(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103180343 B
(45)授权公告日 2016.01.20

(21)申请号 201080068626.6
(22)申请日 2010.08.13
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.02.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2010/005367 2010.08.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/020871 KO 2012.02.16
(73)专利权人 株式会社吉耐森
地址 韩国京畿道城南市
(72)发明人 成永喆 徐相焕 徐裕锡
(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224
代理人 黎艳 万志香
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
A61P 15/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 9619496 A1,1996.06.27, 全文.
EP 1757615 A1,2007.02.28, 全文.
CN 101421306 A,2009.04.29, 全文.
Peter Ohlschlager,et al..An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response.《Vaccine》.2006, 第24卷(第15期), 第2880-2893页.

审查员 高赟

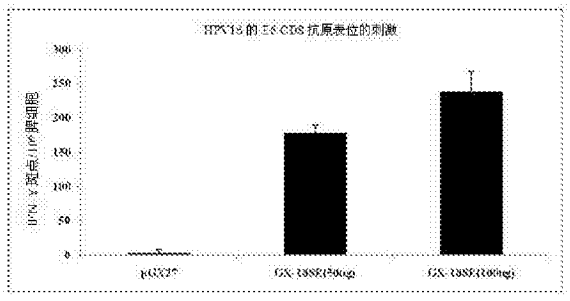
权利要求书1页 说明书6页
序列表7页 附图3页

(54)发明名称

用于预防或治疗宫颈癌的、包含人乳头瘤病毒变形体及免疫增强剂的组合物

(57)摘要

本发明涉及用于预防或治疗包括人乳头瘤病毒变形体及免疫增强剂的宫颈癌的组合物。更具体地,融合蛋白通过诱导HPV16及18型抗原特异性免疫应答治疗由HPV引起的肿瘤,所述融合蛋白包括:融合多肽,该融合多肽被重组以使人乳头瘤病毒16及18型的抗原E6、E7的三维结构变形;信号肽,该信号肽用于分泌所述融合多肽;和免疫增强肽。



CN 103180343 B

1. 一种融合蛋白，其特征在于，该融合蛋白由以下部分组成：

融合多肽，所述多肽由 HPV-16 的 E6 蛋白的第 1 个 - 第 85 个氨基酸，HPV-16 的 E7 蛋白的第 1 个 - 第 65 个氨基酸，HPV-16 的 E6 蛋白的第 71 个 - 第 158 个氨基酸，HPV-16 的 E7 蛋白的第 51 个 - 第 98 个氨基酸，以及 HPV-18 的 E6 蛋白的第 1 个 - 第 85 个氨基酸，HPV-18 的 E7 蛋白的第 1 个 - 第 65 个氨基酸，HPV-18 的 E6 蛋白的第 71 个 - 第 158 个氨基酸，HPV-18 的 E7 蛋白的第 51 个 - 第 105 个氨基酸依次连接组成；

用于分泌所述融合多肽的信号肽；和

免疫增强肽，所述免疫增强肽为如 SEQ ID NO:3 所示的 Flt3L；

其中，所述信号肽、免疫增强肽和融合多肽依次连接。

2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述信号肽为选自组织型纤溶酶原激活物 tPa、HSV gDs 及生长激素的分泌信号肽中的一种或多种。

3. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述信号肽如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合多肽为如 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。

5. 多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码根据权利要求 1 所述的由融合多肽、信号肽和免疫增强肽所组成的融合蛋白。

6. 根据权利要求 5 所述的多核苷酸，其特征在于，所述融合多肽由如 SEQ ID NO :4 所示的碱基序列编码而成。

7. 根据权利要求 5 所述的多核苷酸，其特征在于，所述信号肽由如 SEQ ID NO :5 所示的碱基序列编码而成。

8. 根据权利要求 7 所述的多核苷酸，其特征在于，所述免疫增强肽由如 SEQ ID NO :6 所示的碱基序列编码而成。

9. 重组载体，其特征在于，该重组载体包含权利要求 5 所述的多核苷酸。

10. 宿主细胞，其特征在于，该宿主细胞由权利要求 9 所述的重组载体转化而成。

11. 表达权利要求 1 所述的融合蛋白的方法，其特征在于，该方法为通过培养权利要求 10 所述的宿主细胞来完成的。

12. 用于治疗宫颈癌的组合物，其特征在于，该组合物包括作为活性成分的选自权利要求 1 所述的融合蛋白、由表达所述融合蛋白的重组载体转化而成的宿主细胞及其均浆中的一种或多种物质。

13. 根据权利要求 12 所述的组合物，其特征在于，该组合物进一步包含医学上可接受的载体。

14. 根据权利要求 12 所述的组合物在制备治疗宫颈癌的药物中的用途。

用于预防或治疗宫颈癌的、包含人乳头瘤病毒变形体及免疫增强剂的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗宫颈癌的、包含人乳头瘤病毒(human papillomavirus;HPV)变形体及免疫增强剂的组合物。更具体地,融合蛋白通过诱导HPV16和18型抗原特异性免疫应答治疗由HPV引起的肿瘤。所述融合蛋白包括融合多肽(Polypeptide)、信号肽及免疫增强肽,所述融合多肽被重组,以使作为人乳头瘤病毒16和18型的抗原E6、E7的三维结构变形。

