



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107921110 B

(45) 授权公告日 2021.10.15

(21) 申请号 201680048197.3

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2016.08.18

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/12 (2006.01)

申请公布号 CN 107921110 A

C07K 14/005 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.04.17

C07K 14/025 (2006.01)

(30) 优先权数据

15181791.3 2015.08.20 EP

(56) 对比文件

16156334.1 2016.02.18 EP

CN 101591646 A, 2009.12.02

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 104039833 A, 2014.09.10

2018.02.13

CN 103864936 A, 2014.06.18

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 101100672 A, 2008.01.09

PCT/EP2016/069618 2016.08.18

US 2013064849 A1, 2013.03.14

(87) PCT国际申请的公布数据

Fahad N. Almajhdi等.Design of a highly effective therapeutic HPV16 E6/E7-specific DNA vaccine: optimization by different ways of sequence rearrangements (shuffling).《PLoS One》.2014, 第9卷(第11期), 第1-15页.

W02017/029360 EN 2017.02.23

Qing Zhang等.Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR).《Nucleic Acids Research》.2008, 第36卷第W513-W518页.

(73) 专利权人 扬森疫苗与预防公司

审查员 徐丹

地址 荷兰莱顿

(72) 发明人 E·M·邦尼克

J·H·H·V·屈斯泰

G·C·舍佩尔 K·奥斯特胡伊斯

T·G·乌伊尔 S·卡恩

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

权利要求书2页 说明书58页

代理人 左路 林晓红

序列表22页 附图23页

(54) 发明名称

治疗性HPV18疫苗

(57) 摘要

本发明提供了被用作针对HPV18和/或HPV16的治疗性疫苗的设计核酸构建体和多肽。

1. 一种核酸分子, 该核酸分子编码包括SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的第一多肽。
2. 根据权利要求1所述的核酸分子, 其中该第一多肽进一步包括人乳头瘤病毒(HPV) E2蛋白的至少一个表位。
3. 根据权利要求2所述的核酸分子, 其中该第一多肽包括HPV18 E2蛋白, 该HPV18 E2蛋白在它的DNA结合域具有缺失或突变和/或在它的反式激活域具有突变。
4. 根据权利要求3所述的核酸分子, 其中该第一多肽包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列。
5. 一种载体, 该载体包括根据权利要求1-4中任一项所述的核酸分子, 其中编码该第一多肽的序列可操作地连接至启动子。
6. 根据权利要求5所述的载体, 其中该载体是重组腺病毒。
7. 根据权利要求5所述的载体, 其中该启动子可操作地偶联到阻遏物操纵基因序列上, 阻遏蛋白可以结合至该阻遏物操纵基因序列上, 以便在所述阻遏蛋白的存在下阻遏该启动子的表达。
8. 根据权利要求6所述的载体, 其中该启动子可操作地偶联到阻遏物操纵基因序列上, 阻遏蛋白可以结合至该阻遏物操纵基因序列上, 以便在所述阻遏蛋白的存在下阻遏该启动子的表达。
9. 根据权利要求5所述的载体, 其中该载体是重组痘病毒。
10. 根据权利要求8所述的载体, 其中该载体是修饰的安卡拉痘苗(MVA)。
11. 根据权利要求5-10中任一项所述的载体, 该载体进一步包括编码可操作地连接至启动子的第二多肽的核酸, 其中该第二多肽包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。
12. 一种疫苗组合物, 该疫苗组合物包括根据权利要求5-11中任一项所述的载体和药学上可接受的赋形剂。
13. 一种疫苗组合物, 该疫苗组合物包括:
 - (a) 第一载体, 其是根据权利要求5-10中任一项所述的载体;
 - (b) 第二载体, 该第二载体包括编码可操作地连接至启动子的第二多肽的核酸, 其中该第二多肽包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列; 以及
 - (c) 药学上可接受的赋形剂。
14. 根据权利要求12或13中任一项所述的疫苗组合物在制备用于在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的药物中的用途。
15. 第一疫苗组合物和第二疫苗组合物在制备用于在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的药物中的用途, 该第一疫苗组合物包括根据权利要求5-10中任一项所述的载体和药学上可接受的赋形剂; 该第二疫苗组合物包括载体, 该载体包括编码可操作地连接至启动子的第二多肽的核酸, 其中该第二多肽包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。
16. 根据权利要求14或15所述的用途, 其中不止一次向该受试者给予所述药物。
17. 根据权利要求12或13中任一项所述的疫苗组合物在制备用于治疗受试者中持续性HPV感染、外阴上皮内瘤样病变(VIN)、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、肛门上皮内瘤样病变(AIN)、宫颈癌、口咽癌、阴茎癌、阴道癌或肛门癌的药物中的用途。
18. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述宫颈癌是宫颈鳞状细胞癌(SCC)。
19. 根据权利要求12或13中任一项所述的疫苗组合物在制备用于治疗持续性HPV感染

的药物中的用途。

20. 一种多部分试剂盒,该多部分试剂盒包括:

(a) 第一疫苗组合物,该第一疫苗组合物包括根据权利要求5-10中任一项所述的载体和药学上可接受的赋形剂;和

(b) 第二疫苗组合物,该第二疫苗组合物包括载体,该载体包括编码可操作地连接至启动子的第二多肽的核酸,其中该第二多肽包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

21. 一种多肽,该多肽包括SEQ ID NO:20。

治疗性HPV18疫苗

[0001] 本发明涉及医学领域并且更具体地涉及可以被用于抵抗人乳头瘤病毒类型18和/或类型16的治疗性疫苗的核酸构建体和多肽。

[0002] 发明背景

[0003] 人乳头瘤病毒 (HPV) 家族由多于100种类型 (也称为亚型) 组成,这些类型能够感染皮肤或黏膜的角质细胞。超过40种类型的HPV典型地通过性接触进行传播,并且肛殖区的HPV感染在无论男女中都非常常见。一些性传播的HPV类型可以引起生殖器疣。持续感染“高危”型HPV (例如16、18、31、45型) ——不同于引起皮肤疣的那些——可以发展成癌前病变和浸润性癌,例如宫颈癌、外阴癌、阴道癌、阴茎癌、口咽癌和肛门癌。在感染后的一至两年内,大部分的HPV感染将自发清除。在健康个体中,当抗原激发时,特异性针对HPV-16的病毒早期蛋白E2、E6和E7的循环的Th1-和Th2-型CD4+ T-细胞连同E6特异性的CD8+ T细胞迁移到皮肤中,表明针对HPV-16感染的成功防御通常与这些病毒早期抗原的系统效应T-细胞应答有关。在小部分 (约1%) 的感染个体中,HPV感染持续,最终导致生殖器肿瘤病变。在高危HPV中,HPV16和HPV18是宫颈癌的主要原因,一起造成了约70%的病例,并且这两种类型还在其他HPV诱导的癌症如肛门癌和口咽癌中起到了主要作用。在世界范围内,HPV是引起癌症的最重要的传染性病原体之一。

[0004] 抵抗HPV的疫苗接种被视为减少HPV感染发病率或影响的可行策略 (van der Burg 和 Melief, 2011, Curr Opinion Immunol [免疫学当今观点] 23:252-257)。

[0005] 基于由HPV16和18型的蛋白L1 (包膜蛋白) 所形成的病毒样颗粒 (VLP) 的预防性HPV疫苗在预防HPV16和HPV18的持续感染和相关疾病的方面中非常有效。这些疫苗被认为是通过诱导抵抗L1蛋白的中和抗体提供了无菌免疫。添加来自另外的高危HPV类型的基于L1的VLP可以进一步增加此类疫苗赋予的保护宽度。

[0006] 然而,当此类疫苗可以预防初始感染 (即,它们引起了预防) 时,不存在对由HPV16和HPV18引起的已形成的生殖器病变的有益作用的证明,因此它们不被认为是抵抗HPV的治疗性疫苗 (Hildesheim等人, 2007, JAMA [美国医学会杂志] 298:743-53)。

[0007] 尽管引入了这些预防性疫苗,但是大量人群已经获得或仍处于获得持久性高危的HPV感染的风险,并且因此处于患上癌症的风险。用于根除已形成的HPV感染和相关疾病的治疗性疫苗是一项紧急未满足的医疗需要。

[0008] 已经描述了一些解决这项需要的尝试。例如,已经用各种不同的疫苗接种策略进行临床试验,如,由来自牛型结核菌 (*Mycobacterium bovis*) 和HPV-16 E7的热休克蛋白 (Hsp) 组成的或由来自HPV-16和HPV-18的E6、E7和L2的融合蛋白组成的融合蛋白,嵌合的L1-E7VLP,表达HPV-16和HPV-18的E6和E7或牛乳头瘤病毒E2的重组牛痘病毒,表达HPV-16和HPV-18的E6和E7的CTL表位的DNA疫苗,分泌HPV-16 E7抗原的减活单核细胞增生李斯特菌 (*Lm*),以及包括HPV-16 E6和E7肽的合成长肽 (SLP)。虽然这些方法中的一些显示出了一些但有限的临床疗效,但大多数失败了,证实了需要改善当前的策略。

[0009] 编码早期HPV蛋白E6和E7的基因的整合是从感染到癌症的过程中一项必要的步骤,并且针对保持宫颈癌细胞的肿瘤表型,需要E6和E7的连续表达。因此,E6和E7被认为是

针对治疗性疫苗接种的良好的靶标。如提到的一些研究已经显示了感染了高危HPV的女性的治疗性疫苗接种可以诱导现有病变的消退。Kenter等人显示了使用衍生自HPV16 E6和E7蛋白的SLP以及佐剂作为一种治疗性疫苗的在患有外阴上皮内瘤样病变(VIN)的47%患者中的持久并完全消退(Kenter等人,2009,N Engl J Med[新英格兰医学杂志]361:1838-47)。类似地,一项研究,其中在VIN 2/3患者中将基于蛋白的疫苗(TA-CIN,由HPV16 E6、E7和L2的融合蛋白组成)与局部免疫调控结合,显示出了在63%患者中的完全消退(Daayana等人,2010,Br J Cancer[英国癌症杂志]102:1129-36)。作为疫苗的合成长肽的可能缺陷包括大规模的生产及其相关成本、对潜在反应佐剂的需要以及与免疫接种相关的有关不良反应(尤其是疼痛和肿胀)。由于高度不适,当自发清除率仍然很高的时候,SLP将不可能被用于早期阶段疾病。类似地,由于在TA-CIN治疗的情况下针对局部咪唑莫特治疗的需要,耐受性是一个重要问题,因为大部分女性经历了持续咪唑莫特治疗期间的局部或全身性副作用,这可能影响日常活动。

[0010] 一种可能的替代方案是使用基于核酸疫苗接种例如编码用于疫苗接种的HPV E6和/或E7蛋白的DNA疫苗或病毒载体疫苗。

[0011] 然而,HPV E6和E7蛋白具有致癌的潜力,并且因此由于抗原的拖延表达的可能性,用包括编码这些蛋白的核酸的疫苗接种造成了诱导细胞转化的风险。

[0012] 因此,在基因疫苗接种的情况下,可以使用无毒的/脱毒版本的E6和/或E7,以便排除因为疫苗接种的任何细胞转化风险。通常通过针对这些蛋白功能已知重要的残基的缺失和/或取代来获得野生型E6和E7的致癌潜能丧失(例如,Smahel等人,2001,Virology[病毒学]281:231-38;Yan等人,2009,Vaccine[疫苗]27:431-40;Wieking等人,2012,Cancer Gene Ther[癌症基因治疗]19:667-74)。然而,这些方法的缺点是它们会带来从蛋白去除重要T-细胞表位和/或将新的不希望的T-细胞表位导入蛋白中,并且因此可能不会引起所希望的免疫应答。

[0013] 在去除HPV16 E6和E7的致癌潜能的可替代策略中,已经构建了E6和E7蛋白的改组版本(即,多肽,其中重新排序野生型蛋白的片段)(例如,Öhlschläger等人,2006,Vaccine[疫苗]24:2880-93;Oosterhuis等人,2011,Int J Cancer[国际癌症杂志]129:397-406;Oosterhuis等人,2012,Hum Gen Ther[人类基因治疗]23:1301-12)。然而,这些方法将仍需要生产、配制并且给予多种分子以确保包括E6和E7蛋白的所有可能性表位,这导致了次优的逻辑和相对的高成本,并且此外所描述的策略引入了不存在于E6和E7中的潜在强大的非天然表位,并且由于免疫应答可以源自与此类非天然表位相关的E6/E7表位,因此所述构建体可以不具有最优的免疫学特性。表达一种细胞内靶向融合蛋白(该融合蛋白具有HPV16和HPV18两者的E6和E7的内置遗传佐剂和改组片段)的治疗性DNA疫苗也已经被描述,并且其电穿孔增强免疫接种随其在CIN3患者中引起显著的E6/E7特异性T细胞应答(Kim等人,2014)。

[0014] 已经描述了另一种方法以使免疫原性构建体成为所谓的多表位构建体或小基因(例如US 2007/014810;Mishra等人,2014;Moise等人,2011;Moss等人,2010)。这具有产生涵盖感兴趣的表位的最小肽的目的。然而,这种方法中的潜在缺点是只有天然蛋白的表位的一个亚类是存在的,并且进一步典型地是不天然存在于感兴趣的蛋白质中的间隔序列被引入。

[0015] 本领域仍需要抵抗HPV的治疗性疫苗,优选具有较少上述方法缺点的那些。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明提供了编码多肽的核酸分子,该多肽基本上包括HPV16或HPV18癌蛋白E6和E7的所有可能的T-细胞表位,然而该核酸分子,通过包括已经重新排序的E6和E7蛋白的片段,同时还包含最小化数量的不希望的强的新表位,具有大幅降低的(与wt E6和E7相比)直至不能检测到的转化活性。这与之前由其他人所报告的分子相反。本发明提供了能在抵抗HPV16或HPV18的治疗性疫苗中使用的分子。这些分子还可以与抵抗HPV16和HPV18两者的治疗性疫苗组合。

[0018] 本发明针对HPV16提供了编码多肽的核酸分子,该多肽包括如SEQ ID NO:1所示的序列。针对HPV18本发明提供了编码多肽的核酸分子,该多肽包括如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。

[0019] 所编码的多肽可以进一步包括前导序列。

[0020] 在某些实施例中,所编码的多肽进一步包括人乳头瘤病毒(HPV)E2蛋白的至少一个表位,例如HPV16 E2蛋白或HPV18 E2蛋白。该E2蛋白可以例如在其转录激活和/或DNA结合结构域中被灭活,例如通过缺失、突变或通过蛋白质的不同部分的结构重排。在针对HPV16的某些实施例中,所编码的多肽包括如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5所示的序列。在针对HPV18的某些实施例中,所编码的多肽包括如SEQ ID NO:22所示的序列。

[0021] 在某些实施例中,将该核酸序列进行密码子优化,例如,用于人类细胞中的表达。

[0022] 在针对HPV16的某些实施例中,该核酸序列包括如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6中所示的序列。在针对HPV18的某些实施例中,该核酸序列包括如SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23中所示的序列。

[0023] 本发明还提供了一种包括根据本发明的核酸分子的载体,其中该编码多肽的序列可操作地连接至启动子。

[0024] 在某些实施例中,该载体是DNA载体例如质粒。在其他实施例中,该载体是病毒载体,例如,MVA载体或重组腺病毒载体。在某些优选的实施例中,该载体是重组腺病毒。

[0025] 在某些实施例中,载体中的启动子可操作地偶联到阻遏物操纵基因序列上,阻遏蛋白可以结合至该阻遏物操纵基因序列上,以便在所述阻遏蛋白的存在下阻遏启动子的表达。在某些实施例中,该阻遏物操纵基因序列是TetO序列或CuO序列。

[0026] 本发明还提供了疫苗组合物,该疫苗组合物包括根据本发明的载体、和药学上可接受的赋形剂。

[0027] 本发明还提供了一种在受试者中诱导抵抗HPV(具体地是HPV16或HPV18,或者HPV16和HPV18)的免疫应答的方法,该方法包括向受试者给予根据本发明的疫苗组合物。本发明还提供了根据本发明的疫苗,用于诱导抵抗HPV(具体地是HPV16或HPV18,或者HPV16和HPV18两者)的免疫应答。

[0028] 在某些实施例中,向受试者不止一次给予该疫苗。

[0029] 本发明还提供了一种方法,用于治疗受试者的以下任一项:持续性HPV感染(具体是持续性HPV16或HPV18感染)、外阴上皮内瘤样病变(VIN)、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、肛门上皮内瘤样病变(AIN)、宫颈癌(例如宫颈鳞状细胞癌(SCC))、口咽癌、阴茎癌、阴道癌或肛门癌,该方法包括向受试者给予根据本发明的疫苗。本

发明还提供了根据本发明的疫苗,用于治疗受试者的以下任一项:持续性HPV感染(具体是持续性HPV16或HPV18感染)、外阴上皮内瘤样病变(VIN)、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、肛门上皮内瘤样病变(AIN)、宫颈癌(例如宫颈鳞状细胞癌(SCC))、口咽癌、阴茎癌、阴道癌或肛门癌。

[0030] 本发明针对HPV16还提供了包括如SEQ ID N0:1、SEQ ID N0:3或SEQ ID N0:5所示序列的多肽。本发明针对HPV18还提供了包括如SEQ ID N0:20或SEQ ID N0:22所示的氨基酸序列的多肽。

[0031] 本发明还提供了如以上针对HPV16和HPV18所述的分子的组合。这样的分子可以作为分开的分子组合在单一的组合物中(例如,一种针对HPV16(即编码包含如SEQ ID N0:1中所示的氨基酸序列的多肽)的核酸,和一种针对HPV18(即编码包含含有如SEQ ID N0:20中所示的序列的氨基酸的多肽)的核酸,例如各自在分开的载体上)。可替代地,这样的分子可以经施用至单一的受试者用于至少两种分开的组合物(一种针对HPV16并且一种针对HPV18)的组合。可替代地,这样的分子还可以通过使HPV16和HPV18分子呈现于单一的核酸分子(例如单一的载体)中而进行组合。因此在某些实施例中,本发明提供了根据本发明的载体,该载体包含编码含有SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子和编码含有SEQ ID N0:20所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子两者。在其他实施例中,本发明提供了一种组合物,该组合物包含一种含有编码含有SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子的载体和一种另外的含有编码含有SEQ ID N0:20所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子的载体。在某些实施例中,本发明提供了一种在受试者中用于诱导针对HPV(具体地是HPV16和HPV18)的免疫应答的方法,该方法包括向受试者给予编码含有SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子和编码含有SEQ ID N0:20所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子。在某些实施例中,本发明提供了一种方法,用于治疗受试者中的以下任一项:持续性HPV感染(具体是持续性HPV16或HPV18感染)、外阴上皮内瘤样病变(VIN)、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、肛门上皮内瘤样病变(AIN)、宫颈癌(例如宫颈鳞状细胞癌(SCC))、口咽癌、阴茎癌、阴道癌或肛门癌,该方法包括向受试者给予编码含有SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子和编码含有SEQ ID N0:20所示的氨基酸序列的多肽的核酸分子。在任何这些HPV16/18组合实施例中的某些方面,包含SEQ ID N0:1所示的氨基酸序列的多肽可以包含SEQ ID N0:3或SEQ ID N0:5所示的序列,并且任选地该核酸序列可以包含SEQ ID N0:2、SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:6所示的序列,与此同时包含SEQ ID N0:20所示的氨基酸序列的多肽可以包含SEQ ID N0:22所示的序列,并且任选地该核酸序列可以包含SEQ ID N0:21或SEQ ID N0:23所示的序列。针对个体HPV16或HPV18核酸、载体、多肽、疫苗组合物、用途或以上方法所描述的实施例中的任何特征当然也可以如本文所披露的应用于HPV16和HPV18的组合中。

[0032] 附图简要说明

[0033] 图1.HPV16 E6和E7的融合蛋白的表达。将HEK-293T细胞用DNA载体进行瞬时转染,该DNA载体表达图之上所指示的转基因。在转染后24hr,收获细胞并且通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法用HPV16 E7的抗体(上图)分析细胞抽提物。显示了NF- κ B的加载对照(下图)确认了所有泳道中细胞裂解物的相似的加载。分子量标记在左侧表明。融合蛋白的预期大小:E6E7SH约38kDa;E2E6E7SH和E6E7E2SH约75kDa,LSE2E6E7SH约78kDa。

[0034] 图2.软琼脂中的菌落形成。A) 软琼脂测定设置的示意图。B) 在接种后六周的琼脂中以细胞40x放大率的代表性显微图像。白色箭头强调在E7wt转染细胞中所观察到的菌落。C) 接种后六周,在琼脂中使用GelcountTM和相关的软件的菌落量化。*:p<0.05 (泊松回归模型);**:非劣效性(具有非劣效性界限为5%的广义线性模型)。

[0035] 图3. HPV16 E6E7SH已经失去了E6和E7活性。A) 代表性蛋白质印迹证实了缺乏E6E7SH对p53的降解。将人类p53失效NCI-H1299细胞用表达p53的质粒连同表达HPV16 E6野生型、HPV16 E6E7SH的质粒或空载体进行共转染。非-TF表示非转染细胞。在转染后24小时,制备细胞裂解物,并且将30μg的总蛋白加载到凝胶上。上图-p53染色,中图-E6染色,下图-NF-κB染色(加载对照)。(B) 在四种独立的测定中p53水平的量化。将该p53信号标准化至NF-κB信号。C) 蛋白质印迹证实了E6E7SH对pRb的降解的缺乏,将pRb失效Saos-2细胞用表达pRb的质粒连同表达HPV16 E7野生型、HPV16 E6E7SH的质粒或空载体进行转染。非-TF表示非转染细胞。在转染后24小时,制备细胞裂解物,并且将10μg的总蛋白加载到凝胶上。上图-pRb染色,中图-E7染色,下图-NF-κB染色(加载对照)。D) 在四种独立的测定中pRb水平的量化。将该pRb信号标准化至NF-κB信号。*:p<0.05 (ANOVA模型);**:非劣效性(试验是基于源自ANOVA模型的95%CI's。非劣效性界限被设为75%)。

[0036] 图4. HPV16 E6E7SH不使原代人类表皮角质形成细胞永生化。将原代人类表皮角质形成细胞用编码HPV16 (E6E7wt) 的野生型E6- 和E7- 编码开放阅读框、HPV16 E6E7SH序列或eGFP的慢病毒进行转导。非转导供体细胞被用作对照。如通过约200天的延长寿命和的hTERT激活(未显示)所示的,仅有E6E7wt的表达诱导原代角质形成细胞的永生化。十字架标志表示细胞在衰老过程中死亡并且不能进一步培养。关于详情,参见实例2。在两个另外的供体中获得相似的结果(未显示)。

[0037] 图5.在DNA免疫之后由HPV16 E6E7SH诱导的免疫应答-IFN γ ELISPOT分析。A.免疫接种方案。将CB6F1小鼠用表达HPV16 E6E7SH的DNA质粒或不表达转基因的质粒(对照)进行免疫。免疫接种后两周,处死小鼠并且用对应于E7的15mer肽池刺激分离的脾细胞过夜。B.以点形成单位(SFU) /10⁶脾细胞给出如通过IFN γ ELISPOT测定所测量的个体小鼠中HPV16 E7-特异性免疫应答。

[0038] 图6.HPV16 E6E7SH的免疫原性-IFN γ ELISPOT分析。(A) .免疫接种方案。将小鼠用具有如所示的插入片段的腺病毒载体进行免疫。通过IFN γ ELISPOT分析处于两周(B) 和处于八周(C) 的E7-特异性应答(表示为点形成单位(SFU) /10⁶脾细胞)。闭环代表用1*10¹⁰vp的剂量进行免疫的小鼠,并且开环代表用5*10⁹vp进行免疫的小鼠。黑条代表应答的几何均数。点状线表示在ELISPOT测定中的检测下限。ANOVA事后邦弗朗尼(Post-hoc Bonferroni)统计分析是在对数转换数据上进行的。*:p<0.05。关于详情,参见实例3。

[0039] 图7.HPV16 E2E6E7SH的免疫原性-E7-四聚体染色。(A) .免疫接种方案。将CB6F1小鼠用1*10¹⁰vp的表达如所表示的转基因的腺病毒载体进行免疫。免疫接种后两周,处死该小鼠并且针对能够与E7₄₉₋₅₇-H2-Db四聚体(B) 相互作用的CD8+细胞的存在分析分离的脾细胞。E7-四聚体阳性的CD8+ T-细胞的百分比表示在y轴上。ANOVA事后邦弗朗尼分析是在对数转换数据上进行的,在不同的E6E7SH变体之间的差异无统计学意义。

[0040] 图8.HPV16 E2E6E7SH的免疫原性-IFN γ ELISPOT分析。(A) .免疫接种方案。将CB6F1小鼠用表达图B和C下方所表示的转基因的腺病毒载体进行免疫。免疫接种后两周,处

死该小鼠并且用对应于E2 (B)、E6 (未显示) 或E7 (C) 的15mer肽池刺激分离的脾细胞过夜。以SFU/10⁶脾细胞给出应答。ANOVA事后邦弗朗尼 (Post-hoc Bonferroni) 统计分析是在对数转换数据上进行的。由仅编码E2的腺病毒载体所诱导的E2应答高于包括E6和E7片段的本发明多肽所诱导的应答。差异对E2与E2E6E7SH和E2与E6E7E2SH是显著的 (*:p<0.05)。ANOVA事后邦弗朗尼 (Post-hoc Bonferroni) 统计分析是在对数转换数据上进行的。

[0041] 图9.在免疫的小鼠中的持续HPV16免疫应答。(A) 免疫接种方案。将CB6F1小鼠用1*10¹⁰vp的表达变体HPV16 LSE2E6E7SH、HPV16 E2E6E7SH、HPV16 E6E7SH的Ad35载体、或用不表达转基因的腺病毒载体(空白)进行免疫。每两周取血液样品以利用四聚体染色确定E7-特异性的CD8+ T-细胞的百分比。(B) 免疫接种后两周的免疫应答。包括前导序列的载体诱导了比没有前导序列的载体更高的应答;LSE2E6E7SH与E2E6E7SH (*:p<0.05)。(C) 应答的动力学。ANOVA事后邦弗朗尼 (Post-hoc Bonferroni) 统计分析是在第2周数据集的对数转换数据上进行的。尽管这些结果无统计学意义,但相比于没有E2的分子,由包括E2的分子诱导的E7应答倾向于更高。

[0042] 图10.使用不同的腺病毒载体加强免疫应答。(A) 免疫接种方案。将CB6F1小鼠用表达HPV16 E2E6E7SH (HPV16-Tx) 的Ad26载体或用不表达转基因的Ad26载体(空白)进行免疫。两周后,用如图的下方所表示的基于Ad35的载体重复该免疫接种。在第二次免疫接种后四周,处死小鼠并且用血液样品利用四聚体染色(B) 来确定E7-特异性CD8+ T-细胞的百分比。*表示Ad26.HPV16-Tx/Ad35.HPV16-Tx与Ad26.HPV16-Tx/Ad35.空白的比较,p<0.05(在对数转换数据上的学生t-检验,针对多重比较,α=0.01)。

[0043] 图11.在猕猴中的HPV16 E2E6E7SH的细胞免疫原性。(A) 免疫接种方案。在第0天将猕猴进行免疫接种:通过肌肉注射免疫接种 (i.m) 八只动物获得了Ad26.HPV16-E2E6E7SH并且两只对照动物获得了Ad26.空白。在8周时给予加强免疫接种 (Ad26.HPV16-E2E6E7SH或Ad26.空白)。在16周,动物接受了具有表达相同HPV16 E2E6E7SH的Ad35载体的第二次加强免疫接种,同时对照动物接受了Ad35.空白。腺病毒载体的剂量为1*10¹¹vp/免疫接种。在若干时间点进行抽血。(B) 通过IFN γ ELISPOT测量PBMC中的细胞免疫应答。用对应于HPV16 E2、E6或E7的肽池刺激PBMC,并且描绘在1*10⁶PBMC中点形成单位 (SFU) 的数量。空白对照动物 (n=2) 显示了没有可检测到的应答。关于详情,参见实例4。

[0044] 图12.表达HPV16-E2E6E7SH的腺病毒载体的治疗效果。(A) TC-1注射和免疫接种方案。在第0天用1*10⁵TC-1细胞经皮下注射CB6F1小鼠。在六天后,当肿瘤明显时,以在200μl 0.9%盐水 (该盐水补充以5nmol ODN1826-CpG (B) 或Ad26.HPV16-E2E6E7SH (C)) 的最终体积中的150μg,将小鼠用覆盖HPV16 E6和E7免疫显性表位 (即,HPV16 E6,aa41-65 (KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN; SEQ ID NO:18) 和HPV16 E7 aa 43-77 (GQAEPDRAHYNIVTFC CKCDSTLRLCVQSTHVDI; SEQ ID NO:19)) 的两个SLP进行免疫。对照小鼠接收单独的CpG (D) 或Ad26.空白 (E)。在第20天,所有的小鼠接收了加强免疫接种。将在初次免疫接种中接收Ad26载体的小鼠随后用对应的Ad35载体进行免疫接种。如在初次免疫接种中一样,其他小鼠接收以单独的CpG或CpG为佐剂的SLP。(B-E) 在注射了TC-1的小鼠中的肿瘤测量。肿瘤体积计算为(宽度²*长度)/2。当肿瘤体积超过1000mm³时,处死小鼠。由于大于20%的重量损失,必须处死小鼠 (用星号表示)。(F-G) 针对头35天的图B和C的一个特写。(H) 在TC-1注射后的存活。相比于用SLP和CpG进行免疫的小鼠,用Ad.HPV16-E2E6E7SH治疗的小鼠的存活显著

增加(对数秩检验 $p<0.05$)。在试验结束时(在第92天),三只用Ad.HPV16-E2E6E7SH进行免疫的小鼠是无肿瘤的。

[0045] 图13.携带编码HPVAg或LSE2E6E7SH的转基因的腺病毒载体显示了关于在能够阻遏转基因表达的细胞的增加的病毒产量。A)针对Ad35载体的病毒产量测定。用携带编码GFP-Luc或HPVAg的转基因的Ad35载体感染PER.C6、PER.C6/CymR和PER.C6/TetR细胞。用包含Cu0或Tet0的CMV启动子驱动这些转基因。在感染后四天通过基于Ad35六邻体特异性qPCR的方法确定病毒产量。B)针对Ad26载体的病毒产量测定。用携带编码GFP-Luc、HPVAg或LSE2E6E7SH的转基因的Ad26载体感染PER.C6和PER.C6/TetR细胞,所有这些转基因都通过包含Tet0的CMV启动子进行驱动。在感染后三天通过基于Ad26六邻体特异性qPCR的方法确定病毒产量。关于详情,参见实例6。

[0046] 图14.在载体生产过程中,使用阻遏转基因表达的阻遏物系统防止携带编码HPVAg的转基因的腺病毒载体中转基因盒的不稳定。通过对PER.C6或PER.C6/CymR细胞系的DNA转染,拯救在CMVCu0的控制下的表达HPVAg的Ad35载体。挑选所得的病毒噬斑-每细胞系五个-并且用于对各细胞系的连续感染循环。A)在10次病毒传代后通过PCR分析载体转基因盒区域的整合。将从PER.C6和PER.C6/CymR传代的病毒分离株获得的PCR产物分别示于中图和右图中。通过桑DNA格测序分析针对PER.C6传代的病毒分离株1、2、4和5所获得的看似全长的PCR产物,以及针对PER.C6/CymR传代的分离株1至5所见到的那些。色谱图迹线(未显示)的分析揭示了在PER.C6上生长的所有分离株,而不是在PER.C6/CymR上生长的那些,包含在HPVAg的编码序列内的移码小缺失或过早终止突变。B)在七次病毒传代后分析载体表达HPVAg的能力。用生长在PER.C6和PER.C6/CymR上的病毒分离株转导A549细胞,并且通过蛋白质印迹法使用HPV16 E7-特异性抗体分析HPVAg表达。针对HPVAg的预测大小为83kDa。关于详情,参见实例6。

[0047] 图15.HPV18 E6和E7的融合蛋白的表达。将HEK-293T细胞用DNA载体进行瞬时转染,该DNA载体表达图之上所指示的转基因。在转染后24hr后,收获细胞并且通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法用HPV18 E6的抗体(上图)分析细胞抽提物。显示了NF- κ B的加载对照(下图)确认了这两条泳道中细胞裂解物的相似的加载。分子量标记显示在左侧并且箭头指示融合蛋白。预期大小:E6E7SH约38kDa;E2E6E7SH约75kDa。

[0048] 图16.通过HPV18 E6E7SH设计构建体,在软琼脂上没有菌落形成。A)在接种后六周的琼脂中以细胞40x放大率的代表性显微图像。在E7wt转染细胞中观察到大的菌落形成。B)接种后六周,在琼脂中使用GelcountTM和相关的软件的菌落量化。*: $P<0.05$ (泊松回归模型); **: 非劣效性(具有非劣效性界限为5%的广义线性模型)。

[0049] 图17.HPV18 E6E7SH已经缺失了降解p53和pRb的能力。A)代表性蛋白质印迹证实了缺乏HPV18 E6E7SH对p53的降解。将人类p53失效NCI-H1299细胞用表达p53的质粒连同表达HPV18 E6野生型、E6E7SH的质粒或空载体进行共转染。非-TF表示非转染细胞。在转染后24小时,制备细胞裂解物,并且将30 μ g的总蛋白加载到凝胶上。上图-p53染色,中图-E6染色,下图-NF- κ B染色(加载对照)。(B)在四种独立的测定中p53水平的量化。将该p53信号标准化至NF- κ B信号。C)蛋白质印迹证实了HPV18 E6E7SH对pRb的降解的缺乏,将pRb失效Saos-2细胞用表达pRb的质粒连同表达HPV18 E7野生型、E6E7SH的质粒或空载体进行转染。非-TF表示非转染细胞。在转染后24小时,制备细胞裂解物,并且将10 μ g的总蛋白加载到凝

胶上。上图-pRb染色,中图-E7染色,下图-NF- κ B染色(加载对照)。D)在四种独立的测定中pRb水平的量化。将该pRb信号标准化至NF- κ B信号。*:p<0.05(ANOVA模型);**:非劣效性(试验是基于源自ANOVA模型的95%CI's。非劣效性界限被设为75%)。

[0050] 图18.HPV18 E6E7SH不使原代人类生殖角质形成细胞永生化。将原代人类生殖角质形成细胞用编码HPV18(E6E7wt)的野生型E6-和E7-编码开放阅读框、E6E7SH序列或eGFP的慢病毒进行转导。非转导供体细胞被用作对照。如通过约200天的延长寿命和的hTERT激活(数据未显示)所示的,仅有HPV18 E6E7wt的表达诱导原代角质形成细胞的永生化。十字架标志表示细胞在衰老过程中死亡并且不能进一步培养。关于详情,参见实例8。在两个另外的供体中获得相似的结果(数据未显示)。

[0051] 图19.HPV18 E6E7SH变体的免疫原性-细胞内细胞因子染色。将CB6F1小鼠用表达下图所表示的转基因的腺病毒载体进行免疫。免疫接种后两周,处死该小鼠并且用对应于HPV18 E6的15mer肽池刺激分离的脾细胞过夜。以IFN γ -阳性CD8+ T细胞的百分数给出应答。

[0052] 图20.合并的HPV16和HPV18载体的免疫原性-IFN γ ELISPOT分析用表达来自HPV16(编码SEQ ID NO:3)和HPV18(编码SEQ ID NO:22)的E2E6E7SH转基因的腺病毒载体(类型26)使CB6F1小鼠免疫。初次免疫接种四周后,使小鼠接受用相同E2E6E7SH转基因的35型腺病毒载体进行的异源加强免疫接种。加强免疫接种两周后,处死该小鼠并且用对应于HPV16 E7(A)或HPV18 E6(B)的15mer肽池刺激分离的脾细胞过夜。以SFU/ 10^6 脾细胞给出应答。

[0053] 图21.合并的HPV16和HPV18疫苗在猕猴中的细胞免疫原性。根据如图11中呈现的方案,用HPV16和HPV18设计构建体的组合使猕猴免疫。在第0天:通过肌肉内免疫接种(i.m)使八只猕猴接受Ad26.HPV16-E2E6E7SH和Ad26.HPV18-E2E6E7SH的混合物。在第8周给予相同载体的加强免疫接种。16周后,动物接受了用表达相同HPV16和HPV18 E2E6E7SH融合蛋白的两种Ad35载体的混合物进行的第二次加强免疫接种。腺病毒载体的剂量为 $1*10^{11}$ vp/载体/免疫接种。在若干时间点进行抽血。通过IFN γ ELISPOT测量PBMC中的细胞免疫应答。用对应于HPV16和HPV18的E2、E6或E7的肽池刺激PBMC,并且测定在 $1*10^6$ PBMC中点形成单位(SFU)的数量。该图显示了在每次免疫接种后2周处所有六个测试肽池的累积应答。关于详情,参见实例11。

[0054] 图22.表达HPV16和HPV18 E2E6E7SH的合并的腺病毒载体的治疗效果。在第0天用 $5*10^4$ TC-1细胞经皮下注射C57BL/6小鼠。六天后,当癌症是可感知时,用Ad26.HPV16-E2E6E7SH或Ad26.HPV16-E2E6E7SH和Ad26.HPV18-E2E6E7SH的混合物使小鼠免疫。对照小鼠接受了Ad26.空白。用相应的Ad35载体使所有小鼠在第20天接受加强免疫接种。肿瘤体积计算为(宽度 2 *长度)/2。当肿瘤体积超过 1000mm^3 时,处死小鼠。这些图表显示TC-1注射后的存活。在试验结束时,三只用合并的HPV16+HPV18疫苗进行免疫的小鼠是无肿瘤的。用Ad.HPV16-E2E6E7SH处理的小鼠的中值存活时间与用Ad.HPV16/18-E2E6E7SH进行免疫的小鼠相比没有显著不同。

[0055] 发明详述

[0056] 本发明提供了编码多肽的核酸分子,该多肽包括SEQ ID NO:1。该多肽是融合多肽,并且有时在此称为本发明的多肽,或本发明的融合多肽。使用该多肽产生对HPV16的E6和E7蛋白的免疫应答,并且因此该核酸分子可以被用作预防持续性HPV16感染、以及其相关

