30°C для коротких проб, праймеров или олигонуклеотидов (т.е. от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере примерно 60°C для более длинных проб, праймеров или олигонуклеотидов. Точных условий также можно достичь добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид.

Гомологичную последовательность для нуклеотидов и аминокислот можно определить, используя FASTA, BLAST и гэп-BLAST (Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389, который включен сюда в виде ссылки на полное описание) и программу PAUP* 4.0b10 (D.L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). "Процент сходства" высчитывается с использованием программы PAUP* 4.0b10 (D.L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). Средний аналог консенсусной последовательности высчитывается при сравнении со всеми последовательностями в филогенетическом древе.

Вкратце, алгоритм BLAST, который означает базовый локальный регулирующий поисковый инструмент, подходит для определения гомологичности последовательности (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410, включенный сюда в виде ссылки на полное описание). Программа для осуществления BLAST анализа общедоступна в Национальном Центре Биотехнологической Информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Этот алгоритм включает первичную идентификацию интенсивного подчтета пар последовательностей (HSP) путем идентификации коротких "слов" длины W в рассматриваемой последовательности, которые или соответствуют, или удовлетворяют некоторому положительному порогу оценки T, когда выстраиваются со "словом" той же длины в последовательность базы данных. T описывается как соседнее "слово" порога оценки (Altschul et al., выше). Эти первичные соседние "слова" действуют как затравки в начале поиска для обнаружения HSP, содержащих их. "Слова"-затравки удлиняются в обоих направлениях по длине каждой последовательности, насколько может увеличиться значение кумулятивного выравнивания. Удлинение "слова"-затравки в каждом направлении останавливается, когда: 1) кумулятивное выравненное значение падает на величину X от своего максимального достигнутого значения; 2) кумулятивное значение доходит до нуля или ниже вследствие накопления одного или более отрицательно оцениваемых остатков выравниваний, или 3) достигнут конец любой последовательности. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLAST использует как значения по умолчанию длину слова (W), равную 11, оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919, включенная сюда в виде ссылки на полное описание) выравнивания (B), равную 50, ожидаемое (E), равное 10, M=5, N=4 и сравнение обеих цепей. Алгоритм BLAST (Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5877, включенная сюда в виде ссылки на полное описание) и гэп-BLAST представляют статистический анализ схожести между двумя последовательностями. Одна мера схожести, предоставленная алгоритмом BLAST, - наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая дает индикатор вероятности, по которой парность нуклеотидных последовательностей появится случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной другой, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с другой нуклеиновой кислотой меньше, чем 1, предпочтительно меньше, чем 0,1, более предпочтительно меньше, чем 0,01 и наиболее предпочтительно меньше, чем 0,001.

Используемый в настоящем описании термин "генетический конструкт" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодирующая последовательность включает инициирующие и терминирующие сигналы, функционально связанные с регулирующими элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные направить экспрессию в клетках индивидуума, которому вводится молекула нуклеиновой кислоты.

Используемый в настоящем описании термин "экспрессирующаяся форма" относится к генным конструктам, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок так, что когда она находится в клетках индивидуума, кодирующая последовательность экспрессируется.

Открытые усовершенствованные вакцины основаны на мультифазной стратегии для усиления клеточных иммунных ответов, вызванных иммуногенами. Были разработаны модифицированные консенсусные последовательности. Также открыты генетические варианты осуществления, включающие кодонную оптимизацию, РНК-оптимизацию и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина. Новый конструкт разработан для вызова более сильного и обширного клеточного иммунного ответа, чем соответствующие кодон-оптимизированные иммуногены.

Усовершенствованные вакцины ВПЧ основаны на белках и генетических конструктах, которые кодируют белки с эпитопами, делающими их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых может быть вызван анти-ВПЧ. Соответственно, вакцины могут вызывать терапевтический или профилактический иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления средствами, доставляющими иммуногены, являются ДНК-вакцина, рекомбинантная вакцина, белковая субъединичная вакцина, соединение, содержащее иммуноген, ослабленная вакцина или инактивированная вакцина. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает композицию, выделенную из групп, состоящих из одной или более ДНК-вакцин, одной или более рекомбинантных вакцин, одной или более белковых субъединичных вакцин, одного или более соединений, содержащих иммуноген, одной или более ослабленных вакцин и одной или более инактивированных вакцин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения вакцина, предоставляемая индивидууму, модулирует активность иммунной системы индивидуума и тем самым усиливает иммунный ответ против ВПЧ. Когда молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, попадает в клетку индивидуума, в клетке экспрессируется нуклеотидная последовательность, и таким образом к индивидууму попадает белок. Предоставляются способы доставки последовательности, кодирующей белок, в молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плазмида, как часть рекомбинантной вакцины и как часть ослабленной вакцины, как изолированные белки или белки, входящие в вектор.

Предоставляются композиции и способы, которые профилактически и/или терапевтически иммунизируют индивидуумов против ВПЧ.

Составы для доставки молекул нуклеиновых кислот, которые включают нуклеотидную последовательность, кодирующую иммуноген, функционально связаны с регуляторными элементами. Составы могут включать плазмиду, кодирующую иммуноген, рекомбинантную вакцину, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуноген, живой ослабленный патоген, который кодирует белок по изобретению и/или включает белок по изобретению; инактивированный патоген, включающий белок по изобретению, или соединение, такое как липосома или субъединичная вакцина, которая содержит белок по изобретению. Кроме того, настоящее изобретение связано с инъецируемыми фармацевтическими композициями, которые включают композиции.

SEQ ID NO: 1 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный иммуноген белков ВПЧ 18 E6 и E7. SEQ ID NO: 5 включает SEQ ID NO: 1 и, кроме того, составы лидерной последовательности IgE, связанной с нуклеотидной последовательностью, кодирующей консенсусный иммуноген белков ВПЧ 18 E6 и E7. SEQ ID NO: 2 содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 E6 и E7. SEQ ID NO: 6 включает SEQ ID NO: 2 и, кроме того, содержит лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной иммуногенной последовательностью. Лидерная последовательность IgE представляет собой SEQ ID NO: 4, может кодироваться SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 7 представляет собой нуклеотидную последовательность плазмида pGX302 с SEQ ID NO: 5, встроенной туда для экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления вакцины включают SEQ ID NO: 2 или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вакцины включают SEQ ID NO: 1 как молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вакцины преимущественно содержат SEQ ID NO: 6 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая их кодирует. В некоторых вариантах осуществления вакцины преимущественно содержат SEQ ID NO: 5 как молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления вакцины преимущественно содержат SEQ ID NO: 7.