背景技术

[0002] 众所周知,宫颈癌(cervical cancer)是由于受人乳头瘤病毒16和18型等的高危型人乳头瘤病毒的感染而引起的疾病(zur Hausen,H et al.Biochem Biophys Acta 1996,1288;F55-F78,Mark H et al.J Natl Cancer Inst 1993,85;958-964)。在HPV蛋白中E6、E7蛋白对宫颈癌的发病起主要作用,而且已确认在宫颈癌患者的肿瘤组织中表达99%,从而成为制备用于治疗和预防宫颈癌的疫苗的主要靶物质(von Knebel Doeberitz et al.Int.J.Cancer 1992,51;831-834)。E6与已知用作肿瘤抑制蛋白p53结合,通过促进p53的分解,用细胞凋亡(apoptosis)途径阻止细胞周期的进行。E7与作为肿瘤抑制因子的视网膜母细胞瘤蛋白pRb(retinoblastoma protein)结合,通过使之失活并促进其分解,诱导细胞周期进入S期(Cobrinik et al.,Trends Biochem Sci 1992,17:312-5)。

[0003] 然而,为治疗宫颈癌,在使用通过同时表达HPV16的E6、E7蛋白的核酸序列的组合物的临床试验中,其疗效并不显著(Garcia F et al.Obstet Gynecol 2004,103;317-326)。此结果表明,仅施用HPV抗原是无法发生足以治疗或抑制宫颈癌的抗原特异性免疫应答的。

[0004] 因此,为治疗子宫癌,需增强E6、E7的免疫原性(immunogenicity),并且需消除所述蛋白的致癌能力。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明的目的在于,提供用于预防或治疗由HPV引起的疾病的新型融合蛋白及编码所述融合蛋白的多核苷酸(polynucleotide)。所述融合蛋白可抑制HPV E6、E7蛋白的致癌能力并展现增强的免疫原性。

[0007] 本发明的另一个目的在于,提供表达所述融合蛋白的重组载体(recombinant vector)、包含所述载体的宿主细胞以及用所述宿主细胞表达融合蛋白的方法。

[0008] 本发明的另一个目的在于,提供用所述融合蛋白的、用于预防或治疗由HPV引起的疾病的组合物。

[0009] 本发明的另一个目的在于,提供用所述组合物的、用于预防或治疗由HPV引起的疾病的方法。

[0010] 技术方案

[0011] 为达到上述目的，一方面，本发明提供融合蛋白，该融合蛋白包括：融合多肽，即三维结构变形的、源于人乳头瘤病毒16和18型并包含SEQ ID NO：1氨基酸序列的E6、E7；用于分泌所述融合多肽的信号肽；和免疫增强肽。

[0012] 另一方面，本发明提供多核苷酸，该多核苷酸用于编码本发明的融合蛋白。

[0013] 另一方面，本发明提供重组载体，该重组载体包括本发明的多核苷酸。

[0014] 另一方面，本发明提供宿主细胞，该宿主细胞由本发明的重组载体转化而成。

[0015] 另一方面，本发明提供用于表达本发明的融合蛋白的方法，该方法是通过培养本发明的经转化的宿主细胞完成的。

[0016] 另一方面，本发明提供用于预防或治疗由人乳头瘤病毒引起的疾病的组合物，该组合物包括作为活性成分的、选自本发明的融合蛋白、由表达所述融合蛋白的重组载体转化而成的宿主细胞及其均浆(homogenate)中的一种或多种的物质。

[0017] 另一方面，本发明提供用于预防或治疗由人乳头瘤病毒引起的疾病的方法，该方法包括向需要者施用有效剂量的本发明的组合物的步骤。

[0018] 有益效果

[0019] 本发明所制备的融合蛋白通过诱导高的HPV16和18型抗原特异性免疫应答来治疗由HPV引起的肿瘤，所述融合蛋白包括为改变源于HPV16和18型E6、E7蛋白的三维结构而被重组的融合蛋白、用于向细胞外分泌该融合蛋白的信号肽及免疫增强肽。

附图说明

[0020] 图1展示了对抗癌模型中的C57BL/6小鼠皮下注射肿瘤细胞株TC-1并经过本发明的GX-188E治疗后展示的HPV16的E6特异性CD8+T细胞应答的图。

[0021] 图2展示了对抗癌模型中的C57BL/6小鼠皮下注射肿瘤细胞株TC-1并经过本发明的GX-188E治疗后展示的HPV16的E7特异性CD8+T细胞应答的图。

[0022] 图3展示了对抗癌模型中的C57BL/6小鼠皮下注射肿瘤细胞株TC-1并经过本发明的GX-188E治疗后展示的HPV18的E6特异性CD8+T细胞应答的图。

[0023] 图4展示了对抗癌模型中的C57BL/6小鼠皮下注射肿瘤细胞株TC-1并经过本发明的GX-188E治疗后展示的HPV18的E7特异性CD8+T细胞应答的图。

[0024] 图5展示了对抗癌模型中的C57BL/6小鼠皮下注射肿瘤细胞株TC-1并经过本发明的GX-188E治疗后展示的抗癌效果的图。

具体实施方式

[0025] 下面将详细地说明本发明的内容。

[0026] 本发明涉及融合蛋白，该融合蛋白包括：源于人乳头瘤病毒16及18型并包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的三维结构变形的E6、E7融合多肽；用于分泌所述融合多肽的信号肽；和免疫增强肽。

[0027] 本发明的融合蛋白包括融合多肽，该融合多肽被重组以使源于人乳头瘤病毒16及18型的E6、E7的三维结构变形。更具体地，所述融合多肽由源于人乳头瘤病毒16型的E6蛋白的第1～85位的氨基酸、E7蛋白的第1～65位的氨基酸、E6蛋白的第71～158位