疾病的治疗性疫苗。

[0057] 本发明的多肽是精心设计的分子,该分子事实上包含以片段形式的HPV16的完整的E6和E7氨基酸序列(它只缺少一个来自天然HPV16 E6蛋白C-端的氨基酸),该片段是重新排序的并且部分重叠的,这样使得(实质上)HPV16 E6和E7蛋白的所有的T-细胞表位出现。已经由其他人描述了具有一些作为HPV疫苗的潜能的早期分子(例如,Kenter等人2009,N Engl J Med[新英格兰医学杂志]361:1838-47;Daayana等人,2010,Br J Cancer[英国癌症杂志]102:1129-36;Smahe1等人,2001,Virology[病毒学]281:231-38;Yan等人,2009,Vaccine[疫苗]27:431-40;Öhlschläger等人,2006,Vaccine[疫苗]24:2880-93;Oosterhuis等人,2011,Int J Cancer[国际癌症杂志]129:397-406;EP 1183368,WO 2013/083287),但是这些分子中的每个具有一个或多个缺点。在至少一个方面并且典型的是若干方面中,相对于早期描述的方法,本发明由设计师专门设计的多肽分子是有利的。具体而言,本发明的这些分子和/或载体的优点包括:(i)它们具有所希望的安全谱,因为该核酸具有大幅降低的(与天然E6和E7蛋白质相比)直到不能检测到的转化活性;(ii)它们是单一核酸分子,该单核酸分子容易在工业规模上以经济上可行的手段进行生产,并且不像多分子方法,不会造成逻辑上的挑战;(iii)该编码多肽基本上包括天然HPV16 E6和E7蛋白的所有T-细胞表位;(iv)编码多肽的设计已经最小化所不希望的潜在强大的新表位的引入(即,不存在于天然E6和E7蛋白的表位);和(v)在某些实施例中,它们不依赖于高度反应性的佐剂以提升所希望的免疫应答。因此,通过将各种有利特点结合在单一设计中,本发明的分子代表了一大步迈进,并且是主要针对抵抗HPV16的治疗性疫苗的优秀的候选对象。这些分子还可能作为抵抗HPV16的预防性疫苗,意指它们可能预防已接种疫苗的受试者的HPV16持续感染。

[0058] 在针对编码HPV16设计分子(包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列)的核酸分子的前两个段落中所描述的益处也比照适用于编码针对HPV18的新颖的设计分子(包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列)的核酸分子,这也是本发明的一个目的。

[0059] 我们使用IEDB-AR以确定非天然的强表位的可能的形成,这些非天然的强表位可以在不同的A6和E7片段之间的新产生的连接处引入。在针对HPV16设计分子的某些实施例中,通过精心设计,将针对重新排序的HPV16 E6和E7序列中的20种最常见的HLA-A等位基因、20种最常见的HLA-B等位基因和20种最常见的HLA-C等位基因具有<50nM的预计结合亲和力的具有九个氨基酸长度的新表位的数量最小化至仅一个。这是超越其他人所描述的构建体的一个显著改进,该改进针对单次改组的HPV16 E6蛋白已经包含了超过30个此类新表位,并且改进的构建体将高度可能在序列中包括甚至更多的新表位,这些序列附加至这些构建体以防止表位的丢失(Öhlschläger等人,2006,Vaccine[疫苗]24:2880-93)。因此,相比于其他人描述的方法,由于相比于天然E6和E7,改变的免疫应答的偶然性已经在本发明的分子中最小化,因此本发明的构建体具有显著改进的免疫学谱。

[0060] 本领域技术人员可以使用常规的技术进行核苷酸取代,这些取代不影响多核苷酸编码的多肽序列,这些多核苷酸被描述以反映有待表达这些多肽的任何具体的宿主生物体的密码子使用。因此,除非另外说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此呈简并型式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可以包括

内含子。

[0061] 在一个优选实施例中,对编码根据本发明的多肽的核酸进行密码子优化,以在哺乳动物细胞、优选地人类细胞中表达。密码子优化的方法已知并且已经在先前描述(例如WO 96/09378)。如与野生型序列相比,如果至少一个非优选密码子被更优选的密码子置换,那么认为序列是密码子优化的。在此,非优选密码子是在一种生物体中不如另一个编码相同氨基酸的密码子经常地使用的密码子,并且更优选的密码子是在一种生物体中比一个非优选密码子更经常地使用的密码子。对于特定生物体的密码子使用的频率可见于密码子频率表,如在<http://www.kazusa.or.jp/codon>中。优选的是超过一个非优选密码子,例如,超过10%、40%、60%、80%的非优选密码子,优选的是最多的(例如,至少90%)或所有非优选密码子,由更优选的密码子替代。优选地,在一种生物体中最经常使用的密码子用于一种密码子优化序列。被优选的密码子置换一般引起更高表达。

[0062] 核酸序列可以使用常规的分子生物学技术克隆,或通过DNA合成重新产生,这可以通过在DNA合成和/或分子克隆领域具有业务的服务公司(例如基因艺术公司(GeneArt)、基斯奎思公司(GenScripts)、英杰公司(Invitrogen)、欧陆公司(Eurofins))使用常规程序执行。

[0063] 本领域技术人员将理解,可以改变蛋白质,例如,通过氨基酸取代、缺失、添加等等,例如使用常规的分子生物学程序。一般来说,可以在多肽的功能性或免疫原性没有损耗地应用保守性氨基酸取代。这可以根据本领域技术人员所熟知常规程序进行检测。

[0064] 在某些实施例中,根据本发明的编码的多肽进一步包括前导序列,又称为信号序列或信号肽。它是存在于大部分注定去往分泌通路的新合成的蛋白质的N-末端的短(典型地5个-30个氨基酸长)肽。此种序列的存在可以导致表达和免疫原性的增加。可以使用的非限制性实例是IgE前导肽(参见,例如,US 6,733,994;例如具有序列MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO:7))或HAVT20前导肽(例如,具有序列MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO:9))。可以将这些中的一个任选地添加至本发明多肽的N-端。在其他实施例中,根据本发明的多肽不包括前导序列。

[0065] 存在不同类型的HPV(已经识别了超过120种类型并且以编号进行指代),并且尽管针对某些抗原可能存在一些交叉反应性,但是一般针对每种需要被疫苗覆盖的类型,类型特异性抗原可能需要被掺入疫苗中。类型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、和82是致癌“高危”的性传播HPV,并且可以导致发展为宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、外阴上皮内瘤样病变(VIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、阴茎上皮内瘤病变(PIN)和/或肛门上皮内瘤样病变(AIN)。根据本发明的HPV(即,编码的多肽中的E6和E7片段所源自的HPV)是HPV16(针对SEQ ID NO:1-6)或HPV18(针对SEQ ID NO:20-23)。它可以被用于分别感染有HPV16或HPV18的受试者。在某些实施例中,它还可以适合与抗其他HPV类型的疫苗结合。在某些实施例中,该结合是与如上鉴定的抗高危类型的HPV的疫苗结合,例如抗HPV16的疫苗与抗HPV18的疫苗结合。在其他实施例中,本发明的疫苗与抗HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59、HPV-68、HPV-73或HPV-82中的一种或多种的疫苗结合。例如,如果还不确定HPV感染的具体类型,或如果希望具有预防作用的免疫应答抵抗不止一种HPV类型,那么可以使用此类结合。还设想了将本发明的疫苗与抵抗引起生殖器疣的HPV类型的疫苗的组合,例如HPV6和/或HPV11。这些HPV类

型的序列和由其编码的蛋白(例如E6、E7、E2)可在公用数据库中提供给技术人员,例如,由国家技术信息中心(National Center for of technology Information) (NCBI)所提供的GenBank序列数据库。

[0066] 根据本发明针对HPV16的多肽包括SEQ ID NO:1,并且在一个实施例中,根据本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:2。根据本发明针对HPV18的多肽包括SEQ ID NO:20,并且在一个实施例中,根据本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:21。

[0067] 在此提供了从5'至3'方向的或从N-端至C-端的序列,如本领域中所习惯的。

[0068] 根据本发明的多肽包括HPV16 E6和E7蛋白的表位,或可替代地HPV18 E6和E7蛋白的表位。在某些实施例中,根据本发明的多肽进一步包括(因此该编码多肽的核酸进一步编码)至少一种另外的抗原或此类另外的抗原的一个或多个表位。此类另外的抗原优选地是HPV抗原,优选地是属于在多肽中与E6和E7蛋白相同的HVP类型,即分别是HPV16或HPV18。因此,此种另外的抗原可以是HPV蛋白或其免疫原片段,并且在某些实施例中,包括E2蛋白或其包括HPV(优选地来自HPV16或HPV18)的E2的至少一个表位的片段。此类另外的抗原或表位可以内置于包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20的多肽中的E6和/或E7的两个片段之间,但是优选是使N-端或C-端融合至包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20的E6/E7多肽。可替代地或此外,可以存在刺激免疫应答的氨基酸序列。因此,在某些实施例中,本发明提供了根据本发明的核酸分子,该核酸分子编码包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20的多肽,并且其中该多肽进一步包括至少一种其他抗原,例如,HPV E2蛋白或其至少一个表位,但是优选是更多个表位。针对本发明,添加E2蛋白的一个优点是已知在感染期间/在E6和E7表达仍然非常低的低度病变中E2是早期表达的。在向宫颈癌发展期间,失去了E2表达并且其结果是E6和E7水平的提高(Yugawa和Kiyono,2009,Rev Med Viro1[医学病毒学评论]19:97-113)。将来自E2、E6和E7中的表位结合于一个疫苗中允许在一个广泛标靶群体的患者中治疗,该患者范围为患有持续感染至患有浸润性宫颈癌(或其他HPV16引起的癌症)。在某些实施例中,该E2蛋白是野生型E2蛋白。在某些其他实施例中,该E2蛋白在其DNA结合域中具有已缺失或一个或多个突变(相比于野生型E2蛋白)。HPV16和HPV18 E2蛋白的序列可以发现于NCBI蛋白数据库中(www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)的分别在编号NP_041328.1和AAP20597.1下。已知该蛋白的C-端部分中的HPV16 E2中若干单个氨基酸变化例如G293V、K299M或C300R废止了DNA结合。针对HPV18 E2,对应的氨基酸改变是G294V、K300M、C301R。使用缺少DNA结合能力的E2的变体或片段的优点是它能够在其表达的细胞中通过直接结合至宿主细胞DNA防止不可预测的转录变化。除了或作为替代的以上所描述的DNA结合结构域中的突变,防止E2活性的另外的方法是引入突变,这些突变废止位于E2反式激活域的多个N-末端的活性,和/或被报告以影响E2多肽的结构。针对HPV16 E2,在先前所述的(例如Brokawet等人,1996;Sakai等人,1996)的位置处的氨基酸改变的非限制性实例是R37A、I73A、W92A、E39A、W33A、P106A以及G156A,并且根据本发明的HPV16 E2可以任选地包括反式激活域中的这些突变中的一个或多个。针对HPV18 E2,对应的氨基酸改变是R41A、I77A、W96A、E43A、W37A、P110A以及G161A,并且根据本发明的HPV18 E2可以任选地包括反式激活域中的这些突变中的一个或多个。在某些实施例中,E2具有反式激活域中的突变,在其他实施例中E2具有DNA结合域中的突变,并且在另外的实施例中E2具有反式激活域中的突变和DNA结合域中的突变两者。在又一另一可替代的实施例中,根据本发明的E2多肽被分裂成片段,这些片段被重新排序

(改组)以废止E2活性同时保留E2表位用于免疫原性。此类实施例可以任选地与以上所述的突变(例如在DNA结合域和/或在反式激活域中的突变)中的一个或多个结合。除了野生型HPV E2多肽,所有这样的E2突变体可以根据本发明被用作E2蛋白或其部分或变体。

[0069] 可以内部添加该E2蛋白或其部分或变体,但是优选地是融合至具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20的本发明的多肽的N-端或C-端。在针对HPV16的一个实施例中,本发明的核酸分子编码包括SEQ ID NO:3的多肽。在其一个实施例中,本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:4。在针对HPV16的另一个实施例中,本发明的核酸分子编码包括SEQ ID NO:5的多肽。在其一个实施例中,本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:6。在针对HPV18的一个实施例中,本发明的核酸分子编码包括SEQ ID NO:22的多肽。在其一个实施例中,本发明的核酸分子包括SEQ ID NO:23。

[0070] 还可以进一步使本发明由设计师专门设计的多肽与另外的蛋白融合,例如,所谓的载体蛋白,例如钙网蛋白、结核分枝杆菌热休克蛋白-70、IP10或破伤风毒素片段C(参见Oosterhuis等人,Human Gene Ther[人类基因治疗],2012,见上文,如需更多实例),这些另外的蛋白可以进一步提高对HPV E6和E7(和任选地E2)表位的免疫应答。因此本发明还提供了此类另外的融合蛋白,以及对其进行编码的核酸。

[0071] 在某些实施例中,将根据本发明的核酸分子掺入载体中。如在此使用的“载体”典型地是人工运载外源遗传物质到另一个细胞中的运载体,其中可以对它进行复制和/或表达,并且根据本发明它可以是任何包括根据本发明核酸分子的核酸分子。这些可以通过常规分子生物学技术例如克隆进行制备。典型地,此类载体可以在至少一种类型的适合宿主中进行繁殖,例如细菌、酵母菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞、以及类似物。载体的四种主要类型是质粒、病毒载体、粘粒(cosmid)和人工染色体。载体本身一般是由插入片段(转基因;在本发明中编码本发明融合多肽的核酸)和序列(该序列作为载体的“骨架”)组成的DNA序列。转移遗传信息至另一个细胞的载体的目的典型地是为了分离、扩增或表达靶细胞中的插入片段。优选的是,编码多肽的序列可操作地连接至载体中的启动子。术语“可操作地连接”意指感兴趣的核苷酸序列以一种方式连接至启动子,该方式允许该核苷酸序列(例如,当该载体导入宿主细胞时,在宿主细胞中)表达。表达调节序列可以可操作地连接至转基因上。在某些实施例中,设计载体用来在靶细胞中表达转基因,并且该载体一般具有驱动该转基因表达的启动子序列。在某些实施例中,可以存在常规使用的载体元件(例如转录终止子序列、聚腺苷尾序列、Kozak序列、UTR、复制原点、多克隆位点、遗传标记、抗生素抗性以及另外的序列)中的一种或多种,并且本领域技术人员可以设计载体,这样使得载体具有所希望的性质,例如用于在某些细胞中复制并扩增载体,并且在引入该载体的靶细胞中用于载体中的转基因的表达。包括编码根据本发明的融合多肽的核酸的载体,优选的是被设计用于在哺乳动物细胞中表达的载体,适于作为根据本发明的疫苗。在某些实施例中,根据本发明的载体是质粒、粘粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体、病毒载体、或诸如此类。本领域的普通技术人员知道不同的启动子可以用于获得宿主细胞中基因的表达。在真核细胞中用于表达的一些熟知的并且常用的启动子包括源自病毒的启动子,如腺病毒,例如E1A启动子;源自巨细胞病毒(CMV)的启动子,如CMV立即早期(IE)启动子(在此称为CMV启动子)(例如可从pcDNA获得,英杰公司(Invitrogen)),源自猿猴病毒40(SV40)的启动子(例如可从pIRES获得,目录号631605,BD科学公司(BD Sciences));以及类似物。适合的启动子还可以

源自真核细胞,如金属硫蛋白(MT)启动子、延长因子1 α (EF-1 α)启动子、泛素C或UB6启动子、肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子、以及类似物(参见例如WO 2006/048459)。用于获得在真核细胞中的表达的适合的启动子的非限制性实例是CMV-启动子(US 5,385,839),例如CMV立即早期启动子,例如包括来自CMV立即早期基因增强子/启动子的nt.-735到+95,例如如在此所提供的具有如SEQ ID N0:13所示的序列的CMV启动子。聚腺苷酸化信号,例如牛生长激素polyA信号(US 5,122,458)可以存在于该(这些)转基因后面。

[0072] 还可以添加其他调节序列。术语“调节序列”与“调节元件”在本文中可互换地使用,并且是指核酸片段,典型地但不限于DNA,该核酸片段调节与其有效地连接的核酸序列的转录,并且因此作为转录调节子。调节序列通常包含作为转录结合结构域的核酸序列,所述转录结合结构域被转录蛋白和/或转录因子、增强子或阻遏物等的核酸结合结构域识别。例如,可能使阻遏物序列与启动子可操作地偶联,该阻遏物序列可以被阻遏蛋白限制,该阻遏蛋白可以降低或阻止表达该阻遏蛋白的生产细胞系中的转基因的表达。当传代时和/或当其在生产细胞系中大量生产时,这可以改进核酸分子的遗传稳定性和/或表达水平。本领域已经描述了此类系统。例如,调节序列可以包括一种或多种四环素操纵基因操纵基因序列(tetO),这样使得在四环素操纵基因阻遏蛋白(tetR)存在下抑制表达。在不存在四环素下,该tetR蛋白能够结合至tetO位点并且阻遏可操作地连接至tetO位点的基因的转录。然而,在四环素的存在下,tetR蛋白质中构象变化阻止其结合至操纵基因序列,允许发生可操作连接的基因的转录。在某些实施例中,本发明的核酸分子,例如当存在于重组腺病毒载体中,可以任选地包括可操作地连接至启动子的tetO,这样使得在重组腺病毒中抑制了一种或多种转基因的表达,这些重组腺病毒产生在表达tetR蛋白的生产细胞系中。随后,如果将重组腺病毒引入受试者或不表达tetR蛋白的细胞中,那么将不能抑制表达(例如,国际专利申请WO 07/073513)。在某些其他实施例中,本发明的核酸分子,例如当存在于重组腺病毒中时,可以任选地包括cumate基因开关系统,其中调节表达是通过将阻遏物(CymR)结合至操纵基因位点(CuO),置于启动子下游进行介导(例如,Mullick等人,BMC Biotechnol.[BMC生物技术]2006 6:43)。如本文所使用的,术语“阻遏物”是指具有抑制、干扰、延迟和/或阻遏重组表达载体的异源蛋白产物的产生的能力的实体(例如,蛋白或其他分子)。例如,通过干扰表达载体中(如在表达盒中)处于适当位置的结合位点。阻遏物的实例包括tetR、CymR、乳糖阻遏物、trp阻遏物、半乳糖阻遏物、 λ 阻遏物以及其他本领域中已知的适当的阻遏物。在此提供了使用tetO/tetR操纵基因/阻遏物系统和使用CuO/CymR操纵基因/阻遏物系统的实例。阻遏在载体繁殖期间载体转基因表达可以防止转基因的不稳定性,并且可以在生产期间增加具有本发明转基因的载体的产量。因此,在一些实施例中,本发明载体具有如下启动子,该启动子可以通过阻遏蛋白的结合被阻遏,例如通过具有可操作地偶联到阻遏物操纵基因序列上的启动子(例如,在非限制性实施例中,包含TetO的序列,例如SEQ ID N0:11所示的序列,或者包含CuO的序列,例如SEQ ID N0:12所示的序列),阻遏蛋白(例如,TetR蛋白,例如具有如SEQ ID N0:15所示的氨基酸序列,或者CymR蛋白,例如具有如SEQ ID N0:17所示的氨基酸序列)可以结合至该阻遏物操纵基因序列。

[0073] 在某些实施例中,该载体是质粒DNA分子,或其片段。这些可以用于DNA疫苗接种。其他平台可以用作载体,例如减毒活双缺失的单核细胞增生李斯特菌菌株。

[0074] 在其他实施例中,该载体是重组病毒载体,该重组病毒载体可以是可复制型或复

制缺陷型的。在某些实施例中，病毒载体包括重组DNA基因组。在某些实施例中，根据本发明的载体例如是重组腺病毒、重组反转录病毒、重组痘病毒如牛痘病毒(例如修饰的安卡拉痘苗(MVA))、重组α病毒如塞姆利基森林病毒、重组副粘病毒，如重组麻疹病毒、或其他重组病毒。在某些实施例中，根据本发明的载体是MVA载体。

[0075] 在优选的实施例中，根据本发明的载体是重组腺病毒。腺病毒用作疫苗的优点包括操作简单、优良的大规模可制造性、以及良好的安全记录，该良好的安全记录基于使用已经报道过的多种腺病毒载体在研究、开发、生产和临床试验中的多年经验。被用作疫苗的腺病毒载体通常提供了对转基因所编码的蛋白的良好的免疫应答，该免疫应答包括细胞免疫应答。根据本发明的腺病毒载体可以基于任何类型的腺病毒，并且在某些实施例中，是可以为任何血清型的人类腺病毒。在其他实施例中，它是一种猿猴腺病毒，例如可以为任何血清型的黑猩猩或大猩猩腺病毒。在某些实施例中，根据本发明的载体是人类腺病毒血清型5、26或35的。重组腺病毒载体的制备在本领域中是熟知的。在某些实施例中，根据本发明的腺病毒载体在腺病毒基因组的E1区域(例如，E1a区域和/或E1b区域)的至少一个必需基因功能中是有缺陷的，E1区域属于对病毒复制的必需腺病毒基因组。在某些实施例中，根据本发明的腺病毒载体在非必须E3区域的至少部分中是有缺陷的。在某些实施例中，该载体在E1区域的至少一个必需基因功能中以及在非必须E3区域的至少部分中是有缺陷的。

[0076] 腺病毒载体、其构建方法和其繁殖方法是本领域所熟知的，并且被描述于，例如，美国专利号5,559,099、5,837,511、5,846,782、5,851,806、5,994,106、5,994,128、5,965,541、5,981,225、6,040,174、6,020,191和6,113,913，和Thomas Shenk，“Adenoviridae and their Replication[腺病毒及其复制]”，M.S.Horwitz，“Adenoviruses[腺病毒]”，分别第67和68章，在Virology[病毒学]中，B.N.Fields等人，编辑，第3版，纽约雷文出版社有限公司(Raven Press, Ltd.)，(1996)，以及在此提及的其他参考资料。典型地，腺病毒载体的构建涉及使用标准分子生物技术，如在以下描述的那些，例如，Sambrook等人，Molecular Cloning, Laboratory Manual[分子克隆，实验室手册]，第2版，冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press)，冷泉港，纽约，(1989)，Watson等人，Recombinant DNA[重组DNA]，第2版，Scientific American Books[科学美国人书刊] (1992)，和Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法]，威利国际科学出版社(Wiley Interscience Publishers)，纽约(1995)，和在此提及的其他参考资料。

[0077] 针对重组腺病毒的具体优选的血清型是人类血清型35或人类血清型26。例如在WO 2007/104792中和在Abbink等人，2007 Virology[病毒学] 81: 4654-63中描述了rAd26载体的制备。Ad26的示例性基因组序列发现于GenBank登录号EF 153474中和WO 2007/104792的SEQ ID NO:1中。例如，在美国专利号7,270,811中、在WO 00/70071中以及在Vogels等人，2003, J Virol[病毒学杂志] 77: 8263-71中，描述了rAd35载体的制备。Ad35的示例性基因组序列发现于GenBank登录号AC_000019中和WO 00/70071的图6中。

[0078] 在某些实施例中，该腺病毒是复制缺陷的，例如，因为它包含在基因组的E1区域中的缺失。正如本领域技术人员已知的，在缺失来自腺病毒基因组的必须区域的情况下，由这些区域编码的功能必须由菌株反式提供，优选的是由生产细胞提供，即，当E1、E2和/或E4区域的部分或全部从腺病毒中删除时，这些必须存在于生产细胞中，例如整合到其基因组中，或以所谓的辅助腺病毒或辅助质粒形式。这些腺病毒还可以具有在E3区域中的缺失，该缺

失针对复制是非必要的，并且因此不必补充此种缺失。

[0079] 可以使用的生产细胞（有时在本领域中以及在此还称为‘包装细胞’或‘补充细胞’）可以是任何生产细胞，其中可以繁殖所希望的腺病毒。例如，在生产细胞中完成重组腺病毒载体的繁殖，该生产细胞补充了腺病毒中的缺陷。此类生产细胞优选在其基因组中至少具有腺病毒E1序列，并且从而能够补充在E1区域中具有缺失的重组腺病毒。可以使用任何补充E1的生产细胞，如由E1永生化的人类网膜细胞，例如911或PER.C6细胞（参见美国专利5,994,128）、E1转化的羊水细胞（参见欧洲专利1230354）、E1转化的A549细胞（参见例如WO 98/39411，美国专利5,891,690）、GH329：海拉细胞（Gao等人，2000，Hum Gene Ther[人类基因治疗]11:213-19）、293、以及类似物。在某些实施例中，这些生产细胞是，例如，HEK293细胞、或PER.C6细胞、或911细胞、或IT293SF细胞等。在（Kovesdi等人，2010，Viruses[病毒]2:1681-703）中评论了生产细胞中腺病毒载体的生产。

[0080] 在某些实施例中，E1缺陷的腺病毒包括亚组C的腺病毒（Ad5）的E4-orf6编码序列。这允许在表达Ad5的E1基因的熟知的补充细胞系中此类腺病毒的繁殖，例如293细胞或PER.C6细胞（参见，例如Havenga等人，2006，J Gen Virol[普通病毒学杂志]87:2135-43；WO 03/104467，将其通过引用以其全文结合在此）。

[0081] 在本发明的载体中“异源核酸”（在此还称为‘转基因’）是非天然存在于载体中的核酸，并且根据本发明，编码本发明融合多肽的核酸当存在于载体中时被认为是异源核酸。例如，通过标准分子生物学技术将其引入载体中。例如，可以将其克隆至腺病毒载体的缺失的E1或E3区域，或在E4区域和rITR之间的区域中。通常，转基因可操作地连接到表达控制序列。在优选的实施例中，将转基因克隆至腺病毒载体的E1区域中。

[0082] 可以根据本领域技术人员熟知的各种方法进行载体的生产，如DNA载体、MVA载体或重组腺病毒载体。一般来说，生产需要在培养细胞中繁殖来产生大量的载体材料，随后从细胞培养物中获得载体，并且典型的是随后进一步纯化载体以去除其他物质并且获得纯化的载体，可以将该载体配制到药物组合物中（例如，Hoganson等人，2002，BioProcessing J[生物工艺杂志]1:43-8；Evans等人，2004，J Pharm Sci[药物科学杂志]93:2458-75）。例如，用于从生产细胞的培养物中获得腺病毒的方法已经例如广泛描述于WO 2005/080556中。例如WO 2010/060719和WO 2011/098592，二者通过引用结合在此，描述了用于获得并纯化大量重组腺病毒的适合的方法。

[0083] 在某些方面，本发明还提供了由根据本发明所述的核酸分子编码的多肽。此类多肽包含SEQ ID NO:1（针对HPV16）或SEQ ID NO:20（针对HPV18）。在某些实施例中，此类多肽可以包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5（均针对HPV16）或SEQ ID NO:22（针对HPV18）。此种多肽的特征如上所述。此种多肽可以例如直接用作抵抗HPV的疫苗。

[0084] 本发明进一步提供了包括根据本发明的核酸分子、载体或多肽的疫苗，其中针对这些方面中的每个的实施例可以包括如以上所描述的那些。在优选的实施例中，根据本发明所述的疫苗包括根据本发明的所述的核酸分子。在本发明的其他优选实施例中，该疫苗包括根据本发明所述的载体，优选是DNA载体、MVA载体或重组腺病毒载体。

[0085] 在某些实施例中，根据本发明所述的编码HPV16设计多肽的疫苗进一步包括活性成分，例如，编码不同于HPV16的至少一种HPV类型的E6和/或E7蛋白的至少一个表位的核酸，例如高危的HPV类型如HPV18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、

HPV-56、HPV-58、HPV-59、HPV-68、HPV-73或HPV-82。在某些实施例中,根据本发明所述的编码HPV18设计多肽的疫苗进一步包括活性成分,例如,编码不同于HPV18的至少一种HPV类型的E6和/或E7蛋白的至少一个表位的核酸,例如高危的HPV类型如HPV16、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59、HPV-68、HPV-73或HPV-82。

[0086] 特别优选地是包含编码本发明的HPV16和HPV18设计多肽两者的核酸的疫苗,即编码具有SEQ ID NO:1的多肽的核酸连同编码具有SEQ ID NO:20的多肽的核酸。在此类疫苗中,该HPV16和HPV18组分可以作为单独的分子处于同一组合物中,或者它们可以是处于同一分子中(例如在相同的载体上编码),或它们可以作为具有单独的HPV16组分和单独的HPV18组分的多部分试剂盒被提供用于在疫苗接种中结合使用,例如用于施用之前重构,或者用于单独的但基本上同时施用。此类组合的一个优点是,这样的疫苗可以在感染了HPV16或HPV18(两个最普遍的高风险HPV类型,它们一起导致大多数HPV诱发的癌症)的受试者中治疗地工作,因此这样的疫苗具有超过单型疫苗(具有HPV16或HPV18设计分子)的增加的适用性。

[0087] 术语“疫苗”指示试剂或组合物,该试剂或组合物包含在受试者中有效诱导预防程度和/或治疗程度的免疫性抵抗某种病原体或疾病的活性组分,在此是治疗性地针对HPV。根据本发明,该疫苗典型地包括核酸分子、或载体、以及药学上可接受的赋形剂。当向受试者给予的时候,由根据本发明的核酸分子所编码的多肽将在该受试者中表达,该表达将导致对存在于该多肽中的E6和/或E7抗原片段的免疫应答。瞬时分子(instant molecule)的优点是HPV16(针对SEQ ID NO:1-6)或HPV18(针对SEQ ID NO:20-23)E6和E7的基本上所有T-细胞表位是存在的,并且因此存在于野生型E6或E7中的任何表位的T-细胞应答可以配备到疫苗中。此外,针对根据本发明的核酸分子该疫苗具有如上所述的安全性和有效性的优点。

[0088] 针对向人给予,本发明可以使用包括载体和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在本上下文中,术语“药学上可接受的”意指该载体或赋形剂在所采用的剂量和浓度下不会在它们给予的受试者中引起任何不必要或不良的影响。这些药学上可接受的赋形剂是本领域中众所周知的(参见Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明登氏制药科学],第18版,A.R.Gennaro编,马克出版社(Mack Publishing Company)[1990];Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins[肽和蛋白质的医药配制品发展],S.Frokjaer和L.Hovgaard编,泰勒弗朗西斯集团(Taylor&Francis)[2000];以及Handbook of Pharmaceutical Excipients[医药赋形剂手册],第3版,A.Kibbe编,英国医药出版社(Pharmaceutical Press)[2000])。赋形剂通常是用药物的活性成分配制的药学上无活性的物质。赋形剂通常被用来增大包含有效活性成分(因此通常称为“膨胀剂”、“填料”、“稀释剂”)的配制品,以允许当生产剂型时方便并准确的分配药品。它们还可以服务各种增强治疗的目的,如促进药物吸收或溶解或其他药物动力学考虑。赋形剂还可以在制造过程中使用,除帮助体外稳定性如在预期的保质期中防止变性以外,还来帮助处理所关心的活性物质如通过促进粉末流动性或不黏性。适当的赋形剂的选择还取决于给药途径和剂型,连同活性成分及其他因素。

[0089] 尽管还可以运用冻干制品,但该纯化的核酸分子、载体或多肽优选地是作为无菌

溶液进行配制和给予。无菌溶液是通过无菌过滤或通过本领域中自身已知的其他方法制备。这些溶液接着冻干或填充到医药剂量容器中。溶液的pH值一般在pH 3.0到9.5的范围内,例如pH 5.0到7.5。该核酸分子或载体或多肽典型地是在具有适合缓冲液的溶液中,并且该载体的溶液还可以包含盐。任选地稳定剂可以存在,如白蛋白。在某些实施例中,添加清洁剂。在某些实施例中,疫苗可以被配制为可注射制品。这些配制品包含有效量的核酸分子、载体或多肽(这些有效量的核酸分子、载体或多肽是无菌液体溶液、液体悬浮液或冻干的版本),并且可任选地包含稳定剂或赋形剂。

[0090] 例如,重组腺病毒载体可以储存于缓冲液中,该缓冲液还可以用于腺病毒世界标准(Adenovirus World Standard) (Hoganson等人,2002, Bioprocessing J [生物工艺杂志] 1:43-8) :20mM Tris pH 8,25mM NaCl,2.5%甘油)。适用于向人类给予的另一种有用的配制品缓冲液是20mM Tris、2mM MgCl₂、25mM NaCl、蔗糖10%w/v、聚山梨酯-80 0.02%w/v。适用于重组腺病毒的另一种配制品缓冲液包括10mM-25mM柠檬酸盐缓冲液pH 5.9-6.2,4% -6% (w/w) 羟丙基-β-环糊精(HBCD)、70mM-100mM NaCl、0.018%-0.035% (w/w) 聚山梨酯-80以及任选地包括0.3%-0.45% (w/w) 乙醇。显而易见地,可以使用许多其他缓冲液,并且已知针对存储和针对纯化载体的药用给予的适合的配制品的若干实例。

[0091] 在某些实施例中,包括载体的组合物进一步包括一种或多种佐剂。佐剂在本领域中已知来进一步提高对所施加的抗原决定簇的免疫应答。术语“佐剂”和“免疫刺激剂”在此可互换地使用,并且被定义为引起免疫系统刺激的一种或多种物质。在此上下文中,佐剂用来增强对由本发明载体中核酸分子编码的多肽的免疫应答。适合佐剂的实例包括铝盐,如氢氧化铝和/或磷酸铝和/或磷酸铝钾;油-乳液组合物(或水包油型组合物),包括角鲨烯-水乳液,如MF59(参见例如WO 90/14837);皂昔配制品,例如像QS21和免疫刺激复合物(ISCOMS)(参见例如US 5,057,540;WO 90/03184、WO 96/11711、WO 2004/004762、WO 2005/002620);细菌或微生物衍生物,其实例是单磷酰基脂质A(MPL)、3-O-脱酰基MPL(3dMPL)、包含CpG-基序的寡核苷酸、ADP-核糖基化细菌毒素或其突变体,如大肠杆菌热不稳定的肠毒素LT、霍乱毒素CT等等。还可以使用载体编码的佐剂,例如,通过使用编码感兴趣的抗原与C4-结合蛋白(C4bp)的低聚反应域的融合物的异源核酸(例如,Solabomi等人,2008, Infect Immun [感染与免疫] 76:3817-23),或通过使用编码感兴趣的转基因和TLR-3激动剂如异源性dsRNA(例如WO 2007/100908)的载体,或诸如此类。

[0092] 在其他实施例中,本发明的组合物不包括佐剂。

[0093] 可以将药物组合物给予受试者,例如人类受试者。在一次给予期间向受试者提供的疫苗活性组分的总剂量可以按照技术从业人员已知的进行改变,并且针对腺病毒通常是在1x 10⁷病毒颗粒(vp)和1x 10¹²vp之间,优选地是在1x 10⁸vp和1x 10¹¹vp之间,例如在3x 10⁸和5x 10¹⁰vp之间,例如在10⁹和3x 10¹⁰vp之间。针对DNA疫苗,每次给予的DNA的总量可以例如是在1μg和10mg之间。如果将基因枪用于给予,典型的是使用低剂量,例如10μg。针对肌肉内注射,典型地是使用较高剂量,例如高达5mg。

[0094] 药物组合物的给予可以使用标准给予途径执行。非限制性实施例包括不经肠给予,比如通过注射,例如皮内、肌肉内等、或者皮下或经皮、或粘膜给予,例如鼻内、经口、阴道内、直肠等等。在一个实施例内,通过肌肉内注射给予组合物,例如向手臂的三角肌、或大腿的股外侧肌。在某些实施例中,该疫苗是DNA疫苗,并且这可以例如经皮内给予,例如通过

DNA纹身法(DNA tattooing) (参见,例如,Oosterhuis等人,2012,Curr Top Microbiol Immunol [微生物学和免疫学的当前主题]351:221-50)。该途径还可用于腺病毒载体。在某些实施例中,根据本发明的组合物包括腺病毒载体并且是通过肌肉内注射给予。本领域的技术人员已知给予组合物(例如疫苗)的各种可能性,以诱发对疫苗中的一种或多种抗原的免疫反应。

[0095] 如在此所使用的受试者优选地是哺乳动物,例如啮齿动物,例如小鼠或非人类灵长类动物或人类。优选地,该受试者为人类受试者。

[0096] 可以将本发明的疫苗用来治疗患有由HPV引起的疾病的各种阶段之一的患者(具体是针对包含或编码SEQ ID N0:1-6中的任何一个的疫苗的类型16,或针对包含或编码SEQ ID N0:20-23中的任何一个的疫苗的类型18,或针对包含或编码本文所描述的HPV16和HPV18设计分子两者的疫苗的这两种类型),从这样的事件和持续性HPV感染(例如,如通过HPV DNA测试所检测的),因此在形成(预)癌病变之前,连同宫颈上皮内瘤样病变(CIN;又称宫颈非典型增生和宫颈间质瘤,该CIN是在宫颈表面上鳞状细胞的可能癌变前转换和异常生长(发育异常))至多且包括子宫颈癌(例如宫颈鳞状细胞癌(SCC))。此外,可以靶向其他HPV诱导的瘤形成,如外阴上皮内瘤样病变(VIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、阴茎上皮内瘤病变(PIN)、肛门上皮内瘤样病变(AIN),连同口咽癌(又称头颈癌)、阴茎癌、阴道肿瘤、外阴癌以及肛门癌的晚期。因此,本发明的疫苗可以靶向广泛的HPV诱导的病变,并且可能对HPV诱导的疾病的癌前阶段最有效,例如在(持续)感染和/或瘤形成阶段,其中E2、E6和/或E7的表达最高。还可以将使用本发明的疫苗来的治疗与在晚期癌细胞中可以抵消或克服免疫逃逸机制的化合物(例如,抗PD1/PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体如伊匹木单抗、抗LAG-3抗体、抗CD25抗体、IDO抑制剂、CD40激动性抗体、CD137激动性抗体等等)结合(参见例如Hamid和Carvajal,2013,Expert Opinion Biol Ther [生物治疗专家意见]13:847-861;Mellman等人,2011,Nature Rev [自然综述]480:480-89)。治疗性疫苗接种方法还可以在原则上,在疫苗进一步包括引起外生殖器疣的HPV类型的(序列编码的)E6和/或E7的情况下,用来治疗外生殖器疣或其前体,并且向由此种HPV类型感染的受试者给予。

[0097] 在此使用的,‘治疗’意指给予疫苗来诱导患者中对表达(HPV16 E6和/或E7的表位)HPV16或HPV18 E6和/或E7的细胞的治疗性免疫应答,该免疫应答导致HPV16或HPV18感染的水平的至少降低并且优选地是完全去除HPV16或HPV18感染,这导致了至少减缓并优选地是停止HPV16或HPV18引起的疾病(如瘤形成和/或其症状)的进展。优选地,用疫苗治疗也导致了HPV诱导的癌症的更晚期阶段的缓和。优选的是向患有已经分型的已形成的HPV感染的患者给予疫苗,这样使得可以给予编码对应的HPV类型的多肽的疫苗。在筛选不存在下,该疫苗还可以在部分可能被HPV感染的人群中给予,即性行为活跃的人。还可能向没有被HPV16或HPV18感染的受试者给予本发明的疫苗,例如用于预防性使用,可以与抵抗患者已经感染的另一种HPV类型的疫苗结合,或可替代地在非感染的受试者中。本发明的疫苗还可以向通过其他方法经受过另外的治疗的受试者给予,例如外科手术(去除了由HPV16或HPV18感染引起的病变部位)、或用咪喹莫特治疗(包括TLR-7/8激动剂,参见例如Dayaana等人,2010,Br J Cancer [英国癌症杂志]102:1129-36)。可以通过细胞学或通过HPV测试测量治疗的效果。