Фрагменты SEQ ID NO: 1 могут содержать 90 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO: 1 могут содержать 180 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 270 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 360 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 450 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 540 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 630 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 720 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах осуществления 770 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO: 1, такие как те, что будут описаны здесь в дальнейшем, могут, кроме того, содержать кодирующие последовательности для лидерных последовательностей IgE. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 1 не содержат кодирующих последовательностей для лидерных последовательностей IgE. Фрагменты SEQ ID NO: 1 могут содержать менее чем 180 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 270 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 360 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 450 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 540 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 630 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 690 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 760 нуклеотидов, и в некоторых вариантах осуществления менее чем 780 нуклеотидов.

Фрагменты SEQ ID NO: 2 могут содержать 30 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO: 2 могут содержать 60 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления 90 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления 120 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления 150 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления 180 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления 210 или более аминокислот; и в некоторых вариантах осуществления 240 или более аминокислот. Фрагменты могут содержать менее чем 90 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления менее чем 120 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления менее чем 150 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления менее чем 180 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления менее чем 210 аминокислот и в некоторых вариантах осуществления менее чем 240 аминокислот.

Все фрагменты SEQ ID NO: 5 содержат кодирующие последовательности, которые кодируют последовательности ВПЧ, т.е. фрагменты SEQ ID NO: 5 должны содержать последовательности в добавление к тем, что кодируют лидерный пептид IgE. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ

ID NO: 5 содержат 90 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO: 5 могут содержать 180 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 270 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 360 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 450 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 540 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 630 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 720 или более нуклеотидов; в некоторых вариантах осуществления 810 или более нуклеотидов; и в некоторых вариантах осуществления 830 или более нуклеотидов. Фрагменты SEQ ID NO: 5 могут содержать менее чем 180 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 270 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 360 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 450 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 540 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 630 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 690 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 720 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления менее чем 780 нуклеотидов и в некоторых вариантах осуществления менее чем 840 нуклеотидов.

Фрагменты SEQ ID NO: 6 могут содержать 30 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ. В некоторых вариантах осуществления фрагменты SEQ ID NO: 6 могут содержать 60 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; в некоторых вариантах осуществления 90 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; в некоторых вариантах осуществления 120 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; в некоторых вариантах осуществления 150 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; в некоторых вариантах осуществления 180 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; в некоторых вариантах осуществления 210 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; в некоторых вариантах осуществления 240 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ; и в некоторых вариантах осуществления 270 или более аминокислот, включающих последовательности ВПЧ. Фрагменты могут содержать менее чем 90 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ, в некоторых вариантах осуществления менее чем 120 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ, в некоторых вариантах осуществления менее чем 150 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ, в некоторых вариантах осуществления менее чем 180 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ, в некоторых вариантах осуществления менее чем 210 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ, в некоторых вариантах осуществления менее чем 240 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ, и в некоторых вариантах осуществления менее чем 270 аминокислот, включающих последовательности ВПЧ.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения способы вызова иммунного ответа у индивидуумов против иммуногена включают введение индивидуумам аминокислотной последовательности для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 E6 и E7, или их функциональных фрагментов, или их экспрессирующихся кодирующих последовательностей. Некоторые варианты осуществления включают изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 E6 и E7 или их фрагмента. Некоторые варианты осуществления включают рекомбинантную вакцину, которая кодирует аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 E6 и E7 или их фрагмента. Некоторые варианты осуществления включают субъединичную вакцину, которая содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 E6 и E7 или их фрагмента. Некоторые варианты осуществления содержат живую ослабленную вакцину и/или инактивированную вакцину, которая содержит аминокислотную последовательность для консенсусного иммуногена белков ВПЧ 18 E6 и E7.

Усовершенствованные вакцины содержат белки и генетические конструкты, которые кодируют белки с эпитопами, делающие их особенно эффективными как иммуногены, против которых можно вызвать иммунный ответ анти-ВПЧ. Соответственно, вакцины можно предоставить для выработки терапевтического или профилактического иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления изобретения средство доставки иммуногена представляет собой вакцину ДНК, рекомбинантную вакцину, белковую субъединичную вакцину, состав, содержащий иммуноген, ослабленную вакцину или инактивированную вакцину. В некоторых вариантах осуществления вакцина содержит комбинацию, отобранную из групп, состоящих из одной или более ДНК-вакцин, одной или более рекомбинантных вакцин, одной или более белковых субъединичных вакцин, одной или более композиций, содержащих иммуноген, одну или более ослабленных вакцин и одну или более инактивированных вакцин.

Аспекты изобретения предоставляют способы доставки последовательности, кодирующей белок, в молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плазмида, как часть рекомбинантной вакцины и как часть ослабленной вакцины, как изолированные белки или белки, входящие в вектор.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения предоставляются композиции и способы, которые профилактически и/или терапевтически иммунизируют индивидуума.

ДНК-вакцины описаны в патентах США № 5593972, 5739118, 5817637, 5830876, 5962428, 5981505, 5580859, 5703055, 5676594 и предварительных заявках, цитированных здесь, каждые из которых вклю-

чены в данное описание в качестве ссылки. В дополнение к протоколам доставки, описанным в этих заявках, альтернативные способы доставки ДНК описаны в патентах США № 4945050 и 5036006, которые включены в данное описание в качестве ссылки.

Настоящее изобретение связано с усовершенствованными ослабленными живыми вакцинами, усовершенствованными инактивированными вакцинами и усовершенствованными вакцинами, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных генов, которые кодируют антигены, а также с субъединичными и гликопротеидными вакцинами. Примеры ослабленных живых вакцин, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных антигенов, субъединичных вакцин и гликопротеидных вакцин, описаны в патентах США № 4510245; 4797368; 4722848; 4790987; 4920209; 5017487; 5077044; 5110587; 5112749; 5174993; 5223424; 5225336; 5240703; 5242829; 5294441; 5294548; 5310668; 5387744; 5389368; 5424065; 5451499; 5453364; 5462734; 5470734; 5474935; 5482713; 5591439; 5643579; 5650309; 5698202; 5955088; 6034298; 6042836; 6156319 и 6589529, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки.

