



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0031786

(51)⁷ A61K 39/12; C07K 14/025; C07K
14/005; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2017-02093

(22) 03/11/2015

(86) PCT/EP2015/075516 03/11/2015

(87) WO/2016/071306 12/05/2016

(30) 14191660.1 04/11/2014 EP

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/09/2017 354A

(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)

Archimedesweg 4 NL-2333 CN Leiden, Netherlands

(72) BUNNIK, Evelien, M. (NL); CUSTERS, Jerume, H, H, V, (NL); SCHEPER, Gerrit, Ch, (NL); OOSTERHUIS, Koen (NL); UIL, Taco, Gilles (NL); KHAN, Selina (DK).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, VECTƠ CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC VÀ
VACXIN CHỨA VECTƠ NÀY ĐỂ CHỐNG LẠI SỰ NHIỄM
PAPILLOMAVIRUT TYP 16 Ở NGƯỜI (HPV16)

(57) Sáng chế đề xuất cấu trúc axit nucleic và polypeptit thiết kế mà có thể được dùng làm vacxin trị liệu chống lại HPV16. Các polypeptit này về cơ bản có chứa tất cả các epitop tế bào T có thể có của các protein gây ung thư E6 và E7 HPV 16, tuy nhiên có hoạt tính biến nạp giảm mạnh (khi so với E6 và E7 thể hoang dại), đến mức không phát hiện được, nhờ có chứa mảnh của các protein E6 và E7 đã được đảo thứ tự, trong khi cùng lúc đó có chứa số lượng giảm thiểu của các epitop mới tạo thành không mong muốn. Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho polypeptit có chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 1. Theo các phương án nhất định, polypeptit được mã hóa còn chứa ít nhất là một epitop của protein E2 papillomavirut ở người (HPV), ví dụ protein E2 HPV 16. Sáng chế cũng đề xuất vectơ chứa phân tử axit nucleic này và vacxin chứa vectơ này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y học và cụ thể hơn đến cấu trúc axit nucleic và polypeptit có thể được sử dụng trong vaccin trị liệu chống lại papillomavirut typ 16 ở người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Họ papillomavirut ở người (HPV) gồm hơn 100 typ (còn được gọi là kiểu phụ) có khả năng nhiễm vào tế bào keratin của da hoặc màng niêm mạc. Hơn 40 typ HPV thường được lây truyền thông qua quan hệ tình dục và sự lây nhiễm HPV ở vùng hậu môn-sinh dục rất phổ biến ở cả nam và nữ. Một số typ HPV lây truyền qua đường tình dục có thể gây mụn cóc sinh dục. Sự lây nhiễm dai dẳng các typ HPV "nguy cơ cao" (ví dụ, typ 16, 18, 31, 45) — khác với các typ gây mụn cóc ở da — có thể tiến triển thành các thương tổn tiền ung thư và ung thư xâm lấn, ví dụ ở cổ tử cung, âm hộ, âm đạo, dương vật, miệng-hầu và hậu môn. Phần lớn sự nhiễm HPV thường được tự thanh thải trong từ một đến hai năm sau khi nhiễm. Ở các cá thể khỏe mạnh, các tế bào T CD4+ typ Th1 và Th2 tuân hoàn đặc hiệu đối với protein sớm của virut E2, E6 và E7 của HPV-16 cũng như các tế bào T CD8+ đặc hiệu E6, di chuyển vào da trong quá trình thách thức kháng nguyên, cho thấy rằng việc bảo vệ thành công chống lại sự lây nhiễm HPV-16 thường có liên quan với đáp ứng tế bào T hiệu ứng hệ thống chống lại các kháng nguyên sớm của virut này. Ở một phần nhỏ (~1%) cá thể bị nhiễm, sự nhiễm HPV dai dẳng, cuối cùng dẫn đến các thương tổn tạo u sinh dục. Trong số các HPV nguy cơ cao, HPV16 và HPV18 là nguyên nhân chính gây ung thư cổ tử cung, cùng nhau gây ra khoảng 70% ca ung thư cổ tử cung, và hai typ này cũng đóng vai trò chính trong các bệnh ung thư do HPV gây ra khác như ung thư hậu môn và ung thư miệng-hầu. Trên thế giới, HPV là một trong số các tác nhân lây nhiễm quan trọng nhất gây ung thư.

Chủng ngừa chống lại HPV được cho là biện pháp khả thi để làm giảm tỷ lệ mắc hoặc tác động của việc nhiễm HPV (van der Burg và Melief, 2011, *Curr Opinion Immunol* 23: 252–257).

Vaccin phòng HPV dựa trên các hạt giống như virut (virus like particles - VLP) tạo thành bởi protein (vỏ) L1 của HPV typ 16 và 18, rất hiệu quả để ngăn ngừa sự lây

nhiễm dai dẳng và bệnh có liên quan của HPV16 và HPV18. Các vaccin này được tin là tạo ra tính miễn dịch vô trùng thông qua việc kích thích các kháng thể trung hòa chống lại protein L1. Việc bổ sung các VLP gốc L1 từ các typ HPV nguy cơ cao bổ sung có thể làm tăng thêm phạm vi bảo vệ tạo ra bởi các vaccin này.

Tuy nhiên, mặc dù các vaccin này có thể ngăn ngừa sự lây nhiễm ban đầu (tức là, chúng có khả năng phòng bệnh), không có bằng chứng nào về tác động có lợi đối với các thương tổn sinh dục đã được thiết lập do HPV16 và HPV18 gây ra, vì vậy chúng không được xem là vaccin *trị liệu* chống lại HPV (Hildesheim *et al.*, 2007, *JAMA* 298: 743-53).

Mặc dù các vaccin phòng bệnh này đã được đưa ra, vẫn có nhiều người đã nhiễm hoặc vẫn có nguy cơ bị lây nhiễm HPV nguy cơ cao dai dẳng và, do đó, có nguy cơ bị ung thư. Vaccin trị liệu để loại trừ sự nhiễm HPV đã được thiết lập và các bệnh có liên quan là nhu cầu y tế cấp bách chưa được đáp ứng.

Một số nỗ lực để đáp ứng nhu cầu này đã được mô tả. Ví dụ, các thử nghiệm lâm sàng đã được tiến hành với nhiều biện pháp chủng ngừa khác nhau, như protein dung hợp gồm protein sốc nhiệt (heat shock protein - Hsp) từ *Mycobacterium bovis* và E7 HPV-16 hoặc gồm protein dung hợp của E6, E7 và L2 từ HPV-16 và HPV-18, VLP L1-E7 khảm, virus đậu mùa tái tổ hợp biểu hiện E6 và E7 của HPV-16 và HPV-18 hoặc E2 của virus papilloma ở bò, vaccin ADN biểu hiện epitop CTL của E6 và E7 của HPV-16 và HPV-18, *Listeria monocytogenes* (Lm) sống-được làm giảm độc lực mà tiết ra kháng nguyên E7 HPV-16, và các peptit dài tổng hợp (synthetic long-peptides - SLP) có chứa peptit E6 và E7 HPV-16. Mặc dù một vài phương pháp này cho thấy một số hiệu quả lâm sàng, nhưng ở mức độ hạn chế, hầu hết các phương pháp này đều không thành công, chứng tỏ rằng cần phải cải thiện các biện pháp hiện nay.

Việc hợp nhất các protein HPV sớm E6 và E7 là bước cần thiết trong quá trình từ khi lây nhiễm đến khi ung thư và sự biểu hiện liên tục của E6 và E7 là cần thiết để duy trì kiểu hình tạo u của tế bào ung thư cổ tử cung. Do đó, E6 và E7 được xem là đích tốt cho việc chủng ngừa trị liệu. Như đã được đề cập, một số nghiên cứu đã cho thấy rằng việc chủng ngừa trị liệu ở phụ nữ bị lây nhiễm HPV nguy cơ cao có thể gây thoái triển các thương tổn hiện tại. Kenter và cộng sự đã chỉ ra sự thoái biến hoàn toàn và lâu dài ở 47% bệnh nhân có sự tạo u trong biểu mô âm hộ (Vulvar Intraepithelial Neoplasia - VIN) bằng cách sử dụng SLP có nguồn gốc từ protein E6 và E7 HPV16 và chất bổ trợ

làm vaccin trị liệu (Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47). Tương tự, nghiên cứu trong đó vaccin dựa trên protein (TA-CIN, gồm protein dung hợp của E6, E7 và L2 HPV16) được kết hợp với sự điều biến miễn dịch cục bộ ở 2/3 bệnh nhân VIN, cho thấy sự thoái triển hoàn toàn ở 63% bệnh nhân (Daayana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36). Các nhược điểm có thể có của các peptit dài tổng hợp dùng làm vaccin bao gồm khả năng sản xuất ở quy mô lớn và chi phí liên quan, nhu cầu về chất bổ trợ gây phản ứng phụ tiềm năng và các tác động bất lợi liên quan có liên quan đến việc gây miễn dịch (đặc biệt là chứng đau và sưng tấy). Do mức độ khó chịu cao, không có khả năng SLP sẽ được sử dụng ở bệnh giai đoạn sớm khi tỷ lệ tự thanh thải vẫn còn cao. Tương tự, do cần phải điều trị bằng imiquimod cục bộ trong trường hợp điều trị TA-CIN, khả năng dung nạp là vấn đề quan trọng vì phần lớn phụ nữ đều trải qua các tác dụng phụ cục bộ và toàn thân kéo dài trong khoảng thời gian điều trị bằng imiquimod, điều này có thể ảnh hưởng đến các hoạt động hằng ngày của họ.

Biện pháp thay thế tiềm năng khác là sử dụng việc chủng ngừa dựa trên axit nucleic như vaccin ADN hoặc vaccin virut mã hóa protein E6 và/hoặc E7 HPV để chủng ngừa.

Tuy nhiên, protein E6 và E7 HPV có khả năng gây ung thư và do đó việc chủng ngừa bằng các vaccin có chứa axit nucleic mã hóa các protein này có nguy cơ kích thích sự biến đổi tế bào do khả năng biểu hiện kéo dài các kháng nguyên này.

Do đó, trong trường hợp chủng ngừa di truyền, có thể sử dụng các kiểu không gây ung thư/đã được khử độc của E6 và/hoặc E7 để loại trừ nguy cơ bất kỳ về sự biến đổi tế bào do chủng ngừa. Việc làm mất khả năng gây ung thư của E6 và E7 thể hoang dại thường đạt được bằng cách làm khuyết và/hoặc thay thế các gốc đã biết là quan trọng đối với chức năng của các protein này (ví dụ, Smahel *et al.*, 2001, *Virology* 281:231-38; Yan *et al.*, 2009, *Vaccine* 27: 431-40; Wieking *et al.*, 2012, *Cancer Gene Ther* 19: 667-74; WO 2009/106362). Tuy nhiên, nhược điểm của các phương pháp này là ở chỗ chúng có nguy cơ loại bỏ các epitop tế bào T quan trọng ra khỏi các protein này và/hoặc đưa các epitop tế bào T không mong muốn mới vào các protein này, và do đó có thể không dẫn đến đáp ứng miễn dịch mong muốn.

Trong phương pháp thay thế để loại bỏ khả năng gây ung thư của E6 và E7 HPV16, các kiểu đã được xáo trộn (tức là polypeptit trong đó mảnh của protein thể hoang dại được sắp xếp lại) của protein E6 và E7 đã được tạo cấu trúc (ví dụ Öhlschläger

et al., 2006, *Vaccine* 24: 2880–93; Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406; Oosterhuis *et al.*, 2012, *Hum Gen Ther* 23: 1301-12). Tuy nhiên, các phương pháp này vẫn đòi hỏi việc sản xuất, tạo chế phẩm và sử dụng nhiều phân tử để đảm bảo bao gồm tất cả các epitop có thể có của cả hai protein E6 và E7, dẫn đến việc hậu xử lý dưới mức tối ưu và giá thành tương đối cao, và hơn nữa các phương pháp đã được mô tả đưa vào các epitop không tự nhiên mạnh tiềm năng không có mặt trong E6 và E7 và do đáp ứng miễn dịch có thể đi trệch khỏi các epitop E6/E7 liên quan hướng về các epitop không tự nhiên này, nên các cấu trúc đã được mô tả có thể không có các đặc tính miễn dịch tối ưu.

Do đó, trong lĩnh vực này vẫn có nhu cầu về các vacxin trị liệu chống lại HPV, tốt hơn nếu có ít nhược điểm hơn so với các phương pháp đã được mô tả trước đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho polypeptit có chứa gần như tất cả các epitop tế bào T có thể có của protein gây ung thư E6 và E7 HPV16, tuy nhiên có hoạt tính biến nạp được làm giảm mạnh (so với E6 và E7 thể hoang dại), đến mức không phát hiện được, bằng cách chứa các mảnh của protein E6 và E7 đã được sắp xếp lại, trong khi đồng thời chứa số lượng tối thiểu của các epitop mới tạo thành không mong muốn. Điều này trái ngược với các phân tử đã được nêu ra trước đây bởi các tác giả khác.

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho polypeptit có chứa trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Polypeptit được mã hóa có thể còn có chứa trình tự dẫn đầu.

Theo các phương án nhất định, polypeptit được mã hóa còn có chứa ít nhất một epitop của protein E2 papillomavirus ở người (HPV), ví dụ protein E2 HPV16. Protein E2 có thể được làm đột biến để làm giảm sự liên kết ADN, ví dụ bằng sự làm khuyết hoặc (các) đột biến trong miền liên kết ADN của nó. Theo các phương án nhất định, polypeptit được mã hóa có chứa trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5.

Theo các phương án nhất định, trình tự axit nucleic được tối ưu hóa bộ ba mã hóa, ví dụ để biểu hiện trong tế bào của người.

Theo các phương án nhất định, trình tự axit nucleic có chứa trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 6.

Sáng chế còn đề xuất vector có chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động.

Theo các phương án nhất định, vector là vector ADN như plasmit. Theo các phương án khác, vector là vector virus, như vector MVA hoặc vector adenovirus tái tổ hợp. Theo các phương án nhất định được ưu tiên, vector là adenovirus tái tổ hợp.

Theo các phương án nhất định, trình tự khởi động trong vector được ghép đôi có điều khiển với trình tự điều khiển chất kim hãm, mà protein kim hãm có thể liên kết với, để ức chế sự biểu hiện của trình tự khởi động trong sự có mặt của protein kim hãm này. Theo các phương án nhất định, trình tự điều khiển chất kim hãm là trình tự TetO hoặc trình tự CuO.

Sáng chế còn đề xuất vaccine có chứa vector theo sáng chế, và tá dược được dùng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống lại HPV, cụ thể là HPV16, ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng vaccine theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất vaccine theo sáng chế để sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch chống lại HPV, cụ thể là HPV16.

Theo các phương án nhất định, vaccine được sử dụng cho đối tượng nhiều hơn một lần.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh bất kỳ trong số: sự lây nhiễm HPV dai dẳng (cụ thể sự lây nhiễm HPV16 dai dẳng), sự tạo u trong biểu mô âm hộ (VIN), sự tạo u trong biểu mô cổ tử cung (cervical intraepithelial neoplasia - CIN), sự tạo u trong biểu mô âm đạo (vaginal intraepithelial neoplasia - VaIN), sự tạo u trong biểu mô hậu môn (anal intraepithelial neoplasia - AIN), ung thư cổ tử cung (như carcinoma tế bào vảy cổ tử cung (squamous cell carcinoma - SCC), ung thư miệng-hầu, ung thư dương vật, ung thư âm đạo hoặc ung thư hậu môn ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng vaccine theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất vaccine theo sáng chế để sử dụng trong việc điều trị bệnh bất kỳ trong số: sự lây nhiễm HPV dai dẳng (cụ thể sự lây nhiễm HPV16 dai dẳng), sự tạo u trong biểu mô âm hộ (VIN), sự tạo u trong biểu mô cổ tử cung (CIN), sự tạo u trong biểu mô âm đạo (VaIN), sự tạo u trong biểu mô hậu môn (AIN), ung thư cổ tử cung (như carcinoma tế bào vảy cổ

tử cung (SCC), ung thư miệng-hầu, ung thư dương vật, ung thư âm đạo hoặc ung thư hậu môn ở đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất polypeptit có chứa trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Sự biểu hiện của protein dung hợp của E6 và E7 HPV16. Các tế bào HEK-293T được chuyển nhiễm tạm thời bằng vector ADN biểu hiện gen chuyển được thể hiện trên hình vẽ này. 24 giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được thu hoạch và dịch chiết tế bào được phân tích bằng SDS-PAGE và thẩm tách western với kháng thể kháng E7 HPV16 (ô phía trên). Đối chứng tải thể hiện NF-kB (ô phía dưới) xác nhận sự tải tương tự của dịch tan tế bào ở tất cả các đường chạy. Chất chỉ thị khối lượng phân tử được thể hiện ở phía bên trái. Kích thước dự tính của các protein dung hợp: E6E7SH xấp xỉ 38kDa; E2E6E7SH và E6E7E2SH xấp xỉ 75kDa, LSE2E6E7SH xấp xỉ 78kDa.

Hình 2. Sự tạo thành khuẩn lạc trên aga mềm. A) Biểu diễn dưới dạng sơ đồ thiết lập thử nghiệm aga mềm. B) Hình ảnh hiển vi đại diện ở độ phóng đại 40x của các tế bào trên aga sáu tuần sau khi cấy. Mũi tên màu trắng chỉ các khuẩn lạc được quan sát thấy ở các tế bào được chuyển nhiễm E7wt. C) Định lượng khuẩn lạc sáu tuần sau khi cấy trên aga sử dụng Gelcount™ và phần mềm có liên quan. *: $p < 0,05$ (Mô hình hồi quy Poisson); **: không kém hơn (mô hình tuyến tính tổng quát hóa với biên không kém hơn bằng 5%).

Hình 3. E6E7SH mất hoạt tính E6 và E7. A) Thẩm tách Western đại diện chứng tỏ không có sự thoái biến p53 bởi E6E7SH. Các tế bào NCI-H1299 vô hiệu p53 của người được đồng chuyển nhiễm với plasmit biểu hiện p53 kết hợp với plasmit biểu hiện E6 HPV16 thể hoang dại, E6E7SH hoặc vector rỗng. Không TF biểu thị các tế bào không được chuyển nhiễm. 24 giờ sau khi chuyển nhiễm, dịch tan tế bào được chuẩn bị và 30 μ g protein tổng số được tải lên trên gel. Ô phía trên - nhuộm màu p53, ô ở giữa - nhuộm màu E6, ô phía dưới - nhuộm màu NF-kB (đối chứng tải). (B) Định lượng hàm lượng p53 trong bốn thử nghiệm độc lập. Tín hiệu p53 được chuẩn hóa thành tín hiệu NF-kB. C) Thẩm tách Western chứng tỏ không có sự thoái biến pRb bởi E6E7SH. Các tế bào Saos-2 vô hiệu pRb được chuyển nhiễm với plasmit biểu hiện pRb kết hợp với plasmit biểu hiện E7 HPV16 thể hoang dại, E6E7SH hoặc vector rỗng. Không TF biểu thị các tế bào không được chuyển nhiễm. 24 giờ sau khi chuyển nhiễm, dịch tan tế bào được chuẩn

bị và 10 μ g protein tổng số được tải lên trên gel. Ô phía trên - nhuộm màu pRb, ô ở giữa - nhuộm màu E7, ô phía dưới - nhuộm màu NF- κ B (đối chứng tải). D) Định lượng hàm lượng pRb trong bốn thử nghiệm độc lập. Tín hiệu pRb được chuẩn hóa thành tín hiệu NF- κ B. *: $p < 0,05$ (mô hình thử nghiệm ANOVA); **: không kém hơn (thử nghiệm dựa trên 95% CI có nguồn gốc từ mô hình thử nghiệm ANOVA. Biên không kém hơn được thiết lập ở 75%).