[0098] 疫苗接种包括向受试者或患者至少给予一次本发明的疫苗。还可以提供一种或多

种另外疫苗的一次或多次的加强给予。如果执行加强疫苗接种,那么典型地,此类加强疫苗接种将在具有相同抗原的免疫原性组合物第一次给予受试者(在这些情况下这被称为‘初免接种’)后一周与一年之间,优选地在两周与四个月之间的某一时刻给予相同的受试者。在可替代的加强方案中,还可以向受试者给予不同的载体,例如一种或多种不同血清型的腺病毒、或其他载体如MVA、或DNA、或蛋白,作为初次和增强疫苗接种。在某些实施例中,在初次-加强方案中向同一位患者给予至少两次本发明相同形式的疫苗,例如,用根据本发明的相同的重组腺病毒(如Ad26)。在某些实施例中,在初次-加强方案中至少给予两次本发明的疫苗,但是疫苗的载体不同,例如使用两种不同血清型的腺病毒载体,例如用重组Ad26初免并且用重组Ad35加强,或反之亦然;或用DNA初免并且用腺病毒载体加强,或反之亦然;或用腺病毒载体初免并且用MVA载体加强,或反之亦然。示例性实施例包括用Ad26载体初免并用Ad35载体加强,用Ad26载体初免并用MVA载体加强,用Ad35载体初免并用MVA载体加强,用Ad35载体初免并用Ad26载体加强等,其中在每种情况下该初免和加强载体包含编码本发明的设计多肽的核酸,优选地该初免和加强载体各自编码本发明的同一设计多肽。在某些实施例中,在初次-加强-加强方案中,至少给予三次根据本发明的疫苗。可以将另外的加强给予添加至方案中。还可以同时或基本上同时(例如,不超过10分钟间隔)施用腺病毒载体和MVA载体(其可以是在同一组合物中或不同的组合物中),以诱导免疫应答(参见例如WO 2010/073043)。

[0099] 本发明的一个方面还在受试者中诱导了抗HPV16或HPV18的CTL应答,该方面包括向受试者给予根据本发明的疫苗。技术人员将理解的是,包括HPV16序列(编码或包含SEQ ID NO:1-6中的任何一个)的疫苗在抵抗和旨在用于抵抗HPV16感染方面效果最好,而包括HPV18序列(编码或包含SEQ ID NO:20-23中的任何一个)的疫苗在抵抗和旨在用于抵抗HPV18感染方面效果最好。

[0100] 本发明还提供了以下非限制性实施例:

- [0101] 1) 一种核酸,其编码包括SEQ ID NO:1的多肽;
- [0102] 2) 根据实施例1所述的核酸,其中该多肽进一步包括至少部分的HPV E2蛋白;
- [0103] 3) 根据实施例2所述的核酸,其中该至少部分的HPV E2蛋白来自HPV16的E2蛋白;
- [0104] 4) 根据实施例2所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的N-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0105] 5) 根据实施例2所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的C-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0106] 6) 根据实施例3所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的N-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0107] 7) 根据实施例3所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的C-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0108] 8) 根据实施例2所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0109] 9) 根据实施例3所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0110] 10) 根据实施例4所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变

体,该突变废止了E2的DNA结合;

[0111] 11)根据实施例5所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;

[0112] 12)根据实施例6所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;

[0113] 13)根据实施例7所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;

[0114] 14)一种载体,其包括根据实施例1所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0115] 15)一种载体,其包括根据实施例2所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0116] 16)一种载体,其包括根据实施例3所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0117] 17)一种载体,其包括根据实施例4所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0118] 18)一种载体,其包括根据实施例5所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0119] 19)一种载体,其包括根据实施例6所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0120] 20)一种载体,其包括根据实施例7所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0121] 21)一种载体,其包括根据实施例8所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0122] 22)一种载体,其包括根据实施例9所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0123] 23)一种载体,其包括根据实施例10所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0124] 24)一种载体,其包括根据实施例11所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0125] 25)一种载体,其包括根据实施例12所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0126] 26)一种载体,其包括根据实施例13所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0127] 27)根据实施例14所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0128] 28)根据实施例15所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0129] 29)根据实施例16所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0130] 30)根据实施例17所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0131] 31)根据实施例18所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0132] 32)根据实施例19所述的载体,其中该载体是腺病毒;

- [0133] 33) 根据实施例20所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0134] 34) 根据实施例21所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0135] 35) 根据实施例22所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0136] 36) 根据实施例23所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0137] 37) 根据实施例24所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0138] 38) 根据实施例25所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0139] 39) 根据实施例26所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0140] 40) 根据实施例27所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0141] 41) 根据实施例28所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0142] 42) 根据实施例29所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0143] 43) 根据实施例30所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0144] 44) 根据实施例31所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0145] 45) 根据实施例32所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0146] 46) 根据实施例33所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0147] 47) 根据实施例34所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0148] 48) 根据实施例35所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0149] 49) 根据实施例36所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0150] 50) 根据实施例37所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0151] 51) 根据实施例38所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0152] 52) 根据实施例39所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0153] 53) 根据实施例28所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0154] 54) 根据实施例29所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0155] 55) 根据实施例30所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0156] 56) 根据实施例31所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0157] 57) 根据实施例32所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0158] 58) 根据实施例33所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0159] 59) 根据实施例34所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0160] 60) 根据实施例35所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0161] 61) 根据实施例36所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0162] 62) 根据实施例37所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0163] 63) 根据实施例38所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0164] 64) 根据实施例39所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0165] 65) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例14所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0166] 66) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例15所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0167] 67) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例16所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0168] 68) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例17所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0169] 69) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例18所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0170] 70) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例19所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0171] 71) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例20所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

- [0172] 72) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例21所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0173] 73) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例22所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0174] 74) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例23所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0175] 75) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例24所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0176] 76) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例25所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0177] 77) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例26所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0178] 78) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例27所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0179] 79) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例28所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0180] 80) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例29所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0181] 81) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例30所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0182] 82) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例31所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0183] 83) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例32所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0184] 84) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例33所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0185] 85) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例34所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0186] 86) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例35所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0187] 87) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例36所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0188] 88) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例37所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0189] 89) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例38所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0190] 90) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例39所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0191] 91) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例40所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0192] 92) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例41所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0193] 93) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例42所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0194] 94) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例43所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0195] 95) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例44所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0196] 96) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例45所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0197] 97) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例46所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0198] 98) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例47所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0199] 99) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例48所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0200] 100) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例49所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0201] 101) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例50所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0202] 102) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例51所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0203] 103) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例52所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0204] 104) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例53所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0205] 105) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例54所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

剂；

[0206] 106) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例55所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0207] 107) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例56所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0208] 108) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例57所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0209] 109) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例58所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0210] 110) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例59所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0211] 111) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例60所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0212] 112) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例61所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0213] 113) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例62所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0214] 114) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例63所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0215] 115) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例64所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

[0216] 116) 一种用于在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗组合物;

[0217] 117) 一种用于治疗持续性HPV(类型16)感染的方法,该方法包括向遭受持续性HPV感染的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0218] 118) 一种用于治疗外阴上皮内瘤样病变(VIN)(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有VIN的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0219] 119) 一种用于治疗外阴癌(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有外阴癌的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0220] 120) 一种用于治疗宫颈上皮内瘤样病变(CIN)(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有CIN的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0221] 121) 一种用于治疗宫颈癌(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有宫颈癌的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0222] 122) 一种用于治疗口咽癌(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有口咽癌的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0223] 123) 一种用于治疗阴茎上皮内瘤病变(PIN)(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有PIN的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

[0224] 124) 一种用于治疗阴茎癌(具有潜在的HPV类型16感染)的方法,该方法包括向患有阴茎癌的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;

- [0225] 125) 一种用于治疗阴道上皮内瘤样病变(VaIN) (具有潜在的HPV类型16感染) 的方法, 该方法包括向患有VaIN的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;
- [0226] 126) 一种用于治疗阴道癌 (具有潜在的HPV类型16感染) 的方法, 该方法包括向患有阴道癌的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;
- [0227] 127) 一种用于治疗肛门上皮内瘤样病变(AIN) (具有潜在的HPV类型16感染) 的方法, 该方法包括向患有AIN的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;
- [0228] 128) 一种用于治疗肛门癌 (具有潜在的HPV类型16感染) 的方法, 该方法包括向患有肛门癌的受试者给予根据实施例65-115中任一项所述的疫苗;
- [0229] 129) 一种多肽, 其包括SEQ ID NO:1;
- [0230] 130) 根据实施例129所述的多肽, 其中该多肽进一步包括至少部分的HPV E2蛋白;
- [0231] 131) 根据实施例130所述的多肽, 其中该至少部分的HPV E2蛋白来自HPV16的E2蛋白;
- [0232] 132) 根据实施例130所述的多肽, 其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的N-端侧;
- [0233] 133) 根据实施例130所述的多肽, 其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的C-端侧;
- [0234] 134) 根据实施例131所述的多肽, 其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的N-端侧;
- [0235] 135) 根据实施例131所述的多肽, 其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:1的多肽的C-端侧;
- [0236] 136) 根据实施例130所述的多肽, 其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体, 该突变废止了E2的DNA结合;
- [0237] 137) 根据实施例131所述的多肽, 其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体, 该突变废止了E2的DNA结合;
- [0238] 138) 根据实施例132所述的多肽, 其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体, 该突变废止了E2的DNA结合;
- [0239] 139) 根据实施例133所述的多肽, 其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体, 该突变废止了E2的DNA结合;
- [0240] 140) 根据实施例134所述的多肽, 其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体, 该突变废止了E2的DNA结合;
- [0241] 141) 根据实施例135所述的多肽, 其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体, 该突变废止了E2的DNA结合;
- [0242] 142) 根据实施例3所述的核酸, 该核酸编码根据SEQ ID NO:3的多肽;
- [0243] 143) 根据实施例3所述的核酸, 该核酸编码根据SEQ ID NO:5的多肽;
- [0244] 144) 一种载体, 其编码根据实施例142所述的核酸, 其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;
- [0245] 145) 一种载体, 其编码根据实施例143所述的核酸, 其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;
- [0246] 146) 根据实施例144所述的载体, 其中该载体是腺病毒;

- [0247] 147) 根据实施例145所述的载体,其中该载体是腺病毒;
- [0248] 148) 根据实施例146所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0249] 149) 根据实施例147所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0250] 150) 根据实施例146所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0251] 151) 根据实施例147所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0252] 152) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例144所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0253] 153) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例145所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0254] 154) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例146所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0255] 155) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例147所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0256] 156) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例148所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0257] 157) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例149所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0258] 158) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例150所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0259] 159) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例151所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0260] 160) 一种用于在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗组合物;
- [0261] 161) 一种用于治疗外阴上皮内瘤样病变(VIN)的方法,该方法包括向患有VIN的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0262] 162) 一种用于治疗外阴癌的方法,该方法包括向患有外阴癌的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0263] 163) 一种用于治疗宫颈上皮内瘤样病变(CIN)的方法,该方法包括向患有CIN的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0264] 164) 一种用于治疗宫颈癌的方法,该方法包括向患有宫颈癌的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0265] 165) 一种用于治疗口咽癌的方法,该方法包括向患有口咽癌的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0266] 166) 一种用于治疗阴茎上皮内瘤病变(PIN)的方法,该方法包括向患有PIN的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0267] 167) 一种用于治疗阴茎癌的方法,该方法包括向患有阴茎癌的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0268] 168) 一种用于治疗阴道上皮内瘤样病变(VaIN)的方法,该方法包括向患有VaIN的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;

- [0269] 169) 一种用于治疗阴道癌的方法,该方法包括向患有阴道癌的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0270] 170) 一种用于治疗肛门上皮内瘤样病变(AIN)的方法,该方法包括向患有AIN的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0271] 171) 一种用于治疗肛门癌的方法,该方法包括向患有肛门癌的受试者给予根据实施例152-159中任一项所述的疫苗;
- [0272] 172) 一种核酸,其编码多肽,该多肽包括SEQ ID NO:20;
- [0273] 173) 根据实施例172所述的核酸,其中该多肽进一步包括至少部分的HPV E2蛋白;
- [0274] 174) 根据实施例173所述的核酸,其中该至少部分的HPV E2蛋白来自HPV18的E2蛋白;
- [0275] 175) 根据实施例173所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:20的多肽的N-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0276] 176) 根据实施例173所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:20的多肽的C-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0277] 177) 根据实施例174所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:20的多肽的N-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0278] 178) 根据实施例174所述的核酸,其中该多肽包括融合到具有SEQ ID NO:20的多肽的C-端侧的至少部分的E2蛋白;
- [0279] 179) 根据实施例173所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0280] 180) 根据实施例174所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0281] 181) 根据实施例175所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0282] 182) 根据实施例176所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0283] 183) 根据实施例177所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0284] 184) 根据实施例178所述的核酸,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合;
- [0285] 185) 一种载体,其包括根据实施例172所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;
- [0286] 186) 一种载体,其包括根据实施例173所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;
- [0287] 187) 一种载体,其包括根据实施例174所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;
- [0288] 188) 一种载体,其包括根据实施例175所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;
- [0289] 189) 一种载体,其包括根据实施例176所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作

地连接至启动子；

[0290] 190) 一种载体,其包括根据实施例177所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0291] 191) 一种载体,其包括根据实施例178所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0292] 192) 一种载体,其包括根据实施例179所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0293] 193) 一种载体,其包括根据实施例180所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0294] 194) 一种载体,其包括根据实施例181所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0295] 195) 一种载体,其包括根据实施例182所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0296] 196) 一种载体,其包括根据实施例183所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0297] 197) 一种载体,其包括根据实施例184所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子;

[0298] 198) 根据实施例185所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0299] 199) 根据实施例186所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0300] 200) 根据实施例187所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0301] 201) 根据实施例188所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0302] 202) 根据实施例189所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0303] 203) 根据实施例190所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0304] 204) 根据实施例191所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0305] 205) 根据实施例192所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0306] 206) 根据实施例193所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0307] 207) 根据实施例194所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0308] 208) 根据实施例195所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0309] 209) 根据实施例196所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0310] 210) 根据实施例197所述的载体,其中该载体是腺病毒;

[0311] 211) 根据实施例198所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0312] 212) 根据实施例199所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0313] 213) 根据实施例200所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0314] 214) 根据实施例201所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0315] 215) 根据实施例202所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0316] 216) 根据实施例203所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0317] 217) 根据实施例204所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0318] 218) 根据实施例205所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

[0319] 219) 根据实施例206所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;

- [0320] 220) 根据实施例207所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0321] 221) 根据实施例208所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0322] 222) 根据实施例209所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0323] 223) 根据实施例210所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒;
- [0324] 224) 根据实施例198所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0325] 225) 根据实施例199所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0326] 226) 根据实施例200所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0327] 227) 根据实施例201所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0328] 228) 根据实施例202所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0329] 229) 根据实施例203所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0330] 230) 根据实施例204所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0331] 231) 根据实施例205所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0332] 232) 根据实施例206所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0333] 233) 根据实施例207所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0334] 234) 根据实施例208所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0335] 235) 根据实施例209所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0336] 236) 根据实施例210所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒;
- [0337] 237) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例185所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0338] 238) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例186所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0339] 239) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例187所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0340] 240) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例188所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0341] 241) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例189所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0342] 242) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例190所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0343] 243) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例191所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0344] 244) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例192所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0345] 245) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例193所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0346] 246) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例194所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0347] 247) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例195所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

- [0348] 248) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例196所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0349] 249) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例197所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0350] 250) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例198所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0351] 251) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例199所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0352] 252) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例200所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0353] 253) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例201所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0354] 254) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例202所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0355] 255) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例203所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0356] 256) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例204所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0357] 257) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例205所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0358] 258) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例206所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0359] 259) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例207所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0360] 260) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例208所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0361] 261) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例209所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0362] 262) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例210所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0363] 263) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例211所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0364] 264) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例212所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0365] 265) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例213所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0366] 266) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例214所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0367] 267) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例215所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

剂；

- [0368] 268) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例216所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0369] 269) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例217所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0370] 270) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例218所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0371] 271) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例219所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0372] 272) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例220所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0373] 273) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例221所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0374] 274) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例222所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0375] 275) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例223所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0376] 276) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例224所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0377] 277) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例225所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0378] 278) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例226所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0379] 279) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例227所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0380] 280) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例228所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0381] 281) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例229所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0382] 282) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例230所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0383] 283) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例231所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0384] 284) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例232所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0385] 285) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例233所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0386] 286) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例234所述的载体和药学上可接受的赋形剂;

- [0387] 287) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例235所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0388] 288) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例236所述的载体和药学上可接受的赋形剂;
- [0389] 289) 一种用于在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗组合物;
- [0390] 290) 一种用于治疗持续性HPV(类型18)感染的方法,该方法包括向遭受持续性HPV感染的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0391] 291) 一种用于治疗外阴上皮内瘤样病变(VIN)(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有VIN的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0392] 292) 一种用于治疗外阴癌(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有外阴癌的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0393] 293) 一种用于治疗宫颈上皮内瘤样病变(CIN)(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有CIN的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0394] 294) 一种用于治疗宫颈癌(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有宫颈癌的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0395] 295) 一种用于治疗口咽癌(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有口咽癌的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0396] 296) 一种用于治疗阴茎上皮内瘤病变(PIN)(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有PIN的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0397] 297) 一种用于治疗阴茎癌(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有阴茎癌的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0398] 298) 一种用于治疗阴道上皮内瘤样病变(VaIN)(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有VaIN的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0399] 299) 一种用于治疗阴道癌(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有阴道癌的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0400] 300) 一种用于治疗肛门上皮内瘤样病变(AIN)(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有AIN的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0401] 301) 一种用于治疗肛门癌(具有潜在的HPV类型18感染)的方法,该方法包括向患有肛门癌的受试者给予根据实施例237-288中任一项所述的疫苗;
- [0402] 302) 一种多肽,其包括SEQ ID NO:20;
- [0403] 303) 根据实施例302所述的多肽,其中该多肽进一步包括至少部分的HPV E2蛋白;
- [0404] 304) 根据实施例303所述的多肽,其中该至少部分的HPV E2蛋白来自HPV18的E2蛋白;
- [0405] 305) 根据实施例303所述的多肽,其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:20的多肽的N-端侧;
- [0406] 306) 根据实施例303所述的多肽,其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:20的多肽的C-端侧;
- [0407] 307) 根据实施例304所述的多肽,其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO:

20的多肽的N-端侧；

[0408] 308) 根据实施例304所述的多肽,其中至少部分的E2蛋白融合到具有SEQ ID NO: 20的多肽的C-端侧；

[0409] 309) 根据实施例303所述的多肽,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合；

[0410] 310) 根据实施例304所述的多肽,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合；

[0411] 311) 根据实施例305所述的多肽,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合；

[0412] 312) 根据实施例306所述的多肽,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合；

[0413] 313) 根据实施例307所述的多肽,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合；

[0414] 314) 根据实施例308所述的多肽,其中该至少部分的E2蛋白包括具有突变的E2蛋白变体,该突变废止了E2的DNA结合；

[0415] 315) 根据实施例174所述的核酸,该核酸编码根据SEQ ID NO:22的多肽；

[0416] 316) 一种载体,其编码根据实施例315所述的核酸,其中编码该多肽的序列可操作地连接至启动子；

[0417] 317) 根据实施例316所述的载体,其中该载体是腺病毒；

[0418] 318) 根据实施例317所述的载体,其中该腺病毒是血清型26的人类腺病毒；

[0419] 319) 根据实施例317所述的载体,其中该腺病毒是血清型35的人类腺病毒；

[0420] 320) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例316所述的载体和药学上可接受的赋形剂；

[0421] 321) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例317所述的载体和药学上可接受的赋形剂；

[0422] 322) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例318所述的载体和药学上可接受的赋形剂；

[0423] 323) 一种疫苗组合物,其包括根据实施例319所述的载体和药学上可接受的赋形剂；

[0424] 324) 一种用于在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗组合物；

[0425] 325) 一种用于治疗外阴上皮内瘤样病变(VIN)的方法,该方法包括向患有VIN的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗；

[0426] 326) 一种用于治疗外阴癌的方法,该方法包括向患有外阴癌的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗；

[0427] 327) 一种用于治疗宫颈上皮内瘤样病变(CIN)的方法,该方法包括向患有CIN的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗；

[0428] 328) 一种用于治疗宫颈癌的方法,该方法包括向患有宫颈癌的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗；

- [0429] 329) 一种用于治疗口咽癌的方法,该方法包括向患有口咽癌的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0430] 330) 一种用于治疗阴茎上皮内瘤病变(PIN)的方法,该方法包括向患有PIN的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0431] 331) 一种用于治疗阴茎癌的方法,该方法包括向患有阴茎癌的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0432] 332) 一种用于治疗阴道上皮内瘤样病变(VaIN)的方法,该方法包括向患有VaIN的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0433] 333) 一种用于治疗阴道癌的方法,该方法包括向患有阴道癌的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0434] 334) 一种用于治疗肛门上皮内瘤样病变(AIN)的方法,该方法包括向患有AIN的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0435] 335) 一种用于治疗肛门癌的方法,该方法包括向患有肛门癌的受试者给予根据实施例320-324中任一项所述的疫苗;
- [0436] 336) 一种组合物,该组合物包含编码SEQ ID NO:1的核酸和编码SEQ ID NO:20的核酸;
- [0437] 337) 根据实施例336所述的组合物,该组合物包含编码SEQ ID NO:3的核酸和编码SEQ ID NO:22的核酸;
- [0438] 338) 一种在受试者中诱导抵抗HPV的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予编码SEQ ID NO:1的核酸和编码SEQ ID NO:20的核酸;
- [0439] 339) 根据实施例338所述的方法,该方法包括向该受试者给予编码SEQ ID NO:3的核酸和编码SEQ ID NO:22的核酸;
- [0440] 340) 一种多部分试剂盒,其包括(i) 编码SEQ ID NO:1的核酸和(ii) 编码SEQ ID NO:20的核酸;
- [0441] 341) 一种疫苗组合物,该疫苗组合物包含编码SEQ ID NO:1的核酸和编码SEQ ID NO:20的核酸,以及药学上可接受的赋形剂;
- [0442] 342) 一种用于治疗受试者中的以下的方法:持续性HPV感染、外阴上皮内瘤样病变(VIN)、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)、阴道上皮内瘤样病变(VaIN)、肛门上皮内瘤样病变(AIN)、宫颈癌(例如宫颈鳞状细胞癌(SCC))、口咽癌、阴茎癌、阴道癌或肛门癌,该方法包括向该受试者给予编码SEQ ID NO:1的核酸和编码SEQ ID NO:20的核酸。
- [0443] 除非另有说明,本发明的实践采用免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术,这些在本领域的技能之内。参见例如Sambrook、Fritsch和Maniatis, Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验手册],第2版,1989;Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Ausubel FM等人编辑,1987;Methods in Enzymology[酶学方法]系列(学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.));PCR2:A Practical Approach[PCR2:一种实用的方法],MacPherson MJ、Hams BD、Taylor GR编辑,1995;Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验手册],Harlow和Lane编辑,1988。
- [0444] 在以下实例中将进一步解释本发明。这些实例不以任何方式限制本发明。它们仅

仅用以阐明本发明。

[0445] 实例

[0446] 实例1:设计多肽的构建,该设计多肽基本上包括所有的HPV16 E6和E7 CTL表位

[0447] 我们设计了一种新颖的、非致瘤的多肽(和编码这种多肽的核酸),该多肽基本上包含所有的HPV16 E6和E7蛋白的所有表位,并且具有最小数量的预计的/预测的强大的新表位(新表位意指不存在于野生型HPV16 E6和E7蛋白中的表位)。针对HPV16的本发明的多肽(有时还在此称为‘E6E7SH’)包括如在SEQ ID NO:1中所提供的序列。以SEQ ID NO:2提供编码该多肽的密码子优化的核酸。

[0448] 本发明的分子是单分子,该单分子提供了超过了使用多分子的策略的生产优点。此外,本发明的多肽包括存在于HPV16的野生型E6和E7中的基本上所有假定的CTL表位,并且同时具有最小数量的预期的/预测的强大的新表位,这些新表位可以潜在地可能是免疫显性的并且因此可以从相关的野生型CTL表位转移免疫应答。因此本发明的构建体是比其他人所描述的分子(缺少可能的CTL表位和/或包含更多或更强的新表位)在免疫学上更有利。

[0449] 例如,SEQ ID NO:1的构建体针对如下包含具有预测结合亲和力<50nM的九个氨基酸长度的仅一个新表位:20种最常见的HLA-A、20种最常见的HLA-B和20种最常见的HLA-C等位基因(HLA-A*01:01、HLA-A*02:01、HLA-A*02:03、HLA-A*02:06、HLA-A*02:07、HLA-A*03:01、HLA-A*11:01、HLA-A*23:01、HLA-A*24:02、HLA-A*26:01、HLA-A*29:02、HLA-A*30:01、HLA-A*30:02、HLA-A*31:01、HLA-A*32:01、HLA-A*33:01、HLA-A*33:03、HLA-A*34:01、HLA-A*68:01、HLA-A*68:02、HLA-B*07:02、HLA-B*07:04、HLA-B*08:01、HLA-B*13:01、HLA-B*15:01、HLA-B*18:01、HLA-B*35:01、HLA-B*37:01、HLA-B*39:01、HLA-B*40:01、HLA-B*40:02、HLA-B*40:06、HLA-B*44:02、HLA-B*44:03、HLA-B*46:01、HLA-B*48:01、HLA-B*51:01、HLA-B*52:01、HLA-B*53:01、HLA-B*58:01、HLA-C*07:02、HLA-C*04:01、HLA-C*03:04、HLA-C*01:02、HLA-C*07:01、HLA-C*06:02、HLA-C*03:03、HLA-C*08:01、HLA-C*15:02、HLA-C*12:02、HLA-C*02:02、HLA-C*05:01、HLA-C*14:02、HLA-C*03:02、HLA-C*16:01、HLA-C*08:02、HLA-C*12:03、HLA-C*04:03、HLA-C*17:01、HLA-C*14:03),如在IEDB网站(http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html,2009-09-01B版)针对HLA-A和HLA-B使用ANN(Lundsgaard等人,2008,Nucl Acids Res[核酸研究]36:W509-12)SMM方法(Peters等人,2003,Bioinformatics[生物信息学]19:1765-72)以及针对用于肽结合至MHC类别I分子的预测工具的HLA-C的NetMHCpan方法(Hoof等人,2009,Immunogenetics[免疫遗传学]61:1-13)。Zhang等人(2008)描述了IEDB分析资源。

[0450] 作为一种非限制性实例,使用在IEDB网站的SMM预测工具,该改组的E6和E7序列如由Oosterhuis等人,2011,Int J Cancer[国际癌症杂志]129:397-406和Öhlschläger等人,2006,Vaccine[疫苗]24:2880-93所描述的在核心部分针对20种最常见的HLA-A和-B包含每一个九氨基酸的潜在的强大的独特的新表位(ANN或SMM IC50<50nM)。这甚至不包括用于那种途径的附加物(其中附加物将进一步有助于另外的新表位,并且可能由于限制长度的‘重叠’错过了更多的天然MHC II表位)。事实上,据报道,改进的分子(包含具有改组的E6和E7蛋白(被描述于WO 2013/083287中)的变体)包含针对20种最常见的HLA-A、20种最常见的HLA-B和20种最常见的HLA-C等位基因具有预测的IC50<50nM的九个氨基酸长度的22个独特

的新表位(ANN、SMM或NetMHCPan)。

[0451] 因此,本发明的设计的分子相比于改组的E6和E7以去除功能性的其他已公布的方法,显然有利于具有更低数量的预测的新表位。

[0452] 合成编码我们由此设计的HPV16 E6E7SH分子(即,具有如在SEQ ID N0:1中所提供的氨基酸序列的多肽)的核酸,该核酸序列包括SEQ ID N0:2,并且侧翼为在5'端的HindIII位点和Kozak序列和在3'位点的XbaI位点(在英杰生命技术公司(Invitrogen Life technologies)的委托合成以及标准分子克隆,德国)。

[0453] 使用HindIII和XbaI将该合成的片段克隆到标准表达载体,pCDNA2004.Neo中,该载体具有细菌抗药性标志物(氨比西林)和哺乳类动物抗药性标志物(新霉素),以获得编码本发明分子的质粒载体,例如用于基于(瞬时)转染的试验。

[0454] 可以按照这样使用这些分子,但是还可以用作为包含附加特征的另外的分子的基础。作为非限制性实例,如下描述制备一些另外的变体。

[0455] 可以将HPV16 E6E7SH融合蛋白质序列与其他HPV16早期蛋白的序列结合,以靶向患有持续感染的个体,并且以扩展免疫个体中的免疫系统全部。已经提出,抵抗E2的免疫应答在清除HPV16感染中起到了重要作用(de Jong等人,2002,Cancer Res[癌症研究]62:472-479)。E2与E6E7SH的融合将给出疫苗组分,该疫苗组分具有抵抗从持续感染到浸润性癌或在Leep手术后的复发/难治性疾病的HPV相关癌症的各阶段的抗原。因此,作为此类实施例的非限制性实例,我们制备了编码E6E7SH与E2在它的N-端的融合蛋白的序列。在E2序列中,可以使修饰废止DNA结合活性,该DNA结合活性可能在表达融合蛋白的细胞中影响基因表达。我们使wt HPV16 E2蛋白的位置293的甘氨酸、位置299的赖氨酸和位置300的半胱氨酸分别突变成缬氨酸、甲硫氨酸和精氨酸。每个突变在于其自身已经完全废止了E2与具有E2的结合域的DNA序列的结合(Prakash等人,1992,Genes Dev[基因与发育]6:105-16)。

[0456] 所产生的多肽称为HPV16 E2E6E7SH并且包括SEQ ID N0:3。制备编码该多肽的密码子优化序列并且在SEQ ID N0:4中提供。

[0457] 我们还构建了变体,其中将相同的E2突变蛋白融合至HPV16 E6E7SH融合多肽的C-端,产生了称为HPV16 E6E7E2SH的多肽,该多肽包括SEQ ID N0:5。将编码该构建体的序列提供为SEQ ID N0:6。

[0458] 出于对照的目的,我们还构建了编码多肽的序列,该序列包含针对作为融合蛋白的全长HPV16 E6和E7的野生型序列(将从aa 1至158的E6直接融合到从aa 1至98的E7,在此命名为E6E7wt)。

[0459] 我们还测试了向该多肽添加前导序列的影响。作为非限制性实例,在这些构建体中的一些的N-端处融合编码IgE前导序列的序列(参见例如US 6,733,994)[前导肽的序列提供于SEQ ID N0:7],例如在E6E7wt构建体中,该E6E7wt构建体导致了LSE6E7wt,并且在E2E6E7SH构建体中,该E2E6E7SH构建体导致了LSE2E6E7SH。在免疫小鼠中如通过E7四聚体分析所测的,相比于不具有LS序列的相同抗原,其作用显著($p<0.05$)提高了免疫原性(例如,可以如在图9中所见)。

[0460] 在具有或不具有E2的情况下,编码本发明E6E7SH多肽的序列可以,例如由DNA构建体、由RNA或由病毒载体进行表达。图1证实了当如上所述用表达转基因的DNA载体瞬时转染后在HEK-293T细胞中的表达。在转染之后,收获细胞并且用抵抗HPV16 E7的抗体通过SDS-

PAGE和蛋白质印迹法分析细胞提取物。该试验证实了当表达载体转染后,适当大小的预期融合蛋白的表达。

[0461] 在具有或不具有E2的情况下,并且在具有或不具有增强所编码的融合蛋白的免疫原性的附加序列的情况下,可以使用腺病毒载体来表达E6E7。

[0462] 在基因艺术公司(Geneart),将编码HPV16 E6E7wt对照的基因或上述的HPV16设计序列针对人类表达进行基因优化并且合成。Kozak序列(5' GCCACC 3')直接包含于ATG起始密码子的前面,并且将两个终止密码子(5' TGA TAA 3')添加至各自的编码序列的末端。将这些基因通过HindIII和XbaI位点插入pAdApt35BSU质粒和pAdApt26质粒中(Havenga等人,2006,J Gen Virol[普通病毒学杂志]87,2135-43)。

[0463] 通过单同源重组,所有的腺病毒生产于PER.C6细胞中,并且如之前所述进行生产(针对rAd35:Havenga等人,2006,J Gen Virol[普通病毒学杂志]87:2135-43;针对rAd26:Abbink等人,2007,J Virol[病毒学杂志]81:4654-63)。将PER.C6细胞(Fallaux等人,1998, Hum Gene Ther[人类基因治疗]9:1909-17)维持在具有10%胎牛血清(FBS)、补充以10mM MgCl₂的杜氏改良培养基(DMEM)中。

[0464] 简言之,根据制造商(美国生命技术公司(Life Technologies))提供的说明书使用脂质体转染,用Ad载体质粒转染PER.C6细胞。在到达完全的细胞病变效应(CPE)后一天收获细胞,冻融,在3000rpm下离心5min,并且在-20℃存储。将病毒进行噬斑纯化并且在培养于多孔24组织培养板的单孔中的PER.C6细胞中进行扩增。进一步扩增在培养于T25组织培养烧瓶并随后养于T175组织培养烧瓶中的PER.C6细胞中进行。将从在T175烧瓶后所获得的细胞制备的粗裂解物的3ml到5ml用来接种包含PER.C6细胞的70%融合层的24×T1000五层组织培养烧瓶。使用两步CsCl净化法纯化该病毒。最终,将该病毒以等分在-85℃储存。

[0465] Ad35.HPV16-E6E7wt和Ad35.HPV16-E6E7SH是重组腺病毒血清型35(Ad35)载体,这些载体包括密码子优化的核苷酸序列,分别用于表达野生型HPV16 E6和E7蛋白(E6E7wt)的融合蛋白、以及如上所述的设计的融合蛋白变体(E6E7SH,具有提供于SEQ ID NO:1中的氨基酸序列)。该组合的E6和E7序列置于E1、E3缺失的腺病毒基因组的E1区域中的CMV启动子控制下。Ad26.HPV16-E6E7wt和Ad26.HPV16-E6E7SH是基于重组腺病毒血清型26的等效载体。

[0466] 类似地,产生基于Ad26和Ad35的重组腺病毒载体,这些载体编码HPV16E2E6E7SH(SEQ ID NO:3)变体。类似地,产生编码HPV16 E6E7E2SH(SEQ ID NO:5)变体的Ad26和Ad35。此外,产生编码在N-端具有IgE前导序列的E2E6E7SH融合蛋白的Ad35载体,该载体命名为Ad35.HPV16-LSE2E6E7SH。还生产具有在N-端融合至IgE前导序列的E6E7wt的对照腺病毒。

[0467] 用PER.C6细胞产生重组腺病毒,并且在氯化铯梯度上通过离心进行纯化。

[0468] 在以下实例中提供了偶联至阻遏物系统的构建体的另外的实例。

[0469] 实例2.HPV16设计构建体的转化活性的缺失

[0470] 野生型HPV16 E6和E7蛋白具有致瘤潜能,该致瘤潜在某些测定中表现为转化活性,例如在软琼脂测定中的菌落形成(Massimi和Banks,2005,Methods Mol Med[分子医学方法]119:381-395)。如在实例1中所描述的E6E7SH多肽包括以重新排序方式的E6和E7蛋白的片段。与在此类测定中wt E6和E7蛋白之一相比,预测这可以去除致瘤潜能(例如通过显著降低的转化活性测量的)。

[0471] 其他文献报道了HPV16 E6和E7的基因改组变体确实已经失去了它们的致癌潜能(Öhlschläger等人,2006,Vaccine[疫苗]24:2880-93;Henken等人,2012,Vaccine[疫苗]30:4259-66),证实了基因改组破坏了E6和E7蛋白的野生型功能。

[0472] 为了评估致瘤性的丧失,我们评估了我们的E6E7SH构建体赋予NIH 3T3细胞在软琼脂中生长能力的能力(由例如Massimi和Banks,2005,Methods Mol Med[分子医学方法]119:381-395所描述的)。具有表达野生型HPV16 E7的质粒的NIH3T3细胞的转染一致地导致菌落形成。在这些测定中,仅野生型HPV16 E6的表达不引起在背景上的菌落形成。这与所公布的观察一致,在该测定中E7wt比E6wt更有效(Sedman等人,1991,J Virol[病毒学杂志]65:4860-66)。在四个独立的试验中用我们的E6E7SH构建体进行的转染并不会导致在软琼脂(图2)中细胞的菌落的生长,证实了编码本发明多肽的核酸E6E7SH已经失去了与E7相关的转化能力。

[0473] E6和E7的致瘤潜能分别是与他们降低细胞蛋白p53和pRb水平的能力有关。进行p53和pRb降解测定来证实编码本发明多肽的核酸E6E7SH构建体不具有与野生型E6和E7有关的、处于分子水平的生物活性。简言之,HPV16 E6wt和我们的E6E7SH构建体表达于NCI-H1299细胞中,这些NCI-H1299细胞针对于p53降解测定缺少内源p53。针对pRb降解测定,HPV16 E7wt和E6E7SH构建体表达于pRb失效Saos-2细胞中。正如在图3中可见的,p53与E6wt但不是与E6E7SH的共同表达,导致了p53水平的降低(图A和B)。类似地,图3C和3D显示出了pRb与E7wt但不是与E6E7SH的共同表达,导致了pRb水平的降低。这些数据证实了编码本发明多肽的核酸没有能力在软琼脂中形成菌落并且不包含野生型E6和E7多肽的主要生物活性,即p53和pRb的分别失活。

[0474] 为了进一步证实编码本发明多肽的核酸构建体的安全性,我们使用了原代人类包皮角质形成细胞,该原代人类包皮角质形成细胞是HPV介导的转化的天然靶细胞。原代人类角质形成细胞的永生化需要E6和E7二者野生型的作用(Munger等人,1989,J Virol[病毒学杂志]63:4417-21)。这种测定可能是生理学上最相关的体外测定,来证实我们构建体的安全性(Massimi和Banks,2005,Methods Mol Med[分子医学方法]119:381-395)。与非转导的对照细胞(图4)和激活hTERT、端粒酶催化亚单位(数据未示出)相比,用表达来自HPV16 (E6E7wt)的野生型E6和E7的慢病毒所转导的细胞诱导了原代角质形成细胞的永生化,如通过它们寿命的延长所表明的。与GFP转导的或非转导的角质形成细胞相比,本发明多肽(E6E7SH)的表达不能延长寿命。在两个另外独立的供体中获得相似的结果(数据未显示)。总之,这些数据证实了我们的构建体已经失去了诱导原代人类角质形成细胞永生化的能力,这些原代人类角质形成细胞被认为是高度具有生理意义的模型。