的氨基酸、E7 蛋白的第 51 ～ 98 位的氨基酸和源于人乳头瘤病毒 18 型的 E6 蛋白的第 1 ～ 85 位的氨基酸、E7 蛋白的第 1 ～ 65 位氨基酸、E6 蛋白的第 71 ～ 158 位的氨基酸、E7 蛋白的第 51 ～ 105 位的氨基酸组成。

[0028] 最为具体地，融合多肽可包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

[0029] 此外，所述信号肽指包括约 20 ～ 30 个氨基酸的肽，所述肽能将在细胞内表达的蛋白，尤其将包含 E6、E7 融合多肽的蛋白分泌至细胞外。而且，用于编码所述肽的核酸序列被称为“分泌信号序列”。由于本发明的 E6、E7 融合多肽是在受病毒感染的细胞的核内表达的蛋白 (nucleus protein)，其免疫力弱。因此，由分泌信号序列表达的信号肽诱导三维结构变形的 E6、E7 分泌至细胞外，从而增强抗原特异性体液免疫应答 (humoral immune response) 及细胞免疫应答 (cellular immune response)。

[0030] 所述信号肽可使用包括哺乳动物等的高等真核细胞内的信号肽，如 tPA(组织型纤溶酶原激活物)、HSV gDs，或可使用生长激素等的分泌信号序列。优选地，可使用 tPA。更优选地，可包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

[0031] 此外，免疫增强肽指激活与免疫应答相关的细胞 (如，树突状细胞等) 以增强免疫应答的肽。

[0032] 所述免疫增强肽可使用 CD40 配体、Flt3 配体 (fms 样酪氨酸激酶 3 配体)、鞭毛蛋白或 OX40 等。优选地，可使用 Flt3 配体。所述 Flt3 配体是能够诱导树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的增殖与成熟的因子，经抗原可增强免疫应答，而且在与肿瘤抗原融合时具有能非常有效地减少肿瘤的效果。更优选地，所述 Flt3 配体包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列。

[0033] 另一方面，本发明涉及用于编码本发明的融合蛋白的多核苷酸。

[0034] 所述多核苷酸用于编码本发明的融合蛋白，所述 E6、E7 融合多肽可由 SEQ ID NO : 4 的碱基序列编码而成，但不限于此。此外，所述信号肽可由 SEQ ID NO :5 的碱基序列编码而成，但不限于此。此外，所述免疫增强肽可由 SEQ ID NO :6 的碱基序列编码而成，但不限于此。

[0035] 此外，本发明的多核苷酸可通过化学合成方法或遗传工程技术而制备。化学合成方法为本领域技术人员所熟知的，可使用任何方法。此外，也可通过委托商业核酸合成及制造商购买。当通过遗传工程技术制备时，例如，通过分别制得用于编码已知的 E6 和 E7 融合多肽、信号肽和免疫增强肽的核酸片段，连接这些片段以符合读框来制备。所述制得核酸片段的方法为本领域已知的，本领域技术人员可通过适当的限制酶容易将其连接。在本发明的具体实施方式中，将公开通过化学合成法制备的方法。

[0036] 另一方面，本发明涉及包含本发明的多核苷酸的重组载体。

[0037] 在本发明中，“载体”指包括外源 DNA 的遗传结构，所述外源 DNA 被插入于编码多肽的基因组中。本发明所述的载体为将分泌信号序列、编码人乳头瘤病毒的三维结构变形的 E6 和 E7 融合多肽的核酸序列以及编码免疫增强肽的核酸序列等被插入至基因组中的载体，例如，包括质粒载体 (plasmid vector)、粘粒载体 (cosmid vector)、噬菌体 (bacteriophage vector)、酵母载体 (yeast vector) 或如腺病毒载体 (adenoviral vector)、逆转录病毒载体 (retroviral vector) 和腺伴随病毒载体 (adeno-associated viral vector) 的病毒载体 (viral vector)。

[0038] 所述分泌信号序列为能编码肽的核酸序列，所述肽能将在细胞内表达的肿瘤抗原

分泌至细胞外并使其被免疫细胞识别，其包括如 tPA、HSV gDs 或生长激素的分泌信号序列。优选地，可以使用哺乳动物的高等真核细胞中所用的分泌信号序列。更优选地，可使用 tPA（组织型纤溶酶原激活物）。最优选地，所述分泌信号序列可包含 SEQ ID NO :5 的碱基序列。此外，本发明的分泌信号序列可用在宿主细胞中具有高表达频率的遗传密码子 (codon) 替换。

[0039] 此外，编码所述免疫增强肽的核酸序列指编码通过激活与免疫应答相关的细胞来增强免疫应答的肽的核酸序列。所述免疫增强肽可使用 CD40 配体、Flt3 配体、鞭毛蛋白 (Flagellin) 或 OX40 等。更优选地，免疫增强肽可使用 Flt3 配体。此外，编码本发明的免疫增强肽的核酸序列可用在宿主细胞中具有高表达频率的遗传密码子替换。

[0040] 此外，本发明的重组载体所包含的所述多核苷酸可用在宿主细胞中具有高表达频率的遗传密码子替换。本发明中所表达的“用在宿主细胞中具有高表达频率的遗传密码子替换”或“遗传密码子最优化”指，当宿主细胞内的 DNA 转录或翻译成蛋白时，根据宿主中存在的具有更高偏爱性的遗传密码子，在指示氨基酸的遗传密码子中用更高偏爱性的遗传密码子替多核苷酸遗传密码子，从而增强由核酸编码的氨基酸或蛋白的表达效率。