Hình 4. E6E7SH không làm bất tử hóa tế bào keratin biểu bì sơ cấp của người. Tế bào keratin biểu bì sơ cấp của người được tải nạp với lentivirus mã hóa khung đọc mở mã hóa E6 và E7 thể hoang dại của HPV16 (E6E7wt), trình tự E6E7SH hoặc eGFP. Các tế bào cho không được tải nạp được sử dụng làm đối chứng. Chỉ có sự biểu hiện của E6E7wt kích thích sự bất tử hóa của tế bào keratin sơ cấp như được thể hiện bởi thời gian sống kéo dài và sự hoạt hóa hTERT xung quanh ngày 200 (không được thể hiện). Ký hiệu hình chữ thập biểu thị rằng các tế bào chết vì lão hóa và không thể được nuôi cấy tiếp. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 2. Các kết quả tương tự thu được ở hai thể cho bổ sung (không được thể hiện).

Hình 5. Đáp ứng miễn dịch gây ra bởi E6E7SH sau khi gây miễn dịch ADN – phân tích IFN γ ELISPOT. A. Sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng plasmit ADN biểu hiện E6E7SH hoặc plasmit không biểu hiện gen chuyển (đối chứng). Hai tuần sau khi gây miễn dịch, các con chuột bị giết và các tế bào lách đã được phân lập được kích thích qua đêm bằng nhóm peptit 15mer tương ứng với E7. B. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu E7 ở các con chuột riêng rẽ như được đo được bằng thử nghiệm IFN γ ELISPOT được đưa ra dưới dạng đơn vị tạo thành vết (SFU) cho mỗi 10^6 tế bào lách.

Hình 6. Khả năng gây miễn dịch của E6E7SH – phân tích IFN γ ELISPOT. (A). Sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột được gây miễn dịch bằng vectơ adeno với đoạn cài xen như đã được thể hiện. Đáp ứng đặc hiệu E7 tại thời điểm hai tuần (B) và tại thời điểm tám tuần (C) được phân tích bằng IFN γ ELISPOT (được thể hiện dưới dạng đơn vị tạo thành vết (SFU) cho mỗi 10^6 tế bào lách). Vòng tròn đặc thể hiện chuột được gây miễn dịch bằng liều lượng 1×10^{10} vp, và vòng tròn rỗng thể hiện các con chuột được gây miễn dịch bằng 5×10^9 vp. Vạch ngang màu đen thể hiện giá trị trung bình hình học của các đáp ứng. Đường chấm chấm biểu thị giới hạn phát hiện dưới trong thử nghiệm

ELISPOT. Phân tích thống kê ANOVA Post-hoc Bonferroni được thực hiện trên dữ liệu đã được chuyển đổi log. *: $p < 0,05$. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 3.

Hình 7. Khả năng gây miễn dịch của E2E6E7SH – nhuộm màu E7-tetrame. (A). Sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng 1×10^{10} vp vector adeno biểu hiện gen chuyển như đã được thể hiện. Hai tuần sau khi gây miễn dịch, các con chuột bị giết và các tế bào lách đã được phân lập được phân tích về sự có mặt của các tế bào CD8+ có khả năng tương tác với E7₄₉₋₅₇-H2-Db tetrame (B). Tỷ lệ phần trăm tế bào T CD8+ dương tính với E7-tetrame được biểu thị trên trục y. Phân tích thống kê ANOVA Post-hoc Bonferroni được thực hiện trên dữ liệu đã được chuyển đổi log, sự khác biệt giữa các biến thể E6E7SH khác nhau là không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Hình 8. Khả năng gây miễn dịch của E2E6E7SH – phân tích IFN γ ELISPOT. (A). Sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng vector adeno biểu hiện gen chuyển được thể hiện ở dưới ô B và ô C. Hai tuần sau khi gây miễn dịch các con chuột bị giết và các tế bào lách đã được phân lập được kích thích qua đêm bằng các nhóm peptit 15mer tương ứng với E2 (B), E6 (không được thể hiện) hoặc E7 (C). Các đáp ứng được đưa ra dưới dạng SFU cho mỗi 10^6 tế bào lách. Phân tích thống kê ANOVA Post-hoc Bonferroni được thực hiện trên dữ liệu đã được chuyển đổi log. Đáp ứng E2 được kích thích bởi một mình vector adeno mã hóa E2 là cao hơn so với đáp ứng được kích thích bởi các polypeptit theo sáng chế mà bao gồm các mảnh E6 và E7. Sự khác biệt là có ý nghĩa đối với E2 so với E2E6E7SH và E2 so với E6E7E2SH (*: $p < 0,05$). Phân tích thống kê ANOVA Post-hoc Bonferroni được thực hiện trên dữ liệu đã được chuyển đổi log.

Hình 9. Các đáp ứng được duy trì ở các con chuột đã được gây miễn dịch. (A) Sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng 1×10^{10} vp vector Ad35 biểu hiện các biến thể LSE2E6E7SH, E2E6E7SH, E6E7SH, hoặc bằng vector adeno không biểu hiện gen chuyển (Rỗng). Các mẫu máu được lấy hai tuần một lần để xác định tỷ lệ phần trăm tế bào T CD8+ đặc hiệu E7 bằng cách nhuộm màu tetrame. (B) Đáp ứng miễn dịch hai tuần sau khi gây miễn dịch. Vector bao gồm trình tự dẫn đầu gây ra đáp ứng cao hơn so với vector không có trình tự dẫn đầu; LSE2E6E7SH so với E2E6E7SH (*: $p < 0,05$). (C) Động học của các đáp ứng. Phân tích thống kê ANOVA Post-hoc Bonferroni được thực hiện trên dữ liệu đã được chuyển đổi log của bộ dữ liệu

tuần thứ 2. Đáp ứng E7 gây ra bởi các phân tử bao gồm E2 có xu hướng cao hơn so với phân tử không có E2, mặc dù các kết quả này là không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Hình 10. Sử dụng các vector adenovirut khác nhau để tăng cường đáp ứng miễn dịch. (A). Sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng vector Ad26 biểu hiện E2E6E7SH HPV16 (HPV16-Tx) hoặc bằng vector Ad26 không biểu hiện gen chuyển (rỗng). Hai tuần sau, việc gây miễn dịch được lặp lại với vector dựa trên Ad35 như đã được thể hiện ở phía dưới hình vẽ. Bốn tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ hai, các con chuột bị giết và các mẫu máu được sử dụng để xác định tỷ lệ phần trăm tế bào T CD8+ đặc hiệu E7 bằng cách nhuộm màu tetrame (B). * biểu thị sự so sánh Ad26.HPV16-Tx/Ad35.HPV16-Tx so với Ad26.HPV16-Tx/Ad35.Rỗng, $p < 0,05$ (thử nghiệm t student trên dữ liệu đã được chuyển đổi log, với $\alpha = 0,01$ cho nhiều so sánh).

Hình 11. Khả năng gây miễn dịch tế bào của E2E6E7SH ở khỉ Rhesus macaques. (A) Sơ đồ gây miễn dịch. Khỉ Rhesus macaques được gây miễn dịch vào ngày 0: Tám con vật tiếp nhận Ad26.HPV16-E2E6E7SH và hai con vật đối chứng tiếp nhận Ad26.Rỗng bằng cách gây miễn dịch trong cơ (i.m). Việc gây miễn dịch tăng cường được thực hiện (Ad26.HPV16-E2E6E7SH hoặc Ad26.Rỗng) tại thời điểm 8 tuần. Tại thời điểm 16 tuần, các con vật tiếp nhận sự gây miễn dịch tăng cường lần thứ hai bằng vector Ad35 biểu hiện cùng E2E6E7SH, trong khi các con vật đối chứng tiếp nhận Ad35.Rỗng. Liều lượng của vector adeno là 1×10^{11} vp cho mỗi lần gây miễn dịch. Tiến hành rút máu tại một số thời điểm. (B) Đáp ứng miễn dịch tế bào trong PBMC được xác định bằng IFN γ ELISPOT. PBMC được kích thích bằng các nhóm peptit tương ứng với E2, E6 hoặc E7 HPV16 và số lượng đơn vị tạo thành vết (SFU) trong 1×10^6 PBMC được minh họa. Con vật đối chứng rỗng (n=2) không thể hiện đáp ứng phát hiện được. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 4.

Hình 12. Tác dụng trị liệu của vector Adeno biểu hiện HPV16-E2E6E7SH. (A) Tiêm TC-1 và sơ đồ gây miễn dịch. Các con chuột CB6F1 được tiêm dưới da với 1×10^5 tế bào TC-1 vào ngày 0. Sau sáu ngày, khi các khối u có thể sờ thấy được, các con chuột được gây miễn dịch bằng hai SLP bao gồm các epitop trội miễn dịch E6 và E7 HPV16 (tức là, HPV16 E6, aa 41-65 (KQQLLRREYDYFAFRDLCIVYRDGN; SEQ ID NO: 18) và HPV16 E7 aa 43-77 (GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR; SEQ ID NO: 19)) với lượng 150 μ g trong thể tích cuối cùng bằng 200 μ l nước muối

0,9% được bổ sung 5 nmol ODN1826-CpG (B) hoặc Ad26.HPV16-E2E6E7SH (C). Các con chuột đối chứng tiếp nhận một mình CpG (D) hoặc Ad26.Rỗng (E). Tất cả các con chuột đều tiếp nhận sự gây miễn dịch tăng cường vào ngày 20. Các con chuột tiếp nhận vector Ad26 trong lần gây miễn dịch lần đầu được gây miễn dịch tiếp bằng vector Ad35 tương ứng. Các con chuột khác tiếp nhận, SLP được bổ trợ bằng CpG hoặc CpG một mình như trong lần gây miễn dịch lần đầu. (B-E) Đo khối u ở các con chuột được tiêm TC-1. Thể tích khối u được tính là $(\text{chiều rộng}^2 * \text{chiều dài})/2$. Các con chuột bị giết khi thể tích khối u vượt quá 1000 mm^3 . Hai con chuột bị giết do sự giảm khối lượng lớn hơn 20% (được biểu thị bằng dấu hoa thị). (F-G) Cận cảnh ô B và ô C trong 35 ngày đầu tiên. (H) Sống sót sau khi tiêm TC-1. Sự sống sót của các con chuột được xử lý bằng Ad.HPV16-E2E6E7SH được làm tăng đáng kể so với các con chuột được gây miễn dịch bằng SLP và CpG (Thử nghiệm log-rank $p < 0,05$). Ba con chuột được gây miễn dịch bằng Ad.HPV16-E2E6E7SH không có khối u tại thời điểm kết thúc thử nghiệm (vào ngày 92).

Hình 13. Vector adenovirus mang gen chuyển mã hóa HPV Ag hoặc LSE2E6E7SH thể hiện hiệu suất virus tăng trên các tế bào có khả năng ức chế sự biểu hiện gen chuyển. A) Thử nghiệm hiệu suất virus đối với vector Ad35. Tế bào PER.C6, PER.C6/CymR, và PER.C6/TetR được gây nhiễm bằng các vector Ad35 mang gen chuyển mã hóa GFP-Luc hoặc HPVAg. Các gen chuyển này được điều khiển bởi trình tự khởi động CMV chứa CuO hoặc TetO. Hiệu suất virus được xác định bốn ngày sau khi lây nhiễm bằng phương pháp dựa trên qPCR đặc hiệu Ad35 hexon. B) Thử nghiệm hiệu suất virus đối với vector Ad26. Các tế bào PER.C6 và PER.C6/TetR được lây nhiễm bằng các vector Ad26 mang gen chuyển mã hóa GFP-Luc, HPVAg, hoặc LSE2E6E7SH, tất cả các gen chuyển này đều được điều khiển bởi trình tự khởi động CMV chứa TetO. Hiệu suất virus được xác định ba ngày sau khi lây nhiễm bằng phương pháp dựa trên qPCR đặc hiệu Ad26 hexon. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 6.

Hình 14. Việc sử dụng hệ chất kim hãm để ức chế sự biểu hiện gen chuyển trong quá trình sản xuất vector ngăn ngừa sự không ổn định của băng gen chuyển trong vector adenovirus mang gen chuyển mã hóa cho HPVAg. Vector Ad35 biểu hiện HPVAg dưới sự kiểm soát của CMVCuO được phóng thích bởi sự chuyển nhiễm ADN trên dòng tế bào PER.C6 hoặc PER.C6/CymR. Các mảng virus thu được được chọn lựa – năm mảng đối với mỗi dòng tế bào – và được sử dụng cho các chu kỳ lây nhiễm liên tiếp trên các

dòng tế bào tương ứng. A) Phân tích tính nguyên vẹn của vùng băng gen chuyển vector bằng PCR sau 10 lần cấy chuyển virus. Sản phẩm PCR thu được từ các thể phân lập virus đã được cấy chuyển trên PER.C6 và PER.C6/CymR lần lượt được thể hiện ở ô giữa và ô bên phải. Sản phẩm PCR xuất hiện với chiều dài đầy đủ thu được đối với các thể phân lập virus đã được cấy chuyển PER.C6 1, 2, 4, và 5, và sản phẩm PCR được quan sát thấy đối với các thể phân lập đã được cấy chuyển PER.C6/CymR từ 1 đến 5 được phân tích bằng cách xác định trình tự ADN Sanger. Phân tích các vết sắc ký đồ (không được thể hiện) phát hiện ra rằng tất cả các thể phân lập phát triển trên PER.C6, chứ không phải là các thể phân lập phát triển trên PER.C6/CymR, chứa sự làm khuyết nhỏ làm dịch khung hoặc đột biến kết thúc sớm trong trình tự mã hóa đối với HPVAg. B) Phân tích khả năng biểu hiện HPVAg của vector sau bảy lần cấy chuyển virus. Tế bào A549 được tải nạp bằng các thể phân lập virus phát triển trên PER.C6 và PER.C6/CymR và sự biểu hiện HPVAg được phân tích bằng Thâm tách Western sử dụng kháng thể đặc hiệu E7 HPV16. Kích thước dự đoán đối với HPVAg là 83 kDa. Để hiểu chi tiết, tham khảo Ví dụ 6.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1. Polypeptit này là polypeptit dung hợp, và đôi khi được gọi trong bản mô tả này là polypeptit theo sáng chế, hoặc polypeptit dung hợp theo sáng chế. Polypeptit này là hữu dụng để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại protein E6 và E7 của HPV16, và do đó phân tử axit nucleic có thể được sử dụng làm vaccin trị liệu để ngăn ngừa sự lây nhiễm HPV16 dai dẳng, và các bệnh có liên quan đến nó.

Polypeptit theo sáng chế là phân tử được thiết kế cẩn thận gần như chứa trình tự axit amin E6 và E7 đầy đủ của HPV16 (phân tử này chỉ thiếu một axit amin từ đầu tận cùng C của protein E6 HPV16 nguyên thể) ở dạng các mảnh được sắp xếp lại và gói lên nhau một phần sao cho (gần như) tất cả các epitop tế bào T của protein E6 và E7 HPV16 đều có mặt. Các phân tử có khả năng để làm vaccin HPV trước đây đã được mô tả bởi các tác giả khác (ví dụ Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361: 1838-47; Daayana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129-36; Smahel *et al.*, 2001, *Virology* 281: 231-38; Yan *et al.*, 2009, *Vaccine* 27: 431-40; Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406; EP1183368, WO 2013/083287), nhưng mỗi phân tử trong số các phân tử này đều có một hoặc nhiều nhược điểm. Các phân tử

polypeptit thiết kế theo sáng chế có lợi ở ít nhất một và thường là một vài khía cạnh so với các phương pháp đã được mô tả trước đây. Cụ thể, các ưu điểm của các phân tử và/hoặc vector theo sáng chế bao gồm: (i) chúng có biên dạng độ an toàn mong muốn, vì axit nucleic có hoạt tính biến nạp được làm giảm mạnh (so với protein E6 và E7 nguyên thể), cho đến hoạt tính biến nạp không phát hiện được; (ii) chúng là các phân tử axit nucleic đơn, dễ sản xuất ở quy mô công nghiệp theo cách khả thi về mặt kinh tế, và không giống như các phương pháp đa phân tử, chúng không đặt ra các vấn đề về kiểm tra tình trạng dị ứng ở khâu hậu xử lý; (iii) polypeptit được mã hóa có chứa gần như tất cả các epitop tế bào T của protein E6 và E7 HPV16 nguyên thể; (iv) thiết kế của polypeptit được mã hóa làm giảm thiểu việc đưa vào các epitop mới tạo thành mạnh tiềm năng không mong muốn (tức là các epitop không có mặt trong protein E6 và E7 nguyên thể); và (v) theo các phương án nhất định, chúng không phụ thuộc vào các chất bổ trợ gây phản ứng cao để làm tăng đáp ứng miễn dịch mong muốn. Do đó, các phân tử theo sáng chế thể hiện bước tiến quan trọng bằng cách kết hợp nhiều đặc tính có lợi khác nhau trong một thiết kế, và là các ứng viên tuyệt vời chủ yếu để chủng ngừa trị liệu chống lại HPV16. Các phân tử này cũng có thể có tác dụng làm vaccin phòng ngừa chống lại HPV16, nghĩa là chúng có khả năng ngăn ngừa sự lây nhiễm dai dẳng bởi HPV16 ở các đối tượng đã được chủng ngừa.

Theo các phương án nhất định, nhờ thiết kế cẩn thận, số lượng epitop mới tạo thành có chiều dài chín axit amin với ái lực liên kết dự đoán <50 nM đối với 20 alen HLA-A phổ biến nhất, 20 alen HLA-B phổ biến nhất và 20 alen HLA-C phổ biến nhất được làm giảm thiểu xuống chỉ còn bằng 1. Đây là cải tiến đáng kể so với các cấu trúc đã được mô tả bởi các tác giả khác, mà đối với protein E6 đã được xáo trộn đơn lẻ đã chứa nhiều hơn 30 trong số các epitop mới tạo thành như vậy, và các cấu trúc này sẽ có khả năng cao có chứa số epitop mới tạo thành nhiều hơn nữa trong các trình tự được gắn với các cấu trúc này để ngăn ngừa sự mất epitop (Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880–93). Do đó, các cấu trúc theo sáng chế có biên dạng miễn dịch được cải thiện đáng kể vì khả năng đáp ứng miễn dịch bị thay đổi so với E6 và E7 nguyên thể được làm giảm thiểu ở các phân tử theo sáng chế, so với các phương pháp đã được mô tả bởi các tác giả khác.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng các kỹ thuật thông thường để tạo ra các sự thể nucleotit không ảnh hưởng đến trình tự polypeptit được mã hóa bởi các polynucleotit đã được mô tả để phản ánh việc sử dụng bộ ba mã hóa của sinh vật chủ cụ thể bất kỳ trong đó polypeptit được biểu hiện. Do đó, trừ khi có chỉ dẫn khác, "trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin" bao gồm tất cả các trình tự nucleotit mà là các phiên bản thoái hóa của nhau và mã hóa cho cùng trình tự axit amin. Trình tự nucleotit mã hóa protein và ARN có thể bao gồm các intron.

Theo phương án được ưu tiên, axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở tế bào động vật có vú, tốt hơn nếu là tế bào của người. Các phương pháp tối ưu hóa bộ ba mã hóa đã được biết và mô tả trước đây (ví dụ WO 96/09378). Trình tự được xem là được tối ưu hóa bộ ba mã hóa nếu ít nhất một bộ ba mã hóa không được ưu tiên so với trình tự thể hoang dại được thay thế bằng bộ ba mã hóa được ưu tiên hơn. Trong bản mô tả này, bộ ba mã hóa không được ưu tiên là bộ ba mã hóa được sử dụng ở sinh vật ít thường xuyên hơn so với bộ ba mã hóa khác mã hóa cho cùng axit amin, và bộ ba mã hóa được ưu tiên hơn là bộ ba mã hóa được sử dụng thường xuyên hơn ở sinh vật so với bộ ba mã hóa không được ưu tiên. Tần suất sử dụng bộ ba mã hóa đối với sinh vật cụ thể có thể được tìm thấy trong bảng tần suất bộ ba mã hóa, như trong <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Tốt hơn nếu nhiều hơn một bộ ba mã hóa không được ưu tiên, ví dụ nhiều hơn 10%, 40%, 60%, 80% bộ ba mã hóa không được ưu tiên, tốt hơn nếu hầu hết (ví dụ ít nhất 90%) hoặc tất cả các bộ ba mã hóa không được ưu tiên, được thay thế bằng bộ ba mã hóa được ưu tiên hơn. Tốt hơn nếu các bộ ba mã hóa được sử dụng thường xuyên nhất ở sinh vật được sử dụng trong trình tự được tối ưu hóa bộ ba mã hóa. Việc thay thế bằng các bộ ba mã hóa được ưu tiên nhìn chung dẫn đến sự biểu hiện cao hơn.