[0475] HPV16 E6和E7的可比的片段以不同顺序重组的另一种构建体也不能够使原代人类包皮角质形成细胞永生化。然而,针对那种构建体观察到了长达约120-150天的延长的寿命。这表明了这一领域的一些不可预测性,并且证实了在安全性相关的方面中根据本发明的选择的设计分子的优越性。

[0476] 该实例中的所有实验一起提供了编码根据本发明的HPV16设计多肽的核酸缺少转化活性的强有力的证据,并且因此比HPV16 E6和E7wt构建体大大提高了安全性。

[0477] 实例3.对HPV16 E6E7SH设计构建体的免疫应答

[0478] 如在实例1中所述,我们已经制备了DNA载体和腺病毒载体。

[0479] 基于小鼠用编码野生型E2、或者E6或E7的DNA质粒免疫的初始试验,我们使用CB6F1小鼠菌株用于测量免疫应答,并且用HPV16 E2、E6和E7抗原进行免疫接种在CB6F1中比在C57BL/6小鼠或BALB/c小鼠中诱导出更广泛的细胞免疫应答。在一个单独的实验中,将小鼠用编码本发明分子的DNA载体进行免疫,并且测量细胞免疫应答。可以在用表达E6E7SH的DNA质粒免疫的小鼠中测量HPV16 E7特异性免疫应答(图5)。

[0480] 示于该实例中的以下数据来自用腺病毒载体进行的小鼠实验。

[0481] 为了评估疫苗诱导的免疫原性,用表达HPV16 E6E7wt、LSE6E7wt、E6E7SH的腺病毒载体(Ad35)或不编码转基因的腺病毒载体(空白)对CB6F1小鼠进行免疫。测试向小鼠给予的两种剂量:5*10⁹病毒颗粒(vp)和1*10¹⁰vp。免疫接种后两周和八周,处死这些小鼠并且用HPV16 E7 15mer肽池刺激分离的脾细胞过夜。通过IFN γ ELISPOT分析两周和八周的E7特异性应答。数据呈现于图6中。

[0482] 这显示了用Ad35.HPV16-E6E7SH对小鼠进行免疫接种诱导了如通过ELISPOT分析所测量的E7特异性免疫应答。此外,图6中的结果证实了通过向转基因添加N-端前导序列提高抵抗腺病毒表达的转基因的免疫应答的可能性。

[0483] 其次,对于免疫原性,测试向HPV16 E6E7SH多肽添加HPV16 E2的作用。Ad35载体编码具有融合至N-端(E2E6E7SH)或融合至C-端(E6E7E2SH)的E2的多肽。将CB6F1小鼠用1x10¹⁰vp的剂量进行免疫。图7(E7四聚体染色)和图8(图C, IFN γ ELISPOT)显示了抵抗E7的免疫应答,尽管差异并不是统计学上有意义的,但是相比于不具有E2的构建体,包括E2的设计的构建体的免疫应答往往更高。相比于具有融合至E6E7SH设计多肽的E2的腺病毒载体的应答,针对只编码E2的腺病毒载体具有更高的对E2的应答(图8B),其中E2与E2E6E7SH和E2与E6E7E2SH的差异是显著的(p值:<0.05)。

[0484] 可以推断进一步包括E2的设计的构建体仍可以提供抵抗E7的免疫应答,并且此外还提供了对E2的免疫应答,因此比不包括E2的构建体增大了免疫应答的宽度。

[0485] 当融合至野生型E6和E7的融合蛋白的N-端的时候,显示出了前导序列的添加导致更高的E7特异性应答(图6C)。类似地,确定前导序列对E2E6E7SH融合蛋白的免疫原性的作用。因此,在具有或不具有N-端E2的情况下,将编码HPV16设计多肽的Ad35载体和编码LSE2E6E7SH的Ad35载体用来对小鼠进行免疫接种,并且每隔两周取血液样品来测量E7特异性的免疫应答(图9)。如图7和8所示,存在N-或C-端融合至E6E7SH的E2往往增加了免疫应答。IgE前导序列的添加进一步增加了E7特异性应答(图9B)。随着时间,针对所有三种编码根据本发明的设计的分子的腺病毒载体,观察到了持续免疫应答,并且在免疫接种之后的最高应答与在试验期间的最高应答一致。

[0486] 可以推断可以通过添加特异性序列可以增加设计的构建体(该构建体进一步包括N-端E2)所诱导的应答,例如,IgE前导序列,该IgE前导序列是将所编码的蛋白靶向特异性细胞区室。

[0487] 可以用不同类型的腺病毒载体诱导抵抗本发明肽的细胞免疫应答。在先前的实验中,我们使用了Ad35载体,然而在图10的试验中,用表达HPV16 E2E6E7SH的Ad26腺病毒载体对小鼠进行免疫。数据显示了用基于Ad26的疫苗进行免疫接种也诱导了E7特异性T细胞。此外,这些结果证实了用表达HPV16 E2E6E7SH的Ad35腺病毒载体的第二次免疫接种进一步增强了细胞免疫应答(图10)。

[0488] 实例4. 猕猴中HPV16设计构建体的免疫原性

[0489] 为了评估表达本发明的设计序列的腺病毒载体诱导非人类灵长动物中免疫应答的能力,以 $1*10^{11}$ vp的剂量,用表达HPV16 E2E6E7SH的腺病毒载体(Ad26)或不编码转基因的腺病毒载体(空白)通过肌肉内注射对猕猴进行免疫。在免疫接种后八周,用表达相同抗原的Ad26载体通过免疫接种加强该免疫应答。在第16周时,该动物接受了又一次的表达相同抗原的Ad35的注射。在若干时间点取血液样品并且用对应于HPV16 E2、E6或E7的肽池刺激分离的白细胞过夜。通过IFN γ ELISPOT测量特异性应答。数据呈现于图11中。此外,在初次免疫接种后的第10周和第18周,评估对本发明中的跨新颖连接的肽具有特异性的细胞免疫应答。在所有的动物中IFN γ 应答的诱导是在 <50 SFU/ $1*10^6$ PBMC的检测极限以下进行的(数据未显示)。

[0490] 数据显示了用Ad26.HPV16-E2E6E7SH的非人类灵长动物的免疫接种导致了针对出现于编码转基因中的所有三种HPV16蛋白的细胞免疫应答,但是不是针对新颖的连接。可以用Ad26.HPV16-E2E6E7SH通过另外的免疫接种加强应答,并且在第16周用对应Ad35载体的另外加强进一步增加了HPV16 E2、E6和E7特异性免疫应答。

[0491] 在一个单独的实验中(未显示),用两种腺病毒载体(一种表达HPV16 E6E7SH并且另一种表达HPV16 L1蛋白)的组合通过阴道给药对猕猴进行免疫。在外周血单核细胞中测量到针对E6和E7的低的但是可测量的细胞应答。在这些试验中,检测到了针对L1的强大的细胞免疫应答。

[0492] 实例5.在小鼠肿瘤模型中的治疗效果。

[0493] 针对HPV16(包含SEQ ID NO:1)的本发明的多肽能够诱导动物中的HPV16特异性细胞免疫应答,该细胞免疫应答可以对表达HPV16 E6和/或E7的细胞施加治疗效果。治疗性免疫接种,即在肿瘤已经开始生长后的免疫接种,可以被用来证实治疗性HPV疫苗候选物的效果。在用TC-1细胞(表达HPV16 E6和E7的小鼠细胞)注射的小鼠中测试Ad26和Ad35载体的治疗效果(Lin等人,1996,Cancer Res[癌症研究]56:21-6)。在小鼠中经皮下注射后的几天至几周内TC-1细胞将形成实体瘤。在没有疫苗的情况下,肿瘤快速生长并且在30天内达到 1000mm^3 的预定大小(图D和E)。当达到这种大小时,出于伦理原因处死小鼠。

[0494] 在具有SLP(被用作阳性对照;Kenter等人,2009,N Engl J Med[新英格兰医学杂志]361:1838-47;Zwaveling等人,2002,J Immunol[免疫学杂志]169:350-8)或表达HPV16-E2E6E7SH的腺病毒载体的初次-加强免疫接种时间表下,观察到了TC-1诱导的肿瘤生长的明显降低(图12,图B和C)。在初次免疫接种后的第一个30天的仔细检查(图F和G)显示出了用表达E2E6E7SH的腺病毒载体的免疫接种比用SLP的免疫接种对肿瘤生长具有本质上更大的影响。初始生长速率更低并且在大多数情况下这些肿瘤缩小了。在用腺病毒载体免疫的小鼠中的11只中的3只中,完全消除了肿瘤,这体现在存活图中(图H)。

[0495] 总之,在良好建立的激发模型中,针对HPV16诱导的癌症,用表达本发明的HPV16设计多肽的腺病毒载体进行免疫接种显著降低了肿瘤生长或完全消除了已形成的肿瘤。

[0496] 实例6:使用阻遏物系统来改进表达HPV衍生抗原的腺病毒载体的生产率和遗传稳定性

[0497] 之前已经报道了在强大组成型活性启动子的控制下,插入的腺病毒载体的转基因取决于转基因产物的性质,可以负面影响载体生产(Yoshida和Yamada,1997,Biochem

Biophys Res Commun [生物化学与生物物理学集刊] 230:426-30; Rubinchik等人, 2000, Gene Ther [基因治疗] 7:875-85; Matthews等人, 1999, J Gen Virol [普通病毒学杂志] 80: 345-53; Edholm等人, 2001, J Virol [病毒学杂志] 75:9579-84; Gall等人, 2007, Mol Biotechnol [分子生物技术] 35:263-73)。转基因依赖型载体生产率问题的实例包括低效载体挽救和生长, 低最终载体产量, 和, 在严重的情况下, 具有缺陷转基因盒的病毒突变体的快速过度生长。为了解决这些问题, 多项研究探索了在生产细胞中, 在载体复制期间, 沉默载体转基因表达的可能性 (Matthews等人, 1999, J Gen Virol [普通病毒学杂志] 80:345-53; Edholm等人, 2001, J Virol [病毒学杂志] 75:9579-84; Gall等人, 2007, Mol Biotechnol [分子生物技术] 35:263-73; Cottingham等人, 2012, Biotechnol Bioeng [生物技术与生物工程] 109:719-28; Gilbert等人, 2014, J Virol Methods [病毒学方法杂志] 208:177-88)。在此方面, 在Ad载体的背景下, 之前已经执行了不同的阻遏系统, 并且事实上已经显示出了改进了编码不同类型的(抑制性)转基因的载体生产率和遗传稳定性。

[0498] 已经观察到在此描述的腺病毒载体中的一些, 连同一些编码某些HPV抗原变体的其他腺病毒载体显示出了在此所述的转基因依赖型载体生产率问题中的一些, 并且因此可能在这一方面进一步改善。因此, 我们力图调研使用系统来阻遏载体转基因表达是否可以如在此所述的那些改进表达HPV衍生抗原的Ad载体的生产特性。为此目的, 我们实施了两种存在的阻遏物操纵基因系统, 即TetR/TetO (Yao和Eriksson, 1999, Hum Gene Ther [人类基因治疗] 10:419-22, EP 0990041B1) 和CymR/CuO (Mullick等人, 2006, BMC Biotechnol [BMC生物技术] 6:43), 进入我们的腺病毒载体平台。之前已经有其他人使用TetR/TetO和CymR/CuO系统在载体复制期间通过载体转基因沉默来改善腺病毒载体生产率 (Gall等人, 2007, Mol Biotechnol [分子生物技术] 35:263-73; Cottingham等人, 2012, Biotechnol Bioeng [生物技术与生物工程] 109:719-28; Gilbert等人, 2014, J Virol Methods [病毒学方法杂志] 208:177-88)。这两种系统的实施涉及了在包含TetO或CuO序列的CMV启动子的控制下产生表达感兴趣基因的腺病毒载体。此外, 该实施需要产生稳定表达各自同源阻遏蛋白(即, TetR或CymR)的细胞系。

[0499] 产生若干E1缺失、基于Ad26-和Ad35-的载体, 其中编码异源多肽的序列可操作地连接至包含TetO或CuO操纵基因序列的CMV启动子。首先, 将某些包含TetO-或CuO-的序列(分别是SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12)插入pAdapt26和pAdapt35.Bsu质粒的CMV启动子(EQ ID NO:13)的转录起始位点(TSS)附近 (Abbink等人, 2007, J Virol [病毒学杂志] 81: 4654-63; Havenga等人, 2006, J Gen Virol [普通病毒学杂志] 87:2135-43)。针对两种系统, 将包含操纵基因的序列插入之前所述的CMV启动子的完全相同的位置 (Yao和Eriksson, 1999, Human Gene Ther [人类基因治疗] 10:419-22; EP 0990041B1; Mullick等人, 2006, BMC Biotechnol [BMC生物技术] 6:43; EP 1385946B1)。确切地, 相对于TSS(按原设计; Stenberg等人, 1984, J. Virol. [病毒学杂志] 49:190-9), 分别将包含TetO-和CuO-的序列直接插入位置-20和+7的下游。在SEQ ID NO:13中, 这两个位置分别对应于位置716和742。分别将得到的包含操纵基因的CMV启动子称为CMVTetO和CMVCuO。其次, 使用HindIII和XbaI限制性位点, 将不同的转基因插入得到的构建体的(修改的)CMV启动子的下游。这些转基因包括编码绿色荧光蛋白和萤虫素酶(GFP-Luc)、如以上在实例1中所描述的HPV16 LSE2E6E7SH、和另一种与HPV16 LSE2E6E7SH具有一些类似性的多肽(在该实例中称为‘HPVAg’的构建体)的融

合蛋白的基因。HPVAg包括呈现于LSE2E6E7SH中的相同的前导序列,连同HPV16的E2、E6和E7序列。使用在此所述的方法,在CMVTet0或CMVCu0启动子的控制下,将得到的修饰的pAdapt26和pAdapt35.Bsu质粒用于产生表达上述报告基因和HPV转基因的腺病毒载体。

[0500] 通过PER.C6®细胞的稳定转染,分别使用质粒pcDNA™6/TR(生命技术公司(LifeTechnologies),V1025-20)和pcDNA™6/TR的衍生物产生表达TetR或CymR的细胞系,在pcDNA™6/TR的衍生物中TetR编码序列(SEQ ID NO:14,编码多肽SEQ ID NO:15)被密码子优化的CymR编码序列(SEQ ID NO:16,编码多肽SEQ ID NO:17)替代。如通过pcDNA™6/TR的供应商所述的,使用基于瞬间转染的测定大规模产生稳定的细胞系,来筛选能够阻遏CMVTet0-或CMVCu0-驱动的基因的表达的细胞克隆。在这些细胞中,在载体复制期间,针对其阻遏转基因表达的能力,分析得到的PER.C6/TetR和PER.C6/CymR细胞系。在包含操纵基因的CMV启动子的控制下,在表达对应于各自操纵基因序列的阻遏物的细胞系中,用表达GFP-Luc的载体进行的实验显示了整个完整的病毒复制周期中荧光素酶基因表达减少至少10倍(数据未显示)。这证实了在复制腺病毒载体的背景下PER.C6/TetR和PER.C6/CymR细胞系能够阻遏载体转基因表达。

[0501] 针对表达HPVAg的基于Ad35的载体,调研腺病毒载体转基因表达的TetR-和CymR-介导的阻遏对载体产量的影响(图13A)。为此,通过从CMVTet0或CMVCu0启动子表达HPVAg的载体,以1000病毒颗粒/细胞并且持续三小时的持续时间,使于在24孔板中以3*10⁵细胞/孔接种的PER.C6、PER.C6/TetR和PER.C6/CymR细胞系经受一式四份感染。作为对照,用表达GFP-Luc而不是HPVAg的对应载体进行平行感染。在感染后四天,通过使孔的内容物(即,受感染细胞和介质)经受两次冻融循环来制备粗病毒裂解物。随后通过基于Ad35六邻体序列特异性定量PCR方案确定腺病毒载体效价,该方案用已知的病毒颗粒效价作为标准使用纯化的Ad35载体。结果显示出包含Tet0-和Cu0-的编码HPVAg的Ad35载体,相比于表达GFP-Luc的对照载体,显示出了在正常PER.C6细胞上降低的载体产量。相比之下,当在表达它们同源阻遏物的细胞上生产时(即分别是TetR和CymR),这些相同的载体给出了与用对照载体所获得的那些一样高的产量。这些数据表明,在载体生产期间,在生产细胞中,转基因表达的阻遏针对携带作为转基因的HPVAg的Ad35载体的生产是有益的。

[0502] 针对源自腺病毒血清型26(Ad26)的载体,还调研了阻遏腺病毒载体转基因表达可能对载体产量具有的影响(图13B)。在基本上如针对Ad35载体所述进行的测定中,将携带CMVTet0启动子控制的转基因(该转基因编码GFP-Luc、HPVAg或LSE2E6E7SH)的Ad26载体以1500病毒颗粒/细胞用来感染PER.C6和PER.C6/TetR细胞。三天后获得感染,并且通过基于Ad26六邻体序列特异性定量PCR方法确定病毒颗粒效价。这些结果显示出了对于PER.C6细胞,编码HPVAg和LSE2E6E7SH的载体的产量比用编码GFP-Luc的对照载体所获得的更低。相比之下,对于PER.C6/TetR细胞,这两种载体显示出了与对照载体所获得的一样高的效价。与以上结果一起(针对Ad35载体),这些数据表明在腺病毒载体生产期间遏制转基因表达增加了表达HPVAg和LSE2E6E7SH的载体的产量。

[0503] 我们已经观察到了关于腺病毒载体的遗传稳定性的主要问题,该腺病毒载体携带了针对HPVAg的CMV启动子驱动的转基因。例如,已经观察到在PER.C6上该载体的若干传代后,大部分的载体群由突变载体组成,该突变载体携带在HPVAg编码序列中的一个大的缺失(数据未显示)。

[0504] 我们推断使用转基因表达阻遏系统,如上述两种之一,可以防止与转基因有关的遗传稳定性问题,如抑制载体生长的HPVAg。为了测试这一项,当在PER.C6或PER.C6/CymR细胞上的载体生长后,针对转基因盒稳定性评估具有CMVCu0启动子驱动的HPVAg表达的基于Ad35的载体(图14)。简言之,将载体DNA转染到两种不同的细胞系中,并且允许得到的病毒噬斑生长在琼脂糖层下。从两种转染中的每个,分离五个病毒噬斑,并且分别在相同细胞系(即,用于转染)上进一步传代,持续连续10次病毒传代。在病毒传代数10(VPN10)时,通过转基因盒的PCR扩增评估转基因完整性,并且产生的PCR产物的进一步分析是通过凝胶电泳和桑格测序进行。此外,在VPN7时,针对它们表达HPVAg的能力评估传代的病毒克隆。这通过使用传代的病毒分离株来进行,以1000病毒颗粒/细胞来感染A549细胞,在感染后的48小时裂解这些细胞,并且随后使用针对HPV16 E7(圣克鲁斯生物技术(Santa-Cruz Biotechnology))的单克隆抗体通过蛋白质印迹法分析HPVAg的表达。凝胶电泳和序列分析的结果显示了已经在PER.C6上传代的所有五种病毒分离株每种在转基因盒内携带了小移码缺失或过早终止突变。相比之下,此类缺失或突变不能在任何已经在表达CymR(PER.C6/CymR)的细胞系上传代的载体分离株中检测到。与这些数据相同,所有的PER.C6/CymR繁殖的载体分离株能够表达HPVAg,然而所有的PER.C6生长的载体完全丢失了这项能力,暗示这些载体的缺陷转基因盒。总之,我们的数据证实了使用阻遏物系统,举例来说CymR/Cu0系统,在载体增殖期间来阻遏载体转基因表达是一种有效的手段来防止严重的转基因盒不稳定性,如针对携带表达HPVAg的转基因的载体所见到的那种。

[0505] 实例7:设计多肽的构建,该设计多肽基本上包括所有的HPV18 E6和E7 CTL表位

[0506] 与我们的针对HPV16 E6和E7的设计相似,我们设计了一种新颖的、非致瘤的多肽(和编码这种多肽的核酸),该多肽基本上包含所有的HPV18 E6和E7蛋白的所有表位,并且具有最小数量的预计的/预测的强大的新表位(新表位意指不存在于野生型HPV18 E6和E7蛋白中的表位)。针对HPV18的本发明的多肽(有时还在此称为HPV18 'E6E7SH')包括如在SEQ ID NO:20中所提供的氨基酸序列。以SEQ ID NO:21提供编码该多肽的密码子优化的核酸。

[0507] 针对HPV18的本发明的分子具有如在实例1下针对HPV16所描述的相同的优点。它们是单分子,这些单分子提供了超过了使用多分子的策略的生产优点。此外,本发明的多肽包括存在于HPV18的野生型E6和E7中的基本上所有假定的CTL表位,并且同时具有最小数量的预期的/预测的强大的新表位,这些新表位可以潜在地可能是免疫显性的并且因此可以从相关的野生型CTL表位转移免疫应答。因此本发明的构建体是比其他人所描述的分子(缺少可能的CTL表位和/或包含更多或更强的新表位)在免疫学上更有利。

[0508] 例如,SEQ ID NO:20的HPV18设计构建体针对如下包含具有预测结合亲和力<50nM的、具有九个氨基酸长度的仅一个新表位:20种最常见的HLA-A、20种最常见的HLA-B和20种最常见的HLA-C等位基因,如在实例1中针对HPV16设计构建体所描述的(具有SEQ ID NO:1)。

[0509] 合成编码我们由此设计的HPV18 E6E7SH分子(即,具有如在SEQ ID NO:20中所提供的氨基酸序列的多肽)的核酸,该核酸序列包括SEQ ID NO:21,并且侧翼为在5'端的HindIII位点和Kozak序列和在3'位点的XbaI位点(在英杰生命技术公司(Invitrogen Life technologies)的委托合成以及标准分子克隆,德国)。

[0510] 使用HindIII和XbaI将该合成的片段克隆到标准表达载体, pCDNA2004.Neo中, 该载体具有细菌抗药性标志物(氨比西林)和哺乳类动物抗药性标志物(新霉素), 以获得编码本发明的HPV18设计分子的质粒载体, 例如用于基于(瞬时)转染的试验。

[0511] 可以按照这样使用这些分子, 但是还可以用作为包含附加特征的另外的分子的基础。作为非限制性实例, 如下描述制备一些另外的变体。

[0512] 可以将HPV18 E6E7SH融合蛋白质序列与其他HPV18早期蛋白的序列结合, 以靶向患有持续感染的个体, 并且以扩展免疫个体中的免疫系统全部。作为此类实施例的非限制性实例, 我们制备了编码E6E7SH与E2在它的N-端的融合蛋白的序列。我们使wt HPV18 E2蛋白(Genbank: AAP20597.1)的位置294处的甘氨酸、位置300处的赖氨酸和位置301处的半胱氨酸分别突变成缬氨酸、甲硫氨酸和精氨酸以废止DNA结合活性。这些突变中的每个在于其自身已经完全废止了E2与具有E2的结合域的DNA序列的结合(Prakash等人, 1992, Genes Dev [基因与发育]6:105-16)。

[0513] 所产生的多肽称为HPV18 E2E6E7SH并且包括SEQ ID NO:22。制备编码该多肽的密码子优化序列并且在SEQ ID NO:23中提供。

[0514] 在具有或不具有E2的情况下, 编码本发明HPV18 E6E7SH多肽的序列可以, 例如从DNA构建体、从RNA或从病毒载体进行表达。图15证实了当如上所述用表达转基因的DNA载体瞬时转染后在HEK-293T细胞中的表达。在转染之后, 收获细胞并且用识别HPV18的E6的抗体通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法分析细胞提取物。该试验证实了当表达载体转染后, 适当大小的预期融合蛋白的表达。

[0515] 在具有或不具有E2的情况下, 并且在具有或不具有增强所编码的融合蛋白的免疫原性的附加序列的情况下, 可以使用腺病毒载体来表达E6E7。

[0516] 在基因艺术公司(Geneart), 将上述的编码HPV18设计序列针对人类表达进行基因优化并且合成。Kozak序列(5' GCCACC 3')直接包含于ATG起始密码子的前面, 并且将两个终止密码子(5' TGA TAA 3')添加至各自的编码序列的末端。将这些基因通过HindIII和XbaI位点插入pAdApt35BSU质粒和pAdApt26质粒中(Havenga等人, 2006, J Gen Virol [普通病毒学杂志]87, 2135-43)。

[0517] Ad35.HPV18-E6E7SH是重组腺病毒血清型35(Ad35)载体, 该载体包括密码子优化的核苷酸序列, 用于表达如以上所述的HPV18设计融合蛋白变体(HPV18 E6E7SH, 具有在SEQ ID NO:20中所提供的氨基酸序列)。该组合的E6和E7序列置于E1、E3缺失的腺病毒基因组的E1区域中的CMV启动子控制下。Ad26.HPV18-E6E7SH是基于重组腺病毒血清型26的等效载体。

[0518] 类似地, 产生基于Ad26和Ad35的重组腺病毒载体, 这些载体编码HPV18 E2E6E7SH(SEQ ID NO:22)变体。

[0519] 将所有腺病毒如在以上实例1中所描述的进行生成、制备、纯化以及存储。

[0520] 实例8.HPV18设计构建体的转化活性的缺失

[0521] HPV18的E6和E7蛋白具有致瘤潜能, 该致瘤潜在某些测定中表现为转化活性, 例如在软琼脂测定中的菌落形成(Massimi和Banks, 2005, Methods Mol Med [分子医学方法]119:381-395)。如在实例7中所描述的E6E7SH多肽包括以重新排序方式的E6和E7蛋白的片段。与在此类测定中wt E6和E7蛋白之一相比, 预测这可以去除致瘤潜能(如可以例如通过

转化活性的缺失进行测量)。

[0522] 其他文献报道了HPV16 E6和E7的基因改组变体确实已经失去了它们的致癌潜能(Öhlschläger等人,2006,Vaccine[疫苗]24:2880-93;Henken等人,2012,Vaccine[疫苗]30:4259-66),证实了基因改组破坏了HPV16 E6和E7蛋白的野生型功能。在实例2中,我们已经示出了我们的针对HPV16的设计构建体已经失去E6和E7活性。

[0523] 为了评估致瘤性的丧失,我们评估了我们的HPV18 E6E7SH构建体赋予NIH 3T3细胞在软琼脂中生长能力的能力(由例如Massimi和Banks,2005,Methods Mol Med[分子医学方法]119:381-395所描述的)。具有表达野生型HPV18 E7的质粒的NIH3T3细胞的转染一致地导致菌落形成。与用HPV16 E6获得的结果相似,仅野生型HPV18 E6的表达不引起在背景上的菌落形成。在四个独立的试验中用我们的HPV18 E6E7SH构建体进行的转染并不会导致在软琼脂(图16)中细胞的菌落的生长,证实了编码本发明的多肽的核酸HPV18 E6E7SH已经失去了与E7相关的转化能力。

[0524] E6和E7的致瘤潜能分别是与他们降低细胞蛋白p53和pRb水平的能力有关。进行p53和pRb降解测定来证实编码本发明的多肽的核酸HPV18 E6E7SH不具有与野生型E6和E7有关的、处于分子水平的生物活性。简言之,HPV18 E6wt和我们的HPV18 E6E7SH构建体表达于NCI-H1299细胞中,这些NCI-H1299细胞针对p53降解测定缺少内源p53。针对pRb降解测定,HPV18 E7wt和HPV18 E6E7SH构建体表达于pRb失效Saos-2细胞中。正如在图17中可见的,p53与HPV18 E6wt但不与HPV18 E6E7SH的共同表达,导致了p53水平的降低(图A和B)。类似地,图17C、17D显示出了pRb与HPV18 E7wt但不与HPV18 E6E7SH的共同表达,导致了pRb水平的降低。这些数据证实了编码本发明的HPV18设计多肽的核酸没有能力在软琼脂中形成菌落并且不包含野生型HPV18 E6和E7多肽的主要生物活性,即p53和pRb的分别失活。

[0525] 为了进一步证实编码本发明多肽的核酸构建体的安全性,我们使用了衍生自新生儿包皮的原代人类生殖角质形成细胞(HEKn细胞),该原代人类生殖角质形成细胞是HPV介导的转化的天然靶细胞。原代人类角质形成细胞的永生化需要E6和E7二者野生型的作用(Munger等人,1989,J Virol[病毒学杂志]63:4417-21)。这种测定可能是生理学上最相关的体外测定,来证实我们构建体的安全性(Massimi和Banks,2005,Methods Mol Med[分子医学方法]119:381-395)。与非转导的对照细胞(图18)和活化hTERT、端粒酶催化亚单位(数据未示出)相比,用表达来自HPV18(E6E7wt)的野生型E6和E7的慢病毒所转导的细胞诱导了原代角质形成细胞的永生化,如通过它们寿命的延长所表明的。与GFP转导的或非转导的角质形成细胞相比,本发明的HPV18设计多肽(HPV18 E6E7SH)的表达不能延长寿命。在两个另外独立的供体中获得相似的结果(数据未显示)。总之,这些数据证实了我们的构建体已经失去了诱导原代人类角质形成细胞永生化的能力,这些原代人类角质形成细胞被认为是高度具有生理意义的模型。

[0526] 该实例中的所有实验一起提供了编码根据本发明多肽的核酸缺少转化活性的强有力的证据,并且因此比HPV18 E6和E7wt构建体大大提高了安全性。

[0527] 对比实例8A.本发明的构建体具有独特性质

[0528] 已经制备了另外的HPV18设计构建体(在此称为‘HPV18DC2’,这个构建体的氨基酸序列被提供为SEQ ID N0:24)。HPV18DC2与本发明的HPV18 E6E7SH(SEQ ID N0:20)构建体具有以下相同的特征:(a)其事实上也包含HPV18的完整的E6和E7氨基酸序列,(b)处于相同

数量的重新排序的片段的形式, (c) 这些片段是部分重叠的, 这样使得实质上HPV18 E6和E7的所有T-细胞表位都存在, 以及 (d) 其被设计为最小化所不希望的强新表位的引入。因此本发明的设计构建体和HPV18DC2仅在精确的氨基酸序列方面结构上不同。

[0529] 然而, 这确实转化为至少一种生物差异, 这表明这些分子不能仅仅被认为是可取代彼此的替代方案。

[0530] 具体而言, 如上所示出的(实例8), 本发明的分子在原代包皮角质形成细胞的延伸的寿命中完全没有可测量的功能活性。相比之下, HPV18DC2确实诱导了原代角质形成细胞的延伸的寿命。例如, 根据实例8中描述的实验, 表达本发明的HPV18E6E7SH构建体的供体的细胞有81天的寿命, 其中它们具有7次传代倍增, 而相比之下具有HPV18DC2的细胞有120天的较长的寿命, 其中它们具有67次传代倍增。类似的差别是在独立实验中, 从不同供体的角质形成细胞中发现(以平均从3个供体, 具有本发明的构建体的细胞具有62天的寿命、9次传代倍增, 而具有HPV18DC2的细胞具有156天的更长寿命、62次传代倍增), 示出了构建体之间的差异导致的差异。与寿命由HPV18DC2延长这一观察一致, 用HPV18DC2转导的细胞展示了一些残余的E7活性(即pRb降解/p16上调), 而相比之下, 本发明的用HPV18 E6E7SH分子转导的细胞在这些测定(实例8)中缺乏可检测的活性。

[0531] 当与本发明的HPV16设计构建体(如实例2中提到的)相比时, 类似的观察用替代性HPV16设计者构建体进行。

[0532] 在一个生物模型系统中在看似高度相似的分子之间所观察到的差异表明, 这样的分子不能仅仅被认为是可取代彼此的替代方案。这强调了本发明的设计分子的独特性, 和在本领域中的不可预测性。

[0533] 重要的是, 可以从实例2和8中的实验中得出的结论是, 在所使用的模型系统中本发明的设计分子已失去野生型HPV16/18 E6和E7蛋白的致癌活性。

[0534] 实例9. 对HPV18 E6E7SH设计构建体的免疫应答

[0535] 如在实例7中所述, 我们已经制备了DNA载体和腺病毒载体。为了评估疫苗诱导的免疫原性, 用表达HPV18 E6E7SH或E2E6E7SH的腺病毒载体(Ad35)或不编码转基因的腺病毒载体(空白)作为对照对CB6F1小鼠进行免疫。初次免疫接种后两周, 处死这些小鼠并且用HPV18 E6 15mer肽池刺激分离的脾细胞过夜。通过细胞内细胞因子染色来分析E6-特异性免疫应答。在单独的实验中, 用表达HPV18E2E6E7SH的腺病毒载体(Ad35或Ad26)或不编码转基因的腺病毒载体(空白)作为对照对CB6F1小鼠进行免疫。

[0536] 图19A显示了用Ad35.HPV18-E6E7SH对小鼠进行免疫接种诱导了如通过ICS分析所测量的E6特异性免疫应答。此外, 图19A中的结果展示出E2与设计者构建体的N-末端的融合不降低免疫原性, 尽管在转染后观察到这个E2E6E7变体的低表达(图15)。图19B显示了用Ad35.HPV18-E6E7SH或Ad26.HPV18-E2E6E7SH对小鼠进行免疫接种诱导了产IFN γ 的HPV18-E6特异性CD8T细胞的可比的百分数。

[0537] 可以用不同类型的腺病毒载体诱导抵抗本发明肽的细胞免疫应答。在实验中呈现于图19B中, 将小鼠用表达HPV18 E2E6E7SH的Ad26或Ad35腺病毒载进行免疫。数据显示这些腺病毒载体诱导HPV18 E6-特异性T细胞至以类似的水平。

[0538] 实例10. 将表达HPV16和HPV18设计构建体的腺病毒载体进行组合。

[0539] 将针对不同HPV类型的设计构建体进行组合, 为制造针对不同HPV类型的治疗疫苗

提供了可能性。为了评估表达不同设计序列的腺病毒载体诱导免疫应答的能力,以针对每个载体 $1*10^{10}$ vp的剂量,用表达HPV16 E2E6E7SH(编码包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的蛋白质)的腺病毒载体(Ad26)和表达HPV18 E2E6E7SH(编码包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的蛋白质)的Ad26或不编码转基因的腺病毒载体(空白)通过肌肉内注射对小鼠进行免疫。在免疫接种后四周,用表达相同抗原的Ad35载体通过免疫接种加强该免疫应答。在加强免疫接种后两周测量免疫应答。用对应于HPV18的E6或HPV16的E7的肽池刺激细胞过夜并通过IFN γ ELISPOT测量应答。数据呈现于图20中。

[0540] 数据显示,用表达HPV16 E2E6E7SH和HPV18 E2E6E7SH的Ad26/35载体对小鼠进行免疫接种导致了抵抗这两个(即HPV16和HPV18)设计蛋白的细胞免疫应答。

[0541] 在具有相似免疫接种程序的独立实验(Ad26初次和Ad35加强)中,我们比较了通过表达HPV16 E2E6E7SH的Ad和表达HPV18 E2E6E7SH的Ad一起诱导的免疫应答与用表达HPV16 E2E6E7SH的Ad单独地或用表达HPV18 E2E6E7SH的Ad单独地进行免疫接种的小鼠的免疫应答。加强免疫接种后两周测量免疫应答,并用对应于HPV16和HPV18的E2、E6或E7的肽池刺激细胞过夜,并通过IFN γ ELISPOT连同细胞内细胞因子染色测量这些应答。虽然与仅用个体疫苗组分免疫的动物相比,以表达HPV16 E2E6E7SH的Ad和表达HPV18 E2E6E7SH的Ad的单一组合物进行共同给予确实导致CD4和CD8应答的整体较低的幅度,但该共同给予诱导免疫应答的类似宽度(数据未显示)。

[0542] 因此根据本发明的、表达HPV16 E2E6E7SH和HPV18 E2E6E7SH的构建体的共同给予可能诱导对HPV16和HPV18两者的细胞免疫应答。

[0543] 实例11.猕猴中组合的设计构建体的免疫原性。

[0544] 为了评估表达本发明设计序列的腺病毒载体诱导非人类灵长动物中免疫应答的能力,以针对每个载体 $1*10^{10}$ vp的剂量,用如在先前实例中的两个单独的腺病毒载体(即一起表达HPV16 E2E6E7SH和HPV18 E2E6E7SH的Ad26载体)或不编码转基因的腺病毒载体(空白)通过肌肉内注射对猕猴进行免疫。在免疫接种后八周,用表达相同抗原的Ad26载体使动物接受加强免疫接种。在第16周时,用表达相同抗原的Ad35载体使这些动物接受再一次注射。在若干时间点取血液样品并且用对应于HPV16和HPV18两者的E2、E6或E7的肽池刺激分离的白细胞过夜。通过IFN γ ELISPOT测量特异性应答。数据呈现于图21中。此外,在初次免疫接种后的第10周和第18周,评估对本发明的HPV18设计分子中的跨新颖连接的肽具有特异性的细胞免疫应答。在所有的动物中抵抗这些连接肽的IFN γ 应答的诱导是在 <50 SFU/ $1*10^6$ PBMC的检测限之下进行的(数据未显示)。

[0545] 数据示出,用一起表达HPV16 E2E6E7SH和HPV18 E2E6E7SH的Ad26载体的组合进行非人类灵长动物的免疫接种导致了抵抗呈现于编码的转基因中的几种HPV蛋白的细胞免疫应答。通过用Ad26载体进行的再次免疫接种可导致应答增强。在第16周时用对应的Ad35载体进行再次增强免疫接种,进一步提高免疫应答。

[0546] 实例12.在小鼠肿瘤模型中的组合的构建体的治疗效能。

[0547] 对应于HPV16 E6和E7的本发明的多肽能够在小鼠中诱导细胞免疫应答,这将导致在TC-1模型中的治疗效果(如实例5中示出的)。在该同一模型中测试一起表达HPV16和HPV18设计蛋白两者的腺病毒载体的组合的治疗效果。在没有疫苗的情况下,肿瘤快速生长并且在30天内达到 1000mm^3 的预定大小,在该点因为伦理原因处死小鼠。

[0548] 在该实验中,用表达HPV16 E2E6E7SH的腺病毒载体进行的初次免疫接种-加强免疫接种显著地延长了小鼠的存活期(图22)。使用一起表达HPV16 E2E6E7SH和HPV18 E2E6E7SH两者的腺病毒载体的组合,观察到相似的平均存活时间。在接受该组合疫苗的小鼠的组中,三只动物在90天的监测期结束时也没有患上肿瘤。结论,在针对HPV16诱导的癌症而良好建立的激发模型中,用一起表达本发明的HPV16-和HPV18-特异性设计多肽的腺病毒载体的组合进行的免疫接种显著降低了肿瘤生长或完全消除了已形成的肿瘤。