[0041] 其中，“宿主细胞”包括原核或真核细胞，真核细胞不仅指包括真菌、酵母等的低等真核细胞，还指包括哺乳动物等的高等真核细胞。

[0042] 本发明的重组载体包括用编码所述融合蛋白的核酸，该核酸形式是在宿主细胞中适于表达编码本发明的融合蛋白的核酸的形式。即，本发明的重组载体包括一个或多个基于宿主细胞选取的用于表达的调控序列，该序列与要表达的核酸序列可操作地链接。

[0043] “可操作地链接”指，目标核苷酸序列（例如，在体外转录 / 翻译系统中或在宿主细胞中）以合适方式与所述调控序列链接，以完成其表达。

[0044] 术语“调控序列”包括启动子、增强子及其他调控元件（例如，多腺苷酸化信号）。调控序列包括在众多宿主细胞中指示组成型表达目标核酸的调控序列，以及在特定的宿主细胞中指示表达核酸的调控序列（例如，组织特异性调控序列）。本领域技术人员能理解表达载体的设计可根据要转化的宿主细胞的选择及目标蛋白表达水平等的因素而改变。本发明的表达载体可被引入宿主细胞中以表达所述融合蛋白。

[0045] 此外，本发明的载体可通过标准重组 DNA 技术制备，该标准重组 DNA 技术包括，如平端和粘端连接、通过用限制酶的处理提供适当的末端、为防止不当结合通过碱性磷酸酶处理的磷酸基的去除以及通过 T4DNA 链接酶的酶链接等。通过化学合成方法或遗传工程技术制得的用于编码信号肽、人乳头瘤病毒的 E6 和 E7 融合多肽和免疫增强肽的各 DNA 可与包含适合的调控序列的载体进行重组，以提供本发明的载体。包含所述调控序列的载体可通过商业方法进行购买或制备，本发明制备并使用 pGX27，pGX27 用作制备 DNA 疫苗的载体。

[0046] 在本发明的一个实施例中，所述重组载体可用于制备细胞株来制造本发明的融合蛋白，用作基因治疗的用于基因转移的载体，或用作向受试者施用于的药物活性成分。

[0047] 在另一方面，本发明涉及转化为载体的宿主细胞。所述宿主细胞的种类如上所述。转化可用通过将核酸导入有机体、细胞、组织或器官内的已知的方法，根据宿主细胞在本领域技术人员可理解的范围内选择适合的技术实施所述方法。所述方法包括电穿孔法 (electroporation)、原生质体融合、磷酸钙 ($CaPO_4$) 沉淀、氯化钙 ($CaCl_2$) 沉淀、用碳化硅纤维的搅拌、农杆菌介导的转化、聚乙二醇，硫酸葡聚糖、脂质体转染 (lifofectamin) 等，但

不限于此。

[0048] 在另一方面，本发明涉及用于表达本发明的融合蛋白的方法，即通过培养本发明的转化的宿主细胞来完成。

[0049] 通过在适当的培养基内培养已转化的宿主细胞，或通过培养导入至任何动物体内的所转化的宿主细胞，可容易地表达并大量制备本发明的融合蛋白。

[0050] 另一方面，本发明涉及用于预防或治疗由个体人乳头瘤病毒引发的疾病的组合物，该组合物包括选自本发明的融合蛋白、由用于表达所述融合蛋白的重组载体转化的宿主细胞及其均浆中的一种或多种的物质。

[0051] 在本发明中，“受试者”包括人、猴、鼠、猪、牛及兔子等的哺乳动物，但不限于此。

[0052] 此外，由所述病毒引发的疾病可包括宫颈癌、肝门与生殖器疣 (anogenital warts)、赘疣 (verruca) 等。

[0053] 此外，本发明的组合物可包含药学上可接受的载体。所述载体包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、甲基羟基苯甲酸酯、丙基羟基苯甲酸酯、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油等。进一步，该组合物还可包含润滑剂、润湿剂、调味剂、乳化剂和防腐剂等。

[0054] 本发明的组合物可通过如静脉内、肌内、口服、经皮、粘膜内、鼻内、气管内或皮下等的任何途径向受试者给药，但不限于此。本发明的组合物可通过将组合物施用至体外培养的细胞中，然后将所培养的细胞向受试者体内施用，从而间接向受试者用药。本发明可进行全身或局部给药。

[0055] 本发明的组合物可制成用于口服或注射如肠外的剂型，所述口服剂型包括颗粒剂、粉剂、液体、片剂、胶囊剂或干糖浆剂，但不限于此。优选地，本发明的组合物的剂型可以为液体或注射液剂型。

[0056] 本发明的作为活性成分的融合蛋白或重组表达载体的有效剂量可以为约 0.05 ～ 500mg/kg，优选为 0.5 ～ 50mg/kg，以单次剂量或分批剂量为准。然而，所述给药剂量应由所需治疗的疾病的状况、患者的年龄及体重、症状的严重性等因素确定，因此所述范围不会限于此。

[0057] 另一方面，本发明涉及用于预防或治疗由个体人乳头瘤病毒引发的疾病的方法，该方法包括向受试者施用有效量的本发明的组成物的步骤。

[0058] 本发明的药物组合物、该组合物的功效、给药方法及给药剂量等的内容如上所述。

[0059] 在本发明的方法中，受试者包括人、猴、鼠、猪、牛和兔等的哺乳动物，但不限于此。

[0060] 此外，由所述病毒引发的疾病包括宫颈癌、肝门与生殖器疣、赘疣等。

[0061] 以下，根据本发明的实施例及比较例，将更为详细地说明本发明，但本发明的范围不限于下列实施例。

[0062] 实施例

[0063] <u>< 实施例 1>GX-188E DNA 的结构</u>

[0064] 本发明的实施例中所用的缩写的定义如下：最优化核酸序列，"tPa" 或 "t" 表示组织型纤溶酶原激活物的分泌信号序列；"F" 或 "Flt3L" 表示 fms 样酪氨酸激酶 3 配体。