Попадая в клетку, генетический конструкт(ы) может остаться в клетке как функционирующая экстрахромосомная молекула и/или интегрированная в хромосомную ДНК клетки. ДНК может быть введена в клетку, где она остается как отдельный генетический материал в форме плазиды или плазмид. Альтернативно, линейная ДНК, которая может интегрироваться с хромосомой, может быть введена в клетку. Когда ДНК вводится в клетку, могут быть добавлены реагенты, которые стимулируют интеграцию ДНК в хромосомы.

Последовательности ДНК, которые полезны для стимуляции интеграции, также могут быть включены в молекулу ДНК.

Альтернативно, РНК может вводиться в клетку. Также предусматривается предоставлять генетические конструкты как линейные микрохромосомы, включающие центромеру, теломеры и точку начала репликации. Генные конструкты могут оставаться частью генетического материала в ослабленных живых микроорганизмах или рекомбинантных бактериальных векторах, которые живут в клетках. Генные конструкты могут быть частью геномов рекомбинантных вирусных вакцин, когда генетический материал или интегрируется в хромосому клетки, или остается экстрахромосомным. Генетические конструкты включают регуляторные элементы, необходимые для генной экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты. Элементы включают промотор, инициирующий кодон, терминирующий кодон и сигнал полиаденилирования. Кроме того, для экспрессии генной последовательности, которая кодирует белок-мишень или иммуномодулирующий белок, часто требуются энхансеры. Необходимо, чтобы эти элементы были функционально встроены в последовательность, которая кодирует требуемые белки и чтобы регуляторные элементы работали у тех, кому они вводятся.

Инициирующие кодоны и терминирующий кодон обычно считаются частью нуклеотидной последовательности, которая кодирует требуемый белок. Однако необходимо, чтобы эти элементы функционировали у тех, кому вводится генный конструкт. Инициирующий и терминирующий кодоны должны быть внутри кодирующей последовательности.

Используемые промоторы и сигнал полиаденилирования должны работать в клетках тех, кому они вводятся.

Примеры промоторов полезны для осуществления настоящего изобретения, особенно в производстве генетической вакцины для человека, включая, но без ограничения, промоторы обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор мышиного вируса опухоли молочной железы (MMTV), вирус иммунодефицита человека (MV), такой как промотор ВИВ длинного концевого повтора (LTR), вирус Молони, ALV, цитомегаловирус (CMV), такой как предранний промотор CMV, вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус саркомы Раяса (RSV), а также промоторы из генов человека, такие как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин и человеческий металлотионеин.

Примеры сигналов полиаденилирования полезны для осуществления настоящего изобретения, особенно для производства генетических вакцин для людей, включая, но без ограничения, сигналы полиаденилирования SV40 и сигналы полиаденилирования LTR. Преимущественно используется сигнал полиаденилирования SV40, который находится в плазмиде pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), называемый сигналом полиаденилирования SV40.

Кроме регуляторных элементов, требуемых для экспрессии ДНК, другие элементы также могут быть включены в молекулу ДНК. Такие дополнительные элементы включают энхансеры. Энхансер может быть взят из группы, включающей, но без ограничения, человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин и вирусные энхансеры, такие как CMV, RSV и EBV.

Генетические конструкты могут быть предоставлены с точкой начала репликации у млекопитающих для создания экстрахромосомного конструкта и выработки множественных копий конструкта в клетке. Плазмиды pVAX1, pCEP4 и pREP4 от Invitrogen (Сан-Диего, Калифорния) содержат точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр и ядерный кодирующий регион антигена EBNA-1, который генерирует многокопийную эпизомную репликацию без интеграции.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, связанных с применением иммунизации,

используются молекула(ы) нуклеиновой кислоты, которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие белок по изобретению; и, необязательно, гены белков, которые добавочно усиливают иммунный ответ против таких белков-мишеней. Примерами таких генов являются гены, кодирующие другие цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 и IL-15, включая IL-15, обладающий сигнальной последовательностью, удаляющей и дополнительно включающей сигнальный пептид из IgE. Другие гены, которые могут быть полезны, включают гены, кодирующие MCP-1, MIP-1 α , MIP-1p, IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, TNF receptor, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IkB, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены интерферонового ответа, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

Может быть добавлен дополнительный элемент, который служит мишенью для клеточной деструкции, если по каким-либо причинам желательно элиминировать клетки, получившие генетический конструкт. Ген тимидинкиназы (tk) герпеса в экспрессирующемся виде может быть включен в генетический конструкт. Лекарственное средство гангцикловир может быть введено индивидууму, и это лекарственное средство станет причиной избирательного цитолиза любой клетки, продуцирующей tk, тем самым предоставляя средство для избирательной деструкции клеток с генетическим конструктом.

Для того чтобы максимизировать продукцию белка, могут быть выбраны регуляторные последовательности, которые хорошо подходят для генной экспрессии в клетках, куда введен конструкт. Более того, могут быть выбраны кодоны, которые наиболее эффективно транскрибируются в клетке. Средний специалист в данной области может получить конструкции ДНК, которые являются функциональными в клетках.

В некоторых вариантах осуществления могут быть предоставлены генные конструкты, в которых кодирующие последовательности для белков, описанных здесь, связаны с сигнальным белком IgE. В некоторых вариантах осуществления белки, описанные здесь, связаны с сигнальным белком IgE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, для которых используется белок, средний специалист может, например, продуцировать и изолировать белки по изобретению, используя хорошо известные технологии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для которых используется белок, средний специалист может, например, используя хорошо известные технологии, вставлять молекулы ДНК, которые кодируют белок по изобретению, в коммерчески доступные векторы экспрессии для использования в хорошо известных системах экспрессии. Например, коммерчески доступная плазмида pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может быть использована для продукции белка в *E. coli*. Коммерчески доступная плазмида pYES2 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может, например, быть использована для продукции в штаммах дрожжей *S. cerevisiae*. Коммерчески доступная MAXBAC™ полная бакуловирусная система экспрессии (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может, например, быть использована для продукции в клетках насекомых. Коммерчески доступная плазмида pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния) может, например, быть использована для продукции в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка. Обладая средними специальными знаниями, можно использовать эти коммерческие векторы и системы экспрессии или другое для производства белка с помощью стандартных технологий и легко доступных исходных материалов (см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989), включенный в данный документ в качестве ссылки). Таким образом, требуемые белки можно получить как в прокариотических, так и в эукариотических системах, результатом чего будет диапазон обработанных форм белка.