[0549] 参考文献

[0550] Abbink P,Lemckert AA,Ewald BA,Lynch DM,Denholtz M,Smits S,Holterman L,Damen I,Vogels R,Thorner AR,O'Brien KL,Carville A,Mansfield KG,Goudsmit J,Havenga MJ,Barouch DH(2007) Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D[来自亚组B和D的六种罕见血清型重组腺病毒疫苗载体的比较血清阳性率和免疫原性],J Virol[病毒学杂志]81:4654-4663

[0551] Ausubel FM(1995) Short protocols in molecular biology:a compendium of methods from Current protocols in molecular biology[分子生物学的短方案:来自分子生物学的实验指南的方法概要],威利(Wiley),[奇切斯特]

[0552] Brokaw JL,Blanco M,McBride AA(1996) Amino Acids Critical for the Functions of the Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Transactivator[牛乳头瘤病毒类型1 E2反式激活因子的功能的关键氨基酸],J Virol[病毒学杂志]70:23-29

[0553] Cottingham MG,Carroll F,Morris SJ,Turner AV,Vaughan AM,Kapulu MC,Colloca S,Siani L,Gilbert SC,Hill AV(2012) Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors[在腺病毒载体的转基因盒中防止自发性基因重排],Biotechnol Bioeng[生物技术与生物工程]109:719-728

[0554] Daayana S,Elkord E,Winters U,Pawlita M,Roden R,Stern PL,Kitchener HC(2010) Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia[在患有外阴上皮内瘤样病变的患者中咪喹莫特和HPV治疗性疫苗接种的II期试验],Br J Cancer[英国癌症杂志]102:1129-1136

[0555] de Jong A,van der Burg SH,Kwappenbergh KM,van der Hulst JM,Franken KL,Geluk A,van Meijgaarden KE,Drijfhout JW,Kenter G,Vermeij P,Melief CJ,Offringa R(2002) Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects[在健康受试者中频繁检测人乳头瘤病毒16 E2特异性T-辅助细胞免疫],Cancer Res[癌症研究]62:472-479

[0556] Edholm D,Molin M,Bajak E,Akusjarvi G(2001) Adenovirus vector designed for expression of toxic proteins[针对毒性蛋白表达涉及的腺病毒载体],J Virol[病毒学杂志]75:9579-9584

[0557] Evans RK,Nawrocki DK,Isopi LA,Williams DM,Casimiro DR,Chin S,Chen M,Zhu DM,Shiver JW,Volkin DB(2004) Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines[基于腺病毒载体疫苗的稳定液体配制品的发展],J Pharm

Sci[药学科学杂志]93:2458-2475

[0558] Fallaux FJ,Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses[新辅助细胞和早期匹配区域1-缺失的腺病毒载体预防产生有复制能力的腺病毒], Hum Gene Ther[人类基因治疗] 9:1909-1917

[0559] Frøkjær S, Hovgaard L (2000) Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins[肽和蛋白的药学配制品发展], 泰勒和弗朗西斯(Taylor & Francis), 伦敦

[0560] Gall JG, Lizonova A, EttyReddy D, McVey D, Zuber M, Kovesdi I, Aughtman B, King CR, rough DE (2007) Rescue and production of vaccine and therapeutic adenovirus vectors expressing inhibitory transgenes[挽救并生产表达抑制性转基因的疫苗和治疗性腺病毒载体], Mol Biotechnol[分子生物技术]35:263-273

[0561] Gao GP, Engdahl RK, Wilson JM (2000) A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus[用于大量生产没有出现复制能力的病毒的E1缺失的腺病毒载体的细胞系], Hum Gene Ther[人类基因治疗]11:213-219

[0562] Gennaro AR (1990) Remington's pharmaceutical sciences[雷明顿药学大全], 马克出版公司(Mack)

[0563] Gilbert R, Guilbault C, Gagnon D, Bernier A, Bourget L, Elahi SM, Kamen A, Massie B (2014) Establishment and validation of new complementing cells for production of E1-deleted adenovirus vectors in serum-free suspension culture [在无血清悬浮培养中用于生产E1缺失的腺病毒载体的新补充细胞的建立与评价], J Virol Methods[病毒学方法杂志]208:177-188

[0564] Hamid O, Carvajal RD (2013) Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy[在癌症治疗中的抗程序性死亡-1和抗程序性死亡-配体1抗体], Expert Opin Biol Ther[生物治疗专家意见]13:847-861

[0565] Harlow E, Lane D (1988) Antibodies: a laboratory manual[抗体:实验手册], 冷泉港实验室, 纽约

[0566] Havenga M, Vogels R, Zuidgeest D, Radosevic K, Mueller S, Sieuwerts M, Weichold F, Damen I, Kaspers J, Lemckert A, van Meerendonk M, van der Vlugt R, Holterman L, Hone D, Skeiky Y, Mintardjo R, Gillissen G, Barouch D, Sadoff J, Goudsmit J (2006) Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells[新颖没有复制能力的腺病毒B组载体: PER.C6细胞中高载体稳定性和产量], J Gen Virol[普通病毒学杂志]87:2135-2143

[0567] Henken FE, Oosterhuis K, Ohlschlager P, Bosch L, Hooijberg E, Haanen JB, Steenbergen RD (2012) Preclinical safety evaluation of DNA vaccines encoding modified HPV16 E6 and E7[编码修饰的HPV16 E6和E7的DNA疫苗的临床前安全评价],

Vaccine[疫苗]30:4259-4266

[0568] Hildesheim A,Herrero R,Wacholder S,Rodriguez AC,Solomon D,Bratti MC,Schiller JT,Gonzalez P,Dubin G,Porras C,Jimenez SE,Lowy DR(2007) Effect of human papillomavirus 16/18L1viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection:a randomized trial[在患有事先存在的感染的青年女性中人乳头瘤病毒16/18 L1病毒样颗粒疫苗的作用:随机试验],JAMA[美国医学会杂志]298:743-753

[0569] Hoganson DK,Ma JC,Asato L,Ong M,Printz MA,Huyghe BG,Sosnowski BA,D'Andrea MJ(2002) Development of a stable adenoviral vector formulation[研发稳定腺病毒载体配制品],Bioprocess J[生物工艺杂志]1:43-48

[0570] Hoof I,Peters B,Sidney J,Pedersen LE,Sette A,Lund O,Buus S,Nielsen M(2009) NetMHCpan,a method for MHC class I binding prediction beyond humans[NetMHCpan,一种超越人类用于MHC类别I结合预测的方法],Immunogenetics[免疫遗传学]61:1-13

[0571] Horwitz MS(1996) Adenoviruses[腺病毒]。其中:Fields BN,Knipe DM,Baines JD(编辑)Virology[病毒学],雷文出版社有限公司(Raven Press Ltd),纽约

[0572] Kenter GG,Welters MJ,Valentijn AR,Lowik MJ,Berends-van der Meer DM,Vloon AP,Essahsah F,Fathers LM,Offringa R,Drijfhout JW,Wafelman AR,Oostendorp J,Fleuren GJ,van der Burg SH,Melief CJ(2009) Vaccination against HPV-16oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia[针对外阴上皮内瘤样病变的抵抗HPV-16癌蛋白的疫苗接种],N Engl J Med[新英格兰医学杂志]361:1838-1847

[0573] Kibbe AH(2000) Handbook of pharmaceutical excipients[药用辅料手册],Pharmaceutical Press[英国医药出版社],伦敦

[0574] Kim TJ,Jin HT,Hur SY,Yang HG,Seo YB,Hong SR,Lee CW,Kim S,Woo JW,Park KS,Hwang YY,Park J,Lee IH,Lim KT,Lee KH,Jeong MS,Surh CD,Suh YS,Park JS,Sung YC(2014) Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3patients[在CIN3患者中通过治疗性DNA疫苗进行的HPV持续感染与宫颈病变的清除],Nat Commun[自然通讯]5:5317 (doi:10.1038/ncomms6317)

[0575] Kovesdi I,Hedley SJ(2010) Adenoviral producer cells[腺病毒生产细胞],Viruses[病毒]2:1681-1703

[0576] Lin KY,Guarnieri FG,Staveley-O' Carroll KF,Levitsky HI,August JT,Pardoll DM,Wu TC(1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen[用新颖的疫苗治疗以形成的肿瘤,该疫苗提高肿瘤抗原的主要组织相容性类型II的呈递],Cancer Res[癌症研究]56:21-26

[0577] Lundsgaard C,Lamberth K,Harndahl M,Buus S,Lund O,Nielsen M(2008) NetMHC-3.0:accurate web accessible predictions of human,mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11[NetMHC-3.0:精确网站可以预测人、

小鼠和猴子MHC类型I的长度为8-11的肽的亲和力],Nucleic Acids Res[核酸研究]36:W509-512

[0578] Massimi P,Banks L(2005) Transformation Assays for HPV Oncoproteins[针对HPV癌蛋白的转化测定]。其中:Davy C,Doorbar J(编辑)Human Papillomaviruses: Methods and Protocols[人乳头瘤病毒:方法和方案],Vol 119:Methods in Molecular Medicine Springer[第119卷:分子医学施普林格中的方法],柏林,第381-395页

[0579] Matthews DA,Cummings D,Evelegh C,Graham FL,Prevec L(1999) Development and use of a 293cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein [开发和利用表达乳糖阻遏物的293细胞系用于挽救表达高水平狂犬病毒糖蛋白的重组腺病毒],J Gen Virol[普通病毒学杂志]80(Pt 2):345-353

[0580] McPherson MJ,Hames BD,Taylor GR(1995) PCR 2:a practical approach[PCR 2:实用方法],牛津大学出版社的IRL出版(IRL Press at Oxford University Press), OxfordMellman I,Coukos G,Dranoff G(2011) Cancer immunotherapy comes of age[癌症免疫疗法新纪元],Nature[自然]480:480-489

[0581] Mishra S,Lavelle BJ,Desrosiers J,Ardito MT,Terry F,Martin WD,De Groot AS,Gregory SH(2014) Dendritic cell-mediated,DNA-based vaccination against Hepatitis C induces the multi-epitope-specific response of humanized,HLA transgenic mice[树突细胞介导的、针对丙型肝炎的基于DNA的疫苗接种诱导人源化的HLA转基因小鼠的多表位特异性应答],Plos One[公共科学图书馆综合]9(8):e104606.DOI:10.1371/journal.pone.0104606

[0582] Moise L,Buller RM,Schriewer J,Lee J,Frey SE,Weiner DB,Martin W,De Groot AS(2011) VennVax,a DNA-prime,peptide-boost multi-T-cell epitope poxvirus vaccine,induces protective immunity against vaccinia infection by T cell response alone[VennVax,一种DNA-初免、肽-加强多T细胞表位的痘病毒疫苗,通过单独的T细胞应答诱导针对牛痘感染的保护性免疫],Vaccine[疫苗]29:501-511

[0583] Moss SF,Moise L,Lee DS,Kim W,Zhang S,Lee J,Rogers AB,Martin W,De Groot AS(2011) ,HelicoVax:epitope-based therapeutic Helicobacter pylori vaccination in a mouse model[HelicoVax:在小鼠模型中以表位为基础的治疗性幽门螺杆菌疫苗接种],Vaccine[疫苗]29:2085-2091

[0584] Mullick A,Xu Y,Warren R,Koutroumanis M,Guilbault C,Broussau S, Malenfant F,Bourget L,Lamoureux L,Lo R,Caron AW,Pilotte A,Massie B(2006) The cumatate gene-switch:a system for regulated expression in mammalian cells [cumatate基因开关:在哺乳动物细胞中用于可调型表达的系统],BMC Biotechnol[BMC生物技术]6:43

[0585] Munger K,Phelps WC,Bubb V,Howley PM,Schlegel R(1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes[针对原代人类角质形成细胞的转化人乳头瘤病毒16型的E6和E7一起是必需的并且是足够的],J Virol[病毒

学杂志]63:4417-4421

[0586] Ogun SA,Dumon-Seignovert L,Marchand JB,Holder AA,Hill F(2008) The oligomerization domain of C4-binding protein(C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria[C4结合蛋白(C4bp)的低聚反应域作为一种佐剂,并且由与小鼠C4bp域融合的19千道尔顿裂体性孢子表面蛋白1组成的融合蛋白保护小鼠抵抗疟疾],Infect Immun[感染与免疫]76:3817-3823

[0587] Oosterhuis K,Aleyd E,Vrijland K,Schumacher TN,Haanen JB(2012a) Rational Design of DNA Vaccines for the Induction of Human Papillomavirus Type 16 E6-and E7-Specific Cytotoxic T-Cell Responses[用于诱导人乳头瘤病毒16型E6-和E7-特异性细胞毒性T-细胞应答的DNA疫苗的理性设计],Hum Gene Ther[人类基因治疗]23:1301-1312

[0588] Oosterhuis K,Ohlschlager P,van den Berg JH,Toebe M,Gomez R,Schumacher TN,Haanen JB(2011) Preclinical development of highly effective and safe DNA vaccines directed against HPV 16 E6 and E7[针对HPV 16 E6和E7的高效性和高安全性的DNA疫苗的临床前发展],Int J Cancer[国际癌症杂志]129:397-406

[0589] Oosterhuis K,van den Berg JH,Schumacher TN,Haanen JB(2012b) DNA vaccines and intradermal vaccination by DNA tattooing[DNA疫苗和通过纹身的皮内疫苗接种],Curr Top Microbiol Immunol[微生物学和免疫学的当前主题]351:221-250

[0590] Peters B,Tong W,Sidney J,Sette A,Weng Z(2003) Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-I molecules[检测针对肽与MHC-I分子结合的独立结合假设],Bioinformatics[生物信息学]19:1765-1772

[0591] Prakash SS,Grossman SR,Pepinsky RB,Laimins LA,Androphy EJ(1992) Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2trans-activator[在乳头瘤病毒E2反式激活蛋白中针对接触新颖基序的DNA和蕴涵新颖基序的二聚作用必须的氨基酸],Genes Dev[基因与发育]6:105-116

[0592] Rubinchik S,Ding R,Qiu AJ,Zhang F,Dong J(2000) Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein regulated by the tet-inducible expression system[递送由tet-诱导表达型系统调节的FasL-GFP融合蛋白的腺病毒载体],Gene Ther[基因治疗]7:875-885

[0593] Sambrook J,EFM(1989) Molecular cloning:a laboratory manual[分子克隆:实验手册],冷泉港实验室,冷泉港,纽约

[0594] Sakai H,Yasugi T,Benson JD,Dowhanick JJ,Howley PM(1996) Targeted Mutagenesis of the Human Papillomavirus Type 16 E2 Transactivation Domain Reveals Separable Transcriptional Activation and DNA Replication Functions[人乳头瘤病毒类型16 E2反式激活域的定向突变揭示可分离的转录激活和DNA复制功能],J Virol[病毒学杂志]70:1602-1611

[0595] Sedman SA,Barbosa MS,Vass WC,Hubbert NL,Haas JA,Lowy DR,Schiller JT

(1991) The full-length E6protein of human papillomavirus type 16has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7to immortalize keratinocytes in culture[人乳头瘤病毒16型的全长E6蛋白具有转化和反式激活活性并且与E7合作来永生化培养物中的角质形成细胞].J Virol[病毒学杂志]65: 4860-4866

[0596] Shenk T(1996) Adenoviridae and their Replication[腺病毒及其复制]。其中: Fields BN,Knipe DM,Baines JD(编辑)Virology[病毒学],雷文出版社有限公司(Raven Press Ltd),纽约

[0597] Smahel M,Sima P,udvikova V,Vonka V(2001) Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells[作为DNA疫苗抵抗包含E7的致癌细胞的修饰HPV16 E7基因],Virology[病毒学]281:231-238

[0598] van der Burg SH,Melief CJ(2011) Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies[抵抗人乳头瘤病毒诱导的恶性肿瘤的治疗性疫苗接种],Curr Opin Immunol[免疫学目前的观点]23:252-257

[0599] Watson JD(1992) Recombinant DNA[重组DNA].Scientific American Books[科学美国人书刊],纽约

[0600] Wiekking BG,Vermeer DW,Spanos WC,Lee KM,Vermeer P,Lee WT,Xu Y, Gabitzsch ES,Balcaitis S,Balint JP,Jr.,Jones FR,Lee JH(2012) A non-oncogenic HPV16 E6/E7vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors[一种非致瘤HPV 16 E6/E7疫苗提高表达肿瘤的HPV的治疗],Cancer Gene Ther[癌症基因治疗]19:667-674

[0601] Yan J,Reichenbach DK,Corbitt N,Hokey DA,Ramanathan MP,McKinney KA, Weiner DB,Sewell D(2009) Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16DNA vaccine encoding an E6/E7fusion antigen[随着编码E6/E7融合蛋白的新颖HPV-16DNA疫苗的递送诱导体内抗肿瘤免疫],Vaccine[疫苗]27: 431-440

[0602] Yao F,Eriksson E(1999) A novel tetracycline-inducible viral replication switch[一种新颖的四环素诱导的病毒复制开关].Hum Gene Ther[人类基因治疗]10:419-427

[0603] Yoshida Y,Hamada H(1997) Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal[通过四环素控制的具有核定位信号的反式激活蛋白腺病毒调节的可诱导的基因表达],Biochem Biophys Res Commun[生物化学与生物物理学集刊]230:426-430

[0604] Yugawa T,Kiyono T(2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses:novel functions of E6 and E7 oncoproteins[通过高危人乳头瘤病毒的宫颈肿瘤发生的分子机制:E6和E7癌蛋白的新颖功能],Rev Med Virol[医学病毒学评论]19:97-113

[0605] Zwaveling S,Ferreira Mota SC,Nouta J,Johnson M,Lipford GB,Offringa R, van der Burg SH,Melief CJ(2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long

peptides [随着长肽的疫苗接种有效消除了已形成的人乳头瘤病毒16型表达的肿瘤], J Immunol [免疫学杂志] 169:350-358

[0606] 表I.序列

[0607] SEQ ID NO:1 (HPV16-E6E7SH,HPV16 E6/E7设计多肽的氨基酸序列)

MHQKRTAMFQ DPQERPRKLP QLCTELQTTI HDIILECVYC KQQLEDEIDG
 PAGQAEPDRA HYNIVTFCCK CDSTLRLCVQ STHVDIRTLE DLLMGTGLGIV
 CPICSQKPGT TLEQQYNKPL CDLLIRCINC QKPLCPEEKQ RHLDKKQRFH
 [0608] NIRGRWTGRC MSCCRSSRTR RETQMHGDTP TLHEYMLDLQ PETTDLYCYE
 QLNDSSEEED EIDGPAGQAE PDRAHYNIVT FCCQLCTELQ TTIHDIILEC
 VYCKQQLLRR EVYDFAFRDL CIVYRDGNPY AVCDKCLKFY SKISEYRHYC
 YSLYGTTLEQ QYNKPLCDLL IRCINCQK

[0609] SEQ ID NO:2 (HPV16-E6E7SH,编码HPV16 E6/E7设计多肽的氨基酸序列的核苷酸序列)

ATGCACCAAGA AACGGACCGC CATGTTCCAG GACCCCCAGG
 AACGGCCCAG AAAGCTGCC CAGCTGTGCA CCGAGCTGCA GACCACCATC
 CACGACATCA TCCTGGAATG CGTGTACTGC AAGCAGCAGC TGGAAGATGA
 GATCGACGGC CCTGCTGGCC AGGCCGAACC CGACAGAGCC CACTACAATA
 TCGTGACCTT CTGCTGCAAG TCGGACAGCA CCCTGCGGCT GTGCGTGCAG
 AGCACCCACG TGGACATCCG GACCCTGGAA GATCTGCTGA TGGGCACCCCT
 GGGCATCGTG TGCCCCATCT GCAGCCAGAA GCCCGGCACC ACCCTGGAAC
 AGCAGTACAA CAAGCCCCTG TGCGACCTGC TGATCCGGTG CATCAACTGC
 CAGAAACCCC TGTGCCCGA GGAAAAGCAG CGGCACCTGG ACAAGAACGA
 GCGGTTCCAC AACATCCGGG GCAGATGGAC AGGCAGATGC ATGAGCTGCT
 GCAGAACAG CCGGACCAAGA CGGGAAACCC AGATGCACGG CGACACCCCC
 ACCCTGCACG AGTACATGCT GGACCTGCAG CCCGAGACAA CCGACCTGTA
 CTGCTACGAG CAGCTGAACG ACAGCAGCGA GGAAGAGGGAC GAGATTGACG
 GACCCGCTGG ACAGGCCAG CCTGACCGGG CTCACTATAA CATCGTGACA
 TTTGCTGTC AGCTCTGTAC TGAACCTCAG ACAACAATTAC ACGATATTAT
 TCTCGAATGT GTGTATTGTA AACAGCAGCT CCTGCGGAGA GAGGTGTACG
 ACTTCGCCTT CCGGGACCTC TGCATCGTGT ATCAGGGACGG CAACCCCTAC
 GCCGTGTGCG ACAAGTGCCT GAAGTTCTAC AGCAAGATCA GCGAGTACCG
 GCACTACTGC TACAGCCTGT ACGGAACAAAC ACTCGAACAG CAGTATAACA
 AACCACTCTG TGATCTGCTG ATTGCTGTA TCAATTGTCA GAAGTGATAA

[0611] SEQ ID NO:3 (HPV16 E2E6E7SH,HPV16 E2/E6/E7设计多肽的氨基酸序列)

[0612] METLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGFKHINHQQVPTLAVSKNKA
 LQAIELQLTLEIYNSQYSNEKWTLDVSEVYLTAPTGCIIKKHGYTVEVQFDGDICNTMHYTNWTHIYICEEASVT
 VVEGQVDYYGLYYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNVWEVHAGGQVILCPTSVFSSNEVSSPEIIRQHLANHPAATH
 TKAVALGTEETQTTIQRPRSEPDGNPCHTTKLLHRDSVDSAPILTAFNSSHGRINCNSNTTPIVHLKDANTLMR
 LRYRFKKHCTLYTAVSSTWHTGHNVHKSAIVTLYDSEWQRDQFLSQVKIPKTITVSTGFMSIMHQKRTAMFQDP
 QERPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVDIRTL
 EDLLMGTGLIVCPICSQKPGTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRS
 SRTRRETQMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCQLCTELQTTI
 HDIIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFY SKISEYRHYC SLYGTTLEQQYNKPLCDLL
 IRCINCQK

[0613] SEQ ID NO:4 (HPV16E2E6E7SH,编码HPV16E2/E6/E7设计多肽的核苷酸序列)

[0614] ATGGAAACCCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGC

ACCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGAAGCACATGCGGCTGGAATGCCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGCCTCAAGCACATCAACCACCAGGTGGTGCCACCCCTGGCGTGTCCAAGAACAGGCCATCGAGCTGCAGCTGACCCCTGGAAACCATCTACAACAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCTGCAGGACGTGTCAGCTGGAAACACCATGCACTACACCAACTGGACCCACATCTACATCTCGAAGAGGCCAGCGTGAACGTGGTGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGACTACGTGACGAGGGCATCCGGACCTACTCGTGCAGTTCAAGGACGACGCCAGAACAGCAAGAACAAAGTGTGGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAA CGAGGTGTCCAGCCCCGAGATCATCCGGCAGCACCTGCCAATCACCTGCCACCCACACAAAGGCCGTGGCC TGGGCACCGAGGAAACCCAGACCACCATCCAGCGGCCAGAAGCGAGGCCACACCGCAATCCCTGCCACACCAC AAGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCTATCCTGACCCCTTAACAGCAGCCACAAGGCCGGATCAA CTGCAACAGCAACACCACCCCATCGTGCACCTGAAGGTGGACGCCAACACCTGATGCGGCTGCGGTACAGATTCA AGAAGCACTGCACCCGTACACCCTGTGTCCTCCACCTGGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGGCC ATCGTGCACCTGACCTACGACAGCGAGTGGCAGCGGGACCAGTTCTGAGCCAGGTCAAATCCCCAAGACCATCAC CGTGTCCACCGGCTTCATGAGCATCATGCACCAAGAACGGACGCCATGTTCCAGGACCCCAAGGAACGCCAGAA AGCTGCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCTGGAAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAG CTGGAAGATGAGATCGACGCCCTGCTGGCCAGGCCAACCGACAGAGCCCACTACAATATCGTACCTCTGCTG CAAGTGCACAGCACCCCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTTGGACATCCGGACCCCTGGAAGATCTGCTGATGG GCACCCCTGGCATCGTGTGCCCCATCTGCAGCCAGAAGCCGGACCACCCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTG TGCGACCTGCTGATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCGAGGAAAAGCAGCGCACCTGGACAAGAA GCAGCGGTTCCACAACATCCGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAAGCAGCCGGACCAGACGG AAACCCAGATGCACGGGACACCCCCACCCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCGAGACAACCGACCTGTAC TGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAAGAGGACGAGATTGACGGACCCGCTGGACAGGCCGAGCCTGACCG GGCTCACTATAACATCGTACATTGCTGTCAGCTCTGTACTGAACCTCAGACAACAATTACGATATTATCTCG AATGTGTGTATTGTAACAGCAGCTCTGCGAGAGAGGTGTACGACTTCGCTTCCGGACCTCTGCATCGTGTAT CGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGCACTACTG CTACAGCCTGTACGGAACAAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTCTGTGATCTGCTGATTGCTGTATCAATT GTCAGAAGTGATAA

[0615] SEQ ID NO:5 (HPV16 E6E7E2SH, 编码HPV16 E6/E7/E2设计多肽的氨基酸序列)

[0616] MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCC KCDSTLRLCVQSTHVDIRTLLEDLMGTLGIVCPICSQKPGTTLQQYQNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKK QRFHNIRGRWTGRCMSSCRSSRRETQMHGDTPLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEDEIDGPAGQAEPDR AHYNIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYC YSLYGTTLQQYQNKPLCDLLIRCINCQKMETLCQRLNCQDKILTHYENDSTLIRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREM GFKHINHQVVP TLAVSKNKALQAIQLTLETIYNSQYSNEKWTLQDVSLLEVLTAPTGCIKKHGYTVEVQFDGDIC NTMHYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYYGLYYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNVWEVHAGGQVILCPTSVFSSN EVSSPEIIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRSEPDTGNCPTTLLHRSVDSAPILTAFNSSHGRIN CNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFKKHCTLTYTAVSSTWHWTGHNVKHSAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTIT VSTGFMSI

[0617] SEQ ID NO:6 (HPV16 E6E7E2SH, 编码HPV16 E6/E7/E2设计多肽的核苷酸序列)

[0618] ATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCCAGAAAGCTGCCAGCTGTGC
 ACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATCGA
 CGGCCCTGCTGCCAGGCCAACCGACAGAGCCCACATAAATATCGTACCTCTGCTGCAAGTGCACAGCACCC
 TGCAGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACATCCGGACCCCTGGAAGATCTGCTGATGGCACCCCTGGCATCGT
 TGCCCCATCTGCAGCAGAACGCCGGACCACCCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCTGTGCGACCTGCTGATCCG
 GTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGAAGCAGCGTTCCACAACA
 TCCGGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAGCCGGACCAGACGGAAACCCAGATGCACGGC
 GACACCCCCACCCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCGAGACAACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAA
 CGACAGCAGCGAGGAAGAGGACGAGATTGACGGACCCGCTGGACAGGCCGAGCCTGACCCGGCTCACTATAACATCG
 TGACATTTGCTGTCAGCTCTGTACTGAACTCCAGACAACAATTACGATATTATTCTCGAATGTGTGTATTGTAAA
 CAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCTCCGGACCTCTGCATCGTGTATCGGACGGCAACCCCTA
 CGCCGTGTGCGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCAGTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGTACGGAA
 CAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTCTGTGATCTGCTGATTGCTGTATCAATTGTCAGAAGATGGAAACC
 CTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGCACCGACCTGCGGGACCA
 CATCGACTACTGGAAGCACATGCGGCTGGAATGCGCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGCTTCAAGCACATCA
 ACCACCAGGTGGTGCCACCCCTGGCCGTGTCCAAGAACAAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCAGCTGACCCCTGGAA
 ACCATCTACAACAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCCTGCAAGGACGTCAGTGTCCCTGGAAGTGTACCTGACCGCTCC
 CACCGGCTGCATCAAGAAACACGGTACACCGTGGAGTGCAGTTGACGGGACATCTGCAACACCATGCACTACA
 CCAACTGGACCCACATCTACATCGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTG
 TACTACGTGACGGGACCTACTCGTGCAGTTCAAGGACGACGCCGAGAAGTACAGCAAGAACAAAGT
 GTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTACCTCTGTGCCCCACCAGCGTGTTCAGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCCG
 AGATCATCCGGCAGCACCTGGCAATCACCTGCCGCCACACAAAGGCCGTGGCCCTGGGACCGAGGAAACC
 CAGACCACCATCCAGCGGCCAGAACGCGAGGCCGACACCGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCTGCTGCACCGGGA
 CAGCGTGGACAGCGCCCTATCCTGACCGCCTCAACAGCAGCCACAAGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCA
 CCCCCATCGTGCACCTGAAGGTGGACGCCAACACCCCTGATCGGCTGCGGTACAGATTCAAGAAGCACTGCACCCCTG
 TACACCGCCGTGTCCTCCACCTGGCACTGGACCGGCCAACAGTGAAGCACAAGAGCGCCATCGTACCCCTGACCTA
 CGACAGCGAGTGGCAGCGGGACCAGTTCTGAGCCAGGTAAAATCCCCAAGACCATACCGTGTCCACCGGCTTC
 TGAGCATCTGATAA

[0619] SEQ ID NO:7 (IgE前导肽氨基酸序列)

[0620] MDWTWILFLVAAATRVHS

[0621] SEQ ID NO:8 (编码IgE前导肽的核苷酸序列)

[0622] ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCTGCCGCAACCCGGGTGCACAGC

[0623] SEQ ID NO:9 (aa HAVT20前导肽氨基酸序列)

[0624] MACPGFLWALVISTCLEFSMA

[0625] SEQ ID NO:10 (编码HAVT20前导肽的核苷酸序列)

[0626] ATGGCCTGCCCGCTTCTGTGGGCCCTGGTACAGCACCTGTCTGGAATTGAGCATGGCC

[0627] SEQ ID NO:11 (包含2xTetO的序列)

[0628] GAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGAC

[0629] SEQ ID NO:12 (包含CuO的序列)

[0630] AACAAACAGACAATCTGGTCTGTTGTA

[0631] SEQ ID NO:13 (存在于pAdApt26和pAdApt35质粒中的CMV启动子)

[0632] TCAATATTGCCATTAGCCATATTATTGTTATAGCATAATCAATATTGGCTATTGCCATTGCATACGTTATCCATATCATAATATGTACATTATGGCTATGTCACATTACGCCATGTCAGTACATGACTATTGACTAGTTATTAGTAATCAATTACGGGTCTAGTCATAGCCATATGGAGTTCCCGTTACATAACTTACGGTAAATGCCCGCTGGCTGACGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCGGTTTGCGAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGAGTTGTTTGGCACCAAAATCAACGGACTTCAAATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATGCCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGCACCTCCATAGAAGACACCGGACCGATCCAGCCTCCGCCGGAACGGTGCATTGGA

[0633] SEQ ID NO:14 (TetR, 编码由pcDNATM6/TR表达的TetR多肽的氨基酸序列的核苷酸序列)

[0634] ATGTCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGTAAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTGGAATCGAAGGTTAACACCCGTAACACTGCCAGAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGATGGCATGAAAAATAAGCGGGCTTGCTCGACGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCACTCACTTGCCTTAAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTACGTAATAACGCTAAAGTTTAGATGCTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTAGGTACACGCCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTATGCCAACAAAGGTTTCACTAGAGAATGCATTATGCACTCAGCGCTGTGGGCATTACTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTACGACAAGCTATGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTCTTATCGGCCCTGAATTGATCATATGCCGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGTCCCGTACAGCGGATCCGGGAATTGAGATCTTATTAA

[0635] SEQ ID NO:15 (TetR, 由pcDNATM6/TR表达的TetR多肽的氨基酸序列)

[0636] MSRLDKSKVINSALLELNEVGIEGLTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNRALLDALAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVELDQEHQVAKERETPTTDSMPPLRQAIELFDHQGAEP AFLGLEIICGLEKQLKCESGSAYSGSREFRSY

[0637] SEQ ID NO:16 (CymR, 编码CymR多肽的氨基酸序列的核苷酸序列)

[0638] ATGTCTCCCAAACGACGGACTCAAGCGGAAAGGGCAATGGAAACTCAGGGTAAGCTGATTGCCCGGGCTCTGGGAGTGCTGCGAGAGAAAGGGTATGCCGGTTTCGCATAGCCGACGTTCTGGAGCTGCAGCGTAAGCAGAGGAGCAGGAAAGCCAACTCATCACTTCCGACCAAGCTGGAGCTTGTGGCTACCTTCGAATGGCTGTACGAGCAGATCACGGAAAGGAGTCGTGCTAGGCTGCCAAGCTGAAACCCGAGGATGATGTCATTCACTGAGCTGGCAGATCCAGCTTGCAGGGCATACAGAGAACAGTCGAGCCGAATCGGTTGTGGAGGACATGTGGCTTGGTCTGGTACCGAGAGCCCTCTCACGGGATGCGAGGACATCCTGTGGCTGATCTTAACCTCCGTACAGGGTTGGCAGTGAGGTCCCTTGGCAGAAGGACAAAGAACGGTTGAACGTGTGCGAAACTCAACACTCGAGATTGCTAGGAAACGCTACGCCAAGTTCAAGAGATGA

[0639] SEQ ID NO:17 (CymR, CymR多肽的氨基酸序列)

[0640] MSPKRRTQAERAMETQGKLIAAALGVLRKGYAGFRIADVPGAGVSRGAQSHHPTKLELLLATFEWL
YEQITERSRARLAKLPEDDVIQQMLDDAAEFFLDDDFSISLDLIVAADRDPALREGIQRSTVERNRFVVEDMWLGVL
VSRGLSRDDAEDILWLIFNSVRGLAVRSLWQKDKERFERVRNSTLEIARERYAKFKR

[0641] SEQ ID NO:18 (HPV16 E6,aa41-65)

[0642] KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN

[0643] SEQ ID NO:19 (HPV16 E7 aa 43-77) GQAEPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRLCVQSTHVDIR

[0644] SEQ ID NO:20 (HPV18-E6E7SH设计序列的氨基酸序列)

[0645] MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLDLLCHEQLSDSEEEDEIDGVNHQHLPARR
AEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQHYSDSVYGDITLEKLNTGLYNLLIRC
LRCQKPLNPAEKLRHLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPV DLL
CHEQLSDSEEEDEIDGVNPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFY
SRIRELRHYSDSVYGDITLEKLNTGLYNLLI

[0646] SEQ ID NO:21 (HPV18-E6E7SH设计序列的核苷酸序列)

[0647] ATGGCCAGATTGAGGACCCCACCAAGACGGCCCTACAAGCTGCCGACCTGTGCACCGAGCTGAACACA
TCTCTGCAGGACATCGAGATCACATGCGTGTACTGCAAGACCGTGCTGGACCTGCTGTGCCACGAGCAGCTGCCGA
CTCCGAGGAAGAAAACGACGAGATCGACGGCGTAACCACATCAGCATCTGCCGCCAGACGGGCCAGCCCCAGAGAC
ACACCATGCTGTGCATGTGCTGCAAGTGCAGGAGCCGGATTGAGCTGGTGGAAAGCAGCGCCACGACCTGCGG
GCCTTCCAGCAGCTTTCTGAATACCTGAGCTTCGTGTGCCCTGGTGCAGCCACTACAGCGACTCCGT
GTACGGCGATAACCTGGAAAAGCTGACCAATACCGCCCTGTATAACCTGCTGATCCGGTGCCTGCCAGAAGC
CCCTGAATCCGCCAGAAAAGTGAACGACACCTGAACGAGAACGGCTGCAGCGGAGGCCAAACCATGACGGACCCAAGGC
CAGTGCCACAGCTGCTGCAACCGGCCAGACAGGAACGGCTGCAGCGGAGGCCAAACCATGACGGACCCAAGGC
CACCCCTCAGGACATTGCTGCACCTGGAACCCAGAACGAGATCCCCGTGATCTGCTGTGTCATGAACAGCTCA
GCGACAGCGAAGAGGAAAATGACGAAATTGACGGGTCAACCTGACCTCTGTACCGAACTCAATACCAGTCTCCAG
GATATCGAAATTACCTGTGTACTGTAAAACCGTCTCGAGCTGACCGAGGTGTCAGTCGCCTCAAGGACCT
GTTTGTGGTGTACAGAGACAGCATCCCCACGCCCTGCCACAAGTCATGACTTCTACAGCCGGATCAGAGAGC
TGGCGACTACTCCGATTCTGTATGGCGACACACTCGAGAAGCTCACAAACACAGGACTGTACAATCTGCTCATC
TGATAA

[0648] SEQ ID NO:22 (HPV18-E2E6E7SH设计序列的氨基酸序列)

[0649] MQTPKETLSERLSALQDKIIDHYENDSKIDSQIQYWQLIRWENAIFFAAREHGIQTLNHQVVPAYNI
SKSKAHKAIELQMALQGLAQSAYKTEDWTLQDTCEELWNTPETHCFKKGGQTVQVYFDGNKDNCMTYVAWDSVYYM
TDAGTWDTATCVSHRGLYYVKEGYNTFYIEFKSECEKYGNTGTWEVHFGNNVIDCNDSCMCSTSDDTVSATQLVKQ
LQHTPSPYSTSVGTAKTYGQTSATRPGHCGLAEKQHCGPVNPLLGAATPTGNKRRKLCGNTTPIIHLKVDR
NSLMLRLRYLRKHSDHYRDISSTWHTGAGNEKTGILTIVYHSETQRTKFLNTVAIPDSVQILVGYMTMMARFEDP
TRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLDLLCHEQLSDSEEEDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCK
CEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQHYSDSVYGDITLEKLNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKL
RHLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPV DLLCHEQLSDSEEE
DEIDGVNPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYS
SVYGDITLEKLNTGLYNLLI*

[0650] SEQ ID NO:23 (HPV18-E2E6E7SH设计序列的核苷酸序列)