[0065] 以相连形式化学合成包含 SEQ ID NO:5 核酸序列的最优化遗传密码子的 tPa 分

泌信号序列和包含 SEQ ID NO:6 核酸序列的最优化遗传密码子的 Flt3L。在末端加入 KpnI(5')、NheI(3') 位点,以便插入于载体中。用 KpnI 和 NheI 限制酶处理用于制备 DNA 疫苗的载体 pGX10(韩国专利申请公布号 2003-0047667),然后用连接酶连接所合成的 tPa-Flt3L,从而制备 pGX10/tF。

[0066] 以相连形式化学合成用于编码 HPV16E6 的第 1 ～ 85 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV16E7 的第 1 ～ 65 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV16E6 的第 71 ～ 158 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV16E7 的第 51 ～ 98 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV18E6 的第 1 ～ 85 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV18E7 的第 1 ～ 65 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV18E6 的第 71 ～ 158 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列、用于编码 HPV18E7 的第 51 ～ 105 位氨基酸的最优化遗传密码子的核酸序列(以下,16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C:SEQ ID NO:4)。在末端加入 NheI(5')、XbaI(3') 位点,以便插入到载体中。用 NheI 和 XbaI 酶处理 pGX10/tF16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C,然后用连接酶连接所合成的 16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C,从而制备 pGX10/tFpGX10/tF16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C。通过用 KpnI 和 Xbal 酶处理 pGX10/tF,分离出 tF16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C,用 NheI 和 XbaI 酶处理 pGX10 后,用连接酶连接 16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C,从而制备 pGX27/tF16E6N16E7N16E6C16E7C18E6N18E7N18E6C18E7C(以下均称 "GX-188E")。

[0067] <实施例 2>GX-188E 对宫颈癌的治疗效果的证实

[0068] 为确认 GX-188E 对宫颈癌的治疗效果,对 C57BL/6 小鼠皮下注射 5×10^5个 TC-1 肿瘤细胞,在注射后的第 3 天和第 8 天肌肉注射 50μg 及 100μg 量的 GX-188E,然后进行电穿孔法。从注射肿瘤细胞起的第 27 天为止观察肿瘤细胞的体积变化,在第 36 天去除小鼠的脾,然后将 1×10^6个细胞与 IL-2 及 HPV16 的 E6CD8T 细胞表位(抗原决定基,epitope)($E6_{48\ 57}$;EVYDFAFRDL,Peptron,韩国)或 HPV18 的 E7CD8T 细胞表位($E7_{49\ 57}$;RAHYNIVTF,Peptron,韩国)或 HPV18 的 E6 肽池(peptide pool)或 HPV18 的 E7 肽池一起置于已用 50μl 的 5μg/ml 的抗鼠 IFN-g 抗体(BD Pharmigen,Sandiego,加州)包被的平板中并在 37℃和 5% CO_2的培养箱(Froma,Minnesota,美国)中培养 24 小时。用 PBST 洗涤所述平板后,向其中分别加入 50μl 的 2μg/ml 的含有悬垂生物素的 IFN-g 检测抗体(BD Pharmigen,Sandiego,加州)并在常温下培养约 3 小时。之后,用 PBST 洗涤,其中加入 50μg 的已稀释至 1:2000 的链霉抗生物素蛋白 -AKP(碱性磷酸酶)并在常温下培养约 1 小时。用 PBST 洗涤后,分别加入 50μl 的在 10ml 的碱性磷酸盐缓冲液中的 66μl 的 NBT(Promega,Madison,WI) 与 33μl 的 BCIP(Promega,Madison,WI) 的混合物,以使其相互反应。将平板置于 37℃培养箱中约 30 分钟,然后用蒸馏水(D.W.)洗涤并用计数器对所生成的斑点进行计数。

[0069] 与用作为对照组的 pGX27 处理过的小鼠相比,可确认用 GX-188E 对 TC-1 肿瘤细胞治疗过的小鼠的肿瘤体积明显减小(请参照图 5)。

[0070] 产业应用性

[0071] 本发明的融合蛋白可用于由 HPV 引起的肿瘤的治疗剂。

[0001]

序列表

<110> 株式会社吉耐森（GENEXINE, INC.）

<120> 用于预防或治疗宫颈癌的、包含人乳头瘤病毒变形体及免疫增强剂的组合物

<130> AGP13860715KR

<140> 201080068626.6
<141> 2010-08-13

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 579
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 结构上经修饰的源于HPV16及HPV18型的E6和E7

<400> 1

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro His Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
50 55 60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg Tyr Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr
85 90 95

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln
100 105 110

Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly
115 120 125

[0002]

Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
130 135 140

Lys Cys Asp Ser Thr Leu Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
145 150 155 160

Ser Glu Tyr Arg Tyr Tyr Cys Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
165 170 175

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
180 185 190

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
195 200 205

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
210 215 220

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu His Tyr
225 230 235 240

Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys
245 250 255

Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met
260 265 270

Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Met Ala
275 280 285

Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys
290 295 300

Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr
305 310 315 320

Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala Phe Lys
325 330 335

Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala Cys His
340 345 350

Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg Tyr Tyr Ser

[0003]