Обладая средними специальными знаниями, можно использовать другие коммерчески доступные векторы экспрессии и системы или создать векторы, используя хорошо известные способы и легко доступные исходные материалы. Системы экспрессии, содержащие необходимые контрольные последовательности, такие как промоторы и сигналы полиаденилирования, и предпочтительно энхансеры, легко доступны и известны в данной области в отношении множества хозяев. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989).

Генетические конструкты включают белки, кодирующие последовательность, функционально связанную с промотором, который работает в клеточной линии, в которую трансфицированы конструкты. Примеры конститутивных промоторов включают промоторы из цитомегаловируса или SV40. Примеры индуцируемых промоторов включают мышный вирус лейкемии молочной железы или промоторы металлотионеина. Имея средние специальные знания, можно легко создать генетические конструкты, полезные для трансфекции в клетки ДНК, которая кодирует белок по изобретению, из легко доступных

исходных материалов. Вектор экспрессии, включающий ДНК, которая кодирует белок, используется для трансформации совместимых хозяев, которые затем культивируются и содержатся при условиях, в которых происходит экспрессия чужеродной ДНК.

Произведенный белок извлекается из культуры или путем лизиса клеток, или из среды культуры, как принято и известно специалистам. Имея средние специальные знания и используя хорошо известные технологии, можно выделить белок, произведенный с использованием таких систем экспрессии. Способы очистки белка из естественных источников с использованием антитела, которое специфично связывается с определенным белком, как описано выше, могут также применяться для очистки белка, произведенного по методологии рекомбинантной ДНК.

В дополнение к производству белков путем рекомбинантных техник автоматизированные белковые синтезаторы также могут быть использованы для производства выделенного исключительно чистого белка. Такие техники хорошо известны специалистам и полезны, если производные, у которых есть замена, не обеспечиваются в производстве белка, кодируемого ДНК.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены при использовании любой из нескольких хорошо известных технологий, включая введение ДНК (также известное как ДНК-вакцинация), рекомбинантные векторы, такие как рекомбинантный аденоовирус, рекомбинантный аденоовирус, ассоциированный с вирусом, и рекомбинантная вакцина.

Способы введения включают, но не ограничиваются, введение внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, внутрикожно, подкожно, внутриартериально, интраокулярно и орально, а также местно, трансдермально, путем ингаляции или суппозиторием или в ткань слизистой оболочки, в виде орошения вагинальной, ректальной, уретральной, ротовой и подъязычной тканей. Предпочтительные пути введения включают внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрикожную и подкожную инъекцию. Генетические конструкты могут вводиться посредством, но без ограничения, способов и приборов электропорации, традиционных шприцов, приборов для безыгольной инъекции или "генной пушки для баллистической трансфекции".

Примеры приборов для электропорации и способов электропорации, предпочтительных для легкой доставки ДНК-вакцин, включают те, что описаны в патенте США № 7245963 Draghia-Akli, et al., патенте США изд. 2005/0052630 подписан Smith, et al., содержание которого включено в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Также предпочтительными являются приборы для электропорации и способы электропорации для легкой доставки ДНК-вакцин, предоставляемые в одновременно находящейся на рассмотрении заявке того же владельца на патент США № 11/874072, зарегистрированный 17 октября 2007 г., заявляющей приоритет по статье 35 USC 119(e) предварительных заявок № 60/852149, поданной 17 октября 2006 г., и 60/978982, поданной 10 октября 2007 г., включенных в данное описание в полном объеме в качестве ссылки.

Ниже следующее представляет собой пример осуществления с использованием технологии электропорации, и обсуждается более детально в патентных ссылках, описанных выше: приборы электропорации могут быть сконфигурированы для доставки в требуемую ткань млекопитающего импульсом энергии, производимым постоянным током, таким же, как заданный ток, введенный пользователем. Прибор для электропорации включает электропорационную составляющую и набор электродов или набор рукояток. Электропорационная составляющая может включать один или более из различных элементов приспособлений для электропорации, включая контроллер, волновой генератор тока, тестер импеданса, регистратор волн, входной элемент, элемент сообщения о статусе, коммуникационный порт, компонент памяти, источник питания и выключатель питания. Электропорационная составляющая может функционировать как один элемент электропорационных приборов, и другие элементы являются отдельными элементами (или компонентами) в сообщении с электропорационной составляющей. В некоторых вариантах осуществления электропорационная составляющая может функционировать как более чем один элемент электропорационного прибора, который может находиться в сообщении с другими элементами электропорационного прибора, отдельно от электропорационной составляющей. Использование электропорационной технологии для доставки усовершенствованной вакцины ВПЧ не ограничено элементами электропорационных приборов, существующих как части одного электромеханического или механического прибора, поскольку элементы могут функционировать как один прибор или как различные элементы, сообщающиеся друг с другом. Электропорационная составляющая способна доставить энергетический импульс, который производит постоянный ток в нужной ткани и включает в себя механизм обратной связи. Набор электродов включает комплект электродов, в который входит множество электродов различного размера, где набор электродов получает импульс энергии от электропорационной составляющей и доставляет ее в нужную ткань посредством электродов. По меньшей мере один из множества электродов является нейтральным во время доставки импульса энергии и измеряет импеданс в нужной ткани и передает значение импеданса к электропорационной составляющей. Механизм обратной связи может получить значение импеданса и может подогнать импульс энергии, доставляемый электропорационной составляющей, для поддержания постоянного тока.

В некоторых вариантах осуществления множество электродов может доставлять импульс энергии в децентрализованную структуру. В некоторых вариантах осуществления множество электродов может

доставлять импульс энергии в децентрализованную структуру благодаря контролю электродов запрограммированной последовательностью, и запрограммированная последовательность вводится пользователем электропорационной составляющей. В некоторых вариантах осуществления запрограммированная последовательность включает множество импульсов, доставляемых последовательно, где каждый импульс из множества импульсов доставляется по меньшей мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который оценивает импеданс, и где последующий импульс из множества импульсов доставляется различно одним из по меньшей мере двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который оценивает импеданс.