[0651] ATGCAGACCCCCAAAGAGACACTGAGCGAGCGGCTGAGGCCCTGCAGGACAAGATCATGACCCTAC
 GAGAACGACAGCAAGGACATCGACAGCCAGATCCAGTACTGGCAGCTGATCAGATGGGAGAACGCCATCTTCTCGC
 CGCCAGAGAGCACGGCATCCAGACCCTGAACCACCAGGTGGTCCCCCTACAACATCAGCAAGAGCAAGGCCACA
 AGGCTATCGAGCTGCAGATGGCCCTGCAGGGACTGGCCAGAGGCCCTACAAGACCGAGGGACTGGACCCTGCAGGAT
 ACCTGCGAGGAACGTGGAACACCGAGGCCACCCACTGCTCAAGAAAGGCGGCCAGACCGTGCAGGTGTACTTCGA
 CGGCAACAAGGACAACGTGACCTACGTGGCCTGGACAGCGTGTACTACATGACCGACGCCGGCACCTGGACA
 AGACCGCCACCTGTGTGCCCCACCAGGGCTGTACTACGTGAAAGAGGGCTACAACACCTTCTACATGAGTTCAAG
 AGCGAGTGCAGAAGTACGGCAACACCGGCACATGGGAGGTGCACTTCGGCAACAACGTGATCGACTGCAACGACAG
 CATGTGCAGCACCGACGACACCGTGTCCGCCACCCAGCTGGTAAACAGCTGCAGCACACCCCCAGGCCCTACA
 GCAGCACCGTGTCTGTGGCACCGCCAAGACCTACGGCCAGACCAGCGCCGCCACCAGACCTGGACACTGTGCCCTG
 GCCGAGAAGCAGCACTGCCCTGTGAACCTCTGCTGGAGGCCACCCCCACCGCAACAACAAGCGGAGAAA
 GCTGTGCAGCGGCAACACCAACCCATCATCCACCTGAAGGTGGACCGAACAGCCTGATGCGGCTGCCGTACAGAC
 TCGGAAGCAGCGACCAACTACCGGACATCAGCAGCACCTGGCACTGGACCGCGCTGGCAACGAGAAAACCGGC
 ATCCGTGACCTACACAGCGAACCCAGCGACCAAGTCCCTGAACACCGTGGCCATCCCCGACAGCGTGC
 GATCCTGGTGGATATGACCATGATGCCAGATTGAGGACCCACCAGACGCCCTACAAGCTGCCGACCTGT
 GCACCGAGCTGAACACATCTCTGAGACATCGAGATCACATGCCGTACTGCAAGACCGTGCCTGGACCTGCTGTGC
 CACGAGCAGCTGCGACTCCGAGGAAGAAAACGACGAGATCGACGGCGTAACCCTCAGCATCTGCCGCCAGACG
 GGCGAGCCCCAGAGACACACCATGCTGTGCATGTGCAAGTGCAGGCCCCGATTGAGCTGGTGGTGGAAAGCA
 GCGCCGACGACCTGCCCTCCAGCAGCTTCTGAATACCCCTGAGCTTGTGCCCTGGCGCCAGCCAG
 CACTACAGCAGCTCGTGTACGGGATAACCTGGAAAGCTGACCAATACCCGCTGTATAACCTGCTGATCCGGTG
 CCTGCCGTGCCAGAACGCCCTGAATCCGCCAGAAACTGAGACACCTGAACGAGAACGGCGTCCACAATATCG
 CCGCCACTACAGAGGCCAGTGCCACAGCTGCTGCAACCGGCCAGACAGGAACGGCTGCAGCGAGGCGGGAAACC
 ATGCAAGGACCAAGGCCACCCCTCAGGACATTGCTCTGCACCTGGAACCCAGAACGAGATCCCCGTCGATCTG
 GTGTCATGAACAGCTCGACAGCGAAGAGGAAATGACGAAATTGACGGGTCAACCTGACCTCTGTACCGAAC
 TCAATACCAGTCTCCAGGATATGAAATTACCTGTGTACTGTAAAACCGTCCTGAGCTGACCGAGGTGTTGAG
 TTCGCCCTCAAGGACCTGTTGTGGTGTACAGAGACAGCATCCCCACGCCCTGCCACAAGTGCATGACTTCTA
 CAGCCGGATCAGAGAGCTGCCACTACTCCGATTCTGTATGGCGACACACTCGAGAACGCTACAAACACAGGAC
 TGTACAATCTGCTCATCTGATAA

[0652] SEQ_ID NO:24 (‘HPV18DC2’的氨基酸序列)

[0653] MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPV DLLCHEQLSDSEEEDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTSLQDIEITC
 VYCKTVLELTEVFEFAFKDLFVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSVDYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLQRF
 EDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFADSEEEDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMC
 CKCEARIELVVESSADDLRAFQQFLNTLSFVCPWCASQSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLR
 HLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRRETQ

- [0001] 序列表
[0002] <110> 扬森疫苗与预防公司
[0003] E • M • 邦尼克
[0004] J • H • H • V • 屈斯泰
[0005] G • C • 舍佩尔
[0006] K • 奥斯特胡伊斯
[0007] T • G • 乌伊尔
[0008] S • 卡恩
[0009] <120> 治疗性HPV18疫苗
[0010] <130> 0260 WO 00 ORD
[0011] <150> EP15181791
[0012] <151> 2015-08-20
[0013] <150> EP16156334
[0014] <151> 2016-02-18
[0015] <160> 24
[0016] <170> PatentIn 3.5版本
[0017] <210> 1
[0018] <211> 328
[0019] <212> PRT
[0020] <213> 人工序列
[0021] <220>
[0022] <223> HPV16-E6E7SH设计多肽
[0023] <400> 1
[0024] Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
[0025] 1 5 10 15
[0026] Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
[0027] 20 25 30
[0028] Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile
[0029] 35 40 45
[0030] Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
[0031] 50 55 60
[0032] Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
[0033] 65 70 75 80
[0034] Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
[0035] 85 90 95
[0036] Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu
[0037] 100 105 110
[0038] Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile

[0039]	115	120	125
[0040]	Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp		
[0041]	130	135	140
[0042]	Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys		
[0043]	145	150	155
[0044]	Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His		
[0045]	165	170	175
[0046]	Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu		
[0047]	180	185	190
[0048]	Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu		
[0049]	195	200	205
[0050]	Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala		
[0051]	210	215	220
[0052]	His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln		
[0053]	225	230	235
[0054]	Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln		
[0055]	245	250	255
[0056]	Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile		
[0057]	260	265	270
[0058]	Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys		
[0059]	275	280	285
[0060]	Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr		
[0061]	290	295	300
[0062]	Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu		
[0063]	305	310	315
[0064]	Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys		
[0065]	325		
[0066]	<210> 2		
[0067]	<211> 990		
[0068]	<212> DNA		
[0069]	<213> 人工序列		
[0070]	<220>		
[0071]	<223> 编码HPV16-E6E7SH设计多肽的nt序列		
[0072]	<400> 2		
[0073]	atgcaccaga aacggaccgc catgttccag gacccccagg aacggcccaag aaagctgcc 60		
[0074]	cagctgtgca ccgagctgca gaccaccatc cacgacatca tcctggaatg cgtgtactgc 120		
[0075]	aagcagcagc tggaaagatga gatcgacggc cctgctggcc aggcccgaacc cgacagagcc 180		
[0076]	cactacaata tcgtgacctt ctgctgcaag tgcgacagca ccctgcggct gtgcgtgcag 240		
[0077]	agcacccacg tggacatccg gaccctggaa gatctgctga tggcaccct gggcatcgtg 300		

[0078]	tgccccatct	gcagccagaa	gcccggcacc	accctggaac	agcagtacaa	caagccctg	360										
[0079]	tgcgacctgc	tgatccggtg	catcaactgc	cagaaacccc	tgtccccga	ggaaaagcag	420										
[0080]	cggcacctgg	acaagaagca	gcggttccac	aacatccggg	gcagatggac	aggcagatgc	480										
[0081]	atgagctgct	gcagaaggcag	ccggaccaga	cggaaaccc	agatgcacgg	cgacacccccc	540										
[0082]	accctgcacg	agtacatgct	ggacctgcag	ccc gagacaa	ccgacctgta	ctgctacgag	600										
[0083]	cagctgaacg	acagcagcga	ggaagaggac	gagattgacg	gacccgctgg	acaggccgag	660										
[0084]	cctgaccggg	ctcactataa	catcgta	ttttgtgtc	agctctgtac	tgaactccag	720										
[0085]	acaacaattc	acgatattat	tctcgatgt	gtgtattgt	aacagcagct	cctgcggaga	780										
[0086]	gaggtgtacg	acttcgcctt	ccgggacctc	tgcacgtgt	atcgggacgg	caacccctac	840										
[0087]	gccgtgtcgc	acaagtgcct	gaagttctac	agcaagatca	gcgagtaccg	gcactactgc	900										
[0088]	tacagcctgt	acggaacaac	actcgaacag	cagtataaca	aaccactctg	tgatctgctg	960										
[0089]	attcgctgta	tcaattgtca	gaagtgataa				990										
[0090]	<210>	3															
[0091]	<211>	693															
[0092]	<212>	PRT															
[0093]	<213>	人工序列															
[0094]	<220>																
[0095]	<223>	HPV16 E2E6E7SH设计多肽															
[0096]	<400>	3															
[0097]	Met	Glu	Thr	Leu	Cys	Gln	Arg	Leu	Asn	Val	Cys	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	
[0098]	1																15
[0099]	Thr	His	Tyr	Glu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Ile	Asp	Tyr	
[0100]																	30
[0101]	Trp	Lys	His	Met	Arg	Leu	Glu	Cys	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Arg	Glu	
[0102]																	45
[0103]	Met	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Asn	His	Gln	Val	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Val	
[0104]																	60
[0105]	Ser	Lys	Asn	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala	Ile	Glu	Leu	Gln	Leu	Thr	Leu	Glu	
[0106]																	80
[0107]	Thr	Ile	Tyr	Asn	Ser	Gln	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Trp	Thr	Leu	Gln	Asp	
[0108]																	95
[0109]	Val	Ser	Leu	Glu	Val	Tyr	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Cys	Ile	Lys	Lys	
[0110]																	110
[0111]	His	Gly	Tyr	Thr	Val	Glu	Val	Gln	Phe	Asp	Gly	Asp	Ile	Cys	Asn	Thr	
[0112]																	125
[0113]	Met	His	Tyr	Thr	Asn	Trp	Thr	His	Ile	Tyr	Ile	Cys	Glu	Glu	Ala	Ser	
[0114]																	140
[0115]	Val	Thr	Val	Val	Glu	Gly	Gln	Val	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Val	
[0116]																	160

[0117]	His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu		
[0118]		165	170
[0119]	Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val		175
[0120]		180	185
[0121]	Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro		190
[0122]		195	200
[0123]	Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr		205
[0124]		210	215
[0125]	Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg		220
[0126]		225	230
[0127]	Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu		235
[0128]		245	250
[0129]	Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn		255
[0130]		260	265
[0131]	Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile		270
[0132]		275	280
[0133]	Val His Leu Lys Val Asp Ala Asn Thr Leu Met Arg Leu Arg Tyr Arg		285
[0134]		290	295
[0135]	Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His		300
[0136]		305	310
[0137]	315	320	
[0138]	Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr		
[0139]	325	330	335
[0140]	Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile		
[0141]	340	345	350
[0142]	Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile Met His Gln		
[0143]	355	360	365
[0144]	Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu		
[0145]	370	375	380
[0146]	385	390	395
[0147]	400		
[0148]	Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu		
[0149]	405	410	415
[0150]	Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro		
[0151]	420	425	430
[0152]	Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe		
[0153]	435	440	445
[0154]	Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His		
[0155]	450	455	460
	Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile		
	Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln		

[0156]	465	470	475	480
[0157]	Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln			
[0158]		485	490	495
[0159]	Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln			
[0160]		500	505	510
[0161]	Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys			
[0162]		515	520	525
[0163]	Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His Gly Asp Thr			
[0164]		530	535	540
[0165]	Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp			
[0166]		545	550	555
[0167]	Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu			
[0168]		565	570	575
[0169]	Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn			
[0170]		580	585	590
[0171]	Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile			
[0172]		595	600	605
[0173]	His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg			
[0174]		610	615	620
[0175]	Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg			
[0176]		625	630	635
[0177]	Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser			
[0178]		645	650	655
[0179]	Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr			
[0180]		660	665	670
[0181]	Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys			
[0182]		675	680	685
[0183]	Ile Asn Cys Gln Lys			
[0184]		690		
[0185]	<210> 4			
[0186]	<211> 2085			
[0187]	<212> DNA			
[0188]	<213> 人工序列			
[0189]	<220>			
[0190]	<223> 编码HPV16 E2E6E7SH设计多肽的nt序列			
[0191]	<400> 4			
[0192]	atggaaaccc tgtgccagcg gctgaacgtg tgccaggaca agatcctgac ccactacgag	60		
[0193]	aacgacagca ccgacacctgcg ggaccacatc gactactgga agcacatgcg gctggaatgc	120		
[0194]	gccatctact acaaggccag agagatggc ttcaagcaca tcaaccacca ggtggtgccc	180		

[0195]	accctggccg tgtccaagaa caaggccctg caggccatcg agtcgcagct gaccctggaa	240
[0196]	accatctaca acagccagta cagcaacgag aagtggaccc tgcaggacgt gtccctggaa	300
[0197]	gtgtacctga ccgctccac cggtgcac aagaaacacg gctacaccgt ggaagtgcag	360
[0198]	ttcgacggcg acatctgcaa caccatgcac tacaccaact ggacccacat ctacatctgc	420
[0199]	gaagaggcca gcgtgaccgt ggtggaaggc caggtggact actacggcct gtactacgtg	480
[0200]	cacgagggca tccggaccta cttcgtgcag ttcaaggacg acgcccagaa gtacagcaag	540
[0201]	aacaaagtgt gggaggtgca cgctggcggc caggtcatcc tggccccac cagcgtgttc	600
[0202]	agcagcaacg aggtgtccag ccccagatc acccggcagc acctggccaa tcaccctgcc	660
[0203]	gccacccaca caaaggccgt gcccctggc accgaggaaa cccagaccac catccagcgg	720
[0204]	cccagaagcg agcccgacac cggcaatccc tgccacacca ccaagctgct gcaccggac	780
[0205]	agcgtggaca ggcggccat cctgaccgccc ttcaacagca gccacaaggg cggatcaac	840
[0206]	tgcaacagca acaccacccc catcgtgcac ctgaaggtgg acgccaacac cctgatgcgg	900
[0207]	ctgcgttaca gattcaagaa gcactgcacc ctgtacaccg ccgtgtcctc cacctggcac	960
[0208]	tggaccggcc acaacgtgaa gcacaagacg gccatcgtga ccctgaccta cgacagcgg	1020
[0209]	tggcagcggg accagttcct gagccagggtc aaaatcccc agaccatcac cgtgtccacc	1080
[0210]	ggtttcatga gcatcatgca ccagaaacgg accgccatgt tccaggaccc ccaggaacgg	1140
[0211]	cccgaaaagc tgccccagct gtgcacccgg ctgcagacca ccatccacga catcatcctg	1200
[0212]	gaatgcgtgt actgcaagca gcagctggaa gatgagatcg acggccctgc tggccaggcc	1260
[0213]	gaacccgaca gagccacta caatatcgt accttctgct gcaagtgcga cagcacccctg	1320
[0214]	cggctgtgcg tgcagagcac ccacgtggac atccggaccc tggaaagatct gctgatggc	1380
[0215]	accctggca tcgtgtgccc catctgcac cagaagcccg gcaccaccct ggaacacgcag	1440
[0216]	tacaacaagc ccctgtgcga cctgctgatc cgggtcatca actgccagaa acccctgtgc	1500
[0217]	cccgaggaaa agcagcggca cctggacaag aagcagcgggt tccacaacat ccggggcaga	1560
[0218]	tggacaggca gatgcatgag ctgctgcaga agcagccgga ccagacggga aacccagatg	1620
[0219]	cacggcgaca ccccccaccct gcacgagtac atgctggacc tgcagccgaa gacaaccgac	1680
[0220]	ctgtactgct acgagcagct gaacgacacg agcgaggaag aggacgagat tgacggaccc	1740
[0221]	gctggacagg ccgagcctga ccgggctcac tataacatcg tgacatttt ctgtcagctc	1800
[0222]	tgtactgaac tccagacaac aattcacat attattctcg aatgtgtgta ttgtaaacag	1860
[0223]	cagctcctgc ggagagaggt gtacgacttc gccttccggg acctctgcac cgtgtatcgg	1920
[0224]	gacggcaacc cctacgcccgt gtgcgacaag tgcctgaagt tctacagcaa gatcagcgg	1980
[0225]	taccggcaact actgctacag cctgtacgga acaacactcg aacagcagta taacaaacca	2040
[0226]	ctctgtgatc tgctgattcg ctgtatcaat tgtcagaagt gataa	2085
[0227]	<210> 5	
[0228]	<211> 693	
[0229]	<212> PRT	
[0230]	<213> 人工序列	
[0231]	<220>	
[0232]	<223> HPV16 E6E7E2SH设计多肽	
[0233]	<400> 5	

[0234]	Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro			
[0235]	1	5	10	15
[0236]	Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp			
[0237]	20	25	30	
[0238]	Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile			
[0239]	35	40	45	
[0240]	Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile			
[0241]	50	55	60	
[0242]	Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln			
[0243]	65	70	75	80
[0244]	Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr			
[0245]	85	90	95	
[0246]	Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu			
[0247]	100	105	110	
[0248]	Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile			
[0249]	115	120	125	
[0250]	Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp			
[0251]	130	135	140	
[0252]	Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys			
[0253]	145	150	155	160
[0254]	Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His			
[0255]	165	170	175	
[0256]	Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu			
[0257]	180	185	190	
[0258]	Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu			
[0259]	195	200	205	
[0260]	Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala			
[0261]	210	215	220	
[0262]	His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln			
[0263]	225	230	235	240
[0264]	Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln			
[0265]	245	250	255	
[0266]	Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile			
[0267]	260	265	270	
[0268]	Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys			
[0269]	275	280	285	
[0270]	Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr			
[0271]	290	295	300	
[0272]	Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu			

[0273]	305	310	315	320
[0274]	Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu			
[0275]	325	330	335	
[0276]	Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr			
[0277]	340	345	350	
[0278]	Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys			
[0279]	355	360	365	
[0280]	Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu Met Gly Phe Lys His Ile Asn His			
[0281]	370	375	380	
[0282]	Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala			
[0283]	385	390	395	400
[0284]	Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser			
[0285]	405	410	415	
[0286]	Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr			
[0287]	420	425	430	
[0288]	Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln			
[0289]	435	440	445	
[0290]	Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His			
[0291]	450	455	460	
[0292]	Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val			
[0293]	465	470	475	480
[0294]	Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe			
[0295]	485	490	495	
[0296]	Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp			
[0297]	500	505	510	
[0298]	Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe			
[0299]	515	520	525	
[0300]	Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala			
[0301]	530	535	540	
[0302]	Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu			
[0303]	545	550	555	560
[0304]	Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly			
[0305]	565	570	575	
[0306]	Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser			
[0307]	580	585	590	
[0308]	Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn			
[0309]	595	600	605	
[0310]	Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Val Asp Ala Asn			
[0311]	610	615	620	

[0312] Thr Leu Met Arg Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr
 [0313] 625 630 635 640
 [0314] Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His
 [0315] 645 650 655
 [0316] Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp
 [0317] 660 665 670
 [0318] Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr
 [0319] 675 680 685
 [0320] Gly Phe Met Ser Ile
 [0321] 690
 [0322] <210> 6
 [0323] <211> 2085
 [0324] <212> DNA
 [0325] <213> 人工序列
 [0326] <220>
 [0327] <223> 编码HPV16 E6E7E2SH设计多肽的nt序列
 [0328] <400> 6
 [0329] atgcaccaga aacggaccgc catgttccag gaccccccagg aacggcccaag aaagctgccc 60
 [0330] cagctgtgca ccgagactgca gaccaccatc cacgacatca tcctggaatg cgtgtactgc 120
 [0331] aagcagcagc tggaagatga gatcgacggc cctgctggcc agggcgaacc cgacagagcc 180
 [0332] cactacaata tcgtgacctt ctgctgcaag tgcgacagca ccctgcggct gtgcgtgcag 240
 [0333] agcacccacg tggacatccg gaccctggaa gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 300
 [0334] tgccccatct gcagccagaa gccggcacc accctggAAC agcagtacaa caagcccctg 360
 [0335] tgcgacctgc tgatccggtg catcaactgc cagaaacccc tgtgccccga ggaaaagcag 420
 [0336] cgccacctgg acaagaagca gcggttccac aacatccggg gcagatggac aggcagatgc 480
 [0337] atgagctgct gcagaagcag ccggaccaga cgggaaaccc agatgcacgg cgacacccccc 540
 [0338] accctgcacg agtacatgct ggacctgcag cccgagacaa ccgacactgta ctgctacgag 600
 [0339] cagctgaacg acagcagcga ggaagaggac gagattgacg gacccgctgg acagggcag 660
 [0340] cctgaccggg ctcactataa catcgatgaca ttttgcgttc agtcgttgc tgaactccag 720
 [0341] acaacaattc acgatattat tctcgatgt gtgtattgt aacagcagct cctgcggaga 780
 [0342] gaggtgtacg acttcgcctt ccgggacctc tgcacgtgt atcgggacgg caaccctac 840
 [0343] gccgtgtcg acaagtgcct gaagttctac agcaagatca gcgagtaccg gcactactgc 900
 [0344] tacagcctgt acggaacaac actcgaaacag cagtataaca aaccactctg tgcgtgtac 960
 [0345] attcgctgta tcaattgtca gaagatggaa accctgtgcc agcggctgaa cgtgtgccag 1020
 [0346] gacaagatcc tgaccacta cgagaacgac agcaccgacc tgccggacca catcgactac 1080
 [0347] tggaaagcaca tgcggctgga atgcgcacatc tactacaagg ccagagagat gggcttcaag 1140
 [0348] cacatcaacc accaggtggt gcccacccctg gccgtgtcca agaacaaggc cctgcaggcc 1200
 [0349] atcgagctgc agctgaccct gggaaaccatc tacaacagcc agtacagcaa cgagaagtgg 1260
 [0350] accctgcagg acgtgtccct gggaaaccatc tacaacagcc agtacagcaa cgagaagtgg 1320

- [0351] cacggctaca ccgtggaagt gcagttcgac ggcgacatct gcaacaccat gcactacacc 1380
 [0352] aactggaccc acatctacat ctgcgaagag gccagcgtga ccgtggtgga aggccaggtg 1440
 [0353] gactactacg gcctgtacta cgtgcacgag ggcacatccgga cctacttcgt gcagttcaag 1500
 [0354] gacgacgccc agaagtacag caagaacaaa gtgtgggagg tgcacgctgg cggccaggtc 1560
 [0355] atcctgtgcc ccaccagcgt gttcagcgc aacgaggtgt ccagccccga gatcatccgg 1620
 [0356] cagcacctgg ccaatcaccc tgccgccacc cacacaaagg ccgtggccct gggcaccgag 1680
 [0357] gaaacccaga ccaccatcca gcccggcaga agcgagcccg acacccgcaa tccctgccac 1740
 [0358] accaccaagc tgctgcaccc ggacagcgtg gacagccccc ctatcctgac cgccttcaac 1800
 [0359] agcagccaca agggccggat caactgcaac agcaacacca ccccccacgt gcacctaag 1860
 [0360] gtggacgcca acaccctgat gccgctgcgg tacagattca agaaggactg caccctgtac 1920
 [0361] accgcgtgt cctccaccc gcactggacc gcccacaacg tgaaggaccaa gagcggccatc 1980
 [0362] gtgaccctga cctacgacag cgagtggcag cgggaccagt tcctgagcca ggtcaaaatc 2040
 [0363] cccaagacca tcaccgtgtc caccggcttc atgagcatct gataa 2085
 [0364] <210> 7
 [0365] <211> 18
 [0366] <212> PRT
 [0367] <213> 人工序列
 [0368] <220>
 [0369] <223> IgE前导肽
 [0370] <400> 7
 [0371] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Ala Thr Arg Val
 [0372] 1 5 10 15
 [0373] His Ser
 [0374] <210> 8
 [0375] <211> 54
 [0376] <212> DNA
 [0377] <213> 人工序列
 [0378] <220>
 [0379] <223> 编码IgE前导肽的nt序列
 [0380] <400> 8
 [0381] atggactgga cctggatcct gttcctggtg gctgccgcaa cccgggtgca cagc 54
 [0382] <210> 9
 [0383] <211> 21
 [0384] <212> PRT
 [0385] <213> 人工序列
 [0386] <220>
 [0387] <223> HAVT20前导肽
 [0388] <400> 9
 [0389] Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

[0390]	1	5	10	15			
[0391]	Glu	Phe	Ser	Met Ala			
[0392]			20				
[0393]	<210>	10					
[0394]	<211>	63					
[0395]	<212>	DNA					
[0396]	<213>	人工序列					
[0397]	<220>						
[0398]	<223>	编码HAVT20前导肽的nt序列					
[0399]	<400>	10					
[0400]	atggcctgcc	ccggctttct	gtggccctg	gtcatcagca	cctgtctgga	attcagcatg	60
[0401]	gcc	63					
[0402]	<210>	11					
[0403]	<211>	54					
[0404]	<212>	DNA					
[0405]	<213>	人工序列					
[0406]	<220>						
[0407]	<223>	含有2xTet0的序列					
[0408]	<400>	11					
[0409]	gagctctccc	tatcagtgtat	agagatctcc	ctatcagtga	tagagatcgt	cgac	54
[0410]	<210>	12					
[0411]	<211>	28					
[0412]	<212>	DNA					
[0413]	<213>	人工序列					
[0414]	<220>						
[0415]	<223>	含有2xCu0的序列					
[0416]	<400>	12					
[0417]	aacaaacaga	caatctggtc	tgttgta	28			
[0418]	<210>	13					
[0419]	<211>	829					
[0420]	<212>	DNA					
[0421]	<213>	人工序列					
[0422]	<220>						
[0423]	<223>	CMV启动子					
[0424]	<400>	13					
[0425]	tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
[0426]	ttggccattg	catacgttgt	atccatatca	taatatgtac	atttatattg	gctcatgtcc	120
[0427]	aacattaccg	ccatgttgac	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
[0428]	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240

- [0429] gcctggctga ccgccccaaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
[0430] agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagttttac ggtaaactgc 360
[0431] ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtaacg ccccttattt acgtcaatga 420
[0432] cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccgttacatgacc ttatggact ttcctacttg 480
[0433] gcagtagtacatc tacgtatttag tcattcgat taccatgggtt atgcgggtttt ggcagtagtacat 540
[0434] caatgggcgt ggatagcggt ttgactcactg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
[0435] caatgggagt ttgtttggc accaaaatca acgggactttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660
[0436] cgccccattt acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtt gaggctata taagcagagc 720
[0437] tcgttttagt aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgtttt acctccatag 780
[0438] aagacaccgg gaccgatcca gcctccggcc cgggaaacgg tgcattgga 829
[0439] <210> 14
[0440] <211> 657
[0441] <212> DNA
[0442] <213> 人工序列
[0443] <220>
[0444] <223> 编码TetR多肽的nt序列
[0445] <400> 14
[0446] atgtcttagat tagataaaaag taaagtgtt aacagcgcat tagagctgct taatgaggc 60
[0447] ggaatcgaag gtttacaac ccgtaaactc gcccagaagc taggtgttaga gcagccataca 120
[0448] ttgtattggc atgtaaaaaa taagcgggtt ttgctcgacg ccttagccat tgagatgtt 180
[0449] gataggcacc atactcactt ttgccttta gaagggaaa gctggcaaga tttttacgt 240
[0450] aataacgcta aaagtttag atgtgttta ctaagtcatc gcgtggagc aaaagtacat 300
[0451] ttaggtacac ggcctacaga aaaacagttt gaaactctcg aaaatcaatt agccttttta 360
[0452] tgccaacaag gttttcact agagaatgca ttatatgcac tcagcgctgt gggcatttt 420
[0453] acttttagtt gcgtattggc agatcaagag catcaagtgc ctaaagaaga aagggaaaca 480
[0454] cctactactg atagtatgcc gccatttta cgacaagcta tcgaattatt tgatcacca 540
[0455] ggtgcagagc cagccttctt attcggcattt gaattgtatca tatgcggatt agaaaaacaa 600
[0456] cttaaatgtt aaagtgggtc cgcgtacagc ggatccggg aattcagatc ttattaa 657
[0457] <210> 15
[0458] <211> 218
[0459] <212> PRT
[0460] <213> 人工序列
[0461] <220>
[0462] <223> TetR多肽
[0463] <400> 15
[0464] Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu
[0465] 1 5 10 15
[0466] Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln
[0467] 20 25 30

[0468]	Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys			
[0469]	35	40	45	
[0470]	Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His			
[0471]	50	55	60	
[0472]	Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg			
[0473]	65	70	75	80
[0474]	Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly			
[0475]	85	90	95	
[0476]	Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr			
[0477]	100	105	110	
[0478]	Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu			
[0479]	115	120	125	
[0480]	Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys			
[0481]	130	135	140	
[0482]	Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr			
[0483]	145	150	155	160
[0484]	Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu			
[0485]	165	170	175	
[0486]	Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu			
[0487]	180	185	190	
[0488]	Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser Ala			
[0489]	195	200	205	
[0490]	Tyr Ser Gly Ser Arg Glu Phe Arg Ser Tyr			
[0491]	210	215		
[0492]	<210> 16			
[0493]	<211> 612			
[0494]	<212> DNA			
[0495]	<213> 人工序列			
[0496]	<220>			
[0497]	<223> 编码CymR多肽的nt序列			
[0498]	<400> 16			
[0499]	atgtctccca aacgacggac tcaagcgaa agggcaatgg aaactcaggg taagctgatt 60			
[0500]	gccgcggctc tgggagtgct gcgagagaaa ggttatgccg gtttcgcatt agccgacgtt 120			
[0501]	cctggagctg caggcgtaag cagaggagcc caatctcatc acttccgac caagctggag 180			
[0502]	ctttgctgg ctaccttoga atggctgtac gagcagatca cggaaaggag tcgtgctagg 240			
[0503]	ctggccaagc tgaaacccga ggtatgttc attcagcaga tgctggacga tgcagccgag 300			
[0504]	ttcttctgg acgacgactt cagcatca tgcacacta tcgtagccgc agatcgcat 360			
[0505]	ccagcttgc gcgagggcat acagagaaca gtcgagcgga atcggttgtt ggtggaggac 420			
[0506]	atgtggcttg gtgttctggc gaggcaggc ctctcacggg atgatgccga ggacatcctg 480			

[0507] tggctgatct ttaactccgt cagagggttg gcagtgaggt cccttggca gaaggacaaa 540
 [0508] gaacggttt aacgtgtgcg aaactcaaca ctcgagattt ctagggaacg ctacgccaag 600
 [0509] ttcaagagat ga 612
 [0510] <210> 17
 [0511] <211> 203
 [0512] <212> PRT
 [0513] <213> 人工序列
 [0514] <220>
 [0515] <223> CymR多肽
 [0516] <400> 17
 [0517] Met Ser Pro Lys Arg Arg Thr Gln Ala Glu Arg Ala Met Glu Thr Gln
 [0518] 1 5 10 15
 [0519] Gly Lys Leu Ile Ala Ala Ala Leu Gly Val Leu Arg Glu Lys Gly Tyr
 [0520] 20 25 30
 [0521] Ala Gly Phe Arg Ile Ala Asp Val Pro Gly Ala Ala Gly Val Ser Arg
 [0522] 35 40 45
 [0523] Gly Ala Gln Ser His His Phe Pro Thr Lys Leu Glu Leu Leu Leu Ala
 [0524] 50 55 60
 [0525] Thr Phe Glu Trp Leu Tyr Glu Gln Ile Thr Glu Arg Ser Arg Ala Arg
 [0526] 65 70 75 80
 [0527] Leu Ala Lys Leu Lys Pro Glu Asp Asp Val Ile Gln Gln Met Leu Asp
 [0528] 85 90 95
 [0529] Asp Ala Ala Glu Phe Phe Leu Asp Asp Asp Phe Ser Ile Ser Leu Asp
 [0530] 100 105 110
 [0531] Leu Ile Val Ala Ala Asp Arg Asp Pro Ala Leu Arg Glu Gly Ile Gln
 [0532] 115 120 125
 [0533] Arg Thr Val Glu Arg Asn Arg Phe Val Val Glu Asp Met Trp Leu Gly
 [0534] 130 135 140
 [0535] Val Leu Val Ser Arg Gly Leu Ser Arg Asp Asp Ala Glu Asp Ile Leu
 [0536] 145 150 155 160
 [0537] Trp Leu Ile Phe Asn Ser Val Arg Gly Leu Ala Val Arg Ser Leu Trp
 [0538] 165 170 175
 [0539] Gln Lys Asp Lys Glu Arg Phe Glu Arg Val Arg Asn Ser Thr Leu Glu
 [0540] 180 185 190
 [0541] Ile Ala Arg Glu Arg Tyr Ala Lys Phe Lys Arg
 [0542] 195 200
 [0543] <210> 18
 [0544] <211> 25
 [0545] <212> PRT

[0546]	<213> 人工序列			
[0547]	<220>			
[0548]	<223> HPV16 E6 aa41-65			
[0549]	<400> 18			
[0550]	Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp			
[0551]	1	5	10	15
[0552]	Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn			
[0553]	20	25		
[0554]	<210> 19			
[0555]	<211> 35			
[0556]	<212> PRT			
[0557]	<213> 人工序列			
[0558]	<220>			
[0559]	<223> HPV16 E7 aa43-77			
[0560]	<400> 19			
[0561]	Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys			
[0562]	1	5	10	15
[0563]	Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val			
[0564]	20	25	30	
[0565]	Asp Ile Arg			
[0566]	35			
[0567]	<210> 20			
[0568]	<211> 331			
[0569]	<212> PRT			
[0570]	<213> 人工序列			
[0571]	<220>			
[0572]	<223> HPV18-E6E7SH设计多肽			
[0573]	<400> 20			
[0574]	Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp			
[0575]	1	5	10	15
[0576]	Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys			
[0577]	20	25	30	
[0578]	Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser			
[0579]	35	40	45	
[0580]	Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His			
[0581]	50	55	60	
[0582]	Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met			
[0583]	65	70	75	80
[0584]	Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala			

[0585]	85	90	95
[0586]	Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe		
[0587]	100	105	110
[0588]	Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly		
[0589]	115	120	125
[0590]	Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile		
[0591]	130	135	140
[0592]	Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg		
[0593]	145	150	155
[0594]	His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg		
[0595]	165	170	175
[0596]	Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln		
[0597]	180	185	190
[0598]	Arg Arg Arg Glu Thr Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile		
[0599]	195	200	205
[0600]	Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys		
[0601]	210	215	220
[0602]	His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly		
[0603]	225	230	235
[0604]	Val Asn Pro Asp Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile		
[0605]	245	250	255
[0606]	Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val		
[0607]	260	265	270
[0608]	Phe Glu Phe Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile		
[0609]	275	280	285
[0610]	Pro His Ala Ala Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg		
[0611]	290	295	300
[0612]	Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys		
[0613]	305	310	315
[0614]	Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile		
[0615]	325	330	
[0616]	<210> 21		
[0617]	<211> 999		
[0618]	<212> DNA		
[0619]	<213> 人工序列		
[0620]	<220>		
[0621]	<223> HPV18-E6E7SH 设计序列的nt序列		
[0622]	<400> 21		
[0623]	atggccagat tcgaggaccc caccagacgg ccctacaagg tgcccgacct gtgcaccgag	60	

[0624]	ctgaacacat	ctctgcagga	catcgagatc	acatgcgtgt	actgcaagac	cgtgctggac	120										
[0625]	ctgctgtgcc	acgagcagct	gtccgactcc	gaggaagaaa	acgacgagat	cgacggcgtg	180										
[0626]	aaccatcagc	atctgcccgc	cagacgggcc	gagccccaga	gacacaccat	gctgtcatg	240										
[0627]	tgctcaagt	gcgaggcccc	gattgagctg	gtggtggaaa	gcagcgccga	cgacctgcgg	300										
[0628]	gccttccagc	agctcttct	gaataccctg	agcttcgtgt	gcccttggtg	cgccagccag	360										
[0629]	cactacagcg	actccgtgta	cggcgatacc	ctggaaaagc	tgaccaatac	cggcctgtat	420										
[0630]	aacctgctga	tccggtgcct	gcgggtgccag	aagcccctga	atcccgcga	gaaactgaga	480										
[0631]	cacctgaacg	agaagcggcg	gttccacaat	atcgcggcc	actacagagg	ccagtgccac	540										
[0632]	agctgctgca	accgggccag	acaggaacgg	ctgcagcgga	ggcgggaaac	catgcacgga	600										
[0633]	cccaaggcca	ccctccagga	cattgtcctg	cacctggaac	cccagaacga	gatccccgtc	660										
[0634]	gatctgctgt	gtcatgaaca	gctcagcgac	agcgaagagg	aaaatgacga	aattgacggg	720										
[0635]	gtcaaccctg	acctctgtac	cgaactcaat	accagtctcc	aggatatcga	aattacctgt	780										
[0636]	gtctactgta	aaaccgtcct	cgagctgacc	gaggtgttcg	agttgcctt	caaggacctg	840										
[0637]	tttgtggtgt	acagagacag	catccccac	gccgcctgcc	acaagtgcac	cgacttctac	900										
[0638]	agccggatca	gagagctgctg	gcactactcc	gattctgtgt	atggcgacac	actcgagaag	960										
[0639]	ctcacaaaca	caggactgta	caatctgctc	atctgataa			999										
[0640]	<210>	22															
[0641]	<211>	696															
[0642]	<212>	PRT															
[0643]	<213>	人工序列															
[0644]	<220>																
[0645]	<223>	HPV18-E2E6E7SH设计序列															
[0646]	<400>	22															
[0647]	Met	Gln	Thr	Pro	Lys	Glu	Thr	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	
[0648]	1				5				10					15			
[0649]	Asp	Lys	Ile	Ile	Asp	His	Tyr	Glu	Asn	Asp	Ser	Lys	Asp	Ile	Asp	Ser	
[0650]					20				25					30			
[0651]	Gln	Ile	Gln	Tyr	Trp	Gln	Leu	Ile	Arg	Trp	Glu	Asn	Ala	Ile	Phe	Phe	
[0652]					35				40					45			
[0653]	Ala	Ala	Arg	Glu	His	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Asn	His	Gln	Val	Val	Pro	
[0654]					50				55					60			
[0655]	Ala	Tyr	Asn	Ile	Ser	Lys	Ser	Lys	Ala	His	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Gln	
[0656]					65				70					75			80
[0657]	Met	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Ala	Gln	Ser	Ala	Tyr	Lys	Thr	Glu	Asp	Trp	
[0658]					85				90					95			
[0659]	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Leu	Trp	Asn	Thr	Glu	Pro	Thr	His	
[0660]					100				105					110			
[0661]	Cys	Phe	Lys	Lys	Gly	Gly	Gln	Thr	Val	Gln	Val	Tyr	Phe	Asp	Gly	Asn	
[0662]					115				120					125			