355 360 365

Asp Ser Val Met Tyr Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu
370 375 380

His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu
385 390 395 400

Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn
405 410 415

His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met
420 425 430

Leu Cys Met Cys Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg Tyr Tyr Ser
435 440 445

Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu
450 455 460

Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Lys Ile
485 490 495

Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg
500 505 510

Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val Ala Arg Arg Ala
515 520 525

Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala
530 535 540

Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe
545 550 555 560

Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala
565 570 575

Ser Gln Gln

[0004]

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 组织型纤溶酶原激活物分泌信号序列

<400> 2

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser
20

<210> 3
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> fms样酪氨酸激酶3配体

<400> 3

Ile Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe
1 5 10 15

Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro
20 25 30

Val Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu
35 40 45

Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val
50 55 60

Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile
65 70 75 80

His Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg
85 90 95

Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln
100 105 110

[0005]

Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys
115 120 125

Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp
130 135 140

Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gly Asp

<210> 4
<211> 1746
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最优化遗传密码子的结构上经修饰的源于HPV16及HPV18型的E6和E7的核酸序列

<400> 4
atgcaccaga agagaaccgc catgttccag gaccctcagg agagacctag gaagctgcct 60

cacctgtgta cagagctcca gacaaccatc cacgacatca tcctggagtg cgtgtactgt 120

aagcagcagc tgctgagaag agaggtgtac gacttcgcct tcagagacct gtgcatcgtg 180

tacagagacg gcaaccctta cgccgtgtgc gataagtgtc tgaagttcta ttccaaaatc 240

tccgaatata ggtacatgca cggcgacacc cctaccctgc acgagtacat gctggacctc 300

cagcctgaga ccacagacct gtactgctac gagcagctga acgacagctc tgaggaagag 360

gacgagattg acggacctgc tggccaggcc gagcctgaca gagcccacta caatatcgtg 420

acattctgtt gcaaatgcga ctccacactg gacaagtgcc tgaagttcta cagcaagatc 480

tctgagtaca gatactactg ctactctgtg tacggcacca cactggagca gcagtacaac 540

aagcctctgt gcgacctcct gatccgctgc atcaactgcc agaagcctct gtgccctgag 600

gagaagcaga gacacctgga caagaagcag cggttccaca acatcagagg cagatggacc 660

ggcaggtgca tgtcctgctg tagatcctcc agaaccagac gggagaccca gctgcactac 720

aacatcgtga ccttctgctg caagtgcgac tctaccctga gactgtgcgt gcagtctacc 780

cacgtggaca tcagaaccct ggaggacctg ctgatgggca ccctgggcat cgtgtgccct 840

atctgctctc agaagcctat ggccaggttc gaggacccta ccagaagacc ctacaagctg 900

cctgacctgt gcaccgagct gaacacctct ctgcaagaca tcgagatcac ctgcgtgtac 960

[0006]

tgcaagaccg tgctggagct gaccgaggtg ttcgagttcg ccttcaagga cctgttcgtg 1020

gtgtacagag acagcatccc tcacgctgcc tgccacaagt gcatcgactt ctattccagg 1080

atcagggagc tgcgctatta ctccgactct gtgatgtacg gccccaaggc caccctccag 1140

gacatcgtgc tgcacctgga gcctcagaac gagatccccg tggacctgct gtgccacgag 1200

cagctgtctg actctgaaga ggagaacgac gagatcgacg gcgtgaacca ccagcacctg 1260

cctgccagga gagctgaacc ccagcggcat accatgctgt gtatgtgctt ctactctagg 1320

atcagagagc tgaggtacta ctctgactct gtgtacggcg acaccctgga gaagctgacc 1380

aacaccggcc tgtacaacct gctgatccgg tgcctgaggt gccagaagcc tctgaaccct 1440

gccgagaagc tgagacacct gaacgagaag agaagattcc acaagatcgc tggccactac 1500

agaggccagt gccactcttg ctgcaacaga gccagacagg agagactcca gcggagaagg 1560

gagacccagg tggccagaag agccgagcct cagagacaca ccatgctgtg catgtgctgc 1620

aagtgcgagg ccagaatcga gctggtggtg gagagctctg ccgacgacct gagagccttc 1680

cagcagctgt tcctgtctac cctgagcttc gtgtgccctt ggtgcgcctc tcagcagtaa 1740

tctaga 1746

<210> 5
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最优化遗传密码子的组织型纤溶酶原激活物分泌信号序列的核酸序列

<400> 5
atggatgcta tgaaacgggg cctgtgctgc gtgctgctcc tgtgcggcgc tgtgtttgtg 60

agccctagc 69

<210> 6
<211> 489
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 最优化遗传密码子的fms样酪氨酸激酶3配体的核酸序列