Trình tự axit nucleic có thể được tách dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường, hoặc được tạo ra hoàn toàn mới bằng sự tổng hợp ADN, mà có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình thông thường bởi các công ty dịch vụ có kinh doanh trong lĩnh vực tổng hợp ADN và/hoặc tách dòng phân tử (ví dụ GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng có thể thực hiện các thay đổi đối với protein, ví dụ bằng sự thể, sự làm khuyết, sự thêm axit amin, v.v., ví dụ bằng cách sử dụng các quy trình sinh học phân tử thông thường. Nhìn chung,

có thể áp dụng sự thể axit amin bảo toàn mà không làm mất chức năng hoặc khả năng gây miễn dịch của polypeptit. Điều này có thể được kiểm tra theo các quy trình thông thường đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án nhất định, polypeptit được mã hóa theo sáng chế còn có chứa trình tự dẫn đầu, còn được gọi là trình tự tín hiệu hoặc peptit tín hiệu. Đây là peptit ngắn (thường có chiều dài 5-30 axit amin) có mặt ở đầu tận cùng N của phần lớn các protein mới được tổng hợp mà được hướng đến con đường tiết. Sự có mặt của trình tự này có thể dẫn đến sự biểu hiện và khả năng gây miễn dịch tăng. Ví dụ không giới hạn có thể được sử dụng là peptit dẫn đầu IgE (xem ví dụ US 6,733,994; ví dụ có trình tự MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO: 7)) hoặc peptit dẫn đầu HAVT20 (ví dụ có trình tự MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 9)). Một trong số các peptit dẫn đầu này có thể được bổ sung tùy ý vào đầu tận cùng N của polypeptit theo sáng chế. Theo các phương án khác, polypeptit theo sáng chế không chứa trình tự dẫn đầu.

Tồn tại nhiều typ HPV khác nhau (hơn 120 typ đã được nhận diện và được đề cập đến bằng con số), và nhìn chung đối với mỗi typ cần được chứa trong vaccin, các kháng nguyên đặc hiệu typ có thể cần phải được kết hợp vào vaccin, mặc dù có thể tồn tại một số khả năng phản ứng chéo đối với các kháng nguyên nhất định. Các typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, và 82 là HPV lây qua đường tình dục “có nguy cơ cao” gây ung thư và có thể dẫn đến phát triển sự tạo u trong biểu mô cổ tử cung (CIN), sự tạo u trong biểu mô âm hộ (VIN), sự tạo u trong biểu mô âm đạo (VaIN), sự tạo u trong biểu mô dương vật (PIN), và/hoặc sự tạo u trong biểu mô hậu môn (AIN). HPV theo sáng chế (tức là HPV mà từ đó thu được các mảnh E6 và E7 trong polypeptit được mã hóa) là HPV16. Nó có thể được sử dụng cho các đối tượng bị lây nhiễm HPV16. Theo các phương án nhất định, nó cũng có thể được kết hợp một cách thích hợp với vaccin chống lại các typ HPV khác. Theo các phương án nhất định, dạng kết hợp này là với vaccin chống lại HPV thuộc typ nguy cơ cao như được xác định trên đây, ví dụ với vaccin chống lại HPV18. Theo các phương án khác, vaccin theo sáng chế được kết hợp với vaccin chống lại một hoặc nhiều trong số HPV-18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, hoặc -82. Các dạng kết hợp này có thể, ví dụ, được sử dụng nếu vẫn chưa chắc chắn được loại lây nhiễm HPV chính xác, hoặc nếu mong muốn có đáp ứng miễn dịch với tác dụng phòng bệnh chống lại nhiều hơn một typ HPV. Các dạng kết hợp của vaccin theo sáng chế với vaccin chống lại typ HPV gây mụn cóc sinh dục,

như HPV6 và/hoặc HPV11, cũng được dự tính. Trình tự của các typ HPV này và protein được mã hóa bởi trình tự này (ví dụ E6, E7, E2) là có sẵn với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong các cơ sở dữ liệu công khai, như cơ sở dữ liệu trình tự ngân hàng gen (GenBank) do Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (NCBI) cung cấp.

Polypeptit theo sáng chế có chứa SEQ ID NO: 1, và theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế có chứa SEQ ID NO: 2.

Các trình tự trong bản mô tả này được đưa ra theo hướng từ 5' đến 3' hoặc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, như thường được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Polypeptit theo sáng chế có chứa epitop của protein E6 và E7 HPV16. Theo các phương án nhất định, polypeptit theo sáng chế còn có chứa (và do đó axit nucleic mã hóa cho polypeptit còn mã hóa cho) ít nhất một kháng nguyên khác hoặc (các) epitop của kháng nguyên khác này. Kháng nguyên khác này tốt hơn nếu là kháng nguyên HPV, tốt hơn nếu thuộc cùng typ HPV như protein E6 và E7 trong polypeptit, tức là HPV16. Do đó, kháng nguyên khác này có thể là protein HPV hoặc mảnh sinh miễn dịch của nó, và theo các phương án nhất định có chứa protein E2 hoặc mảnh của nó chứa ít nhất một epitop của E2 của HPV, tốt hơn nếu từ HPV16. Các kháng nguyên hoặc epitop khác này có thể được đặt bên trong giữa hai mảnh của E6 và/hoặc E7 trong polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1, nhưng tốt hơn nếu được dung hợp đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C với polypeptit E6/E7 có chứa SEQ ID NO: 1. Theo cách khác hoặc ngoài ra, trình tự axit amin gây đáp ứng miễn dịch có thể có mặt. Do đó, theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic theo sáng chế, mã hóa cho polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1, và trong đó polypeptit này còn có chứa ít nhất một kháng nguyên khác, ví dụ protein E2 HPV hoặc ít nhất một epitop của nó, nhưng tốt hơn nếu nhiều epitop hơn. Một ưu điểm của việc bổ sung kháng nguyên E2 đối với sáng chế là ở chỗ E2 được biết là được biểu hiện sớm trong quá trình lây nhiễm/trong các thương tổn mức thấp khi mà sự biểu hiện của E6 và E7 vẫn rất thấp. Trong quá trình phát triển thành ung thư cổ tử cung, sự biểu hiện của E2 bị mất đi và kết quả là, hàm lượng E6 và E7 được làm tăng (Yugawa và Kiyono, 2009, *Rev Med Virol* 19: 97–113). Việc kết hợp các epitop từ E2, E6 và E7 trong một vaccin cho phép điều trị nhóm bệnh nhân mục tiêu rộng, từ mức bị lây nhiễm dai dẳng đến mức bị ung thư cổ tử cung xâm lấn (hoặc các bệnh ung thư khác do HPV16 gây ra). Theo các phương án nhất định, protein E2 là protein E2 thể hoang

dại. Theo các phương án nhất định khác, protein E2 có sự làm khuyết hoặc một hoặc nhiều đột biến trong miền liên kết ADN của nó (so với protein E2 thể hoang dại). Trình tự của protein E2 HPV16 (NP_041328.1) có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu protein của NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) với số NP_041328.1. Một vài thay đổi axit amin đơn lẻ trong E2 như G293V, K299M, hoặc C300R trong phần đầu tận cùng C của protein này được biết là làm phá hủy liên kết ADN. Ưu điểm của việc sử dụng biến thể hoặc mảnh của E2 không có khả năng liên kết ADN là ở chỗ nó có thể ngăn ngừa các thay đổi phiên mã không thể dự đoán trước được thông qua sự liên kết trực tiếp với ADN tế bào chủ trong các tế bào ở đó nó được biểu hiện. Protein E2 hoặc một phần hoặc biến thể của nó có thể được bổ sung bên trong, nhưng tốt hơn nếu vào đầu tận cùng N hoặc vào đầu tận cùng C của polypeptit theo sáng chế có SEQ ID NO: 1. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa cho polypeptit có chứa SEQ ID NO: 3. Theo một phương án của nó, phân tử axit nucleic theo sáng chế có chứa SEQ ID NO: 4. Theo phương án khác, phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa cho polypeptit có chứa SEQ ID NO: 5. Theo một phương án của nó, phân tử axit nucleic theo sáng chế có chứa SEQ ID NO: 6.

Cũng có thể tạo ra các thể dung hợp khác của polypeptit thiết kế theo sáng chế với các protein khác, ví dụ protein được gọi là protein chất mang, như Calreticulin, protein sốc nhiệt của *Mycobacterium Tuberculosis*-70, IP10, hoặc mảnh độc tố uốn ván C (xem Oosterhuis et al., *Human Gene Ther*, 2012, *trên đây*, về các ví dụ khác nữa), mà có thể tăng cường thêm đáp ứng miễn dịch với epitop E6 và E7 (và tùy ý E2) HPV. Do đó, sáng chế còn đề xuất các protein dung hợp khác này, và axit nucleic mã hóa cho chúng.

Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic theo sáng chế được kết hợp vào vectơ. "Vectơ" như được sử dụng trong bản mô tả này, thường là vectơ để mang một cách nhân tạo vật liệu di truyền lạ vào tế bào khác, ở đó nó có thể được sao chép và/hoặc được biểu hiện, và theo sáng chế có thể là phân tử axit nucleic bất kỳ kết hợp phân tử axit nucleic theo sáng chế. Các vectơ này có thể được điều chế theo các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường như tách dòng. Thông thường, các vectơ này có thể được nhân giống trong ít nhất một loại vật chủ thích hợp như vi khuẩn, nấm men, tế bào côn trùng, tế bào động vật có vú, và các vật chủ tương tự. Bốn loại vectơ chính là plasmit, vectơ virus, cosmit, và nhiễm sắc thể nhân tạo. Nhìn chung, vectơ bản thân nó là trình

tự ADN gồm đoạn cài xen (gen chuyển; theo sáng chế, axit nucleic mã hóa cho polypeptit dung hợp theo sáng chế) và trình tự đóng vai trò làm "khung" của vector. Mục đích của vector mà truyền thông tin di truyền vào tế bào khác thường là để phân lập, nhân lên, hoặc biểu hiện đoạn cài xen trong tế bào đích. Tốt hơn nếu, trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động trong vector. Thuật ngữ "được liên kết có điều khiển" được dự định nghĩa là trình tự nucleotit quan tâm được liên kết với trình tự khởi động theo cách cho phép biểu hiện trình tự nucleotit này (ví dụ, trong tế bào chủ khi vector này được đưa vào tế bào chủ). Trình tự điều hòa biểu hiện có thể được liên kết có điều khiển với gen chuyển. Theo các phương án nhất định, vector được thiết kế để biểu hiện gen chuyển trong tế bào đích, và nhìn chung có trình tự trình tự khởi động điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều thành phần vector thường được sử dụng như trình tự kết thúc phiên mã, trình tự đuôi polyadenin hóa, trình tự Kozak, UTR, điểm khởi đầu sao chép, vị trí đa tách dòng, gen đánh dấu, kháng chất kháng sinh, và các trình tự khác có thể có mặt, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế vector sao cho nó có các tính chất mong muốn, ví dụ để sao chép trong một số tế bào nhất định để nhân giống và nhân vector, và để biểu hiện gen chuyển của vector trong các tế bào đích mà vector này được đưa vào. Vector có chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit dung hợp theo sáng chế, tốt hơn nếu được thiết kế để biểu hiện ở tế bào động vật có vú, thích hợp làm vaccin theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, vector theo sáng chế là plasmid, cosmit, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men, nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn, vector virus, hoặc các vector tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết các trình tự khởi động khác nhau có thể được sử dụng để thu được sự biểu hiện của gen trong tế bào chủ. Một số trình tự khởi động đã biết rõ và được sử dụng nhiều để biểu hiện trong tế bào nhân chuẩn có chứa trình tự khởi động có nguồn gốc từ các virus, như adenovirus, ví dụ trình tự khởi động E1A, trình tự khởi động có nguồn gốc từ cytomegalovirus (CMV), như trình tự khởi động sớm qua trung gian (IE) CMV (được gọi trong bản mô tả này là trình tự khởi động CMV) (có thể thu được chẳng hạn từ pcADN, Invitrogen), trình tự khởi động có nguồn gốc từ virus khỉ 40 (SV40) (ví dụ có thể thu được từ pIRES, số catalô 631605, BD Sciences), và các trình tự khởi động tương tự. Các trình tự khởi động thích hợp cũng có thể có nguồn gốc từ tế bào nhân chuẩn, như trình tự khởi động metallothionein (MT), trình tự khởi động yếu tố kéo dài 1 α (EF-

1 α), trình tự khởi động ubiquitin C hoặc UB6, trình tự khởi động actin, trình tự khởi động globulin miễn dịch, trình tự khởi động sốc nhiệt, và các trình tự khởi động tương tự (xem ví dụ WO 2006/048459). Ví dụ không giới hạn về trình tự khởi đầu phiên mã thích hợp để thu được biểu hiện trong tế bào nhân chuẩn là trình tự khởi đầu phiên mã CMV (US 5,385,839), ví dụ trình tự khởi đầu phiên mã ngay ban đầu CMV, ví dụ bao gồm nt. Từ -735 đến +95 từ vùng tăng cường/trình tự khởi động gen sớm sát cạnh CMV, ví dụ trình tự khởi động CMV như được đưa ra trong bản mô tả này với trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 13. Tín hiệu polyadenyl hóa, ví dụ tín hiệu polyA hormon sinh trưởng bò (US 5,122,458), có thể có mặt ở sau (các) gen chuyển này.

Các trình tự điều hòa khác cũng có thể được bổ sung. Thuật ngữ "trình tự điều hòa" được sử dụng thay thế lẫn nhau với "yếu tố điều hòa" trong bản mô tả này và chỉ đoạn axit nucleic, thông thường nhưng không giới hạn ở ADN, điều biến sự phiên mã của trình tự axit nucleic mà nó được liên kết có điều khiển với, và do đó hoạt động như là tác nhân điều biến phiên mã. Trình tự điều hòa thường có chứa trình tự axit nucleic mà là miền liên kết phiên mã được nhận biết bởi miền liên kết axit nucleic của protein phiên mã và/hoặc yếu tố phiên mã, vùng tăng cường hoặc chất kìm hãm v.v.. Ví dụ, có thể ghép đôi có điều khiển trình tự ức chế với trình tự khởi động, trình tự ức chế này có thể được liên kết bởi protein kìm hãm mà có thể làm giảm hoặc ngăn chặn sự biểu hiện của gen chuyển trong dòng tế bào sản xuất biểu hiện protein kìm hãm này. Điều này có thể tăng cường độ ổn định di truyền và/hoặc mức biểu hiện của phân tử axit nucleic trong quá trình cấy chuyển và/hoặc khi phân tử này được sản xuất với lượng lớn trong dòng tế bào sản xuất. Các hệ thống này đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, trình tự điều hòa có thể có chứa một hoặc nhiều trình tự điều khiển operon tetracyclin (tetO), sao cho sự biểu hiện bị ức chế trong sự có mặt của protein kìm hãm operon tetracyclin (tetR). Trong sự vắng mặt của tetracyclin, protein tetR có khả năng liên kết với vị trí tetO và ức chế sự phiên mã của gen được liên kết có điều khiển với vị trí tetO. Tuy nhiên, trong sự có mặt của tetracyclin, sự thay đổi hình dạng trong protein tetR ngăn nó không liên kết với trình tự điều khiển, cho phép xảy ra sự phiên mã của gen được liên kết có điều khiển. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic, ví dụ khi có mặt trong vectơ adenovirut tái tổ hợp, theo sáng chế có thể tùy ý bao gồm tetO được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động, sao cho sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen chuyển bị ức chế trong adenovirut tái tổ hợp mà được sản xuất trong dòng tế

bào sản xuất trong đó protein tetR được biểu hiện. Sau đó, sự biểu hiện sẽ không bị ức chế nếu adenovirut tái tổ hợp được đưa vào đối tượng hoặc vào tế bào không biểu hiện protein tetR (ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 07/ 073513). Theo các phương án nhất định khác, phân tử axit nucleic theo sáng chế, ví dụ khi có mặt trong adenovirut tái tổ hợp, có thể tùy ý bao gồm hệ chuyển gen cumat, trong đó việc điều hòa biểu hiện được điều tiết bởi sự liên kết của chất kim hãm (CymR) với vị trí điều khiển (CuO), được đặt phía dưới trình tự khởi động (ví dụ, Mullick et al. *BMC Biotechnol.* 2006 6:43). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất kim hãm," chỉ các thực thể (ví dụ, protein hoặc các phân tử khác) có khả năng kim chế, can thiệp, làm chậm và/hoặc ức chế sự sản xuất của sản phẩm protein khác loại của vector biểu hiện tái tổ hợp. Ví dụ, bằng cách can thiệp vào vị trí liên kết ở vị trí thích hợp dọc theo vector biểu hiện, như trong bảng biểu hiện. Ví dụ về chất kim hãm bao gồm tetR, CymR, chất kim hãm lac, chất kim hãm trp, chất kim hãm gal, chất kim hãm lambda, và các chất kim hãm thích hợp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về việc sử dụng hệ chất kim hãm/vùng điều khiển tetO/tetR và hệ chất kim hãm/vùng điều khiển CuO/CymR được đưa ra trong bản mô tả này. Việc ức chế biểu hiện gen chuyển vector trong quá trình nhân giống vector có thể ngăn ngừa sự không ổn định của gen chuyển, và có thể làm tăng hiệu suất của các vector có gen chuyển theo sáng chế trong quá trình sản xuất. Do đó, theo một số phương án, vector theo sáng chế có trình tự khởi động mà có thể bị ức chế bởi sự liên kết của protein kim hãm, ví dụ bằng cách có trình tự khởi động được ghép đôi có điều khiển với trình tự điều khiển chất kim hãm (ví dụ theo các phương án không giới hạn, trình tự chứa TetO, ví dụ trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự chứa CuO, ví dụ trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 12), mà protein kim hãm (ví dụ protein tetR, ví dụ có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 15, hoặc protein CymR, ví dụ có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 17) có thể liên kết với.

Theo các phương án nhất định, vector là phân tử ADN plasmid, hoặc mảnh của nó. Các vector này có thể được sử dụng cho việc chủng ngừa ADN. Các nền khác cũng có thể được sử dụng làm vector, ví dụ chủng *Listeria monocytogenes* sống-được làm giảm độc lực được làm khuyết kép.

Theo các phương án khác, vector là vector virus tái tổ hợp, vector này có thể có khả năng sao chép hoặc thiếu khả năng sao chép. Theo các phương án nhất định, vector virus

có chứa hệ gen ADN tái tổ hợp. Theo các phương án nhất định, vectơ theo sáng chế là, ví dụ, adenovirut tái tổ hợp, retrovirut tái tổ hợp, virut đậu tái tổ hợp như virut đậu mùa (ví dụ virut đậu mùa Ankara cải biến (MVA)), alphavirut tái tổ hợp như virut rừng semliki, paramyxovirut tái tổ hợp, như virut sởi tái tổ hợp, hoặc virut tái tổ hợp khác. Theo các phương án nhất định, vectơ theo sáng chế là vectơ MVA.