[0663]	Lys Asp Asn Cys Met Thr Tyr Val Ala Trp Asp Ser Val Tyr Tyr Met		
[0664]	130	135	140
[0665]	Thr Asp Ala Gly Thr Trp Asp Lys Thr Ala Thr Cys Val Ser His Arg		
[0666]	145	150	155
[0667]	Gly Leu Tyr Tyr Val Lys Glu Gly Tyr Asn Thr Phe Tyr Ile Glu Phe		
[0668]	165	170	175
[0669]	Lys Ser Glu Cys Glu Lys Tyr Gly Asn Thr Gly Thr Trp Glu Val His		
[0670]	180	185	190
[0671]	Phe Gly Asn Asn Val Ile Asp Cys Asn Asp Ser Met Cys Ser Thr Ser		
[0672]	195	200	205
[0673]	Asp Asp Thr Val Ser Ala Thr Gln Leu Val Lys Gln Leu Gln His Thr		
[0674]	210	215	220
[0675]	Pro Ser Pro Tyr Ser Ser Thr Val Ser Val Gly Thr Ala Lys Thr Tyr		
[0676]	225	230	235
[0677]	Gly Gln Thr Ser Ala Ala Thr Arg Pro Gly His Cys Gly Leu Ala Glu		
[0678]	245	250	255
[0679]	Lys Gln His Cys Gly Pro Val Asn Pro Leu Leu Gly Ala Ala Thr Pro		
[0680]	260	265	270
[0681]	Thr Gly Asn Asn Lys Arg Arg Lys Leu Cys Ser Gly Asn Thr Thr Pro		
[0682]	275	280	285
[0683]	Ile Ile His Leu Lys Val Asp Arg Asn Ser Leu Met Arg Leu Arg Tyr		
[0684]	290	295	300
[0685]	Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg Asp Ile Ser Ser Thr Trp		
[0686]	305	310	315
[0687]	His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr Val Thr		
[0688]	325	330	335
[0689]	Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe Leu Asn Thr Val Ala Ile		
[0690]	340	345	350
[0691]	Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr Met Thr Met Met Ala Arg		
[0692]	355	360	365
[0693]	Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr		
[0694]	370	375	380
[0695]	Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys		
[0696]	385	390	395
[0697]	Lys Thr Val Leu Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu		
[0698]	405	410	415
[0699]	Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala		
[0700]	420	425	430
[0701]	Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys		

[0702]	435	440	445
[0703]	Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu		
[0704]	450	455	460
[0705]	Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Val Cys Pro		
[0706]	465	470	475
[0707]	Trp Cys Ala Ser Gln His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu		
[0708]	485	490	495
[0709]	Glu Lys Leu Thr Asn Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu		
[0710]	500	505	510
[0711]	Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn		
[0712]	515	520	525
[0713]	Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys		
[0714]	530	535	540
[0715]	His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg		
[0716]	545	550	555
[0717]	Glu Thr Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His		
[0718]	565	570	575
[0719]	Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln		
[0720]	580	585	590
[0721]	Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn Pro		
[0722]	595	600	605
[0723]	Asp Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr		
[0724]	610	615	620
[0725]	Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe		
[0726]	625	630	635
[0727]	Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala		
[0728]	645	650	655
[0729]	Ala Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg		
[0730]	660	665	670
[0731]	His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn		
[0732]	675	680	685
[0733]	Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile		
[0734]	690	695	
[0735]	<210> 23		
[0736]	<211> 2094		
[0737]	<212> DNA		
[0738]	<213> 人工序列		
[0739]	<220>		
[0740]	<223> HPV18-E2E6E7SH设计序列的nt序列		

[0741]	<400>	23
[0742]	atgcagaccc	ccaaagagac actgagcgag cggctgagcg ccctgcagga caagatcatc 60
[0743]	gaccactacg	agaacgacag caaggacatc gacagccaga tccagtactg gcagctgatc 120
[0744]	agatggaga	acgccatctt cttcgccgccc agagagcactg gcatccagac cctgaaccac 180
[0745]	caggtggtgc	ccgcctacaa catcagcaag agcaaggccc acaaggctat cgagctgcag 240
[0746]	atggccctgc	agggactggc ccagagcgcc tacaagaccg aggactggac cctgcaggat 300
[0747]	acctgcgagg	aactgtggaa caccgagccc acccactgct tcaagaaagg cggccagacc 360
[0748]	gtcaggtgt	acttcgacgg caacaaggac aactgcatga cctacgtggc ctgggacaggc 420
[0749]	gtgtactaca	tgaccgacgc cgccacctgg gacaagaccg ccacctgtgt gtcccaccgg 480
[0750]	ggcctgtact	acgtgaaaga gggctacaac accttctaca tcgagttcaa gagcgagtgc 540
[0751]	gagaagtacg	gcaacacccgg cacatgggag gtgacttcg gcaacaacgt gatcactgc 600
[0752]	aacgacagca	tgtcagcac cagcgacgac accgtgtccg ccacccagct ggtaaacag 660
[0753]	ctgcagcaca	cccccagccc ctacagcagc accgtgtctg tggcaccgc caagacctac 720
[0754]	ggccagacca	gcccggccac cagacctgga cactgtggcc tggccgagaa gcagcactgc 780
[0755]	ggccctgtga	accctctgct gggagccgccc acccccacccg gcaacaacaa gcggagaaag 840
[0756]	ctgtcagcg	gcaacaccac ccccatcatc cacatgaagg tggaccggaa cagcctgatg 900
[0757]	cggctgcgg	acagactgcg gaagcacacg gaccactacc gggacatcag cagcacctgg 960
[0758]	cactggaccg	gchgctggcaa cgagaaaacc ggcacccctga ccgtgaccta ccacagcgaa 1020
[0759]	acccagcgga	ccaagttcct gaacaccgtg gccatccccg acagcgtgc gatcctgg 1080
[0760]	ggatatatga	ccatgatggc cagattcgag gacccacca gacggcccta caagctgcc 1140
[0761]	gacctgtca	ccgagctgaa cacatctctg caggacatcg agatcacatg cgttactgc 1200
[0762]	aagaccgtgc	tggacctgct gtgccacgag cagctgtccg actccgagga agaaaacgac 1260
[0763]	gagatcgacg	gcgtgaacca tcagcatctg cccgcccac gggccgagcc ccagagacac 1320
[0764]	accatgctgt	gcatgtgctg caagtgcgag gcccggattg agctgggtt ggaaagcagc 1380
[0765]	gccgacgacc	tgcggccctt ccagcagctc tttctgaata ccctgagctt cgtgtgcc 1440
[0766]	tggtcgcca	gccagcacta cagcgactcc gtgtacggcg ataccctgga aaagctgacc 1500
[0767]	aataccggcc	tgtataacct gctgatccgg tgcctgcggt gccagaagcc cctgaatccc 1560
[0768]	gccgagaaac	tgagacacct gaacgagaag cggcggttcc acaatatcgc cggccactac 1620
[0769]	agaggccagt	gccacagctg ctgcaaccgg gccagacagg aacggctgc gcgaggcgg 1680
[0770]	gaaaccatgc	acggacccaa gcccaccctc caggacattt tcctgcaccc ggaaccccg 1740
[0771]	aacgagatcc	ccgtcgatct gctgtgtcat gaacagctca ggcacagcga agagaaaaat 1800
[0772]	gacgaaattt	acgggtcaa ccctgaccc tgcgttccat tcaataccag tctccaggat 1860
[0773]	atcgaaattt	cctgtgtcta ctgtaaaacc gtcctgcggc tgaccgaggt gttcgagttc 1920
[0774]	gccttcaagg	acctgtttgt ggtgtacaga gacagcatcc cccacgcccgc ctgccacaag 1980
[0775]	tgcacactcg	tctacagccg gatcagagag ctgcggact actccgattc tgttatggc 2040
[0776]	gacacactcg	agaagctcac aaacacagga ctgtacaatc tgctcatctg ataa 2094
[0777]	<210>	24
[0778]	<211>	338
[0779]	<212>	PRT

[0780]	<213> 人工序列															
[0781]	<220>															
[0782]	<223> HPV18DS2氨基酸序列															
[0783]	<400> 24															
[0784]	Met	His	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Ile	Val	Leu	His	Leu	Glu
[0785]	1				5				10					15		
[0786]	Pro	Gln	Asn	Glu	Ile	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Cys	His	Glu	Gln	Leu	Ser
[0787]					20				25					30		
[0788]	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Asn	Asp	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Asn	His	Gln	His
[0789]						35			40				45			
[0790]	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Gln	Arg	His	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp
[0791]						50			55				60			
[0792]	Ile	Glu	Ile	Thr	Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu
[0793]						65			70			75		80		
[0794]	Val	Phe	Glu	Phe	Ala	Phe	Lys	Asp	Leu	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser
[0795]						85			90			95				
[0796]	Ile	Pro	His	Ala	Ala	Cys	His	Lys	Cys	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile
[0797]						100			105			110				
[0798]	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu
[0799]						115			120			125				
[0800]	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Gln
[0801]						130			135			140				
[0802]	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Arg	Pro	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Leu	Cys
[0803]						145			150			155		160		
[0804]	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr	Cys	Val	Tyr
[0805]						165			170			175				
[0806]	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Phe	Ala	Asp	Ser	
[0807]						180			185			190				
[0808]	Glu	Glu	Glu	Asn	Asp	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Asn	His	Gln	His	Leu	Pro
[0809]						195			200			205				
[0810]	Ala	Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Gln	Arg	His	Thr	Met	Leu	Cys	Met	Cys	Cys
[0811]						210			215			220				
[0812]	Lys	Cys	Glu	Ala	Arg	Ile	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Asp	Asp
[0813]						225			230			235		240		
[0814]	Leu	Arg	Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Phe	Val	Cys
[0815]						245			250			255				
[0816]	Pro	Trp	Cys	Ala	Ser	Gln	Ser	Asp	Ser	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu
[0817]						260			265			270				
[0818]	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg

[0819]	275	280	285
[0820]	Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu		
[0821]	290	295	300
[0822]	Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His		
[0823]	305	310	315
[0824]	Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu		
[0825]		325	330
[0826]	Thr Gln		335

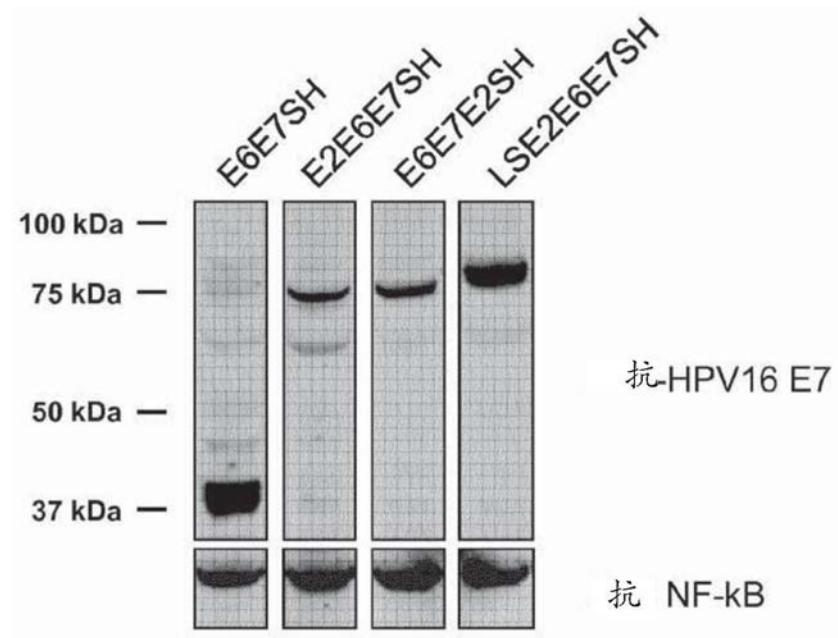


图1

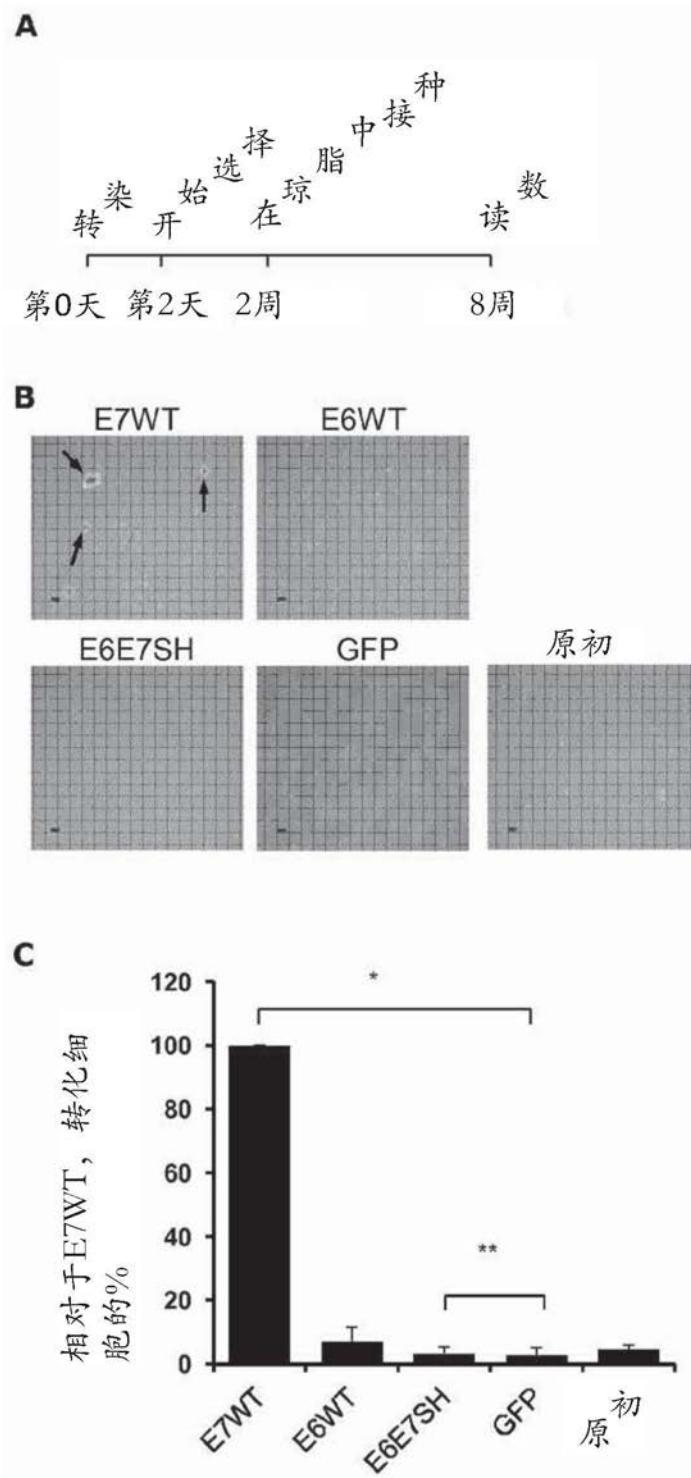


图2

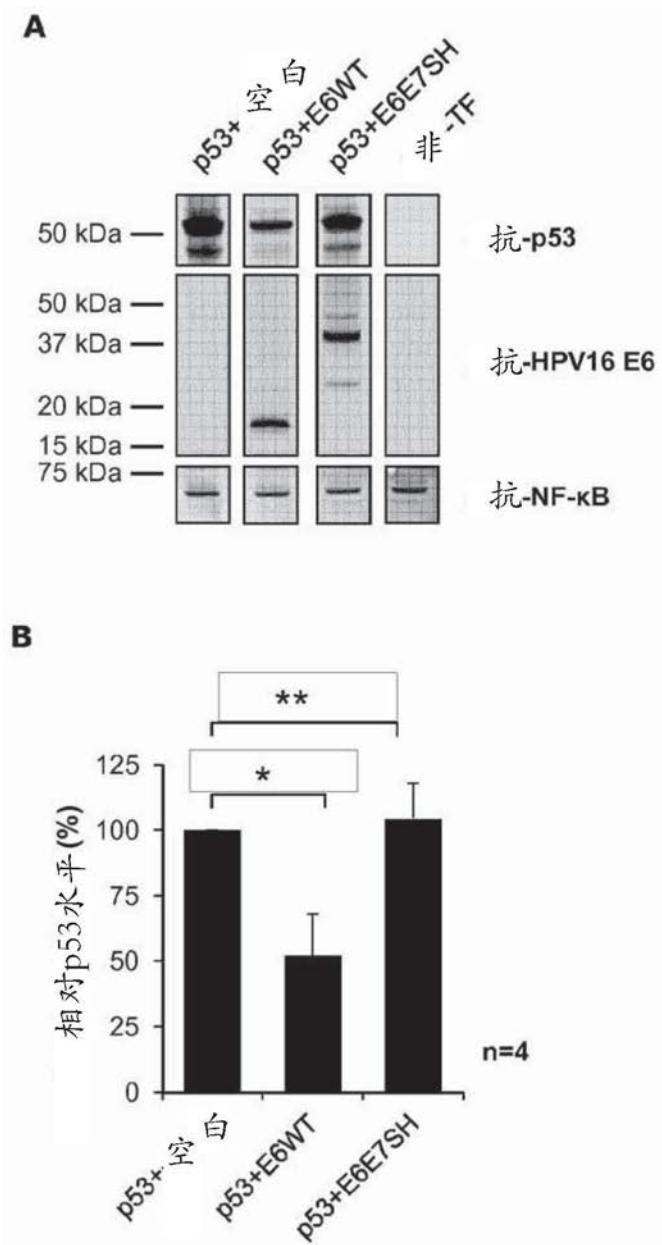


图3

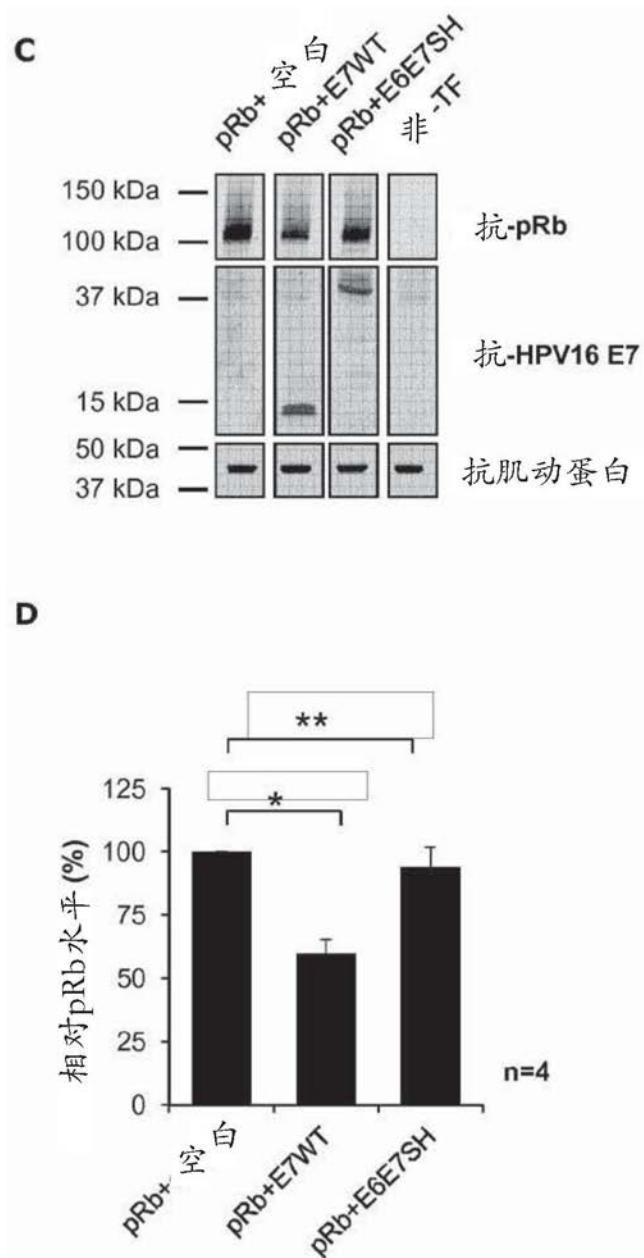


图3续

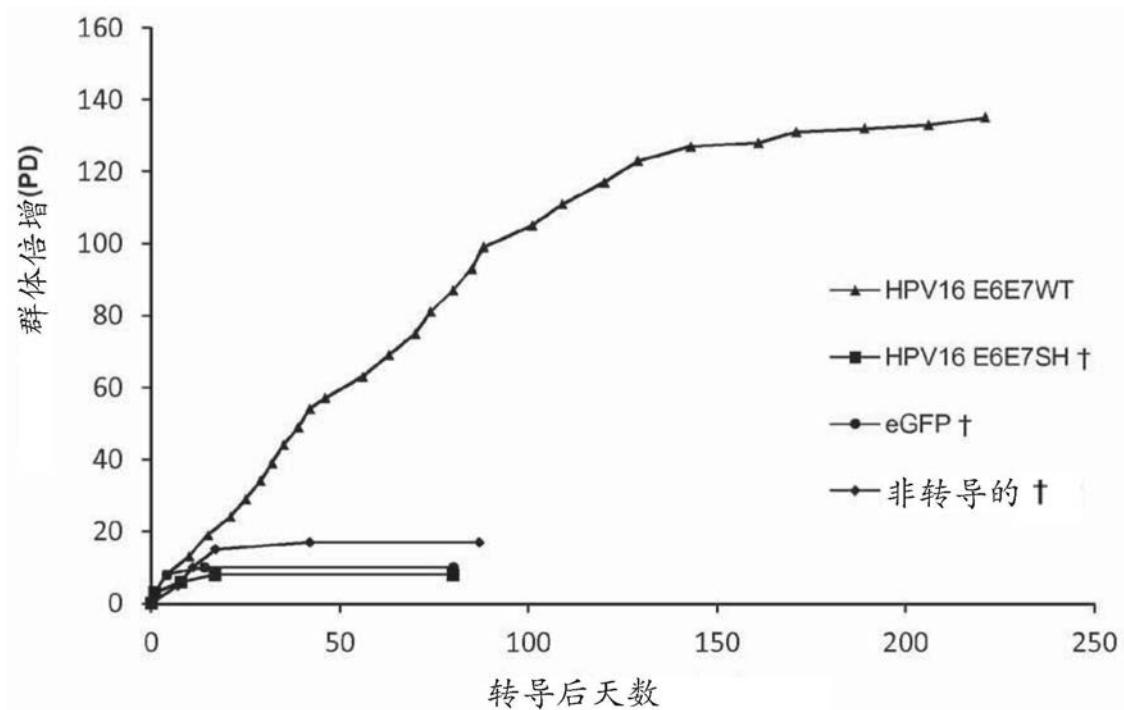


图4

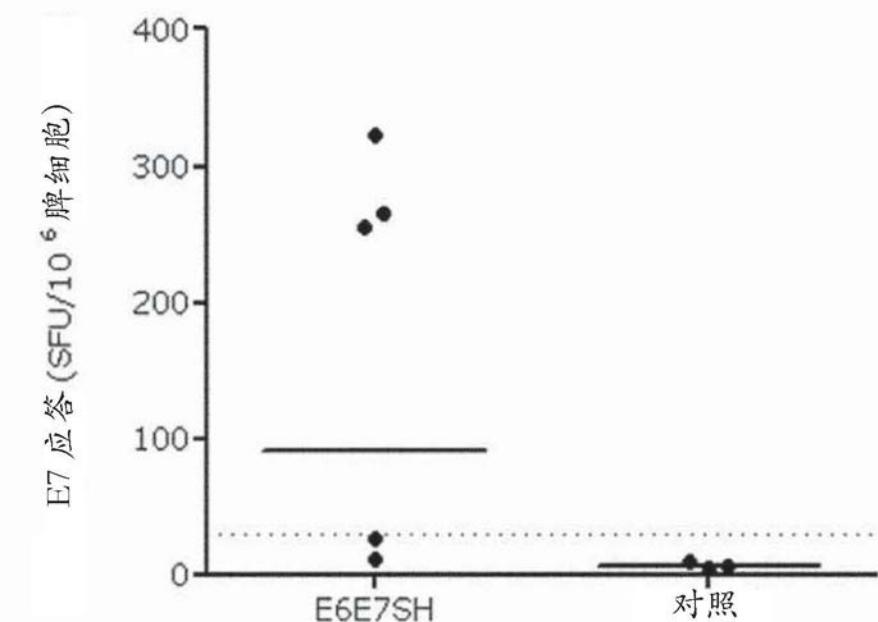
A**B**

图5

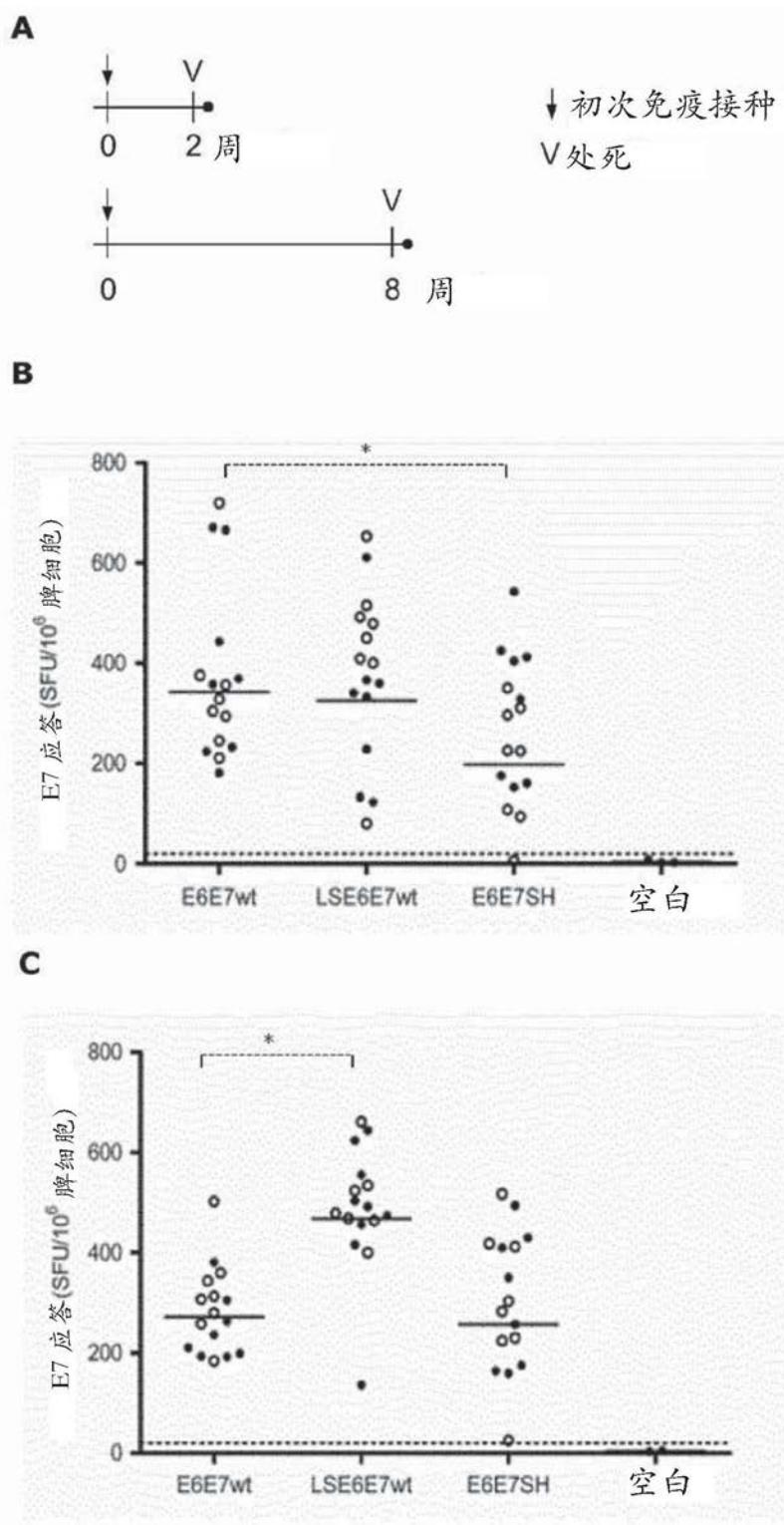


图6

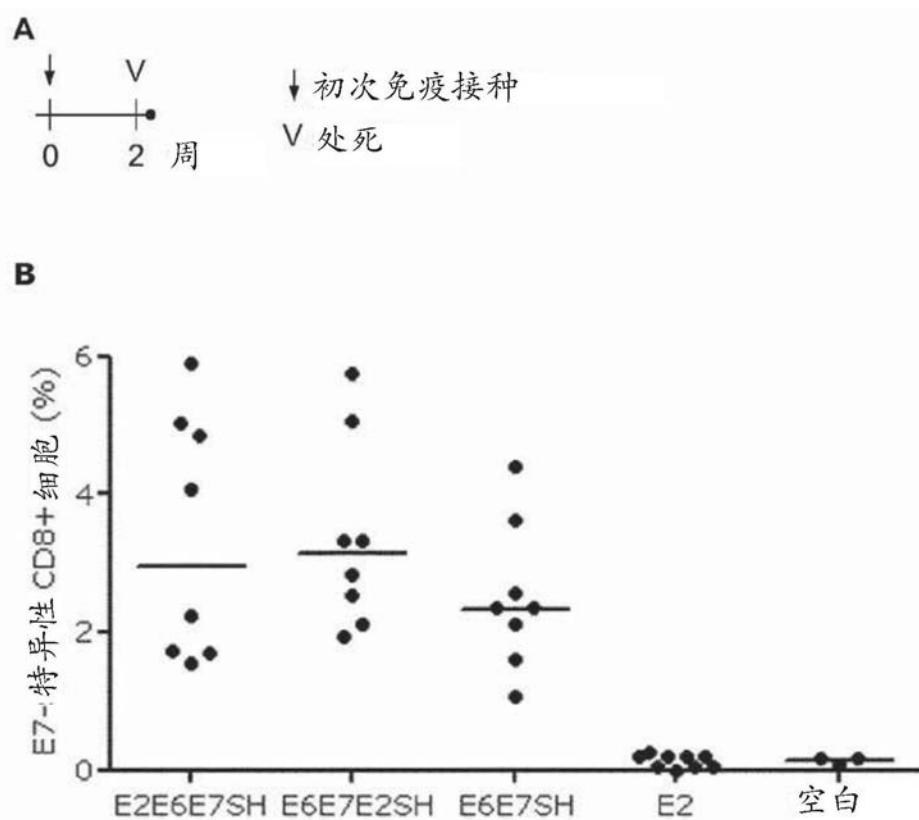


图7

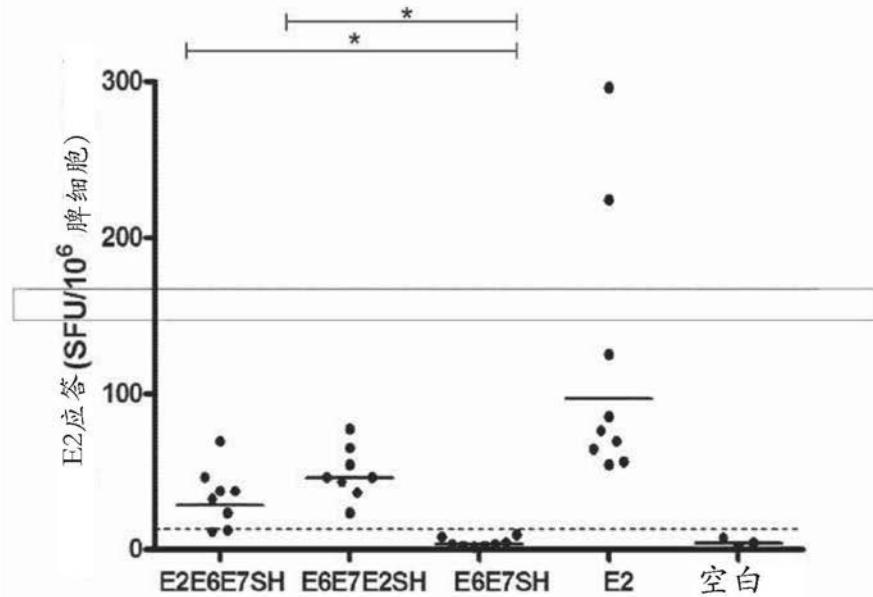
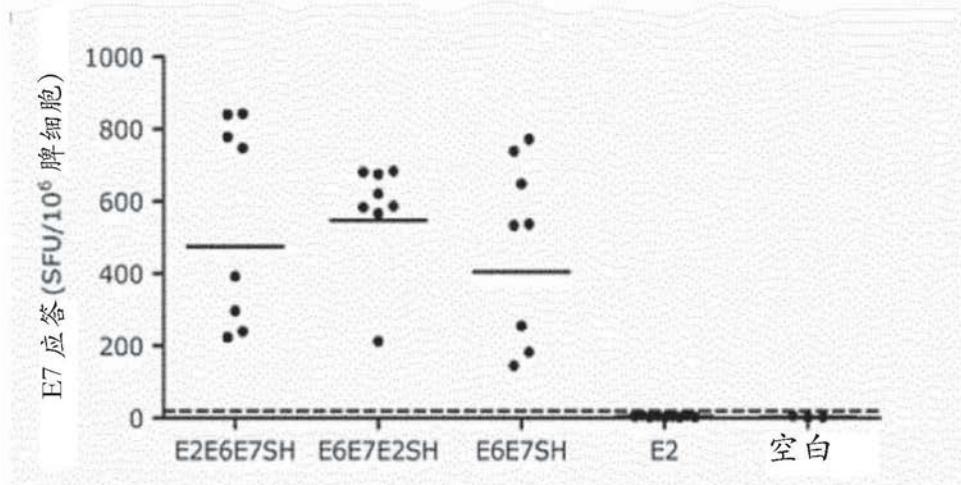
A**B****C**

图8

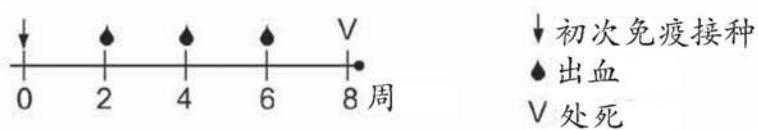
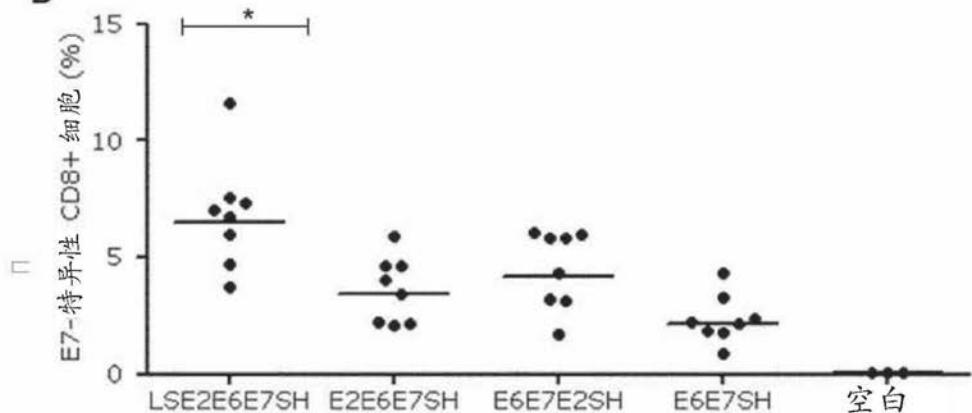
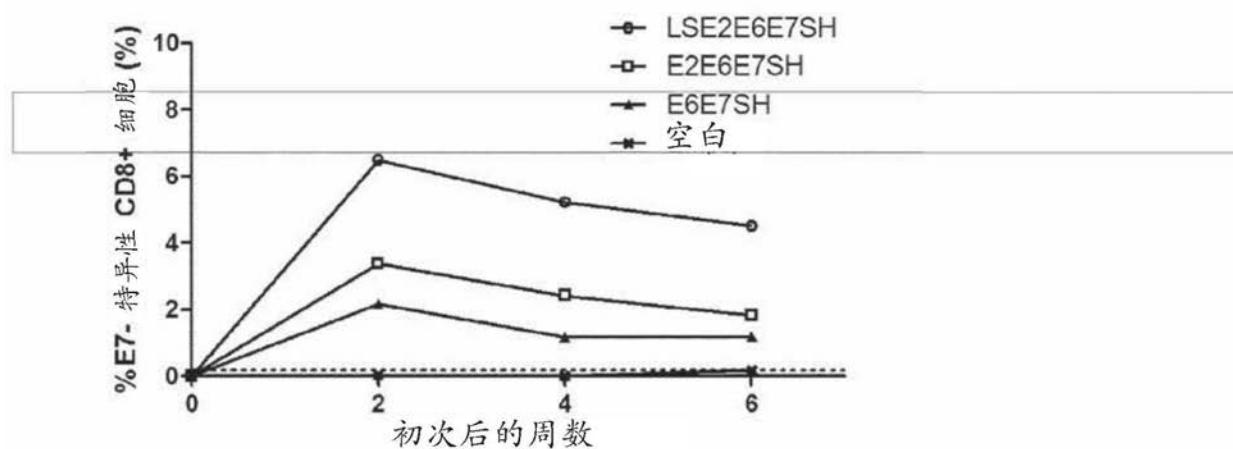
A**B****C**

图9

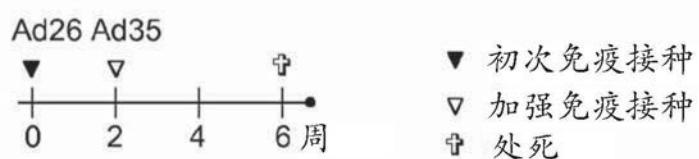
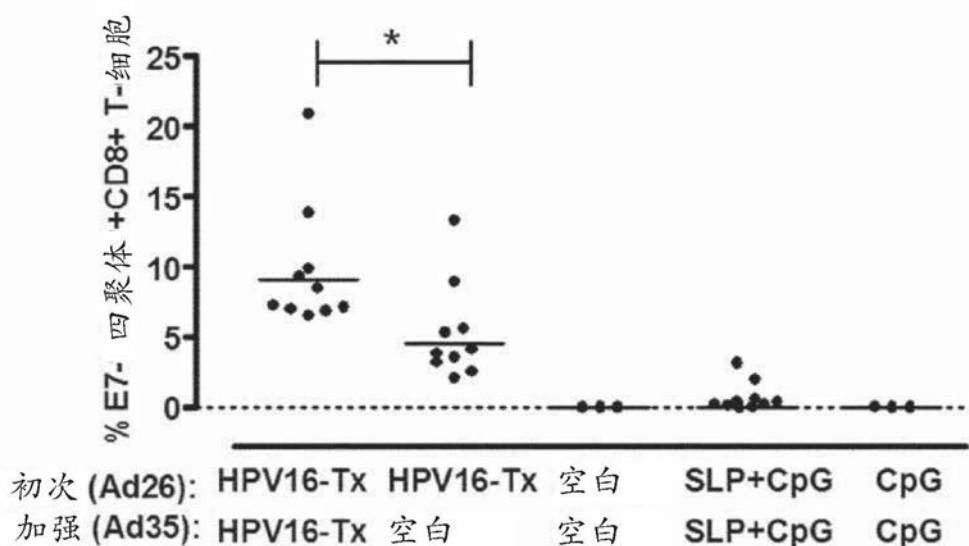
A**B**