<400> 6
atcacccagg actgctcctt ccaacacagc cccatctcct ccgacttcgc tgtcaaaatc 60

cgtgagctgt ctgactacct gcttcaagat tacccagtca ccgtggcctc caacctgcag 120

[0007]

gacgaggagc tctgcggggg cctctggcgg ctggtcctgg cacagcgctg gatggagcgg 180

ctcaagactg tcgctgggtc caagatgcaa ggcttgctgg agcgcgtgaa cacggagata 240

cactttgtca ccaaatgtgc ctttcagccc ccccccagct gtcttcgctt cgtccagacc 300

aacatctccc gcctcctgca ggagacctcc gagcagctgg tggcgctgaa gccctggatc 360

actcgccaga acttctcccg gtgcctggag ctgcagtgtc agcccgactc ctcaaccctg 420

ccacccccat ggagtccccg gcccctggag gccacagccc cgacagcccc gggcggcggc 480

agcggcgat 489

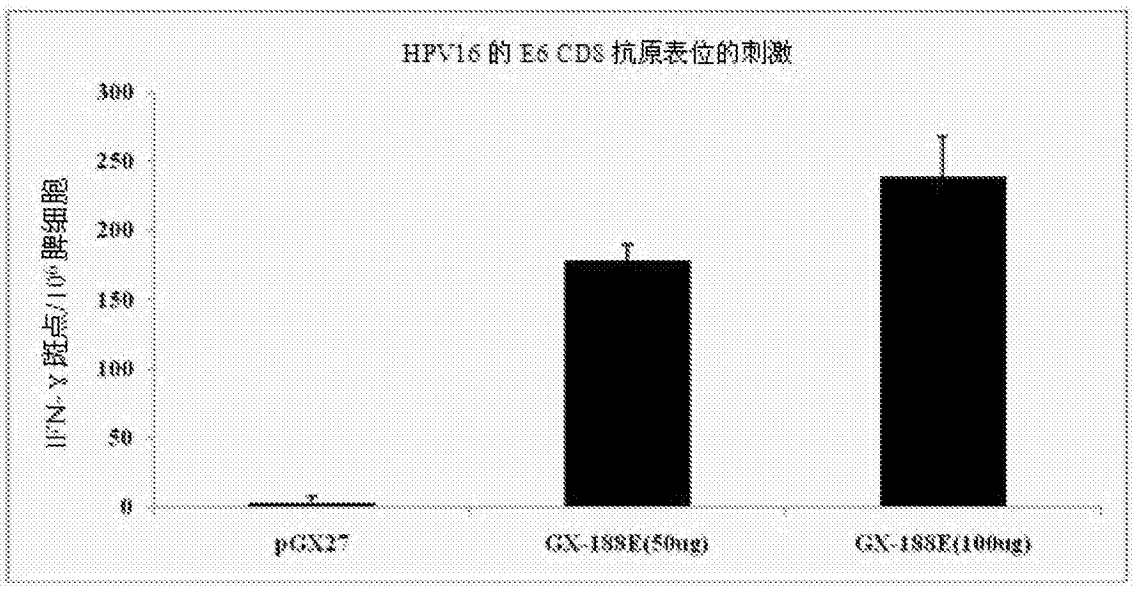

HPV16 的 E6 CDS 抗原表位的刺激
IFN-γ 斑点/10^6 脾细胞
300
250
200
150
100
50
0
pGX27
GX-188E(50ug)
GX-188E(100ug)

图 1

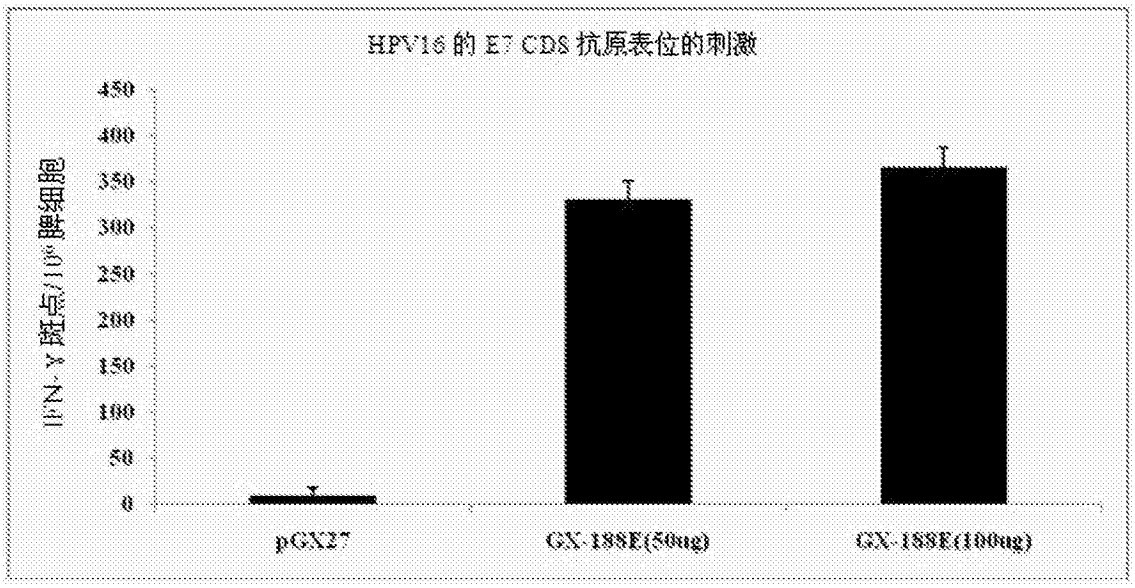

HPV16 的 E7 CDS 抗原表位的刺激
IFN-γ 斑点/10^6 脾细胞
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pGX27
GX-188E(50ug)
GX-188E(100ug)