Theo các phương án được ưu tiên, vectơ theo sáng chế là adenovirut tái tổ hợp. Ưu điểm của adenovirut để sử dụng làm vaccin bao gồm dễ thao tác, khả năng sản xuất tốt ở quy mô lớn, và hồ sơ dữ liệu độ an toàn tuyệt vời dựa trên nhiều năm kinh nghiệm trong nghiên cứu, phát triển, sản xuất và các thử nghiệm lâm sàng với nhiều vectơ adenovirut đã được báo cáo. Vectơ adenovirut được sử dụng làm vaccin nhìn chung tạo ra đáp ứng miễn dịch tốt đối với protein được mã hóa bởi gen chuyên, bao gồm đáp ứng miễn dịch tế bào. Vectơ adenovirut theo sáng chế có thể được dựa trên typ adenovirut bất kỳ, và theo các phương án nhất định là adenovirut của người, mà có thể thuộc typ huyết thanh bất kỳ. Theo các phương án khác, nó là adenovirut của khỉ, như adenovirut tinh tinh hoặc vượn gorin, mà có thể thuộc typ huyết thanh bất kỳ. Theo các phương án nhất định, vectơ theo sáng chế thuộc typ huyết thanh adenovirut của người 5, 26 hoặc 35. Việc điều chế vectơ adenovirut tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án nhất định, vectơ adenovirut theo sáng chế thiếu hụt ít nhất một chức năng gen thiết yếu của vùng E1, ví dụ vùng E1a và/hoặc vùng E1b, của hệ gen adenovirut cần thiết cho sự sao chép của virut. Theo các phương án nhất định, vectơ adenovirut theo sáng chế thiếu hụt ít nhất một phần của vùng E3 không thiết yếu. Theo các phương án nhất định, vectơ thiếu hụt ít nhất một chức năng gen thiết yếu của vùng E1 và ít nhất một phần của vùng E3 không thiết yếu.

Vectơ adenovirut, phương pháp tạo cấu trúc của nó và phương pháp nhân giống nó, đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 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, và 6,113,913, và Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", các Chương 67 và 68, một cách tương ứng, trong *Virology*, B. N. Fields *et al.*, eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), và các tài liệu tham khảo khác được đề cập trong bản mô tả này. Thông thường, việc tạo cấu trúc vectơ adenovirut liên quan đến việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn, như các kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*,

a *Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson *et al.*, *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992), và Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), và các tài liệu tham khảo khác được đề cập trong bản mô tả này.

Các typ huyết thanh được đặc biệt ưu tiên đối với adenovirut tái tổ hợp là typ huyết thanh của người 35 hoặc typ huyết thanh của người 26. Việc điều chế vectơ rAd26 được mô tả, ví dụ, trong WO 2007/104792 và trong Abbink *et al.*, 2007 *Virology* 81: 4654-63. Trình tự hệ gen của Ad26 nêu làm ví dụ được tìm thấy trong GenBank Accession EF 153474 và trong SEQ ID NO:1 của WO 2007/104792. Việc điều chế vectơ rAd35 được mô tả, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 7,270,811, trong WO 00/70071, và trong Vogels *et al.*, 2003, *J Virol* 77: 8263-71. Trình tự hệ gen của Ad35 nêu làm ví dụ được tìm thấy trong GenBank Accession AC_000019 và trên Hình 6 của WO 00/70071.

Theo các phương án nhất định, adenovirut thiếu khả năng sao chép, ví dụ vì nó chứa sự làm khuyết trong vùng E1 của hệ gen. Như đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong trường hợp loại bỏ các vùng thiết yếu từ hệ gen adenovirut, các chức năng được mã hóa bởi các vùng này phải được cung cấp ở dạng trans, tốt hơn nếu bởi tế bào sản xuất, tức là khi một phần hoặc toàn bộ các vùng E1, E2 và/hoặc E4 được loại bỏ khỏi adenovirut, các vùng này phải có mặt trong tế bào sản xuất, ví dụ được kết hợp vào hệ gen của nó, hoặc ở dạng được gọi là adenovirut hỗ trợ hoặc plasmid hỗ trợ. Adenovirut cũng có thể có khuyết đoạn trong vùng E3, mà không cần thiết cho quá trình sao chép, và do đó, khuyết đoạn như vậy không cần phải được bổ sung.

Tế bào sản xuất (đôi khi còn được gọi trong lĩnh vực kỹ thuật và trong bản mô tả này là 'tế bào đóng gói' hoặc 'tế bào bổ sung') mà có thể được sử dụng có thể là tế bào sản xuất bất kỳ trong đó adenovirut mong muốn có thể được nhân giống. Ví dụ, việc nhân giống vectơ adenovirut tái tổ hợp được thực hiện ở tế bào sản xuất mà bổ sung các thiếu hụt trong adenovirut. Các tế bào sản xuất như vậy tốt hơn nếu có ít nhất trình tự adenovirut E1 trong hệ gen của nó, và nhờ đó có khả năng bổ sung adenovirut tái tổ hợp với sự làm khuyết trong vùng E1. Có thể sử dụng tế bào sản xuất bổ sung E1 bất kỳ, như tế bào võng mạc của người được bất tử hóa bởi E1, ví dụ tế bào 911 hoặc PER.C6 (xem bằng sáng chế Mỹ số 5,994,128), tế bào nước ối đã được biến nạp E1 (xem bằng sáng

chế châu Âu số 1230354), tế bào A549 đã được biến nạp E1 (xem ví dụ WO 98/39411, bằng sáng chế Mỹ số 5,891,690), GH329:HeLa (Gao *et al.*, 2000, *Hum Gene Ther* 11: 213-19), 293, và các tế bào tương tự. Theo các phương án nhất định, tế bào sản xuất là, ví dụ, tế bào HEK293, hoặc tế bào PER.C6, hoặc tế bào 911, hoặc tế bào IT293SF, và các tế bào tương tự. Việc sản xuất vectơ adenovirut trong tế bào sản xuất được bàn luận trong (Kovesdi *et al.*, 2010, *Viruses* 2: 1681-703).

Theo các phương án nhất định, adenovirut thiếu hụt E1 có chứa trình tự ghi mã E4-orf6 của adenovirut thuộc nhóm phụ C như Ad5. Điều này cho phép sự nhân giống của các adenovirut này trong các dòng tế bào bổ sung đã biết rõ biểu hiện gen E1 của Ad5, như ví dụ tế bào 293 hoặc tế bào PER.C6 (xem, ví dụ Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; WO 03/104467, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

"Axit nucleic khác loại" (cũng được gọi trong bản mô tả này là 'gen chuyển') trong vectơ theo sáng chế là axit nucleic không có mặt một cách tự nhiên trong vectơ, và theo sáng chế, axit nucleic mã hóa cho polypeptit dung hợp theo sáng chế được xem là axit nucleic khác loại khi có mặt trong vectơ. Nó được đưa vào vectơ ví dụ bằng kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Ví dụ, nó có thể được tách dòng vào vùng E1 hoặc E3 đã được làm khuyết của vectơ adenovirut, hoặc trong vùng nằm giữa vùng E4 và rITR. Gen chuyển nhìn chung được liên kết có điều khiển với trình tự kiểm soát biểu hiện. Theo các phương án được ưu tiên, gen chuyển được tách dòng vào vùng E1 của vectơ adenovirut.

Việc sản xuất vectơ như vectơ ADN, hoặc vectơ adenovirut tái tổ hợp, có thể được thực hiện theo các phương pháp khác nhau đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhìn chung, việc sản xuất này đòi hỏi sự nhân giống trong các tế bào đã được nuôi cấy để tạo ra lượng vật liệu vectơ đáng kể, sau đó thu hoạch vectơ này từ môi trường nuôi cấy tế bào, và thông thường sau đó là tinh chế tiếp vectơ này để loại bỏ các chất khác và thu được vectơ đã được tinh chế mà có thể được tạo chế phẩm thành dược phẩm (ví dụ, Hoganson *et al.*, 2002, *BioProcessing J* 1: 43-8; Evans *et al.*, 2004, *J Pharm Sci* 93:2458-75). Ví dụ, phương pháp thu hoạch adenovirut từ môi trường nuôi cấy tế bào sản xuất đã được mô tả rộng rãi, ví dụ, trong WO 2005/080556. Ví dụ WO 2010/060719, và WO 2011/098592, cả hai tài liệu này đều

được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn, mô tả các phương pháp thích hợp để thu được và tinh chế lượng lớn adenovirut tái tổ hợp.

Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế còn đề xuất polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic theo sáng chế. Polypeptit này có chứa SEQ ID NO: 1. Theo các phương án nhất định, polypeptit này có thể có chứa SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5. Đặc tính của polypeptit này là như được mô tả trên đây. Polypeptit này có thể, ví dụ, được sử dụng trực tiếp làm vaccin chống lại HPV.

Sáng chế còn đề xuất vaccin có chứa phân tử axit nucleic, vector hoặc polypeptit theo sáng chế, trong đó các phương án đối với mỗi trong số các khía cạnh này có thể bao gồm các phân tử axit nucleic, vector hoặc polypeptit theo sáng chế như được mô tả trên đây. Theo các phương án được ưu tiên, vaccin theo sáng chế có chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế. Theo các phương án được ưu tiên khác, vaccin có chứa vector theo sáng chế, tốt hơn nếu là vector ADN, vector MVA, hoặc vector adenovirut tái tổ hợp.

Theo các phương án nhất định, vaccin theo sáng chế có chứa các thành phần hoạt tính khác, ví dụ axit nucleic mã hóa ít nhất một epitop của protein E6 và/hoặc E7 của ít nhất một typ HPV khác với HPV16, ví dụ typ HPV nguy cơ cao như HPV18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73, hoặc -82.

Thuật ngữ "vaccin" chỉ chất hoặc chế phẩm chứa thành phần hoạt tính có hiệu quả kích thích mức độ miễn dịch phòng bệnh và/hoặc trị liệu ở đối tượng chống lại mầm bệnh hoặc bệnh nhất định, trong trường hợp này là trị liệu chống lại HPV. Vaccin thông thường có chứa phân tử axit nucleic, hoặc vector, theo sáng chế, và tá dược được dụng. Trong quá trình sử dụng cho đối tượng, polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic theo sáng chế sẽ được biểu hiện ở đối tượng, điều này sẽ dẫn đến đáp ứng miễn dịch đối với mảnh kháng nguyên E6 và/hoặc E7 có mặt trong polypeptit. Ưu điểm của các phân tử theo sáng chế là ở chỗ gần như tất cả các epitop tế bào T của E6 và E7 HPV16 đều có mặt và do đó đáp ứng tế bào T đối với epitop bất kỳ có mặt trong E6 hoặc E7 thể hoang dại có thể được tăng lên trong vaccin. Ngoài ra, vaccin này có tất cả các ưu điểm về độ an toàn và công hiệu như được chỉ ra trên đây đối với phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Để sử dụng cho người, sáng chế có thể sử dụng được phẩm có chứa vector và chất mang hoặc tá dược được dụng. Trong nội dung của sáng chế, thuật ngữ "được dụng" nghĩa là chất mang hoặc tá dược, ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, sẽ không gây

ra tác động có hại hoặc không mong muốn bất kỳ ở các đối tượng sử dụng chúng. Các tá dược được dụng này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer và L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; và Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Tá dược nhìn chung là chất không có hoạt tính về mặt dược học được tạo công thức với thành phần hoạt tính của thuốc. Các tá dược thường được sử dụng để làm tăng thể tích hoặc khối lượng cho chế phẩm chứa thành phần hoạt tính hiệu nghiệm (do đó thường được gọi là "chất độn," "chất làm đầy," hoặc "chất pha loãng"), để cho phép phân phối thuận tiện và chính xác chất thuốc khi sản xuất dạng liều lượng. Chúng cũng có thể dùng cho các mục đích tăng cường trị liệu khác nhau, như tạo điều kiện dễ dàng cho sự hấp thụ hoặc hòa tan thuốc, hoặc các mối quan tâm dược động học khác. Các tá dược cũng có thể hữu ích trong quá trình sản xuất, để hỗ trợ việc xử lý chất hoạt tính có liên quan như tạo điều kiện dễ dàng cho tính chất chảy của bột hoặc các tính chất khác không phải tính chất kết dính, ngoài việc hỗ trợ tính ổn định in vitro như ngăn ngừa sự biến tính trong thời hạn sử dụng mong đợi. Việc lựa chọn các tá dược thích hợp cũng tùy thuộc vào đường dùng và dạng liều lượng, cũng như thành phần hoạt tính và các yếu tố khác.

Phân tử axit nucleic, vector hoặc polypeptit được tinh chế tốt hơn nếu được tạo chế phẩm và được sử dụng dưới dạng dung dịch vô trùng mặc dù cũng có thể sử dụng các chế phẩm được làm đông lạnh. Các dung dịch vô trùng được điều chế bằng cách lọc vô trùng hoặc bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, các dung dịch được làm đông lạnh hoặc được nạp đầy vào đồ chứa phân liềudược. Độ pH của dung dịch nhìn chung nằm trong khoảng từ độ pH 3,0 đến 9,5, ví dụ độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,5. Phân tử axit nucleic hoặc vector hoặc polypeptit thường ở trong dung dịch có chất đệm thích hợp, và dung dịch chứa vector cũng có thể chứa muối. Tùy ý, chất làm ổn định có thể có mặt, như albumin. Theo các phương án nhất định, chất tẩy rửa được bổ sung. Theo các phương án nhất định, vacxin có thể được tạo chế phẩm thành chế phẩm tiêm được. Các chế phẩm này chứa lượng hữu hiệu của phân tử axit nucleic, vector hoặc polypeptit là dung dịch lỏng vô trùng, huyền phù lỏng hoặc dạng được làm đông lạnh và tùy ý chứa chất làm ổn định hoặc tá dược.

Ví dụ, vector adenovirut tái tổ hợp có thể được bảo quản trong chất đệm mà cũng được sử dụng đối với Adenovirut theo Tiêu chuẩn thế giới (Hoganson *et al.*, 2002, *Bioprocessing J* 1: 43-8): 20 mM Tris độ pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% glyxerol. Chất đệm chế phẩm hữu dụng khác thích hợp để sử dụng cho người là 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, sucroza 10% khối lượng/thể tích, polysorbat-80 0,02% khối lượng/thể tích. Chất đệm chế phẩm khác thích hợp cho adenovirut tái tổ hợp có chứa 10-25 mM chất đệm xitrat độ pH 5,9-6,2, 4-6% (khối lượng/khối lượng) hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (khối lượng/khối lượng) polysorbat-80, và tùy ý 0,3-0,45% (khối lượng/khối lượng) etanol. Tất nhiên, nhiều chất đệm khác có thể được sử dụng, và một số ví dụ về chế phẩm thích hợp để bảo quản và để sử dụng các vector đã được tinh chế trong dược phẩm là đã được biết.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm có chứa vector còn có chứa một hoặc nhiều chất bổ trợ. Chất bổ trợ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để làm tăng thêm đáp ứng miễn dịch đối với quyết định kháng nguyên đã được áp dụng. Thuật ngữ "chất bổ trợ" và "chất kích thích miễn dịch" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, và được định nghĩa là một hoặc nhiều chất gây kích thích hệ miễn dịch. Trong nội dung của sáng chế, chất bổ trợ được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic trong vector theo sáng chế. Ví dụ về chất bổ trợ thích hợp bao gồm các muối nhôm như nhôm hydroxit và/hoặc nhôm phosphat và/hoặc nhôm kali phosphat; chế phẩm nhũ tương-dầu (hoặc chế phẩm dầu trong nước), bao gồm nhũ tương squalen-nước, như MF59 (xem ví dụ WO 90/14837); chế phẩm saponin, như, ví dụ QS21 và Phức hợp kích thích miễn dịch (ISCOMS) (xem ví dụ US 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); dẫn xuất vi khuẩn hoặc vi sinh vật, ví dụ về nó là monophosphoryl lipid A (MPL), MPL đã được 3-O-deaxyl hóa (3dMPL), oligonucleotit chứa CpG-motif, độc tố vi khuẩn ADP-ribosyl hóa hoặc các thể đột biến của nó, như độc tố ruột không bền nhiệt của *E. coli* LT, độc tố tả CT, và các dạng tương tự. Cũng có thể sử dụng chất bổ trợ được mã hóa bởi vector, ví dụ bằng cách sử dụng axit nucleic khác loại mã hóa thể dung hợp của miễn oligome hóa của protein liên kết C4 (C4bp) với kháng nguyên quan tâm (ví dụ Solabomi *et al.*, 2008, *Infect Immun* 76: 3817-23), hoặc bằng cách sử dụng vector mã hóa cả gen chuyển quan tâm và chất chủ vận TLR-3 như dsARN khác loại (ví dụ WO 2007/100908), hoặc các vector tương tự.

Theo các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế không chứa chất bổ trợ.

Dược phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng, ví dụ đối tượng là người. Liều tổng cộng của thành phần hoạt tính của vacxin được cung cấp cho đối tượng trong một lần sử dụng có thể thay đổi như đã biết với bác sĩ lành nghề, và đối với adenovirut nhìn chung nằm trong khoảng từ 1×10^7 hạt virut (vp) đến 1×10^{12} vp, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1×10^8 vp đến 1×10^{11} vp, ví dụ tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 3×10^8 đến 5×10^{10} vp, ví dụ tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10^9 đến 3×10^{10} vp. Đối với vacxin ADN, lượng ADN tổng cộng cho mỗi lần sử dụng có thể, ví dụ nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 10 mg. Nếu sử dụng súng bắn gen, thì thông thường lượng thấp được sử dụng, ví dụ 10 μ g. Để tiêm trong cơ, thường sử dụng lượng cao hơn, ví dụ lên đến 5 mg.

Việc sử dụng dược phẩm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đường dùng chuẩn. Các phương án không làm giới hạn sáng chế bao gồm dùng ngoài đường tiêu hóa, như bằng cách tiêm, ví dụ trong da, trong cơ, v.v., hoặc dưới da hoặc qua da, hoặc dùng qua màng niêm mạc, ví dụ trong mũi, qua đường miệng, trong âm đạo, qua trực tràng, và các đường dùng tương tự. Theo một phương án, chế phẩm được sử dụng bằng cách tiêm trong cơ, ví dụ vào cơ đenta của cánh tay, hoặc cơ rộng ngoài của đùi. Theo các phương án nhất định, vacxin là vacxin ADN, và vacxin này có thể, ví dụ, được sử dụng trong da, ví dụ bằng cách xăm ADN (xem, ví dụ Oosterhuis *et al.*, 2012, *Curr Top Microbiol Immunol* 351: 221-50). Đường dùng này cũng khả thi đối với vector adenovirut. Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế có chứa vector adenovirut và được sử dụng bằng cách tiêm trong cơ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết về các khả năng sử dụng chế phẩm, như vacxin để gây đáp ứng miễn dịch với (các) kháng nguyên trong vacxin.

Đối tượng như được sử dụng trong bản mô tả này tốt hơn nếu là động vật có vú, ví dụ động vật gặm nhấm, ví dụ chuột, hoặc động vật linh trưởng không phải người, hoặc người. Tốt hơn nếu, đối tượng là đối tượng người.

Vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhân có một trong số các giai đoạn bệnh khác nhau do HPV gây ra (cụ thể typ 16), từ mức độ lây nhiễm HPV tình cờ và dai dẳng như vậy (ví dụ, như được phát hiện bằng cách thử nghiệm ADN HPV), tức là trước khi các thương tổn (tiền) ung thư được tạo thành, cũng như sự tạo u trong biểu mô cổ tử cung (CIN; còn được biết là loạn sản cổ tử cung và sự tạo u kế cổ tử cung, mà là sự biến đổi tiền ác tính tiềm năng và sự phát triển bất thường (loạn sản)

tế bào vảy trên bề mặt của cổ tử cung) cho đến và bao gồm ung thư cổ tử cung (như caxinom tế bào vảy cổ tử cung (SCC)). Ngoài ra, các tạo u khác do HPV gây ra, như sự tạo u trong biểu mô âm hộ (VIN), sự tạo u trong biểu mô âm đạo (VaIN), sự tạo u trong biểu mô dương vật (PIN), sự tạo u trong biểu mô hậu môn (AIN) có thể được nhắm đích cũng như nhiều giai đoạn tiến triển của ung thư miệng-hầu (còn được biết là ung thư đầu và cổ), ung thư dương vật, ung thư âm đạo, ung thư âm hộ và ung thư hậu môn. Do đó, vaccin theo sáng chế có thể nhắm đích khoảng rộng các thương tổn do HPV gây ra, và dường như có hiệu quả nhất ở giai đoạn tiền ung thư của bệnh do HPV gây ra, ví dụ tại thời điểm lây nhiễm (dai dẳng) và/hoặc giai đoạn tạo u, trong đó sự biểu hiện của E2, E6 và/hoặc E7 là cao nhất. Cũng có thể kết hợp điều trị sử dụng vaccin theo sáng chế với các hợp chất kháng hoặc có thể khắc phục cơ chế lẫn tránh miễn dịch ở các tế bào ung thư tiến triển, ví dụ, kháng thể kháng PD1/PD-L1, kháng thể kháng CTLA-4 như Ipilimumab, kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng CD25, chất ức chế IDO, kháng thể chủ vận CD40, kháng thể chủ vận CD137, v.v. (xem, ví dụ Hamid và Carvajal, 2013, *Expert Opinion Biol Ther* 13: 847-861; Mellman *et al.*, 2011, *Nature Rev* 480: 480-89). Phương pháp chủng ngừa trị liệu về nguyên tắc cũng có thể được sử dụng để điều trị mụn cóc sinh dục ngoài hoặc tiền thân của nó trong trường hợp vaccin có chứa thêm (các trình tự mã hóa) E6 và/hoặc E7 của typ HPV gây mụn cóc sinh dục ngoài và được sử dụng cho đối tượng bị lây nhiễm typ HPV này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, 'điều trị' nghĩa là việc sử dụng vaccin để gây đáp ứng miễn dịch trị liệu chống lại các tế bào biểu hiện (epitop của) E6 và/hoặc E7 HPV16 ở bệnh nhân, dẫn đến ít nhất là làm giảm mức độ lây nhiễm HPV16 và tốt hơn nếu loại bỏ hoàn toàn sự lây nhiễm HPV16, dẫn đến tạo ra ít nhất là làm chậm và tốt hơn nếu làm dừng sự tiến triển của bệnh do HPV16 gây ra như sự tạo u và/hoặc các triệu chứng của nó. Tốt hơn nếu việc điều trị bằng vaccin cũng dẫn đến sự thuyên giảm nhiều giai đoạn tiến triển hơn của ung thư do HPV gây ra. Ưu tiên nếu sử dụng vaccin cho bệnh nhân có sự lây nhiễm HPV đã được thiết lập mà đã được định typ, vì vậy vaccin mã hóa cho polypeptit của loại HPV tương ứng có thể được sử dụng. Trong trường hợp không được sàng lọc, vaccin cũng có thể được sử dụng ở một bộ phận quần thể có khả năng bị lây nhiễm HPV, tức là những người có hoạt động tình dục. Cũng có thể sử dụng vaccin theo sáng chế cho đối tượng chưa bị lây nhiễm bởi HPV16, ví dụ để sử dụng phòng bệnh, có thể kết hợp với vaccin chống lại typ HPV khác mà bệnh nhân đã bị lây

nhiễm, hoặc theo cách khác ở các đối tượng không bị lây nhiễm. Vacxin theo sáng chế cũng có thể được sử dụng cho đối tượng mà được điều trị thêm bằng các biện pháp khác, ví dụ phẫu thuật (loại bỏ thương tổn do sự lây nhiễm HPV16 gây ra), hoặc điều trị bằng imiquimod (có chứa chất chủ vận TLR-7/8, xem ví dụ Dayaana *et al.*, 2010, *Br J Cancer* 102: 1129 – 36). Hiệu quả của việc điều trị có thể được xác định bằng tế bào học hoặc bằng cách thử nghiệm HPV.

Việc chủng ngừa bao gồm sử dụng vacxin theo sáng chế cho đối tượng hoặc bệnh nhân ít nhất một lần. Cũng có thể đưa ra một hoặc nhiều lần sử dụng tăng cường của một hoặc nhiều vacxin khác. Nếu việc chủng ngừa tăng cường được thực hiện, thông thường, việc chủng ngừa tăng cường này sẽ được sử dụng cho cùng đối tượng tại thời điểm từ một tuần đến một năm, tốt hơn nếu từ hai tuần đến bốn tháng, sau khi sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch với cùng kháng nguyên cho đối tượng trong lần đầu tiên (mà trong các trường hợp này được gọi là ‘chủng ngừa lần đầu’). Trong các chế độ trị liệu tăng cường thay thế, cũng có thể sử dụng các vectơ khác nhau, ví dụ một hoặc nhiều adenovirut thuộc các typ huyết thanh khác nhau, hoặc các vectơ khác như MVA, hoặc ADN, hoặc protein, cho đối tượng làm chủng ngừa lần đầu hoặc chủng ngừa tăng cường. Theo các phương án nhất định, cùng dạng vacxin theo sáng chế được sử dụng ít nhất hai lần cho cùng đối tượng trong chế độ trị liệu lần đầu-tăng cường, ví dụ với cùng adenovirut tái tổ hợp (như Ad26) theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, vacxin theo sáng chế được sử dụng ít nhất hai lần trong chế độ trị liệu lần đầu-tăng cường, nhưng vectơ của vacxin là khác nhau, ví dụ sử dụng hai typ huyết thanh khác nhau của vectơ adenovirut, ví dụ chủng ngừa lần đầu bằng Ad26 tái tổ hợp và chủng ngừa tăng cường bằng Ad35 tái tổ hợp, hoặc ngược lại; hoặc chủng ngừa lần đầu bằng ADN và chủng ngừa tăng cường với vectơ adenovirut, hoặc ngược lại; hoặc chủng ngừa lần đầu bằng vectơ adenovirut và chủng ngừa tăng cường bằng vectơ MVA, hoặc ngược lại. Theo các phương án nhất định, vacxin theo sáng chế được sử dụng ít nhất ba lần, trong chế độ trị liệu lần đầu-tăng cường-tăng cường. Các lần sử dụng tăng cường khác có thể được bổ sung cho chế độ trị liệu.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề xuất việc gây ra đáp ứng CTL chống lại HPV16 ở đối tượng, bao gồm cho đối tượng dùng vacxin theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án không làm giới hạn sáng chế sau đây:

1) axit nucleic mã hóa cho polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1;

- 2) axit nucleic theo phương án 1, trong đó polypeptit này còn chứa ít nhất là một phần của protein E2 HPV;
- 3) axit nucleic theo phương án 2, trong đó ít nhất một phần của protein E2 HPV là từ protein E2 của HPV16;
- 4) axit nucleic theo phương án 2, trong đó polypeptit này có chứa ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng N của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 5) axit nucleic theo phương án 2, trong đó polypeptit này có chứa ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng C của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 6) axit nucleic theo phương án 3, trong đó polypeptit này có chứa ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng N của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 7) axit nucleic theo phương án 3, trong đó polypeptit này có chứa ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng C của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 8) axit nucleic theo phương án 2, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 9) axit nucleic theo phương án 3, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 10) axit nucleic theo phương án 4, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 11) axit nucleic theo phương án 5, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 12) axit nucleic theo phương án 6, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 13) axit nucleic theo phương án 7, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 14) vector có chứa axit nucleic theo phương án 1, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 15) vector có chứa axit nucleic theo phương án 2, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;

- 16) vector có chứa axit nucleic theo phương án 3, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 17) vector có chứa axit nucleic theo phương án 4, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 18) vector có chứa axit nucleic theo phương án 5, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 19) vector có chứa axit nucleic theo phương án 6, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 20) vector có chứa axit nucleic theo phương án 7, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 21) vector có chứa axit nucleic theo phương án 8, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 22) vector có chứa axit nucleic theo phương án 9, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 23) vector có chứa axit nucleic theo phương án 10, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 24) vector có chứa axit nucleic theo phương án 11, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 25) vector có chứa axit nucleic theo phương án 12, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 26) vector có chứa axit nucleic theo phương án 13, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 27) vector theo phương án 14, trong đó vector này là adenovirut;
- 28) vector theo phương án 15, trong đó vector này là adenovirut;
- 29) vector theo phương án 16, trong đó vector này là adenovirut;
- 30) vector theo phương án 17, trong đó vector này là adenovirut;
- 31) vector theo phương án 18, trong đó vector này là adenovirut;
- 32) vector theo phương án 19, trong đó vector này là adenovirut;
- 33) vector theo phương án 20, trong đó vector này là adenovirut;
- 34) vector theo phương án 21, trong đó vector này là adenovirut;
- 35) vector theo phương án 22, trong đó vector này là adenovirut;
- 36) vector theo phương án 23, trong đó vector này là adenovirut;

- 37) vectơ theo phương án 24, trong đó vectơ này là adenovirut;
- 38) vectơ theo phương án 25, trong đó vectơ này là adenovirut;
- 39) vectơ theo phương án 26, trong đó vectơ này là adenovirut;
- 40) vectơ theo phương án 27, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 41) vectơ theo phương án 28, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 42) vectơ theo phương án 29, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 43) vectơ theo phương án 30, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 44) vectơ theo phương án 31, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 45) vectơ theo phương án 32, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 46) vectơ theo phương án 33, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 47) vectơ theo phương án 34, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 48) vectơ theo phương án 35, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 49) vectơ theo phương án 36, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 50) vectơ theo phương án 37, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 51) vectơ theo phương án 38, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 52) vectơ theo phương án 39, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 53) vectơ theo phương án 28, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;

- 54) vector theo phương án 29, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 55) vector theo phương án 30, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 56) vector theo phương án 31, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 57) vector theo phương án 32, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 58) vector theo phương án 33, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 59) vector theo phương án 34, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 60) vector theo phương án 35, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 61) vector theo phương án 36, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 62) vector theo phương án 37, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 63) vector theo phương án 38, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 64) vector theo phương án 39, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 65) vacxin có chứa vector theo phương án 14, và tá dược được dụng;
- 66) vacxin có chứa vector theo phương án 15, và tá dược được dụng;
- 67) vacxin có chứa vector theo phương án 16, và tá dược được dụng;
- 68) vacxin có chứa vector theo phương án 17, và tá dược được dụng;
- 69) vacxin có chứa vector theo phương án 18, và tá dược được dụng;
- 70) vacxin có chứa vector theo phương án 19, và tá dược được dụng;
- 71) vacxin có chứa vector theo phương án 20, và tá dược được dụng;
- 72) vacxin có chứa vector theo phương án 21, và tá dược được dụng;
- 73) vacxin có chứa vector theo phương án 22, và tá dược được dụng;
- 74) vacxin có chứa vector theo phương án 23, và tá dược được dụng;

- 75) vacxin có chứa vector theo phương án 24, và tá dược được dụng;
- 76) vacxin có chứa vector theo phương án 25, và tá dược được dụng;
- 77) vacxin có chứa vector theo phương án 26, và tá dược được dụng;
- 78) vacxin có chứa vector theo phương án 27, và tá dược được dụng;
- 79) vacxin có chứa vector theo phương án 28, và tá dược được dụng;
- 80) vacxin có chứa vector theo phương án 29, và tá dược được dụng;
- 81) vacxin có chứa vector theo phương án 30, và tá dược được dụng;
- 82) vacxin có chứa vector theo phương án 31, và tá dược được dụng;
- 83) vacxin có chứa vector theo phương án 32, và tá dược được dụng;
- 84) vacxin có chứa vector theo phương án 33, và tá dược được dụng;
- 85) vacxin có chứa vector theo phương án 34, và tá dược được dụng;
- 86) vacxin có chứa vector theo phương án 35, và tá dược được dụng;
- 87) vacxin có chứa vector theo phương án 36, và tá dược được dụng;
- 88) vacxin có chứa vector theo phương án 37, và tá dược được dụng;
- 89) vacxin có chứa vector theo phương án 38, và tá dược được dụng;
- 90) vacxin có chứa vector theo phương án 39, và tá dược được dụng;
- 91) vacxin có chứa vector theo phương án 40, và tá dược được dụng;
- 92) vacxin có chứa vector theo phương án 41, và tá dược được dụng;
- 93) vacxin có chứa vector theo phương án 42, và tá dược được dụng;
- 94) vacxin có chứa vector theo phương án 43, và tá dược được dụng;
- 95) vacxin có chứa vector theo phương án 44, và tá dược được dụng;
- 96) vacxin có chứa vector theo phương án 45, và tá dược được dụng;
- 97) vacxin có chứa vector theo phương án 46, và tá dược được dụng;
- 98) vacxin có chứa vector theo phương án 47, và tá dược được dụng;
- 99) vacxin có chứa vector theo phương án 48, và tá dược được dụng;
- 100) vacxin có chứa vector theo phương án 49, và tá dược được dụng;
- 101) vacxin có chứa vector theo phương án 50, và tá dược được dụng;
- 102) vacxin có chứa vector theo phương án 51, và tá dược được dụng;
- 103) vacxin có chứa vector theo phương án 52, và tá dược được dụng;
- 104) vacxin có chứa vector theo phương án 53, và tá dược được dụng;
- 105) vacxin có chứa vector theo phương án 54, và tá dược được dụng;
- 106) vacxin có chứa vector theo phương án 55, và tá dược được dụng;

- 107) vacxin có chứa vectơ theo phương án 56, và tá dược được dụng;
- 108) vacxin có chứa vectơ theo phương án 57, và tá dược được dụng;
- 109) vacxin có chứa vectơ theo phương án 58, và tá dược được dụng;
- 110) vacxin có chứa vectơ theo phương án 59, và tá dược được dụng;
- 111) vacxin có chứa vectơ theo phương án 60, và tá dược được dụng;
- 112) vacxin có chứa vectơ theo phương án 61, và tá dược được dụng;
- 113) vacxin có chứa vectơ theo phương án 62, và tá dược được dụng;
- 114) vacxin có chứa vectơ theo phương án 63, và tá dược được dụng;
- 115) vacxin có chứa vectơ theo phương án 64, và tá dược được dụng;
- 116) phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống lại HPV ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115;
- 117) phương pháp điều trị sự nhiễm HPV (typ 16) dai dẳng, bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc chứng nhiễm HPV dai dẳng;
- 118) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô âm hộ (VIN) (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc VIN;
- 119) phương pháp điều trị ung thư âm hộ (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc ung thư âm hộ;
- 120) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô cổ tử cung (CIN) (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc CIN;
- 121) phương pháp điều trị ung thư cổ tử cung (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc ung thư cổ tử cung;
- 122) phương pháp điều trị ung thư miệng-hầu (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc ung thư miệng-hầu;
- 123) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô dương vật (PIN) (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vacxin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc PIN;

- 124) phương pháp điều trị ung thư dương vật (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc ung thư dương vật;
- 125) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô âm đạo (VaIN) (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc VaIN;
- 126) phương pháp điều trị ung thư âm đạo (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc ung thư âm đạo;
- 127) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô hậu môn (AIN) (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc AIN;
- 128) phương pháp điều trị ung thư hậu môn (có sự nhiễm HPV typ 16 bên dưới), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 65 đến 115 cho đối tượng mắc ung thư hậu môn;
- 129) polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1;
- 130) polypeptit theo phương án 129, trong đó polypeptit này còn chứa ít nhất là một phần của protein E2 HPV;
- 131) polypeptit theo phương án 130, trong đó ít nhất một phần của protein E2 HPV là từ protein E2 của HPV16;
- 132) polypeptit theo phương án 130, trong đó ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng N của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 133) polypeptit theo phương án 130, trong đó ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng C của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 134) polypeptit theo phương án 131, trong đó ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng N của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 135) polypeptit theo phương án 131, trong đó ít nhất là một phần của protein E2 được dung hợp với phía đầu tận cùng C của polypeptit có trình tự SEQ ID NO: 1;
- 136) polypeptit theo phương án 130, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 137) polypeptit theo phương án 131, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;

- 138) polypeptit theo phương án 132, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 139) polypeptit theo phương án 133, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 140) polypeptit theo phương án 134, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 141) polypeptit theo phương án 135, trong đó ít nhất một phần của protein E2 có chứa biến thể của protein E2 có đột biến mà phá hủy liên kết ADN của E2;
- 142) axit nucleic theo phương án 3, mã hóa cho polypeptit theo SEQ ID NO: 3;
- 143) axit nucleic theo phương án 3, mã hóa cho polypeptit theo SEQ ID NO: 5;
- 144) vectơ mã hóa cho axit nucleic theo phương án 142, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 145) vectơ mã hóa cho axit nucleic theo phương án 143, trong đó trình tự mã hóa cho polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động;
- 146) vectơ theo phương án 144, trong đó vectơ này là adenovirut;
- 147) vectơ theo phương án 145, trong đó vectơ này là adenovirut;
- 148) vectơ theo phương án 146, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 149) vectơ theo phương án 147, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 26;
- 150) vectơ theo phương án 146, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 151) vectơ theo phương án 147, trong đó adenovirut là adenovirut ở người có typ huyết thanh 35;
- 152) vacxin có chứa vectơ theo phương án 144, và tá dược được dụng;
- 153) vacxin có chứa vectơ theo phương án 145, và tá dược được dụng;
- 154) vacxin có chứa vectơ theo phương án 146, và tá dược được dụng;
- 155) vacxin có chứa vectơ theo phương án 147, và tá dược được dụng;
- 156) vacxin có chứa vectơ theo phương án 148, và tá dược được dụng;
- 157) vacxin có chứa vectơ theo phương án 149, và tá dược được dụng;
- 158) vacxin có chứa vectơ theo phương án 150, và tá dược được dụng;
- 159) vacxin có chứa vectơ theo phương án 151, và tá dược được dụng;

160) phương pháp gây đáp ứng miễn dịch chống lại HPV ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159;

161) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô âm hộ (VIN), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc VIN;

162) phương pháp điều trị ung thư âm hộ, bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc ung thư âm hộ;

163) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô cổ tử cung (CIN), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc CIN;

164) phương pháp điều trị ung thư cổ tử cung, bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc ung thư cổ tử cung;

165) phương pháp điều trị opopharyngeal cancer, bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc ung thư miệng-hầu;

166) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô dương vật (PIN), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc PIN;

167) phương pháp điều trị ung thư dương vật, bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc ung thư dương vật;

168) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô âm đạo (VaIN), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc VaIN;

169) phương pháp điều trị ung thư âm đạo, bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc ung thư âm đạo;

170) phương pháp điều trị sự tạo u trong biểu mô hậu môn (AIN), bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc AIN;

171) phương pháp điều trị ung thư hậu môn, bao gồm bước dùng vaccin theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 152 đến 159 cho đối tượng mắc ung thư hậu môn.

Việc thực hiện sáng chế này sẽ sử dụng, trừ khi có chỉ dẫn khác, các kỹ thuật thông thường của miễn dịch học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, sinh học tế bào, và ADN tái tổ hợp, mà nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ xem tài liệu Sambrook, Fritsch và Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al., eds, 1987; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR2: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds, 1988.

Sáng chế còn được giải thích thêm trong các ví dụ sau đây. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế trong trường hợp bất kỳ. Chúng chỉ dùng để làm rõ sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: xây dựng polypeptit thiết kế có chứa về cơ bản tất cả các epitop CTL E6 và E7 HPV16

Chúng tôi đã thiết kế polypeptit không tạo khối u, mới (và axit nucleic mã hóa cho nó) mà có chứa về cơ bản tất cả các epitop CTL của các protein E6 và E7 HPV16, và có số lượng tối thiểu của các epitop mới tạo thành mạnh được dự kiến/được dự đoán (các epitop mới tạo thành có nghĩa là các epitop không có mặt ở các protein E6 và E7 HPV16 thể hoang dại). Polypeptit theo sáng chế (đôi khi còn được gọi là 'E6E7SH' ở trong bản mô tả này) có chứa trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1. Axit nucleic được tối ưu hóa bộ ba mã hóa mã hóa cho polypeptit này được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Các phân tử theo sáng chế là các phân tử đơn lẻ, mà mang lại các lợi thế sản xuất so với các chiến lược mà sử dụng đa phân tử. Ngoài ra, polypeptit theo sáng chế có chứa về cơ bản tất cả các epitop CTL giả định mà có mặt ở E6 và E7 thể hoang dại của HPV16, và cùng lúc đó có số lượng tối thiểu của các epitop mới tạo thành mạnh được dự kiến/được dự đoán mà có tiềm năng trội miễn dịch và do đó làm trệch hướng đáp ứng miễn dịch từ các epitop CTL thể hoang dại thích hợp. Do đó các cấu trúc theo sáng chế được ưa thích hơn về mặt miễn dịch so với các phân tử được mô tả bởi các tác giả khác mà thiếu các epitop CTL có thể có và/hoặc có chứa nhiều epitop mới tạo thành hơn hoặc các epitop mới tạo thành khỏe hơn.