В некоторых вариантах осуществления механизма обратной связи выполняется или аппаратурой, или программным обеспечением. Предпочтительно механизм обратной связи выполняется аналоговой системой управления с обратной связью. Предпочтительно эта обратная связь происходит каждые 50, 20, 10 или 1 мкс, но предпочтительна обратная связь в режиме реального времени или мгновенная (т.е. практически мгновенная, как определяется в доступных техниках установленное время ответа). В некоторых вариантах осуществления нейтральный электрод оценивает импеданс в нужной ткани и передает импеданс механизму обратной связи, и механизм обратной связи реагирует на импеданс и корректирует импульс энергии, поддерживая значение постоянного тока, сходное заданному значению. В некоторых вариантах осуществления механизма обратной связи непрерывно и мгновенно поддерживает постоянный ток в течение доставки импульса энергии.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты доставляется в клетки вместе с введением полинуклеотида с функцией энхансера или организующего агента генетической вакцины. Полинуклеотиды с функцией энхансера описаны в патенте США № 5593972, 5962428 и интернациональной заявке № PCT/US94/00899, зарегистрированной 26 января 1994 г., каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки. Организующие агенты генетической вакцины описаны в патенте США № 021579 от 1 апреля 1994 г., который включен в данное описание в качестве ссылки. Коагенты, которые вводятся вместе с молекулами нуклеиновых кислот, могут вводиться как смесь с молекулами нуклеиновой кислоты, или вводиться одновременно с введением молекул нуклеиновой кислоты, или отдельно, до или после введения молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, другие агенты, которые могут выполнять функции трансфицирующих агентов и/или реплицирующих агентов и/или воспалительных агентов и которые могут вводиться совместно с GVF, включая факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как α -интерферон, гамма-интерферон, GM-CSF, фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 и IL-15, а также фактор роста фибробластов, поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адьювант Фрейнда, аналог LPS, включающий монофосфорилированный липид А (WL), мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и гиалуроновая кислота, могут также быть использованы для совместного введения с генетическим конструктом. В некоторых вариантах осуществления может быть использован иммуномодулирующий белок, такой как GVF. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты предоставляется совместно с PLG, чтобы обеспечить доставку/усвоение энхансера.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат от около 1 нг до около 2000 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции, соответствующие настоящему изобретению, содержат от около 5 нг до около 1000 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от около 10 нг до около 800 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от около 0,1 до около 500 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от около 1 до около 350 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от около 25 до около 250 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат от около 100 до около 200 мкг ДНК.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению разработаны в соответствии с используемым способом введения. В случаях, когда фармацевтические композиции являются инъектируемыми фармацевтическими составами, они стерильны, не содержат пирогенных препаратов и не содержат твердых частиц. Предпочтительно используется изотоническая формула. Обычно добавки для изотоничности могут включать хлористый натрий, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. В некоторых случаях предпочтитаются изотонические растворы, такие как фосфатный солевой буфер. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. В некоторых вариантах осуществления в состав добавляется сосудосуживающий агент.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения предоставляются способы вызова иммунных ответов. Вакцина может быть основанной на белке, живой ослабленной вакциной, клеточной вакциной, рекомбинантной вакциной, или вакциной нуклеиновой кислоты, или ДНК-вакциной. В некоторых вариантах осуществления способы вызова у индивидуума иммунного ответа против иммуногена включают способы вызова мышечных иммунных ответов, состоящих из введения индивидуума одного или более из белка СТАСК, белка ТЕСК, белка МЕС и их функциональных фрагментов,

или их экспрессирующихся кодирующих последовательностей в комбинации с очищенными молекулами нуклеиновой кислоты, которые кодируют белок по изобретению, и/или рекомбинантной вакциной, которая кодирует белок по изобретению, и/или субъединичной вакциной, содержащей белок по изобретению, и/или живой ослабленной вакциной, и/или инактивированной вакциной. Один или более из белка СТАСК, белка ТЕСК, белка МЕС и их функциональные фрагменты могут быть введены прежде, одновременно или после введения очищенной молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуноген, и/или рекомбинантной вакцины, которая кодирует иммуноген, и/или субъединичной вакцины, которая содержит иммуноген, и/или живой ослабленной вакцины, и/или инактивированной вакцины. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводится изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или более белков, выбранных из группы, содержащей СТАСК, ТЕСК, МЕС и их функциональные фрагменты.

Кроме того, настоящее изобретение иллюстрируется следующим примером. Должно быть понятно, что этот пример, показывающий варианты осуществления изобретения, является лишь иллюстративным. Из вышеизложенного обсуждения и этого примера специалист может убедиться в важнейших характеристиках этого изобретения и без отступления от объема его притязаний и не выходя за его границы, может внести различные изменения и модифицировать изобретение, чтобы адаптировать его к различным использованием и условиям. Таким образом, различные варианты осуществления изобретения в дополнение к тем, что показаны и описаны здесь, будут очевидны специалистам из вышеизложенного описания. Подразумевается, что такие варианты осуществления также попадают в границы прилагаемых утверждений.

Все патенты США, заявки США и ссылки на литературу, цитируемые в ходе настоящего описания, тем самым включены сюда в качестве ссылки в полном объеме.

Пример.

Были подготовлены оптимизированные консенсусные последовательности вируса папилломы человека (ВПЧ) вирусных белков 18 E6 и 7. Последовательность предназначена для высоких уровней экспрессии. Эта последовательность пригодна для технологии авторов генетической иммунизации. Результаты экспериментов, поставленных с использованием консенсусной последовательности, были положительными. На фиг. 1 дано описание плазмидного конструкта, который включает последовательность нуклеиновой кислоты консенсусного ВПЧ 18-6 и 7 в плазмиде pGX3002 (SEQ ID NO: 7). Нуклеотидная последовательность консенсусного ВПЧ 18-6 и 7, которая встроена в плазмиду pGX3002, включает кодирующую последовательность лидерного белка IgE, связанного с кодирующими последовательностями консенсусного ВПЧ 18-6 и 7.

Плазмида pGX3002 экспрессирует оптимизированные антигены человеческого папилломавируса 18-6 и 7 (ВПЧ 18 E6 и 7), приводимые в действие промотором CMV (pCMV) гормона роста крупного рогатого скота с 3' конца и сигналом полиаденилирования (bGHpA) с использованием pVAX основы, которая включает ген устойчивости к канамицину (Kan) и точку начала репликации плазмиды (pUC ori).