图 2

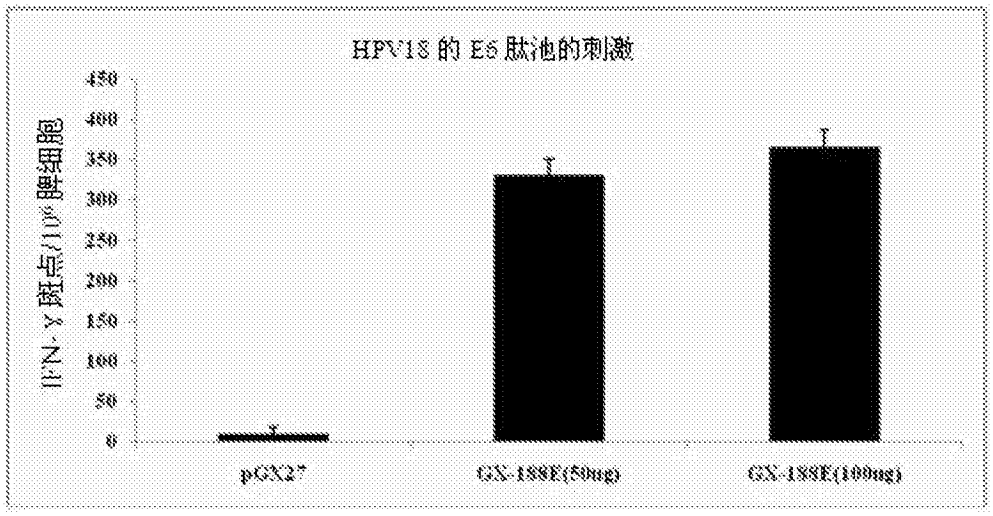

HPV18 的 E6 肽池的刺激
IFN-γ 斑点/10⁶ 脾细胞
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pGX27
GX-188E(50ug)
GX-188E(100ug)

图 3

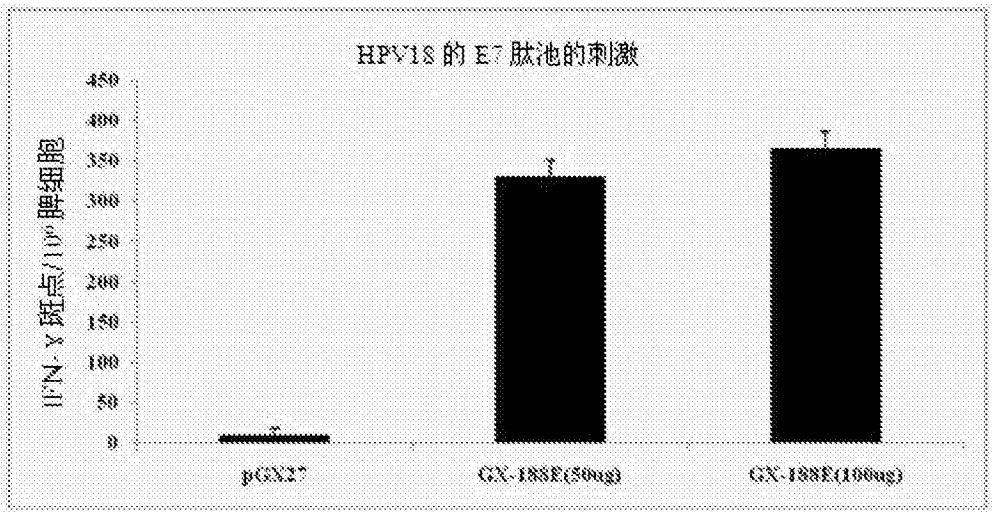

HPV18 的 E7 肽池的刺激
IFN-γ 斑点/10⁶ 脾细胞
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pGX27
GX-188E(50ug)
GX-188E(100ug)

图 4

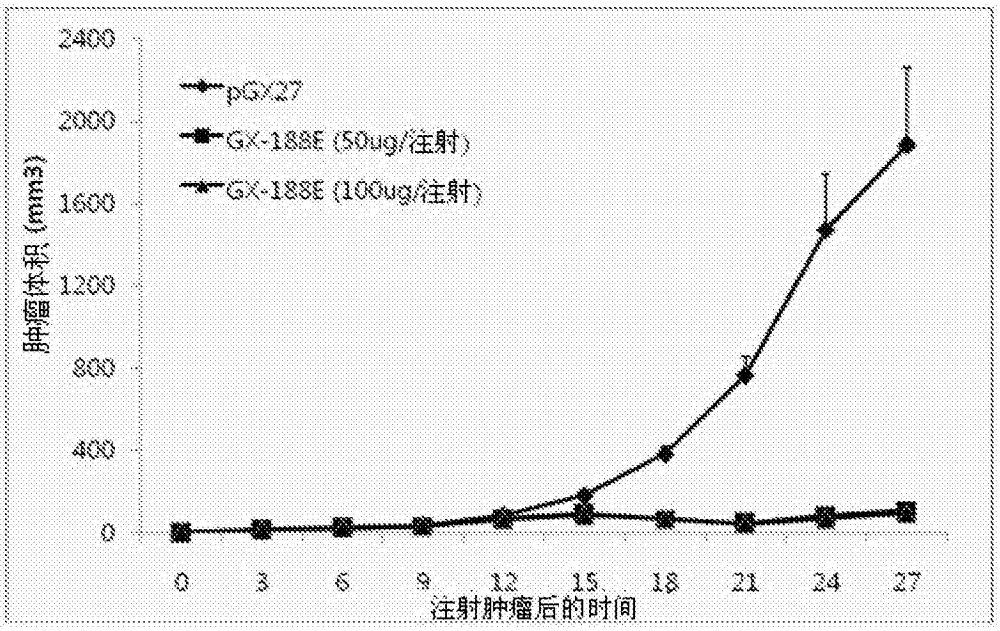

2400
2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 (mm3)
pGX27
GX-188E (50ug/注射)
GX-188E (100ug/注射)
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
注射肿瘤后的时间

图 5