Chẳng hạn, cấu trúc nêu trong SEQ ID NO: 1 chỉ chứa một epitop mới tạo thành có chiều dài là chín axit amin có ái lực liên kết được dự đoán <50 nM đối với 20 alen

HLA-A thông dụng nhất, 20 alen HLA-B thông dụng nhất và 20 alen HLA-C thông dụng nhất (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), như được xác định bằng cách sử dụng phương pháp ANN (Lundegaard *et al.*, 2008, *Nucl Acids Res* 36: W509-12) và SMM (Peters *et al.*, 2003, *Bioinformatics* 19: 1765-72) đối với HLA-A và HLA-B và phương pháp NetMHCpan (Hoof *et al.*, 2009, *Immunogenetics* 61: 1-13) đối với HLA-C của công cụ dự đoán đối với 'Sự liên kết peptit với các phân tử MHC lớp I' trên trang web IEDB (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html, phiên bản 2009-09-01B).

Ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, bằng cách sử dụng công cụ dự đoán SMM trên trang web IEDB, các trình tự E6 và E7 bị xáo trộn như được mô tả bởi Oosterhuis *et al.*, 2011, *Int J Cancer* 129: 397-406 và Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93 có chứa mỗi chín epitop mới tạo thành đơn nhất khỏe tiềm năng (IC50 ANN hoặc SMM < 50 nM) đối với 20 HLA-A và -B thông dụng nhất, ở phần lõi. Điều này thậm chí loại trừ các phần phụ dùng trong phương thức tiếp cận đó (trong đó các phần phụ sẽ đóng góp thêm vào các epitop mới tạo thành bổ sung, và có thể trượt ra ngoài trên các epitop MHC II tự nhiên hơn do chiều dài hạn chế của 'phần gồi lên nhau'). Thật vậy, phân tử được cải thiện đã được báo cáo có chứa biến thể có các protein E6 và E7 bị xáo trộn mà đã được mô tả trong WO 2013/083287, có chứa 22 epitop mới tạo thành đơn nhất có chiều dài là chín axit amin có IC50 được dự đoán < 50 nM (ANN, SMM hoặc

NetMHCPan) đối với 20 alen HLA-A thông dụng nhất, 20 alen HLA-B thông dụng nhất và 20 alen HLA-C thông dụng nhất.

Do đó, các phân tử thiết kế theo sáng chế rõ ràng là thuận lợi trong việc có số lượng thấp hơn nhiều của các epitop mới tạo thành được dự đoán so với các phương thức tiếp cận đã được công bố khác trong đó E6 và E7 bị xáo trộn để loại bỏ chức năng.

Axit nucleic mã hóa cho phân tử E6E7SH HPV16 được thiết kế như vậy (tức là polypeptit có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1) được tổng hợp, trình tự axit nucleic này có chứa SEQ ID NO: 2, và được củng cố bên sườn bởi vị trí HindIII và trình tự Kozak trên đầu 5' và vị trí XbaI trên vị trí 3' (tổng hợp tùy chỉnh và tách dòng phân tử tiêu chuẩn tại Invitrogen Life technologies, Đức).

Các mảnh đã được tổng hợp được tách dòng bằng cách sử dụng HindIII và XbaI vào vector biểu hiện tiêu chuẩn, pcADN2004.Neo, chứa cả thành phần đánh dấu kháng khuẩn (Ampixilin) và thành phần đánh dấu kháng động vật có vú (Neomycin), để thu được vector plasmit mã hóa cho phân tử theo sáng chế, ví dụ cho các thí nghiệm dựa trên sự chuyển nhiễm (tạm thời).

Các phân tử này có thể được dùng như vậy, nhưng cũng có thể được dùng làm cơ sở cho các phân tử khác mà có chứa các đặc điểm bổ sung. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, một số biến thể khác được điều chế như được mô tả dưới đây.

Trình tự protein dung hợp E6E7SH HPV16 có thể được kết hợp với các trình tự của các protein sớm HPV16 khác để hướng đích các cá thể có sự nhiễm dai dẳng và để mở rộng danh mục miễn dịch ở cá thể được gây miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch chống lại E2 đã được đề xuất để đóng vai trò quan trọng trong việc thanh thải sự nhiễm HPV16 (de Jong *et al.*, 2002, *Cancer Res* 62: 472-479). Sự dung hợp của E2 vào E6E7SH sẽ tạo ra thành phần vacxin mà chứa kháng nguyên chống lại các giai đoạn của ung thư có liên quan đến HPV từ sự nhiễm dai dẳng đến ung thư xâm lấn hoặc bệnh tái hồi/dai dẳng sau khi phẫu thuật LEEP. Do đó, ví dụ không làm giới hạn sáng chế về các phương án này là, chúng tôi đã điều chế trình tự mã hóa cho protein dung hợp của E6E7SH với E2 ở đầu tận cùng N của nó. Trong trình tự E2 các cải biến có thể được tạo ra để phá hủy hoạt tính liên kết ADN mà có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen ở các tế bào biểu hiện protein dung hợp. Chúng tôi đã gây đột biến Glyxin ở vị trí 293, Lysin ở vị trí 299 và Xystein ở vị trí 300 của protein E2 HPV16 thể hoang dại lần lượt thành Valin, Methionin và Arginin. Mỗi đột biến này trên bản thân nó đã hoàn toàn phá hủy sự liên kết của E2

với các trình tự ADN mà chứa miền liên kết E2 (Prakash et al., 1992, *Genes Dev* 6: 105-16).

Polypeptit thu được được gọi là E2E6E7SH HPV16 và có chứa SEQ ID NO: 3. Trình tự đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa mã hóa cho polypeptit này được điều chế và được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Chúng tôi cũng đã tạo cấu trúc biến thể trong đó cùng protein đột biến E2 được dung hợp với đầu tận cùng C của polypeptit dung hợp E6E7SH HPV16, mang lại sự tăng lên cho polypeptit được gọi là E6E7E2SH HPV16, mà có chứa SEQ ID NO: 5. Trình tự mã hóa cho cấu trúc này được nêu dưới dạng SEQ ID NO: 6.

Để làm đối chứng, chúng tôi cũng đã tạo cấu trúc các trình tự mã hóa cho polypeptit mà có chứa các trình tự thể hoang dại cho E6 và E7 HPV16 chiều dài đầy đủ dưới dạng protein dung hợp (E6 từ aa 1 đến 158 được dung hợp trực tiếp với E7 từ aa 1 đến 98, được gọi tên trong bản mô tả này là E6E7wt).

Chúng tôi cũng đã thử nghiệm hiệu quả của việc bổ sung các trình tự dẫn đầu vào polypeptit. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, trình tự mã hóa cho trình tự dẫn đầu IgE (Ví dụ xem tài liệu US 6,733,994) [trình tự của peptit dẫn đầu được nêu trong SEQ ID NO: 7] được dung hợp ở đầu tận cùng N của một số cấu trúc, ví dụ ở cấu trúc E6E7wt, mà tạo ra LSE6E7wt, và ở cấu trúc E2E6E7SH, mà tạo ra LSE2E6E7SH. Hiệu quả của chúng được tăng cường đáng kể ($p < 0,05$) khả năng gây miễn dịch so với cùng kháng nguyên mà không có trình tự LS khi đo bằng phân tích E7-tetrame ở chuột được gây miễn dịch (chẳng hạn như có thể thấy trên Hình 9).

Các trình tự mà mã hóa cho các polypeptit E6E7SH theo sáng chế, có hoặc không có E2, chẳng hạn có thể được biểu hiện từ cấu trúc ADN, từ ARN hoặc từ vector virus. Hình 1 chứng tỏ sự biểu hiện ở tế bào HEK-293T khi chuyển nhiễm tạm thời bằng vector ADN biểu hiện gen chuyển như được mô tả ở trên. Sau khi chuyển nhiễm, thu hoạch các tế bào và phân tích dịch chiết tế bào bằng SDS-PAGE và thẩm tách western bằng kháng thể chống lại HPV16 E7. Thí nghiệm này chứng minh sự biểu hiện của protein dung hợp được mong đợi có kích thước thích hợp khi chuyển nhiễm vector biểu hiện.

Vector adenovirus có thể được dùng để biểu hiện E6E7, có hoặc không có E2, và có hoặc không có các trình tự khác để làm tăng thêm khả năng gây miễn dịch của protein dung hợp được mã hóa.

Gen, mã hóa cho trình tự đối chứng E6E7 HPV16 thể hoang dại hoặc trình tự thiết kế HPV được mô tả ở trên là gen được tối ưu hóa cho sự biểu hiện ở người và được tổng hợp, bởi Geneart. Trình tự Kozak (5' GCCACC 3') được bao gồm trực tiếp ở phải trước bộ ba mở đầu ATG, và hai bộ ba kết thúc (5' TGA TAA 3') được bổ sung ở đầu của trình tự mã hóa tương ứng. Gen này được cài xen trong plasmid pAdApt35BSU và trong plasmid pAdApt26 (Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87, 2135-43) thông qua các vị trí HindIII và XbaI.

Tất cả các adenovirut được tạo ra trong tế bào PER.C6 bằng cách tái tổ hợp cùng loại đơn lẻ và được tạo ra như được mô tả trước đây (đối với rAd35: Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87: 2135-43; đối với rAd26: Abbink *et al.*, 2007, *J Virol* 81: 4654-63). Tế bào PER.C6 (Fallaux *et al.*, 1998, *Hum Gene Ther* 9: 1909-17) được duy trì trong môi trường Eagle được cải biến Dulbecco (DMEM) với 10% huyết thanh thai bò (FBS), được bổ sung 10 mM MgCl₂.

Một cách ngắn gọn, tế bào PER.C6 được chuyển nhiễm bằng vector plasmid Ad, bằng cách sử dụng Lipofectamine theo hướng dẫn sử dụng do nhà sản xuất đưa ra (Life Technologies). Thu hoạch các tế bào một ngày sau khi đạt được hiệu quả gây bệnh tế bào (CPE) đầy đủ, rửa đông, ly tâm trong thời gian 5 phút ở tốc độ 3.000 vòng/phút, và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C. Virut được tinh chế bằng và được khuếch đại trong tế bào PER.C6 được nuôi cấy trong giếng đơn lẻ của 24 đĩa nuôi cấy mô nhiều giếng. Tiến hành khuếch đại thêm nữa trong tế bào PER.C6 được nuôi cấy trong bình thót cổ nuôi cấy mô T25 và tiếp đó là trong bình thót cổ nuôi cấy mô T175. Dịch tan tế bào thô điều chế từ tế bào thu được sau khi bình thót cổ T175, từ 3 đến 5 ml được dùng để cấy truyền bình thót cổ nuôi cấy mô năm lớp 24×T1000 có chứa 70% lớp hợp lưu của tế bào PER.C6. Virut được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế CsCl hai bước. Cuối cùng, virut được lưu trữ trong các phân phân ước ở nhiệt độ -85°C.

Ad35.HPV16-E6E7wt, và Ad35.HPV16-E6E7SH là các vector typ huyết thanh 35 (Ad35) adenovirut tái tổ hợp có chứa các trình tự nucleotit được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện, lần lượt, protein dung hợp của các protein E6 và E7 HPV16 thể hoang dại (E6E7wt), và biến thể protein dung hợp thiết kế như được mô tả ở trên (E6E7SH, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1). Các trình tự E6 và E7 kết hợp được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động CMV trong vùng E1 của hệ gen adenovirut

bị làm khuyết E1,E3. Ad26.HPV16-E6E7wt, và Ad26.HPV16-E6E7SH là các vector tương đương dựa trên typ huyết thanh adenovirus tái tổ hợp 26.

Tương tự, vector adenovirus tái tổ hợp dựa trên Ad26 và Ad35 được tạo ra mà mã hóa cho biến thể E2E6E7SH HPV16 (SEQ ID NO: 3). Cũng như vậy, Ad26 và Ad35 mã hóa cho biến thể E6E7E2SH HPV16 (SEQ ID NO: 5) được tạo ra. Ngoài ra, vector Ad35 mã hóa cho protein dung hợp E2E6E7SH có trình tự dẫn đầu IgE ở đầu tận cùng N được tạo ra, được đặt tên là Ad35.HPV16-LSE2E6E7SH. Ngoài ra adenovirus đổi chứng có E6E7wt dung hợp với trình tự dẫn đầu IgE ở đầu tận cùng N được tạo ra.

Adenovirus tái tổ hợp được tạo ra trên tế bào PER.C6 và được tinh chế bằng cách ly tâm trên gradien xesi clorua.

Các ví dụ khác về cấu trúc theo sáng chế mà được ghép đôi với hệ chất kim hãm được nêu trong ví dụ muộn dưới đây.

Ví dụ 2 Sự thiếu hoạt tính biến nạp của cấu trúc thiết kế

Các protein E6 và E7 HPV16 thể hoang dại có tiềm năng tạo khối u, mà hiển nhiên là hoạt tính biến nạp trong các thử nghiệm nhất định, chẳng hạn như sự hình thành khuẩn lạc trong thử nghiệm aga mềm (Massimi và Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Polypeptit E6E7SH như được mô tả trong ví dụ 1 có chứa các mảnh của các protein E6 và E7 theo kiểu sắp xếp lại thứ tự. Điều này được mong đợi là làm loại bỏ tiềm năng tạo khối u, như có thể đo được chẳng hạn bằng hoạt tính biến nạp giảm đi đáng kể khi so với một trong các protein E6 và E7 thể hoang dại trong các thử nghiệm này.

Các tác giả khác đã báo cáo rằng biến thể bị xáo trộn gen của E6 và E7 HPV16 quả thật bị mất khả năng gây ung thư của chúng (Öhlschläger *et al.*, 2006, *Vaccine* 24: 2880-93; Henken *et al.*, 2012, *Vaccine* 30: 4259-66), chứng tỏ rằng việc xáo trộn gen phá hỏng chức năng thể hoang dại của các protein E6 và E7.

Để đánh giá sự mất đặc tính tạo khối u, chúng tôi đánh giá khả năng của cấu trúc E6E7SH của chúng tôi để mang lại khả năng phát triển trong aga mềm cho tế bào NIH 3T3 (như được mô tả bởi ví dụ Massimi và Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Sự chuyển nhiễm của tế bào NIH3T3 bằng plasmit biểu hiện E7 HPV16 thể hoang dại nhất quán dẫn đến sự hình thành khuẩn lạc. Trong các thử nghiệm này, sự biểu hiện của một mình E6 HPV16 thể hoang dại không gây ra sự hình thành khuẩn lạc ở bên trên nền. Điều này phù hợp với các quan sát đã được công bố rằng E7wt hiệu quả hơn nhiều

so với E6wt trong thử nghiệm này (Sedman *et al.*, 1991, *J Virol* 65: 4860-66). Sự chuyển nhiễm bằng cấu trúc E6E7SH của chúng tôi không dẫn đến sự phát triển của khuẩn lạc của tế bào trong aga mềm (Hình 2) trong bốn thí nghiệm độc lập, chứng tỏ rằng axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế, E6E7SH, bị mất khả năng biến nạp mà được kết hợp với E7.

Khả năng tạo khối u của E6 và E7 lần lượt được kết hợp với khả năng làm giảm hàm lượng của các protein tế bào p53 và pRb. Các thử nghiệm thoái hóa p53 và pRb được thực hiện để chứng minh rằng axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế, E6E7SH, cấu trúc không có hoạt tính sinh học kết hợp với E6 và E7 thể hoang dại ở cấp độ phân tử. Nói tóm lại, E6wt HPV16 và cấu trúc E6E7SH của chúng tôi được biểu hiện ở tế bào NCI-H1299 mà thiếu p53 nội sinh cho thử nghiệm thoái hóa p53. Đối với thử nghiệm thoái hóa pRb E7wt HPV16 và cấu trúc E6E7SH được biểu hiện ở tế bào Saos-2 vô hiệu pRb. Như có thể thấy trên Hình 3, sự đồng biểu hiện của p53 với E6wt, chứ không phải là với E6E7SH, dẫn đến hàm lượng p53 giảm (các ô A và B). Cũng như vậy, các ô 3C và 3D cho thấy rằng sự đồng biểu hiện của pRb với E7wt, chứ không phải là với E6E7SH, dẫn đến hàm lượng pRB giảm. Dữ liệu này chứng tỏ rằng axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế không có khả năng tạo thành khuẩn lạc trong aga mềm và không chứa các hoạt tính sinh học chính của các polypeptit E6 và E7 thể hoang dại, cụ thể là sự làm bất hoạt lần lượt p53 và pRb.

Để chứng minh thêm độ an toàn của cấu trúc axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế, chúng tôi đã tạo ra việc sử dụng tế bào keratin bao quy đầu ở người sơ cấp mà là tế bào đích tự nhiên cho sự biến nạp qua trung gian HPV. Sự bất tử hóa của tế bào keratin ở người sơ cấp đòi hỏi tác động của cả E6 và E7 thể hoang dại (Munger *et al.*, 1989, *J Virol* 63: 4417-21). Thử nghiệm này có khả năng là thử nghiệm *in vitro* thích hợp nhất về mặt sinh lý để chứng minh độ an toàn của cấu trúc của chúng tôi (Massimi và Banks, 2005, *Methods Mol Med* 119: 381-395). Tế bào được tải nạp bằng lentivirus biểu hiện E6 và E7 thể hoang dại từ HPV16 (E6E7wt) gây ra sự bất tử hóa trong tế bào keratin sơ cấp như được chỉ ra bởi sự kéo dài của tuổi thọ của chúng khi so với tế bào đối chứng không được tải nạp (Hình 4) và sự hoạt hóa của hTERT, dưới đơn vị xúc tác của telomeraza (dữ liệu không được thể hiện). Sự biểu hiện của polypeptit theo sáng chế (E6E7SH) không thể làm kéo dài tuổi thọ so với tế bào keratin được tải nạp hoặc không được tải nạp GFP. Kết quả tương tự thu được ở hai thể cho độc lập bổ

sung (dữ liệu không được thể hiện). Xem xét cùng với dữ liệu này chứng tỏ rằng cấu trúc của chúng tôi bị mất khả năng to gây ra sự bất tử hóa ở tế bào keratin ở người sơ cấp, mà được coi như là mẫu sinh lý tốt.

Cấu trúc khác trong đó các mảnh của E6 và E7 HPV16 được kết hợp lại theo thứ tự khác cũng không có khả năng bất tử hóa tế bào keratin bao quy đầu ở người sơ cấp. Tuy nhiên, quan sát thấy tuổi thọ tăng lên đến xấp xỉ 120-150 ngày đối với cấu trúc đó. Điều này chỉ ra một số điều không thể dự đoán được trong lĩnh vực này, và chứng tỏ tính vượt trội của các phân tử thiết kế theo sáng chế ở khía cạnh liên quan đến độ an toàn này.

Cùng với nhau, các thí nghiệm trong ví dụ này đưa ra bằng chứng mạnh mẽ về sự thiếu hoạt tính biến nạp của axit nucleic mã hóa cho polypeptit theo sáng chế, và do đó độ an toàn được cải thiện mạnh so với các cấu trúc thể hoang dại E6 và E7 HPV16.

Ví dụ 3. Đáp ứng miễn dịch đối với cấu trúc thiết kế E6E7SH

Chúng tôi đã điều chế vectơ ADN và vectơ adenovirut, như được mô tả trong Ví dụ 1.