图10

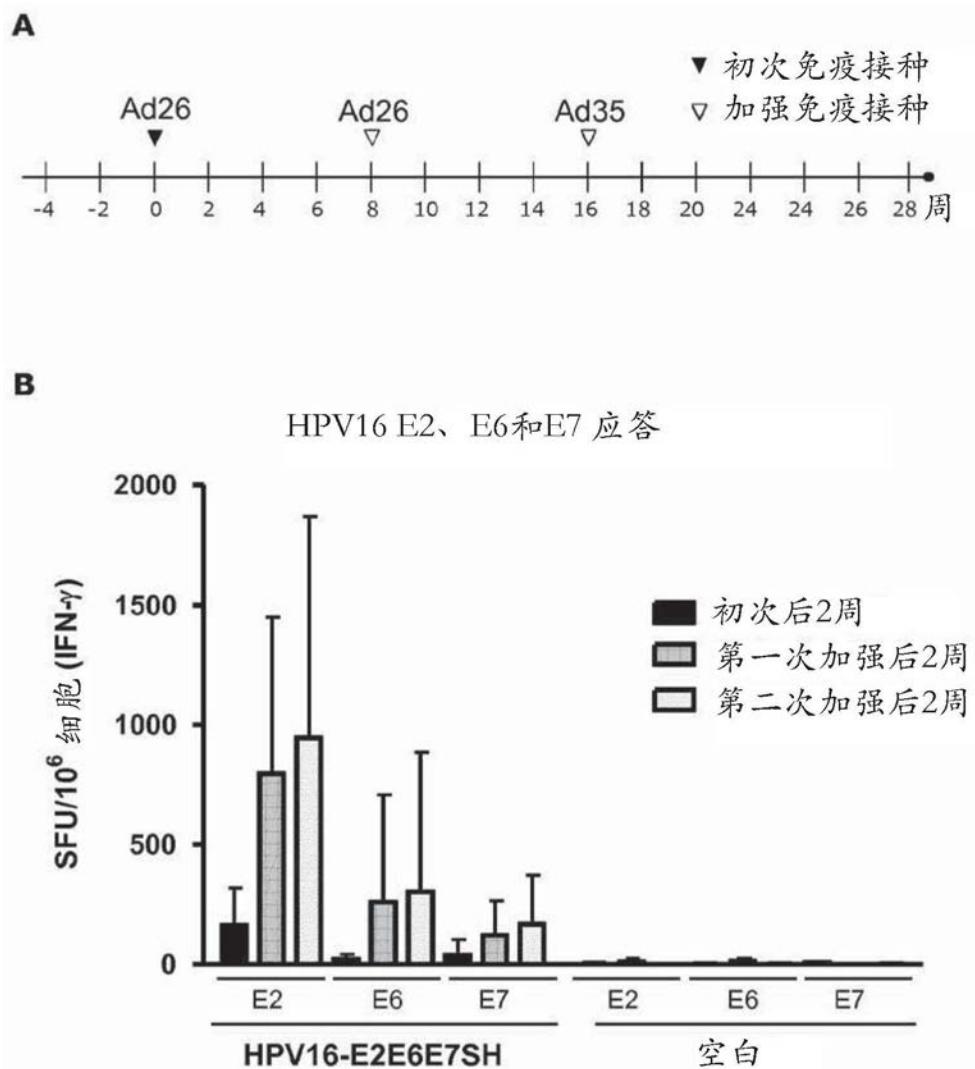
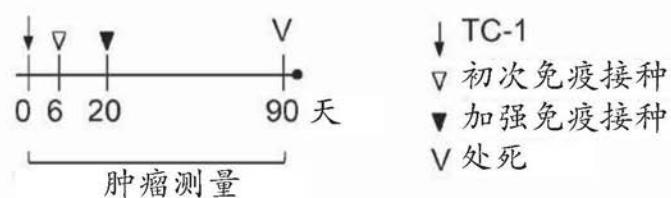
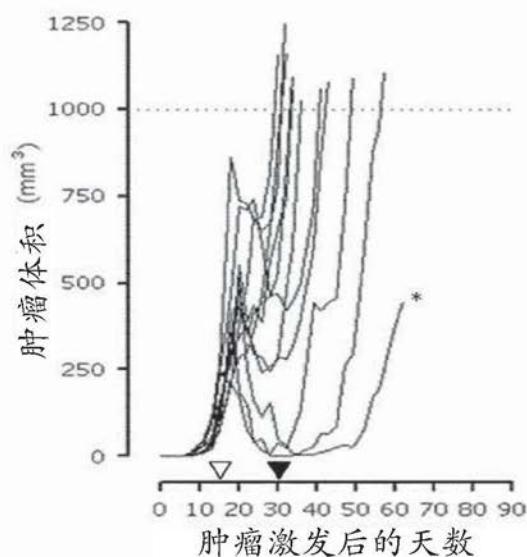


图11

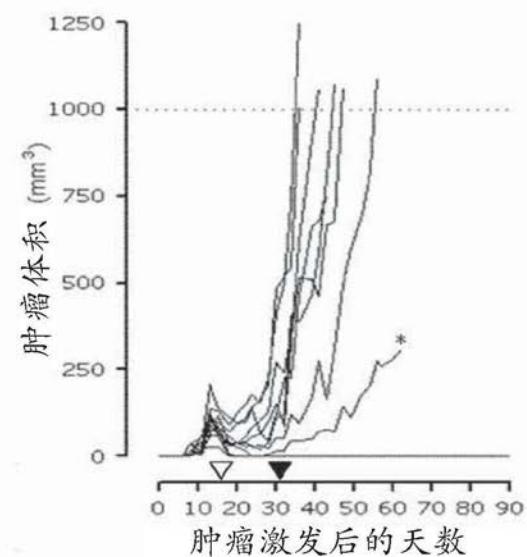
A



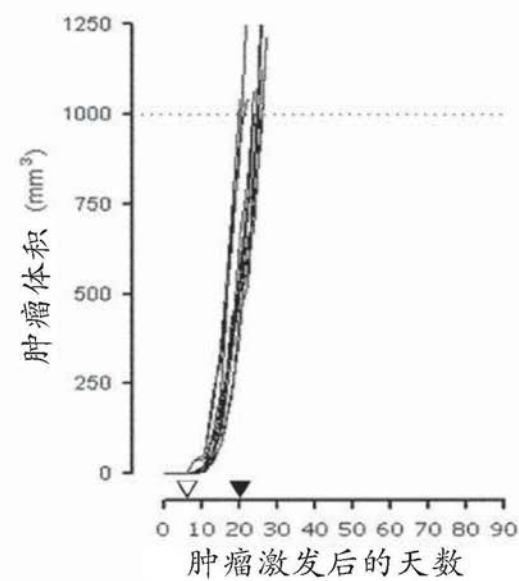
B



C



D



E

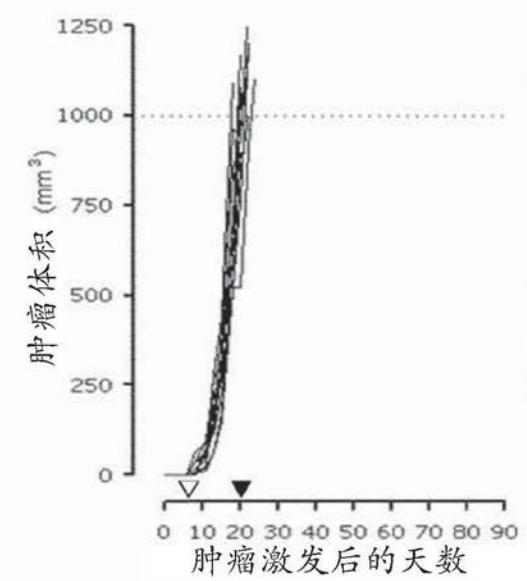


图12

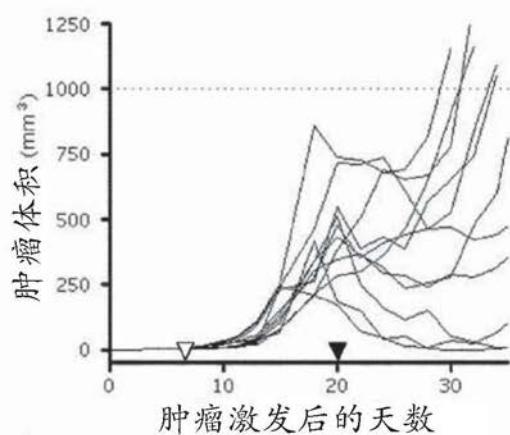
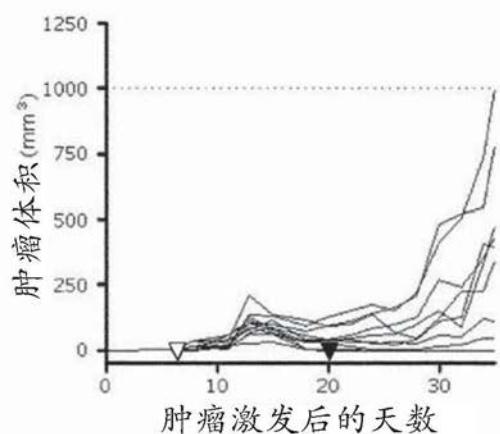
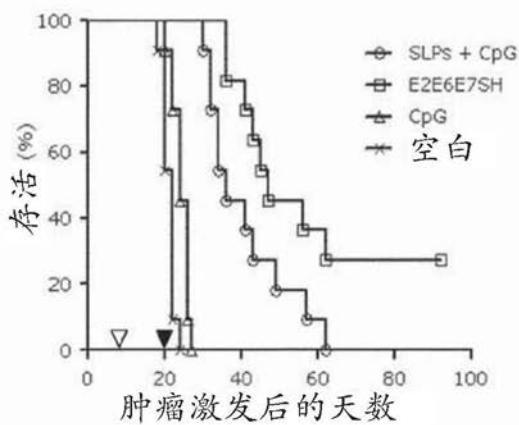
F**G****H**

图12续

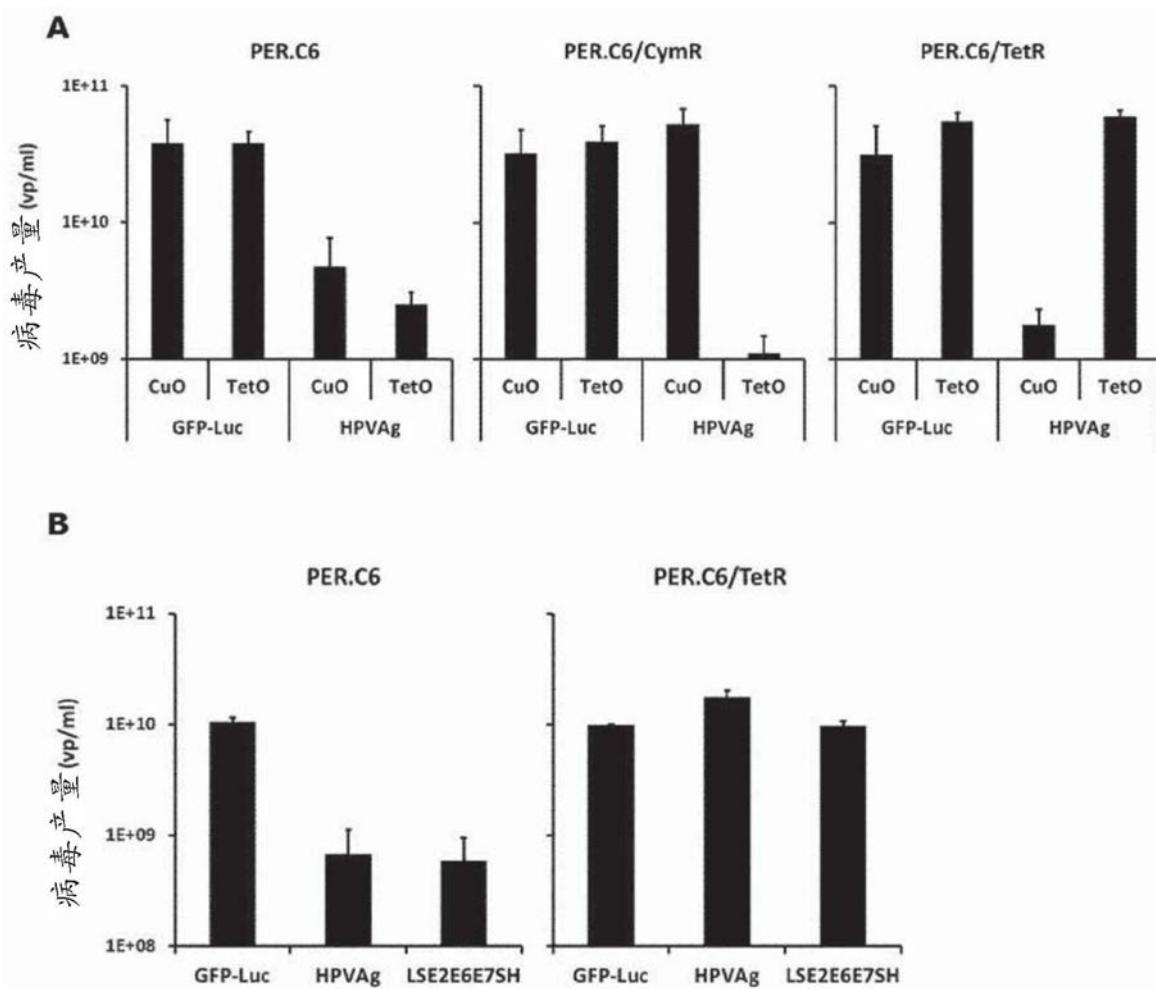


图13

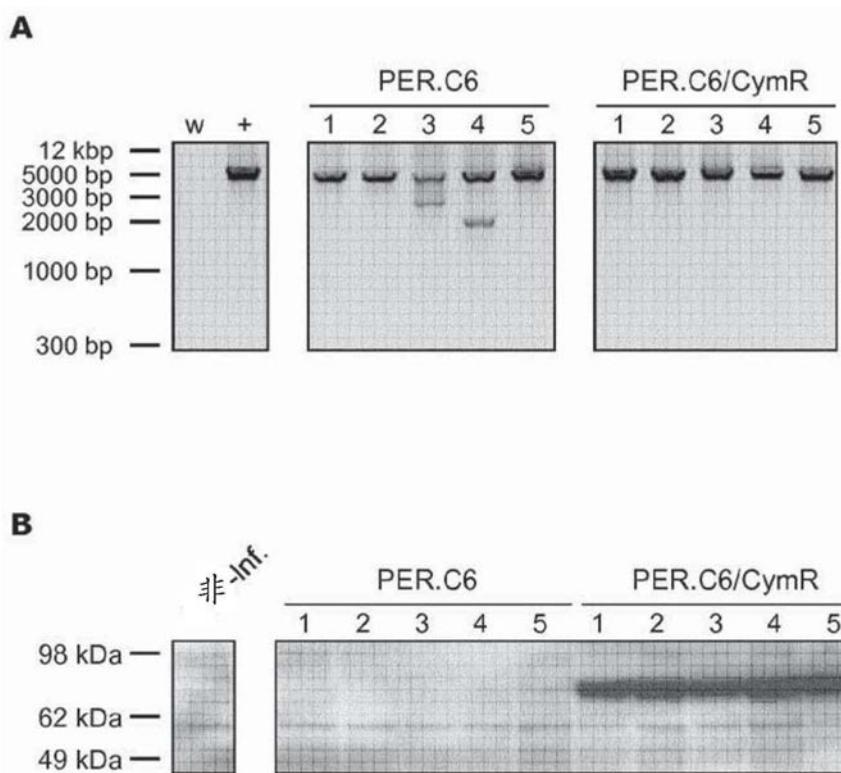


图14

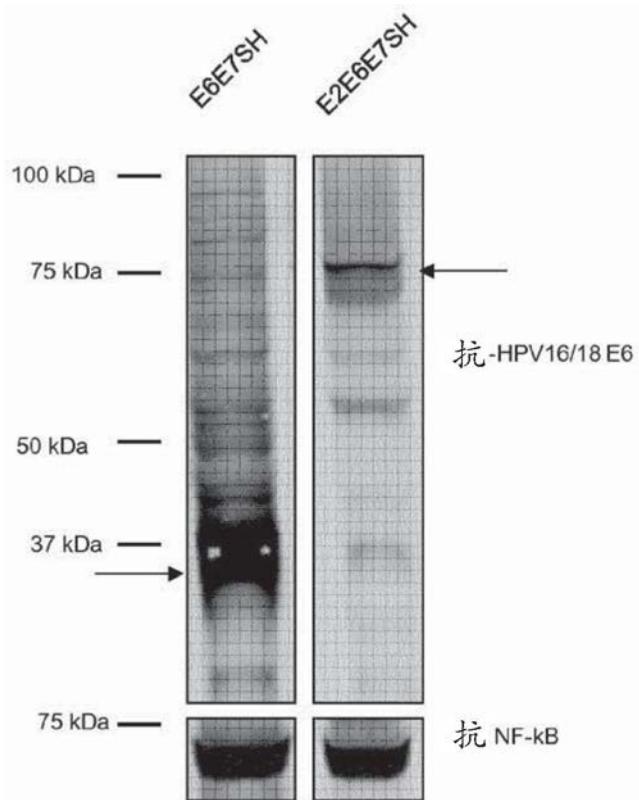
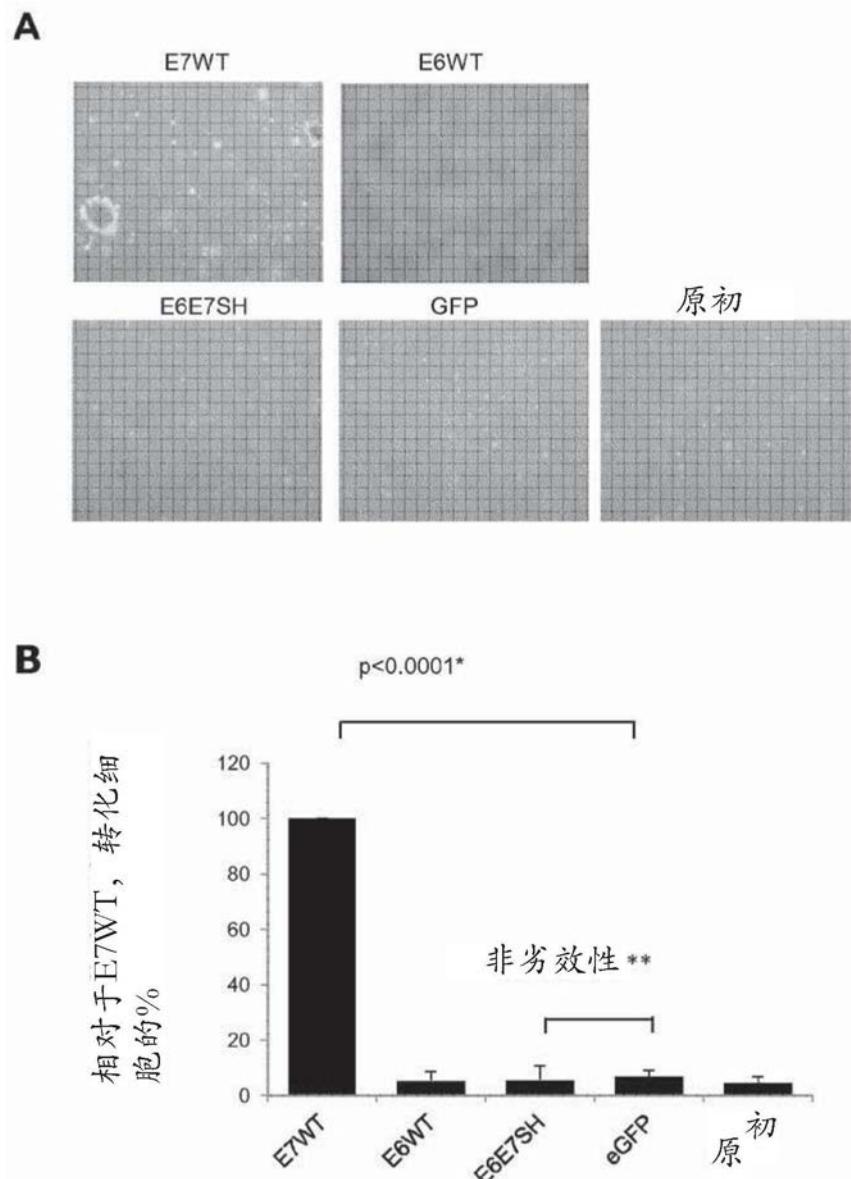


图15



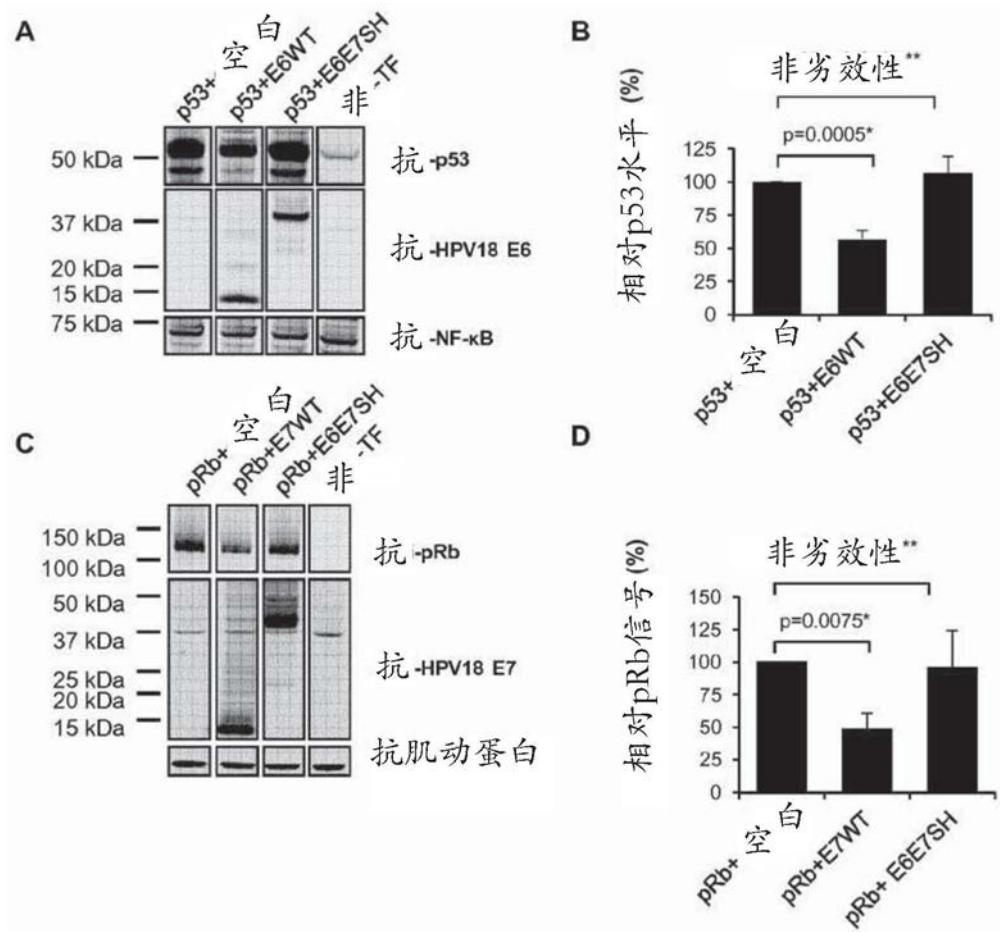


图17

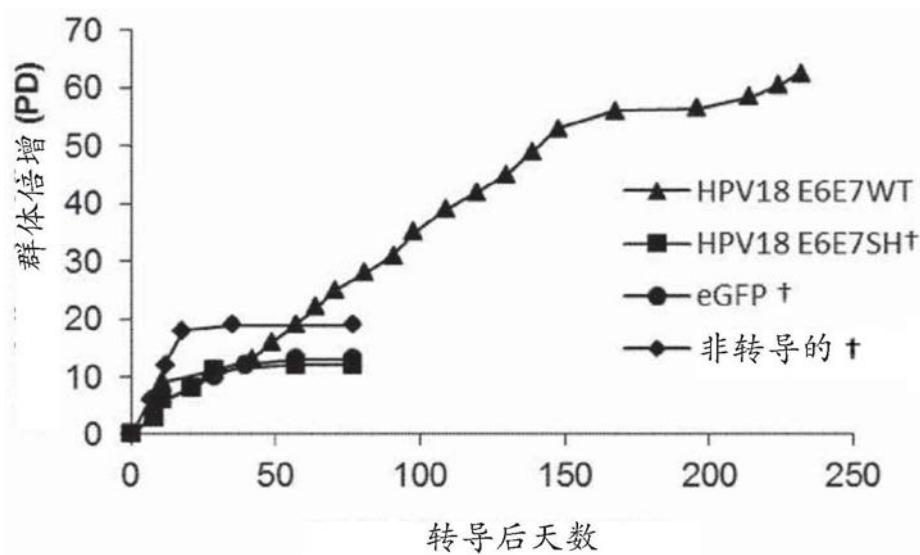


图18

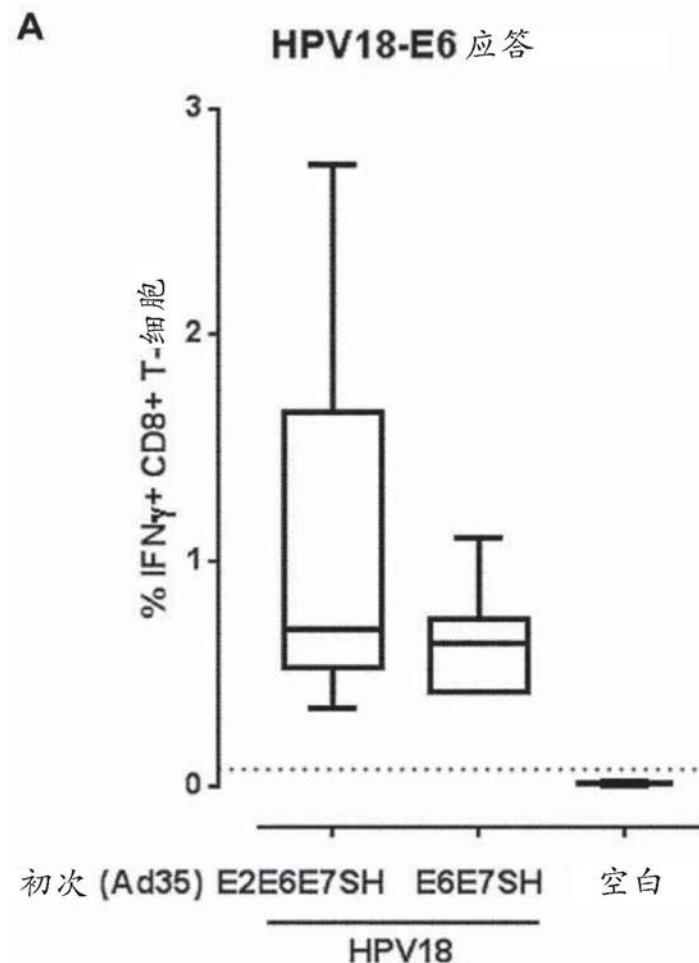


图19

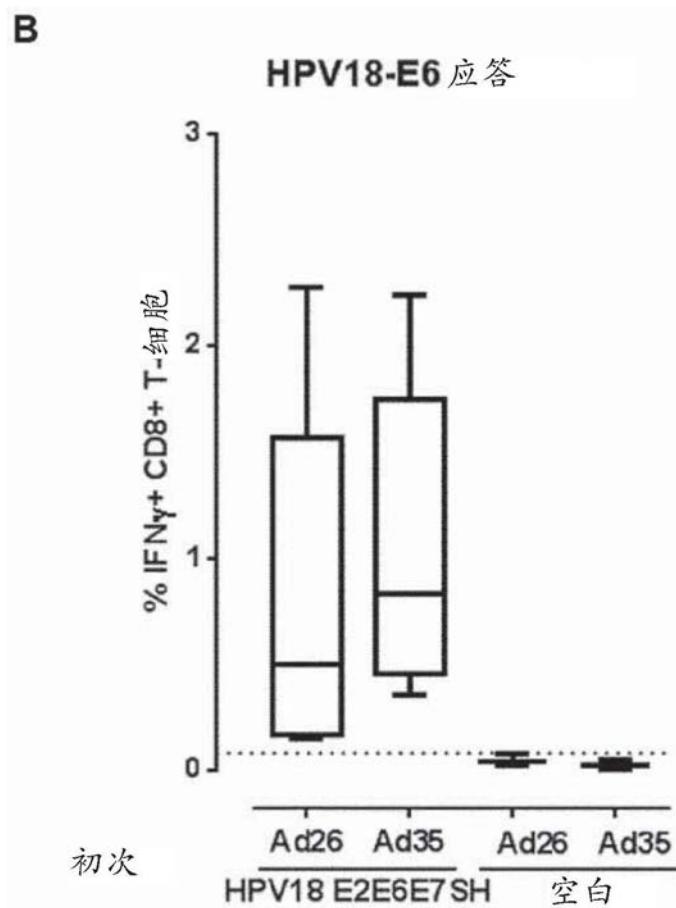


图19续

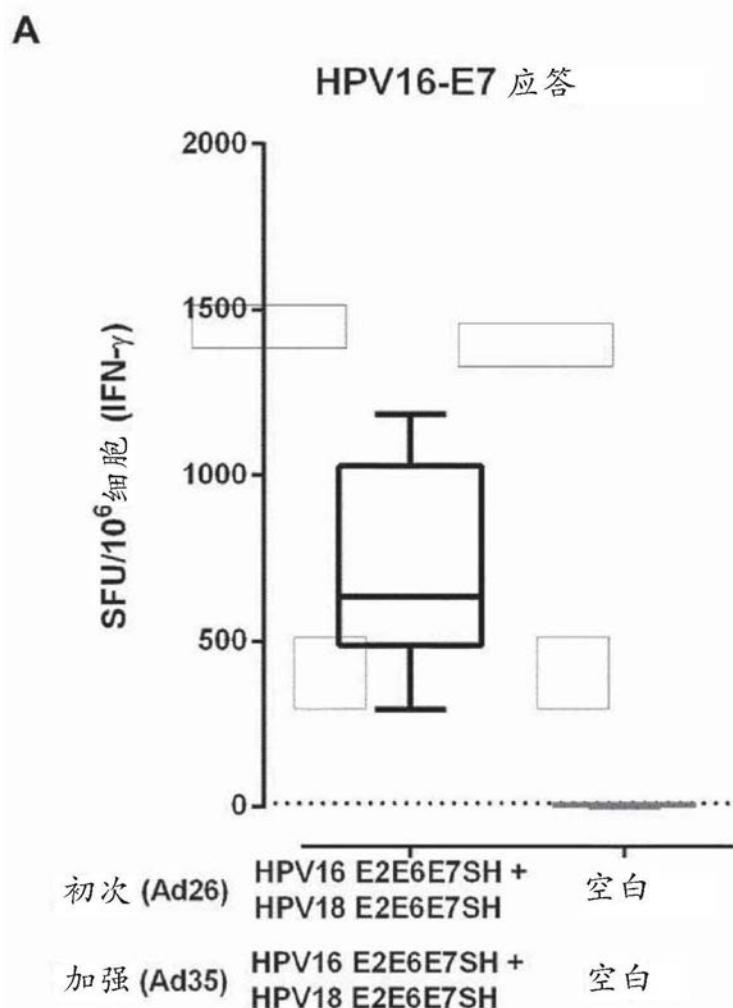


图20

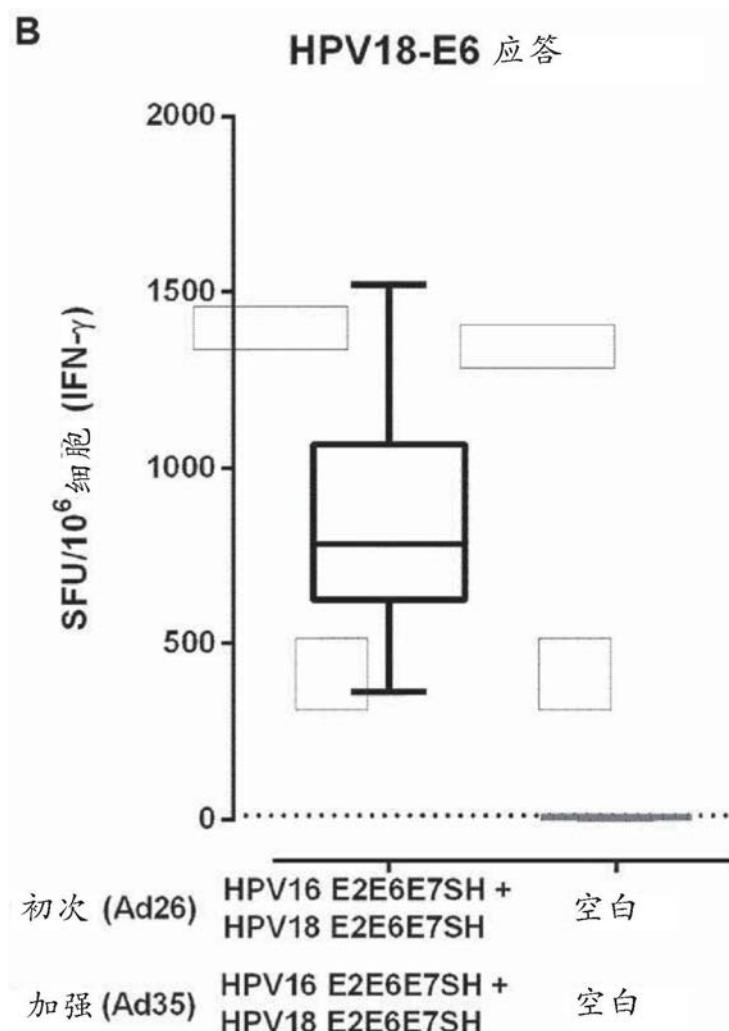


图20续

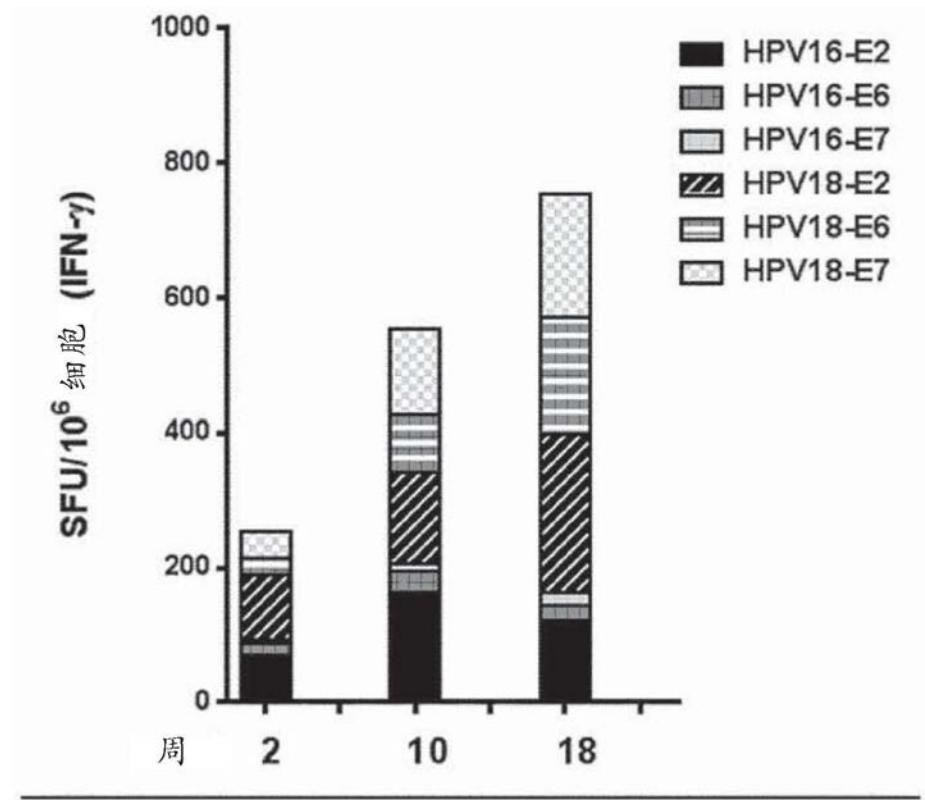


图21

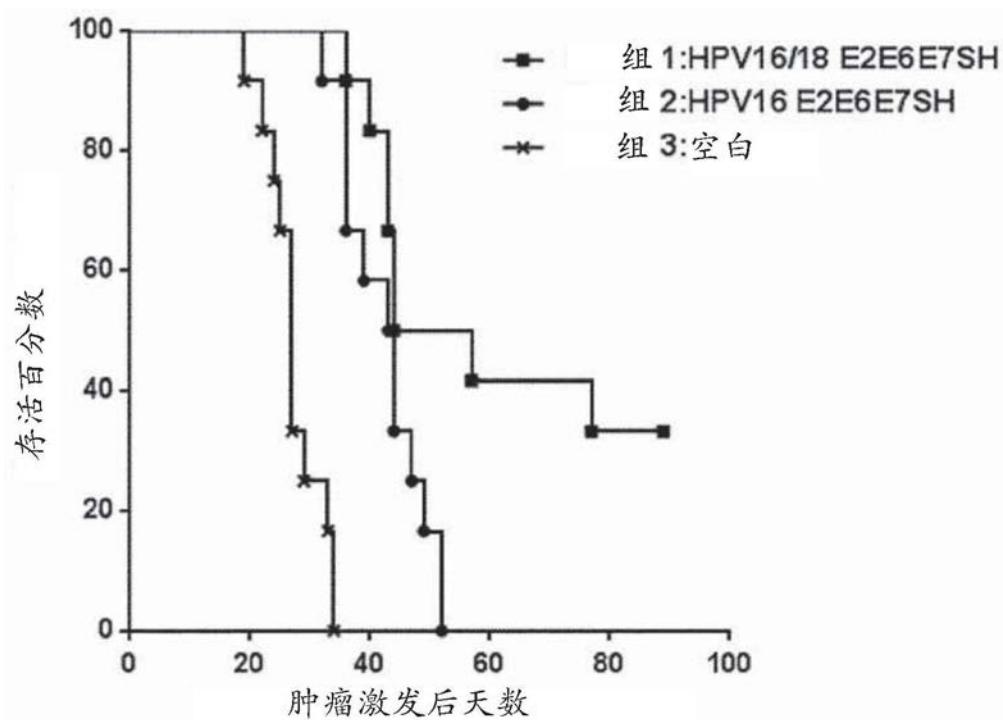


图22