Элементы	Пары оснований
Промотор CMV	137-724
Кодирующая последовательность ВПЧ 18-6 и 7	754-1606
PolyA bGH	1649-1879
Устойчивость к Kan	2052-2846
pUC Ori	3145-3818

Перечень последовательностей

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
 Weiner, David B
 Yan, Jian

<120> УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ ВИРУСА ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПАПИЛЛОМЫ И СПОСОБЫ ИХ
 ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

<130> 133172.02700

<150> US 61/146,942
 <151> 2009-01-23

<150> US 12/691,588
 <151> 2010-01-21

<160> 7

<170> Патентная версия3.5

<210> 1
 <211> 783
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность ВПЧ, кодирующая E6 и E7

<400> 1

gccagatcc	aggacccac	caggagccgc	tacaagctgc	ccgatctgtg	tacccgagctg	60
aacaccagcc	tgcaaggacat	cgagatcacc	tgtgtgtact	gtaagaccgt	gctggagactg	120
accgaggtgt	tcgagaagga	cctgttcgtg	gtgtacaggg	acagcatccc	ccacgcgcgc	180
tgcacacaagt	gtatcgactt	ctacagccgg	atccgggagc	tgagacacta	cagccacagc	240
gtgtacggcg	ataccctgga	gaagctgacc	aacaccggcc	tgtacaacct	gctgatccgg	300
tgcctgagat	gccagaagcc	cctgctgaga	cacctgaacg	agaagcggcg	gttccacaac	360
atcgccggcc	actacagagg	ccagtgccac	agctgctgta	acagggccag	gcaggagaga	420
ctgcagcgg	gaagagagac	ccaggtgagg	ggcaggaaga	gaagaagcca	cggccccaag	480
gccaccctgc	aggatatcgt	gctgcacctg	gagccccaga	atgagatccc	cgtggatctg	540
ctggcccacg	gccagctgtc	cgacagcgg	gaggagaacg	acgagatcga	cggcgtgaat	600
caccagcacc	tgcctgcccag	aagagccgag	cctcagaggc	acaccatgt	gtgtatgtgc	660
tgttaagtgt	aggcccgat	cgaactggtg	gtggagagca	gcccgcacga	cctgagagcc	720
ttccacgcgc	tgttccctgaa	caccctgagc	ttcgtgtgtc	cttgggtgtgc	cagccagcag	780
tga						783

<210> 2
 <211> 260
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность пептида ВПЧ с Е6 и Е7

<400> 2

Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Gly	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Leu
1															15

Cys	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr	Cys	Val
															30
20															

Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys	Asp	Leu
															45
35															

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

Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser	Asp	Ser
															80
65															

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

Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg	His	Leu
															110
100															

Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His	Tyr	Arg	Gly	Gln
															125
115															

Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Arg	Arg
															140
130															

Arg	Glu	Thr	Gln	Val	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Gly	Pro	Lys
															160
145															

Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Ile	Val	Leu	His	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn	Glu	Ile
															175
165															

Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	His	Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu
															190
180															

Asn	Asp	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Asn	His	Gln	His	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg
															205
195															

Ala	Glu	Pro	Gln	Arg	His	Thr	Met	Leu	Cys	Met	Cys	Cys	Lys	Cys	Glu
															220
210															

Ala	Arg	Ile	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala
															240
225															

Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys
 245 250 255

Ala Ser Gln Gln
260

<210> 3
<211> 54
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Лидерная последовательность ДНК IgE

<400> 3
atggacttgg a cctggatcct gttccctggtg gccgctgc ca cacgggtgca c a g c 54

<210> 4
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Лидерная последовательность пептидов I₉E

<400> 4

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser

<210> 5
<211> 837
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Консенсусная трансгенная последовательность нуклеиновой кислоты ВПЧ,
включающая IgE
<400> 5

atggactgga cctggatctt gttcttggtg gcccgtgcca cacgggtgca cagcgccaga 60

ttcgaggacc ccaccaggag cggctacaag ctggccgatc tttgttaccga gctgaacacc 120

aggcctgcagg acatcgagat caccctgtgt tactgttaaga ccgtgctgga gctgaccgag 180

gtgttcgaga aggacctgtt cgtgggtgtac agggacacgca tcccccacgc cgccctgccac 240

aagtgtatcg acttctacag ccggatccgg gagctgagac actacagcga cagcgtgtac 300

ggcgataaccc tggagaagct gaccaaacacc ggcctgtaca acctgtctgat ccggtgtcctg 360

agatgccaga agccccctgt gagacacacgt aacgagaaga ggcgggttcca caacatcgcc 420

ggccactaca gaggccagtg ccacagctgc tgtaaacaggg ccaggcagga gagactgcag 480

cgaggagaagag agacccaggt gagggggcagg aagagaagaa gccacggccc caaggccacc 540

ctgcaggata	tcgtgctgca	cctggagccc	cagaatgaga	tccccgtgga	tctgctggc	600
cacggccagc	tgtccgacag	cgaggaggag	aacgacgaga	tcgacggcgt	gaatcaccag	660
cacctgcctg	ccagaagagc	cgagcctcag	aggcacacca	tgctgtgtat	gtgctgtaag	720
tgtgaggccc	ggatcgaact	ggtggggag	agcagcgccg	acgacacctgag	agccttccag	780
cagctgttcc	tgaacaccct	gagcttcgtg	tgtccttgg	gtgccagcca	gcagtga	837

<210> 6

<211> 278

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность белка ВПЧ с лидерным пептидом IgE

<400> 6

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val
1					5				10				15		

His	Ser	Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Gly	Tyr	Lys	Leu	Pro
					20			25				30			

Asp	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr
						35	40					45			

Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys
						50	55			60					

Asp	Leu	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala	Cys	His
65					70				75		80				

Lys	Cys	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser
						85		90			95				

Asp	Ser	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu
						100		105		110					

Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg
							115	120		125					

His	Leu	Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His	Tyr	Arg
							130	135		140					

Gly	Gln	Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln
							145	150		155		160			

Arg	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Val	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Gly
						165		170		175					

Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn
 180 185 190

Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Gly His Gly Gln Leu Ser Asp Ser Glu
 195 200 205

Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala
 210 215 220

Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys
 225 230 235 240

Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu
 245 250 255

Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro
 260 265 270

Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 275

<210> 7
 <211> 3824
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Плазмиды GX3002 с консенсусной и IgE-лидерной последовательностями
 <400> 7
 gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctgttattta 60
 atagtaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120
 acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180
 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga 240
 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtaegcc 300
 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360
 atgggacttt octacttggc agtacatcta cgtatttagtc atcgcttattta ccatggtgat 420
 gcggttttgg cagtagatca atggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480
 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaaatcaac gggactttcc 540
 aaaaatgtcgta aacaactccg ccccatgtac gcaaatgggc ggttaggcgtg tacggtgaa 600
 ggtctatata agcagagctc totggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660
 aattaatacg actcaactata gggagaccca agctggctag cgtttaact taagcttggt 720
 accgagctcg gatccactag tccagtggtgg tggaaattcgc caccatggac tggacactgga 780
 tcctgttccct ggtggccgct gcccacacggg tgcacacgcg cagattcgag gacccacca 840

ggagcggcta caagctgccc gatctgtgt a cgagctgaa caccagcctg caggacatcg	900
agatcacctg tgtgtactgt aagaccgtgc tggagctgac cgaggtgttc gagaaggacc	960
tgttcgtggt gtacagggac agcatcccc acgccgcctg ccacaagtgt atcgacttct	1020
acagccggat ccgggagctg agacactaca gcgacagcgt gtacggcgat accctggaga	1080
agctgaccaa caccggcctg tacaacctgc tgatccggtg cctgagatgc cagaagcccc	1140
tgctgagaca cctgaacgag aagcggcggt tccacaacat cgcggccac tacagaggcc	1200
agtgccacag ctgctgtaac agggccaggc aggagagact gcagcggaga agagagaccc	1260
aggtgagggg caggaagaga agaagccacg gccccaaaggc caccctgcag gatatcgtgc	1320
tgcacctgga gccccagaat gagatccccg tggatctgtc gggccacggc cagctgtccg	1380
acagegagga ggagaacgac gagatcgcacg gcgtaatca ccagcacctg cctgccagaa	1440
gagccgagcc tcagaggcac accatgtgt gtatgtgtc taagtgtgag gcccggatcg	1500
aactgggtgt ggagagcgc gccgacgacc tgagagcctt ccagcagctg ttctgtaaaca	1560
ccctgagctt cgtgtgtcct tgggtgtccca gccagcagtg atgagcggcc gctcgagtct	1620
agagggcccc ttaaaccctg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttt ccagccatct	1680
gttgtttgcc cctccccctg gccttcctt accctggaag gtgccactcc cactgtcctt	1740
tcctaataaa atgagggaaat tgcacatcgat tgcactgatc ggtgtcatcc tattctgggg	1800
ggtgggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg	1860
gatgcgggtgg gctctatggc ttctactggg cgggtttatg gacagcaagc gaaccggaaat	1920
tgccagctgg ggcgcctct ggtaaagggtt ggaagccctg caaaatggat tggatggctt	1980
tcttggccaa aaggatctga tggcgccagg gatcaagctc tgatcaagag acaggatgag	2040
gatcggttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gtttgggtgg	2100
agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgcgtgt	2160
tccggctgtc agcgcagggg cgcgggttc ttttgcctt gaccgacctg tccgggtcccc	2220
tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc tattgtggct ggcacacg ggcgttcctt	2280
gcgcagctgt gtcacgtt gtcactgaa cggaaaggga ctggctgcta ttgggcgaag	2340
tgccggggca ggtatctcctg tcatctcacc ttgtctctgc cgagaaagta tccatcatgg	2400
ctgatgcaat gcccggctg catacgctt atccggctac ctgcccattc gaccaccaag	2460
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggtatggaaac cggctttgtc gatcaggatg	2520
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcga	2580
gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgat cccatggcga tgcctgctt ccgaatatca	2640
tggtgaaaaa tggccgcattt tctggattca tcgactgtgg cccgctgggt gtggcggacc	2700
gctatcagga catagcggtt gtcacccgtt atattgtga agagcttggc ggcgaatggg	2760

ctgaccgctt cctcggtcgtt tacggatcg ccgctcccgaa ttccgcagcgc atcccttct	2820
atcccttct tgacgagttc ttctgaattttaa acgttccatg atgcgttatt	2880
ttctcccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatcag gtggacttt tcggggaaat	2940
gtgcgcggaa cccctatttg tttattttc taaatacatt caaatatgtt tccgctatg	3000
agacaataac cctgataaaat gcttcaataa tagcacgtgc taaaacttca ttttaattt	3060
aaaaggatct aggtgaagat ccttttgat aatctcatga cccaaatccc ttaacgtgag	3120
tttcgttcc actgagcgtc agacccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct	3180
tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcac aaaaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt	3240
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcaagcgc	3300
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgttagtttgcaccactt caagaactct	3360
gtacgaccgc ctacatacct cgtctgtcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc	3420
gataagtctgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagtt taccggataa ggccgcgg	3480
tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagctgg agcgaacgac ctacaccgaa	3540
ctgagataacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg	3600
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggaa acaggagac gcacgagggaa gcttccaggg	3660
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga	3720
tttttgtat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgcccagcaa cgcggcctt	3780
ttacgggttcc tggcccttttgcgttccatgt tctt	3824

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВПЧ Е6/E7, который индуцирует иммунный ответ у субъекта, причем указанная последовательность выбрана из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 1;

фрагментов SEQ ID NO: 1, содержащих 90 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1; последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией с SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 5;

фрагментов SEQ ID NO: 5, содержащих 90 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1; и последовательностей, обладающих по меньшей мере 90% гомологией с SEQ ID NO: 5.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая SEQ ID NO: 1.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 1.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 98% гомологией с SEQ ID NO: 1.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 99% гомологией с SEQ ID NO: 1.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая SEQ ID NO: 5.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 5.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 98% гомологией с SEQ ID NO: 5.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая последовательность, обладающую по меньшей мере 99% гомологией с SEQ ID NO: 5.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, выбранная из группы, состоящей из

фрагментов SEQ ID NO: 1, содержащих 270 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1;

фрагментов SEQ ID NO: 1, содержащих 450 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1;

фрагментов SEQ ID NO: 1, содержащих 630 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1;

фрагментов SEQ ID NO: 1, содержащих 720 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1;

фрагментов SEQ ID NO: 1, содержащих 770 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1;

фрагментов SEQ ID NO: 5, содержащих 270 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 5; фрагментов SEQ ID NO: 5, содержащих 450 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 5; фрагментов SEQ ID NO: 5, содержащих 630 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 5; фрагментов SEQ ID NO: 5, содержащих 720 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 5; и фрагментов SEQ ID NO: 5, содержащих 770 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 5.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где указанная молекула представляет собой плазмиду.

12. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген ВПЧ E6/E7, который индуцирует иммунный ответ у субъекта, причем указанная последовательность выбрана из группы, состоящей из

последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 2;

последовательностей, которые кодируют аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 2;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 2, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 2 содержат 120 или более аминокислот SEQ ID NO: 2;

последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6;

последовательностей, которые кодируют аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 6;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 120 или более аминокислот SEQ ID NO: 6.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 2.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

последовательности, которая кодирует SEQ ID NO: 6;

последовательностей, которые кодируют аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 6;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 120 или более аминокислот SEQ ID NO: 6.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п.14, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 6.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по п.14, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 150 или более аминокислот последовательности SEQ ID NO: 6;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 180 или более аминокислот последовательности SEQ ID NO: 6;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 210 или более аминокислот последовательности SEQ ID NO: 6; и

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 240 или более аминокислот последовательности SEQ ID NO: 6.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по п.12, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 2, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 2 содержат 150 или более аминокислот SEQ ID NO: 2;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 2, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 2 содержат 180 или более аминокислот SEQ ID NO: 2;

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 2, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 2 содержат 210 или более аминокислот SEQ ID NO: 2; и

фрагментов последовательностей, которые кодируют фрагменты SEQ ID NO: 2, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 2 содержат 240 или более аминокислот SEQ ID NO: 2.

18. Фармацевтическая композиция для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

19. Инъецируемая фармацевтическая композиция для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

20. Способ генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

21. Способ по п.20, где указанная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК.

22. Способ по п.21, где указанная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

23. Способ по п.20, где указанную молекулу нуклеиновой кислоты вводят индивидууму путем электропорации.

24. Способ по п.20, где у индивидуума диагностировали наличие инфекции ВПЧ.

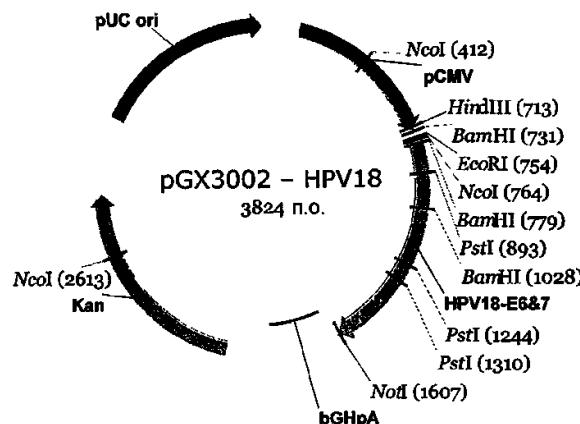
25. Рекомбинантная вакцина для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.
26. Рекомбинантная вакцина по п.25, где указанная рекомбинантная вакцина представляет собой рекомбинантную осповакцину.
27. Живая ослабленная вакцина для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.
28. Белок, содержащий аминокислотную последовательность антигена ВПЧ E6/E7, который индуцирует иммунный ответ у субъекта, выбранную из группы, состоящей из
- SEQ ID NO: 2;
- последовательностей, обладающих по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 2;
- фрагментов SEQ ID NO: 2, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 2 содержат 120 или более аминокислот SEQ ID NO: 2;
- SEQ ID NO: 6;
- последовательностей, обладающих по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 6;
- фрагментов SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 120 или более аминокислот SEQ ID NO: 6.
29. Белок по п.28, содержащий SEQ ID NO: 2.
30. Белок по п.28, содержащий последовательности, обладающие по меньшей мере 98% гомологией с SEQ ID NO: 2.
31. Белок по п.28, содержащий последовательности, обладающие по меньшей мере 99% гомологией с SEQ ID NO: 2.
32. Белок по п.28, содержащий последовательности, обладающие по меньшей мере 98% гомологией с SEQ ID NO: 6.
33. Белок по п.28, содержащий последовательности, обладающие по меньшей мере 99% гомологией с SEQ ID NO: 6.
34. Белок по п.28, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из
- SEQ ID NO: 6;
- последовательностей, обладающих по меньшей мере 95% гомологией с SEQ ID NO: 6;
- фрагментов SEQ ID NO: 6, где указанные фрагменты SEQ ID NO: 6 содержат 120 или более аминокислот SEQ ID NO: 6.
35. Белок по п.34, содержащий SEQ ID NO: 6.
36. Белок по п.34, содержащий
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 6, содержащие 150 или более аминокислот SEQ ID NO: 6;
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 6, содержащие 180 или более аминокислот SEQ ID NO: 6;
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 6, содержащие 210 или более аминокислот SEQ ID NO: 6; и
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 6, содержащие 240 или более аминокислот SEQ ID NO: 6.
37. Белок по п.28, содержащий
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 2, содержащие 150 или более аминокислот SEQ ID NO: 2;
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 2, содержащие 180 или более аминокислот SEQ ID NO: 2;
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 2, содержащие 210 или более аминокислот SEQ ID NO: 2; и
- фрагменты последовательности SEQ ID NO: 2, содержащие 240 или более аминокислот SEQ ID NO: 2.
38. Фармацевтическая композиция для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая белок по п.28.
39. Инъецируемая фармацевтическая композиция для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая белок по п.28.
40. Рекомбинантная вакцина для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая белок по п.28.
41. Рекомбинантная вакцина по п.40, представляющая собой рекомбинантную осповакцину.
42. Живая ослабленная вакцина для генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, содержащая белок по п.28.
43. Способ генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму композиции, содержащей белок по п.28.
44. Способ генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму рекомбинантной вакцины по п.25.
45. Способ генерации иммунного ответа против ВПЧ у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму живой ослабленной вакцины по п.27.

VGX 3100 (часть) - внутренний код плазмиды pGX3002 - ВПЧ 18-6 и 7

Плазмиды экспрессируют антигены папилломавируса человека 18-6&7 (ВПЧ 18 E6 и 7), приводимые в действие промотором CMV (pCMV) гормона роста крупного рогатого скота с 3' конца и сигналом полиаденилирования (bGHpA); основа pVAX включает ген устойчивости к канамицину (Kan) и точку начала репликации плазмиды (pUC ori).

Элементы:**Пары оснований**

Промотор CMV:	137-724
Кодирующая последовательность ВПЧ 18-6 и 7:	754-1606
bGH PolyA:	1649-1879
Устойчивость к Kan:	2052-2846
pUC Ori:	3145-3818



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2