Chúng tôi đã sử dụng chủng chuột CB6F1 để đo đáp ứng miễn dịch, dựa trên thí nghiệm ban đầu trong đó con chuột mà được gây miễn dịch bằng plasmit ADN mã hóa cho E2, hoặc E6 hoặc E7 thể hoang dại, và sự gây miễn dịch bằng kháng nguyên E2, E6 và E7 HPV16 gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào rộng hơn ở con chuột CB6F1 so với ở con chuột C57BL/6 hoặc con chuột Balb/c. Trong thí nghiệm riêng rẽ con chuột được gây miễn dịch bằng vectơ ADN mã hóa cho các phân tử theo sáng chế và đáp ứng miễn dịch tế bào được đo. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu E7 HPV16 có thể được đo ở con chuột được gây miễn dịch bằng plasmit ADN biểu hiện E6E7SH (Hình 5).

Dữ liệu sau đây được thể hiện trong ví dụ này là từ các thí nghiệm ở chuột mà được thực hiện với vectơ adenovirut.

Để đánh giá khả năng gây miễn dịch do vacxin gây ra, con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng vectơ adeno (Ad35) biểu hiện E6E7wt, LSE6E7wt, E6E7SH hoặc vectơ adeno không mã hóa cho gen chuyên (Rỗng). Hai liều lượng được thử nghiệm để dùng cho chuột: 5×10^9 hạt virut (vp) và 1×10^{10} vp. Hai và tám tuần sau khi gây miễn dịch các con chuột bị giết chết và được phân lập tế bào lách được kích thích qua đêm bằng nhóm peptit 15mer E7 HPV16. Phân tích đáp ứng đặc hiệu E7 vào hai tuần và vào tám tuần bằng IFN γ ELISPOT. Dữ liệu được thể hiện trên Hình 6.

Điều này cho thấy rằng sự gây miễn dịch cho chuột bằng Ad35.HPV16-E6E7SH gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu E7 khi đo bằng phân tích ELISPOT. Ngoài ra, kết quả trên Hình 6 chứng tỏ khả năng có thể làm tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại gen chuyển được biểu hiện ở adenovirut bằng cách bổ sung trình tự dẫn đầu đầu tận cùng N vào gen chuyển.

Tiếp theo hiệu quả của việc bổ sung E2 vào polypeptit E6E7SH đối với khả năng gây miễn dịch được thử nghiệm. Vector Ad35 mã hóa cho polypeptit mà có E2 dung hợp với đầu tận cùng N (E2E6E7SH) hoặc với đầu tận cùng C (E6E7E2SH). Con chuột CB6F1 được gây miễn dịch bằng liều lượng 1×10^{10} vp. Hình 7 (nhuộm màu E7-tetrame) và Hình 8 (Bảng C, IFN γ ELISPOT) thể hiện đáp ứng miễn dịch chống lại E7, mà đối với cấu trúc thiết kế bao gồm E2 có xu hướng cao hơn so với cấu trúc không có E2, mặc dù sự khác biệt không đáng kể về mặt thống kê. Đáp ứng chống lại E2 là cao hơn đối với vector adenovirut chỉ mã hóa cho E2 so với đáp ứng đối với vector adenovirut mà có E2 được dung hợp với polypeptit E6E7SH thiết kế (Hình 8B), với sự khác biệt là đáng kể đối với cả E2 so với E2E6E7SH và E2 so với E6E7E2SH (giá trị p: <0,05).

Kết luận là cấu trúc thiết kế mà bao gồm thêm E2 vẫn có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại E7, và ngoài ra còn tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại E2, do đó làm tăng độ rộng của đáp ứng miễn dịch đối với các cấu trúc mà không bao gồm E2.

Việc bổ sung trình tự dẫn đầu được thể hiện là dẫn đến đáp ứng đặc hiệu E7 cao hơn khi được dung hợp với đầu tận cùng N của protein dung hợp của E6 và E7 thể hoang dại (Hình 6C). Tương tự, hiệu quả của trình tự dẫn đầu lên khả năng gây miễn dịch của protein dung hợp E2E6E7SH được xác định. Do đó, vector Ad35 mã hóa cho polypeptit thiết kế, có hoặc không có E2 đầu tận cùng N và vector Ad35 mã hóa cho LSE2E6E7SH được dùng để gây miễn dịch cho con chuột và mẫu máu được lấy vào các khoảng cách hai tuần để đo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu E7 (Hình 9). Như được thể hiện trên Hình 7 và Hình 8 sự có mặt của E2 được dung hợp ở đầu tận cùng N hoặc C với E6E7SH có xu hướng làm tăng đáp ứng miễn dịch. Việc bổ sung trình tự dẫn đầu IgE làm tăng hơn nữa đáp ứng đặc hiệu E7 (Hình 9B). Theo thời gian, quan sát thấy đáp ứng miễn dịch được duy trì ở tất cả ba vector adenovirut mà mã hóa cho các phân tử thiết kế theo sáng chế, và đáp ứng cao nhất sau khi gây miễn dịch tương ứng với đáp ứng cao nhất trong khoảng thời gian diễn ra của thí nghiệm.

Kết luận là đáp ứng gây ra bởi cấu trúc thiết kế mà bao gồm thêm E2 đầu tận cùng N có thể được làm tăng bằng cách bổ sung các trình tự đặc hiệu, ví dụ, trình tự dẫn đầu IgE, mà hướng đích protein được mã hóa vào khoang tế bào đặc hiệu.

Đáp ứng miễn dịch tế bào chống lại peptit theo sáng chế có thể được gây ra bằng các loại vector adenovirut khác nhau. Trong thí nghiệm trước chúng tôi đã sử dụng vector Ad35, trong khi ở thí nghiệm trên Hình 10, chuột được gây miễn dịch bằng vector adenovirut Ad26 biểu hiện E2E6E7SH. Dữ liệu cho thấy rằng sự gây miễn dịch bằng vacxin dựa trên Ad26 cũng cảm ứng tế bào T đặc hiệu E7. Ngoài ra, kết quả chứng tỏ rằng sự gây miễn dịch thứ hai bằng vector adenovirut Ad35 biểu hiện E2E6E7SH làm tăng cường hơn nữa đáp ứng miễn dịch tế bào (Hình 10).

Ví dụ 4. Khả năng gây miễn dịch của cấu trúc thiết kế ở rhesus macaques.

Để đánh giá khả năng của vector adenovirut biểu hiện trình tự thiết kế theo sáng chế để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật linh trưởng không phải là người, rhesus macaques được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong cơ bằng vector adeno (Ad26) biểu hiện E2E6E7SH hoặc vector adeno không mã hóa cho gen chuyển (Rỗng), bằng liều lượng 1×10^{11} vp. Tám tuần sau khi gây miễn dịch đáp ứng miễn dịch được tăng cường bởi sự gây miễn dịch bằng vector Ad26 biểu hiện cùng kháng nguyên. Vào tuần 16 các con vật tiếp nhận một lần tiêm nữa bằng vector Ad35 biểu hiện cùng kháng nguyên. Mẫu máu được lấy vào một vài thời điểm và tế bào bạch cầu đã được phân lập được kích thích qua đêm bằng nhóm peptit tương ứng với E2, E6 hoặc E7 HPV16. Các đáp ứng đặc hiệu được đo bằng IFN γ ELISPOT. Dữ liệu được thể hiện trên Hình 11. Ngoài ra vào tuần 10 và tuần 18 sau sự gây miễn dịch đầu tiên, đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu với peptit bao trùm các mối nối mới theo sáng chế được đánh giá. Sự cảm ứng của đáp ứng IFN γ là ở tất cả các con vật ở dưới giới hạn phát hiện < 50 SFU trong mỗi 1×10^6 PBMC (dữ liệu không được thể hiện).

Dữ liệu này cho thấy rằng sự gây miễn dịch của động vật linh trưởng không phải là người bằng Ad26.HPV16-E2E6E7SH dẫn đến đáp ứng miễn dịch tế bào chống lại cả ba protein HPV16 mà có mặt ở gen chuyển được mã hóa, nhưng không chống lại các mối nối mới. Các đáp ứng có thể được tăng cường bằng cách gây miễn dịch bổ sung bằng Ad26.HPV16-E2E6E7SH và sự tăng cường bổ sung vào tuần 16 bằng vector Ad35 tương ứng làm tăng hơn nữa đáp ứng miễn dịch đặc hiệu E2, E6 và E7 HPV16.

Việc dùng chất tăng cường miễn dịch vào tuần 72 lại bằng Ad26.HPV16-E2E6E7SH dẫn đến sự tăng lên của đáp ứng miễn dịch tế bào HPV16, mà sau một ít tuần bị suy giảm (không được thể hiện).

Trong thí nghiệm riêng rẽ (không được thể hiện), Rhesus macaques được gây miễn dịch bằng cách dùng trong âm đạo bằng dạng kết hợp của hai vectơ adenovirut, một vectơ biểu hiện E6E7SH HPV16 và vectơ kia biểu hiện protein L1 HPV16. Các đáp ứng tế bào thấp nhưng có thể đo được ở tế bào máu đơn nhân ngoại vi chống lại cả E6 và E7. Trong các thí nghiệm này, phát hiện thấy đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh chống lại L1.

Ví dụ 5. Hiệu quả trị liệu ở mẫu khối u chuột.

Polypeptit theo sáng chế có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu HPV16 ở các con vật, mà có thể gây ra hiệu quả trị liệu lên tế bào biểu hiện E6 và/hoặc E7 HPV16. Sự gây miễn dịch trị liệu, tức là sự gây miễn dịch sau khi sự phát triển khối u đã bắt đầu, có thể được dùng để chứng minh hiệu quả của ứng viên vacxin HPV trị liệu. Hiệu quả trị liệu của vectơ Ad26 và Ad35 được thử nghiệm ở con chuột mà đã được tiêm bằng tế bào TC-1 (tế bào chuột biểu hiện E6 và E7 HPV16) (Lin *et al.*, 1996, *Cancer Res* 56: 21-6). Tế bào TC-1 sẽ tạo thành khối u rắn trong từ vài ngày tới hàng tuần sau khi tiêm dưới da ở chuột. Khi không có vacxin khối u phát triển nhanh và đạt đến kích thước định trước bằng 1000 mm³ trong 30 ngày (các bảng D và E). Khi đạt đến kích thước này các con chuột bị giết vì lí do đạo đức.

Với kế hoạch gây miễn dịch tăng cường đầu tiên bằng SLP (dùng làm đối chứng dương; Kenter *et al.*, 2009, *N Engl J Med* 361:1838-47; Zwaveling *et al.*, 2002, *J Immunol* 169:350-8) hoặc vectơ adenovirut biểu hiện HPV16-E2E6E7SH, quan sát thấy sự giảm rõ rệt của sự phát triển của khối u do TC-1 gây ra (Hình 12, các bảng B và C). Sự kiểm tra kĩ lưỡng hơn của 30 ngày đầu tiên sau các lần gây miễn dịch đầu tiên (các bảng F và G) cho thấy rằng sự gây miễn dịch bằng vectơ adeno biểu hiện E2E6E7SH có ảnh hưởng về cơ bản lớn hơn lên sự phát triển khối u so với sự gây miễn dịch bằng SLP. Tốc độ phát triển ban đầu thấp hơn nhiều và trong hầu hết các trường hợp khối u bị co lại. Ở 3 trong số 11 con chuột được gây miễn dịch bằng vectơ adenovirut, khối u bị triệt tiêu hoàn toàn, mà được phản ánh trong đồ thị sống sót (Bảng H).

Tóm lại, sự gây miễn dịch bằng vectơ adenovirut biểu hiện polypeptit theo sáng chế làm giảm đáng kể sự phát triển khối u hoặc triệt tiêu hoàn toàn khối u đã được thiết

lập trong mẫu thử thách đã được thiết lập rõ ràng đối với bệnh ung thư do HPV16 gây ra.

Ví dụ 6: Sử dụng hệ chất kìm hãm để cải thiện năng suất và độ ổn định di truyền của vector adenovirut biểu hiện kháng nguyên có nguồn gốc từ HPV

Trước đây đã có báo cáo rằng gen chuyển được cài xen vào vector adenovirut dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động có hoạt tính cấu trúc mạnh có thể, tùy thuộc vào đặc tính của sản phẩm gen chuyển, ảnh hưởng một cách tiêu cực đến sự sản xuất vector (Yoshida & Yamada, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-30; Rubinchik *et al.*, 2000, *Gene Ther* 7:875-85; Matthews *et al.*, 1999, *J Gen Virol* 80:345-53; Edholm *et al.*, 2001, *J Virol* 75:9579-84; Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73). Ví dụ về vấn đề năng suất vector phụ thuộc vào gen chuyển bao gồm sự giải thoát và sự phát triển vector không hiệu quả, hiệu suất vector cuối cùng thấp, và, trong các trường hợp nghiêm trọng, sự phát triển quá nhanh của thể đột biến virus có băng gen chuyển khiếm khuyết. Để giải quyết các vấn đề này, nhiều nghiên cứu thăm dò khả năng làm chậm sự biểu hiện gen chuyển vector trong quá trình sao chép vector ở tế bào sản xuất (Matthews *et al.*, 1999, *J Gen Virol* 80:345-53; Edholm *et al.*, 2001, *J Virol* 75:9579-84; Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham *et al.*, 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert *et al.*, 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). Về vấn đề này, các hệ ức chế khác nhau đã được cài đặt trước đó trong phạm vi của vector Ad và quả thật đã thể hiện làm cải thiện năng suất vector và độ ổn định di truyền đối với các vector mã hóa cho các loại gen chuyển (ức chế) khác nhau.

Đã quan sát thấy rằng một số vector adenovirut được mô tả ở trong bản mô tả này, cũng như là một số vector adenovirut khác mã hóa cho các biến thể kháng nguyên HPV nhất định, biểu lộ một số vấn đề năng suất vector phụ thuộc vào gen chuyển được mô tả ở trên, và do đó có khả năng được cải thiện hơn nữa ở khía cạnh đó. Do đó chúng tôi đã tìm kiếm để nghiên cứu xem việc sử dụng các hệ thống này để ngăn chặn sự biểu hiện gen chuyển vector có thể cải thiện đặc tính sản xuất của vector Ad biểu hiện kháng nguyên có nguồn gốc từ HPV như các vector được mô tả ở trong bản mô tả này. Để đạt được mục đích này, chúng tôi đã lắp đặt hai hệ chất kìm hãm-vùng điều khiển hiện hữu, tức là TetR/TetO (Yao & Eriksson, 1999, *Hum Gene Ther* 10:419-22, EP0990041B1) và CymR/CuO (Mullick *et al.*, 2006, *BMC Biotechnol* 6:43), vào nền tảng vector adenovirut của chúng tôi. Cả hai hệ thống TetR/TetO và CymR/CuO đã được sử dụng từ trước bởi

các tác giả khác để cải thiện năng suất vector adenovirut thông qua việc làm câm gen chuyển vector trong quá trình sao chép vector (Gall *et al.*, 2007, *Mol Biotechnol* 35:263-73; Cottingham *et al.*, 2012, *Biotechnol Bioeng* 109:719-28; Gilbert *et al.*, 2014, *J Virol Methods* 208:177-88). Việc lắp đặt hai hệ thống này bao gồm việc tạo ra vector adenovirut biểu hiện các gen quan tâm dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động CMV có chứa trình tự TetO hoặc trình tự CuO. Ngoài ra, việc lắp đặt này đòi hỏi việc tạo ra các dòng tế bào biểu hiện ổn định protein kìm hãm cùng nguồn tương ứng (tức là TetR hoặc CymR).

Một số vector gốc Ad26 và Ad35, bị làm khuyết E1 được tạo ra trong đó các trình tự mã hóa cho các polypeptit khác loại được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động CMV có chứa các trình tự điều khiển TetO hoặc CuO. Trước hết, các trình tự có chứa TetO hoặc CuO nhất định (SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, lần lượt) được cài xen ở gần vị trí bắt đầu phiên mã (TSS) của trình tự khởi động CMV (SEQ ID NO: 13) của các plasmit pAdapt26 và pAdapt35.Bsu (Abbink *et al.*, 2007, *J Virol* 81:4654-63; Havenga *et al.*, 2006, *J Gen Virol* 87:2135-43). Các trình tự có chứa vùng điều khiển được cài xen chính xác là ở cùng vị trí của trình tự khởi động CMV như được mô tả trước đây đối với hai hệ thống (Yao & Eriksson, 1999, *Human Gene Ther* 10:419-22; EP0990041B1; Mullick *et al.*, 2006, *BMC Biotechnol* 6:43; EP1385946B1). Cụ thể, đối với TSS (như được gán ban đầu; Stenberg *et al.*, 1984, *J. Virol.* 49: 190-9), các trình tự có chứa TetO và CuO được cài xen trực tiếp xuôi dòng lần lượt của các vị trí -20 và +7. Trong SEQ ID NO: 13, hai vị trí này lần lượt tương ứng với các vị trí 716 và 742. Trình tự khởi động CMV có chứa vùng điều khiển thu được được gọi tên, lần lượt, là CMVTetO và CMVCuO. Tiếp theo, các gen chuyển khác nhau được cài xen xuôi dòng của trình tự khởi động CMV (được cải biến) của cấu trúc thu được bằng cách sử dụng các vị trí giới hạn HindIII và XbaI. Các gen chuyển này bao gồm các gen mã hóa cho protein dung hợp của protein huỳnh quang màu xanh lá cây và luciferaza (GFP-Luc), LSE2E6E7SH từ sáng chế này, và polypeptit khác có độ tương tự nào đó với LSE2E6E7SH (cấu trúc được đề cập đến trong ví dụ này là 'HPVAg'). HPVAg có chứa cùng trình tự dẫn đầu như có mặt trong LSE2E6E7SH, cũng như là các trình tự E2, E6, và E7 của HPV16. Bằng cách sử dụng các phương pháp như được mô tả ở trong bản mô tả này, các plasmit pAdapt26 và pAdapt35.Bsu đã được cải biến thu được được dùng để

tạo ra vector adenovirus biểu hiện vùng báo cáo và gen chuyển HPV nêu trên dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động CMVTetO hoặc CMVCuO.

Các dòng tế bào biểu hiện TetR hoặc CymR được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm ổn định tế bào PER.C6® bằng cách sử dụng lần lượt, pcADNTM6/TR plasmid (Life Technologies, V1025-20) và dẫn xuất của pcADNTM6/TR trong đó trình tự mã hóa TetR (SEQ ID NO: 14, mà mã hóa cho polypeptit SEQ ID NO: 15) được thay bằng trình tự mã hóa CymR được tối ưu hóa bộ ba mã hóa (SEQ ID NO: 16, mà mã hóa cho polypeptit SEQ ID NO: 17). Sự tạo thành dòng tế bào ổn định được thực hiện trên quy mô lớn như được mô tả bởi nhà cung cấp pcADNTM6/TR bằng cách sử dụng thử nghiệm dựa trên sự chuyển nhiễm tạm thời để sàng lọc các dòng tế bào có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen được phát động bởi CMVTetO hoặc CMVCuO. Các dòng tế bào PER.C6/TetR và PER.C6/CymR thu được được phân tích về khả năng của chúng để ức chế sự biểu hiện gen chuyển trong quá trình sao chép vector trong các tế bào này. Thí nghiệm tiến hành với vector biểu hiện GFP-Luc dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động CMV có chứa vùng điều khiển cho thấy sự giảm ít nhất là 10 lần của sự biểu hiện gen luciferaza trong suốt chu kỳ sao chép virus hoàn chỉnh ở các dòng tế bào biểu hiện chất kìm hãm tương ứng với các trình tự điều khiển riêng lẻ (dữ liệu không được thể hiện). Điều này xác nhận rằng các dòng tế bào PER.C6/TetR và PER.C6/CymR có khả năng ức chế sự biểu hiện gen chuyển vector trong phạm vi của vector adenovirus sao chép.

Tác động của sự ức chế qua trung gian TetR và CymR của sự biểu hiện gen chuyển vector adeno lên năng suất vector được khảo sát đối với vector dựa trên Ad35 biểu hiện HPVAg (Hình 13A). Đối với vấn đề này, các dòng tế bào PER.C6, PER.C6/TetR, và PER.C6/CymR, được cấy ở mật độ 3×10^5 tế bào trong mỗi giếng trong các giếng của đĩa 24 giếng, được đưa đi thực hiện sự gây nhiễm bốn bản sao – ở mật độ 1000 hạt virus trong mỗi tế bào và trong khoảng thời gian ba giờ – bằng vector biểu hiện HPVAg từ trình tự khởi động CMVTetO hoặc CMVCuO. Để làm đối chứng, sự gây nhiễm song song được thực hiện bằng các vector tương ứng biểu hiện GFP-Luc thay vì HPVAg. Bốn ngày sau khi gây nhiễm, dịch tan virus thô được điều chế bằng cách đưa những chất chứa trong giếng (tức là tế bào và môi trường được gây nhiễm) vào hai chu kỳ kết đông-rã đông. Tiếp đó độ chuẩn vector adeno được xác định bằng quy trình dựa trên PCR định lượng đặc hiệu trình tự Ad35 hexon mà sử dụng vector Ad35 được tinh chế với độ chuẩn hạt virus đã biết làm chuẩn. Kết quả cho thấy rằng cả hai vector Ad35 mã hóa cho HPVAg

có chứa TetO và CuO, so với vector đối chứng biểu hiện GFP-Luc, thể hiện năng suất vector giảm đi trên tế bào PER.C6 bình thường. Ngược lại, khi được sản xuất trên tế bào biểu hiện chất kìm hãm cùng nguồn của chúng (tức là lần lượt là TetR và CymR), cùng các vector này mang lại năng suất cao như năng suất thu được bằng vector đối chứng. Dữ liệu này chỉ ra rằng sự ức chế của sự biểu hiện gen chuyển trong quá trình sản xuất vector ở tế bào sản xuất có thể có lợi cho năng suất của vector Ad35 mang HPVAg làm gen chuyển.

Tác động mà sự ức chế của sự biểu hiện gen chuyển vector adeno có thể có lên năng suất vector cũng được khảo sát đối với các vector có nguồn gốc từ typ huyết thanh adenovirus 26 (Ad26) (Hình 13B). Trong thử nghiệm được tiến hành về cơ bản như được mô tả ở trên đối với vector Ad35, vector Ad26 mang gen chuyển được kiểm soát bởi trình tự khởi động CMVTetO mã hóa cho GFP-Luc, HPVAg, hoặc LSE2E6E7SH được dùng để gây nhiễm tế bào PER.C6 và PER.C6/TetR ở mật độ 1500 hạt virus cho mỗi tế bào. Ba ngày sau sự gây nhiễm được thu hoạch và độ chuẩn hạt virus được xác định bằng phương pháp dựa trên PCR định lượng đặc hiệu trình tự Ad26 hexon. Kết quả cho thấy rằng trên tế bào PER.C6 năng suất đối với các vector mã hóa cho HPVAg và LSE2E6E7SH thấp hơn năng suất thu được bằng vector đối chứng mã hóa cho GFP-Luc. Ngược lại, trên tế bào PER.C6/TetR, cả hai vector này thể hiện độ chuẩn mà cao bằng độ chuẩn thu được đối với vector đối chứng. Cùng với kết quả ở trên (đối với vector Ad35), dữ liệu này chỉ ra rằng sự ức chế của sự biểu hiện gen chuyển trong quá trình sản xuất vector adeno làm tăng năng suất của các vector biểu hiện HPVAg và LSE2E6E7SH.

Chúng tôi đã quan sát thấy các vấn đề chính về độ ổn định di truyền của vector adenovirus mà mang gen chuyển được điều khiển bởi trình tự khởi động CMV đối với HPVAg. Ví dụ, quan sát thấy rằng sau một vài vòng đi qua của vector này trên PER.C6 phần lớn quần thể vector có chứa các vector đột biến mà mang sự làm khuyết lớn ở trình tự mã hóa HPVAg (dữ liệu không được thể hiện).

Chúng tôi giải thích rằng việc sử dụng hệ ức chế sự biểu hiện gen chuyển, chẳng hạn như một trong hai hệ được mô tả ở trên, có thể ngăn chặn vấn đề về độ ổn định di truyền liên quan đến gen chuyển, chẳng hạn như HPVAg mà ức chế sự phát triển vector. Để thử nghiệm điều này, vector dựa trên Ad35 với sự biểu hiện HPVAg được điều khiển bởi trình tự khởi động CMVCuO được đánh giá về độ ổn định bằng gen chuyển khi phát

triển vector trên tế bào PER.C6 hoặc PER.C6/CymR (Hình 14). Tóm lại, vector ADN được chuyển nạp vào hai dòng tế bào khác nhau và các mảng virus thu được được để cho phát triển dưới lớp agarosa. Từ mỗi trong hai sự chuyển nhiễm, năm mảng virus được phân lập và được cho đi riêng rẽ thêm trên cùng một dòng tế bào (tức là như được dùng cho sự chuyển nhiễm), đối với mười đường virus liên tiếp. Tính toàn vẹn gen chuyển được đánh giá bằng khuếch đại PCR của băng gen chuyển ở đường virus số mười (VPN10), và phân tích tiếp theo của sản phẩm PCR thu được bằng điện di trên gel và xác định trình tự Sanger. Ngoài ra, ở VPN7, các dòng virus đã được cho đi được đánh giá về khả năng của chúng để biểu hiện HPVAg. Việc này được thực hiện bằng cách sử dụng thể phân lập virus đã được cho đi để gây nhiễm tế bào A549 ở mật độ 1000 hạt virus cho mỗi tế bào, làm tan tế bào vào 48 giờ sau gây nhiễm, và tiếp đó là phân tích sự biểu hiện của HPVAg by thẩm tách western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại HPV16 E7 (Santa-Cruz Biotechnology). Kết quả của các phân tích điện di trên gel và xác định trình tự cho thấy cả năm thể phân lập virus mà đã được cho đi trên PER.C6 mang sự làm khuyết dịch khung hoặc đột biến kết thúc sớm trong băng gen chuyển. Ngược lại, sự làm khuyết hoặc đột biến này có thể không được phát hiện trong thể phân lập vector bất kỳ mà đã được cho đi qua trên dòng tế bào biểu hiện CymR (PER.C6/CymR). Thống nhất với dữ liệu này, tất cả các thể phân lập vector được nhân giống PER.C6/CymR có thể biểu hiện HPVAg, trong khi tất cả các vector được phát triển PER.C6 hoàn toàn mất đi khả năng này, cho thấy băng gen chuyển khiếm khuyết đối với các vector này. Kết luận là, dữ liệu của chúng tôi chứng tỏ rằng việc sử dụng hệ chất kim hãm, chẳng hạn như hệ CymR/CuO, để ức chế sự biểu hiện gen chuyển vector trong quá trình nhân giống vector là phương thức hữu hiệu để ngăn chặn sự mất ổn định băng gen chuyển nghiêm trọng, chẳng hạn như có thể thấy đối với các vector mang gen chuyển biểu hiện HPVAg.

Tài liệu tham khảo

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. *J Virol* 81:4654-4663

- Ausubel FM (1995) Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Wiley, [Chichester]
- 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. *Biotechnol Bioeng* 109:719-728
- 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. *Br J Cancer* 102:1129-1136
- de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg 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. *Cancer Res* 62:472-479
- Edholm D, Molin M, Bajak E, Akusjarvi G (2001) Adenovirus vector designed for expression of toxic proteins. *J Virol* 75:9579-9584
- 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. *J Pharm Sci* 93:2458-2475
- 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. *Hum Gene Ther* 9:1909-1917
- Frøkjær S, Hovgaard L (2000) Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Taylor & Francis, London
- Gall JG, Lizonova A, EttyReddy D, McVey D, Zuber M, Kovesdi I, Aughtman B, King CR, Brough DE (2007) Rescue and production of vaccine and therapeutic adenovirus vectors expressing inhibitory transgenes. *Mol Biotechnol* 35:263-273
- 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. *Hum Gene Ther* 11:213-219
- Gennaro AR (1990) Remington's pharmaceutical sciences. Mack

- 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. *J Virol Methods* 208:177-188
- Hamid O, Carvajal RD (2013) Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 13:847-861
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Havenga M, Vogels R, Zuijdgeest 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. *J Gen Virol* 87:2135-2143
- 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. *Vaccine* 30:4259-4266
- 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 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298:743-753
- Hoganson DK, Ma JC, Asato L, Ong M, Printz MA, Huyghe BG, Sosnowshi BA, D'Andrea MJ (2002) Development of a stable adenoviral vector formulation. *Bioprocess J* 1:43-48
- 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. *Immunogenetics* 61:1-13
- Horwitz MS (1996) Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Baines JD (eds) *Virology*. Raven Press Ltd, New York
- Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, Essahsah F, Fathes LM, Offringa R, Drijfhout JW, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, van der Burg SH, Melief CJ (2009) Vaccination

- against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361:1838-1847
- Kibbe AH (2000) Handbook of pharmaceutical excipients. Pharmaceutical Press, London
- Kovesdi I, Hedley SJ (2010) Adenoviral producer cells. *Viruses* 2:1681-1703
- 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. *Cancer Res* 56:21-26
- Lundegaard 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. *Nucleic Acids Res* 36:W509-512
- Massimi P, Banks L (2005) Transformation Assays for HPV Oncoproteins. In: Davy C, Doorbar J (eds) *Human Papillomaviruses : Methods and Protocols*. Vol 119: *Methods in Molecular Medicine* Springer, Berlin, pp 381-395
- Matthews DA, Cummings D, Eveleigh C, Graham FL, Prevec L (1999) Development and use of a 293 cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):345-353
- McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (1995) *PCR 2 : a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480-489
- 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 cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 6:43
- Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63:4417-4421
- 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. *Infect Immun* 76:3817-3823
- 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. *Hum Gene Ther* 23:1301-1312
- 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. *Int J Cancer* 129:397-406
- Oosterhuis K, van den Berg JH, Schumacher TN, Haanen JB (2012b) DNA vaccines and intradermal vaccination by DNA tattooing. *Curr Top Microbiol Immunol* 351:221-250
- 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. *Bioinformatics* 19:1765-1772
- 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 E2 trans-activator. *Genes Dev* 6:105-116
- 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. *Gene Ther* 7:875-885
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT (1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 65:4860-4866
- Shenk T (1996) Adenoviridae and their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Baines JD (eds) *Virology*. Raven Press Ltd, New York
- Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V (2001) Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology* 281:231-238

- van der Burg SH, Melief CJ (2011) Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol* 23:252-257
- Watson JD (1992) Recombinant DNA. Scientific American Books, New York
- Wieking 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 HPV 16 E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors. *Cancer Gene Ther* 19:667-674
- 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-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen. *Vaccine* 27:431-440
- Yao F, Eriksson E (1999) A novel tetracycline-inducible viral replication switch. *Hum Gene Ther* 10:419-427
- Yoshida Y, Hamada H (1997) Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-430
- Yugawa T, Kiyono T (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 19:97-113
- 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. *J Immunol* 169:350-358

Bảng I. Các trình tự

SEQ ID NO: 1 (HPV16-E6E7SH, trình tự axit amin của polypeptit thiết kế E6/E7 HPV16)

MHQKRTAMFQ DPQERPRKLP QLCTELQTTI HDIILECVYC KQQLEDEIDG
 PAGQAEPDRA HYNIVTFCK CDSTLRLCVQ STHVDIRTLE DLLMGTLGIV
 CPICSQKPGT TLEQQYNKPL CDLLIRCINC QKPLCPEEKQ RHLDDKKQRFH
 NIRGRWTGRC MSCCRSSRTR RETQMHGDTPLTHEYMLDLQ PETTDLYCYE
 QLNDSSSEED EIDGPAGQAE PDRAHYNIVT FCCQLCTELQ TTIHDIILEC
 VYCKQQLLR EVYDFAFRDL CIVYRDGNPY AVCDKCLKFY SKISEYRHYC
 YSLYGTTLLEQ QYNKPLCDLL IRCINCQK

SEQ ID NO: 2 (HPV16-E6E7SH, trình tự nucleotit mã hóa cho trình tự axit amin của polypeptit thiết kế E6/E7 HPV16)

ATGCACCAGA	AACGGACCGC	CATGTTCCAG	GACCCCCAGG
AACGGCCCCAG	AAAGCTGCCC	CAGCTGTGCA	CCGAGCTGCA
GACCACCATC	CACGACATCA	TCCTGGAATG	CGTGTACTGC
AAGCAGCAGC	TGGAAGATGA	GATCGACGGC	CCTGCTGGCC
AGGCCGAACC	CGACAGAGCC	CACTACAATA	TCGTGACCTT
CTGCTGCAAG	TGCGACAGCA	CCCTGCGGCT	GTGCGTGCAG
AGCACCCACG	TGGACATCCG	GACCCTGGAA	GATCTGCTGA
TGGGCACCCT	GGGCATCGTG	TGCCCCATCT	GCAGCCAGAA
GCCCGGCACC	ACCCTGGAAC	AGCAGTACAA	CAAGCCCCTG
TGCGACCTGC TGATCCGGTG CATCAACTGC CAGAAACCCC TGTGCCCCGA			
GGAAAAGCAG	CGGCACCTGG	ACAAGAAGCA	GCGGTTCCAC
AACATCCGGG	GCAGATGGAC	AGGCAGATGC	ATGAGCTGCT
GCAGAAGCAG	CCGGACCAGA	CGGGAAACCC	AGATGCACGG
CGACACCCCC	ACCCTGCACG	AGTACATGCT	GGACCTGCAG
CCCGAGACAA	CCGACCTGTA	CTGCTACGAG	CAGCTGAACG
ACAGCAGCGA	GGAAGAGGAC	GAGATTGACG	GACCCGCTGG
ACAGGCCGAG CCTGACCGGG CTCACTATAA CATCGTGACA TTTTGCTGTC			
AGCTCTGTAC TGAAGTCCAG ACAACAATTC ACGATATTAT TCTCGAATGT			
GTGTATTGTA AACAGCAGCT CCTGCGGAGA GAGGTGTACG ACTTCGCCTT			
CCGGGACCTC TGCATCGTGT ATCGGGACGG CAACCCCTAC GCCGTGTGCG			

ACAAGTGCCT GAAGTTCTAC AGCAAGATCA GCGAGTACCG
 GCACTACTGC TACAGCCTGT ACGGAACAAC ACTCGAACAG
 CAGTATAACA AACCCTCTG TGATCTGCTG ATTCGCTGTA TCAATTGTCA
 GAAGTGATAA

SEQ ID NO: 3 (E2E6E7SH HPV16, trình tự axit amin của polypeptit thiết kế E2/E6/E7 HPV16)

METLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDRLRDHIDYWKHMRLECAIYYKAREMGF
 KHINHQVVPTLAVSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLQDVSLEVYLT
 APTGCIKKHGYTVEVQFDGDICNTMHYTNWTHIYICEEASVTVVEGQVDYYG
 LYYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNKVWEVHAGGQVILCPTSVFSSNEVSSPE
 IIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRSEPDTGNPCHTTKLLHRDSVD
 SAPILTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFFKKHCTLYTAVSS
 TWHWTGHNKVKHKSIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTITVSTGFMSIMHQK
 RTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLEDEIDGPAGQAEPD
 RAHYNIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPGTTL
 EQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCC
 RSSRTRRETQMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAG
 QAEPDRAHYNIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLC
 IVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLLEQQYNKPLCDLLIRCI
 NCQK

SEQ ID NO: 4 (E2E6E7SH HPV16, trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit thiết kế E2/E6/E7 HPV16)

ATGGAAACCCTGTGCCAGCGGCTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGAC
 CCACTACGAGAACGACAGCACCGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGA
 AGCACATGCGGCTGGAATGCGCCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGC
 TTCAAGCACATCAACCACCAGGTGGTGCCACCCTGGCCGTGTCCAAGAA
 CAAGGCCCTGCAGGCCATCGAGCTGCAGCTGACCCTGGAAACCATCTACA
 ACAGCCAGTACAGCAACGAGAAGTGGACCCTGCAGGACGTGTCCCTGGAA
 GTGTACCTGACCGCTCCACCGGCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGT
 GGAAGTGCAGTTCGACGGCGACATCTGCAACACCATGCACTACACCAACT
 GGACCCACATCTACATCTGCGAAGAGGCCAGCGTGACCGTGGTGGGAAGGC
 CAGGTGGACTACTACGGCCTGTACTACGTGCACGAGGGCATCCGGACCTA

CTTCGTGCAGTTCAAGGACGACGCCGAGAAGTACAGCAAGAACAAAGTGT
 GGGAGGTGCACGCTGGCGGCCAGGTCATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTC
 AGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCCCGAGATCATCCGGCAGCACCTGGCCAA
 TCACCCTGCCGCCACCCACACAAAGGCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAAA
 CCCAGACCACCATCCAGCGGCCCAGAAGCGAGCCCGACACCGGCAATCCC
 TGCCACACCACCAAGCTGCTGCACCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCCTAT
 CCTGACCGCCTTCAACAGCAGCCACAAGGGCCGGATCAACTGCAACAGCA
 ACACCACCCCCATCGTGCACCTGAAGGTGGACGCCAACACCCTGATGCGG
 CTGCGGTACAGATTCAAGAAGCACTGCACCCTGTACACCGCCGTGTCCTCC
 ACCTGGCACTGGACCGGCCACAACGTGAAGCACAAGAGCGCCATCGTGAC
 CCTGACCTACGACAGCGAGTGGCAGCGGGACCAGTTCCTGAGCCAGGTCA
 AAATCCCCAAGACCATCACCGTGTCCACCGGCTTCATGAGCATCATGCACC
 AGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGGCCCAGAAAGCTG
 CCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGA
 ATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATCGACGGCCCTGCTG
 GCCAGGCCGAACCCGACAGAGCCCCTACAATATCGTGACCTTCTGCTGC
 AAGTGCGACAGCACCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACAT
 CCGGACCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGCCCCAT
 CTGCAGCCAGAAGCCCGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAACAAGCCCC
 TGTGCGACCTGCTGATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTGTGCCCCG
 AGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGAAGCAGCGGTTCCACAACATCCG
 GGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAGCCGGACC
 AGACGGGAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAGTACAT
 GCTGGACCTGCAGCCCGAGACAACCGACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGA
 ACGACAGCAGCGAGGAAGAGGACGAGATTGACGGACCCGCTGGACAGGC
 CGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATTTTGCTGTCAGCTCTG
 TACTGAACTCCAGACAACAATTCACGATATTATTCTCGAATGTGTGTATTG
 TAAACAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGGGACC
 TCTGCATCGTGTATCGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAAGTGCC
 TGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGCCTGT
 ACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTCTGTGATCTGCTG
 ATTCGCTGTATCAATTGTCAGAAGTGATAA

SEQ ID NO: 5 (E6E7E2SH HPV16, trình tự axit amin mã hóa cho polypeptit thiết kế E6/E7/E2 HPV16)

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLEDEIDGPAG
 QAEPDRAHYNIVTFCKKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQK
 PGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRC
 MSCCRSSRTRRETQMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEID
 GPAGQAEPDRAHYNIVTFCCQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAF
 RDLICIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLL
 IRCINCQKMETLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRLECAIYY
 KAREMGFKHINHQVVPTLAVSKNKALQAIELQLTLETIYNSQYSNEKWTLQD
 VSLEVYLTAPTGCICKKHGYTVEVQFDGDICNTMHYTNWTHIYICEEASVTVVE
 GQVDYYGLYYVHEGIRTYFVQFKDDAEKYSKNKVWEVHAGGQVILCPTSVF
 SSNEVSSPEIIRQHLANHPAATHTKAVALGTEETQTTIQRPRSEPDTGNPCHTT
 KLLHRDSVDSAPILTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKVDANTLMRLRYRFFK
 HCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKSAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTITVST
 GFMSI

SEQ ID NO: 6 (E6E7E2SH HPV16, trình tự nucleotit mã hóa cho polypeptit thiết kế E6/E7/E2 HPV16)

ATGCACCAGAAACGGACCGCCATGTTCCAGGACCCCCAGGAACGGCCCAG
 AAAGCTGCCCCAGCTGTGCACCGAGCTGCAGACCACCATCCACGACATCA
 TCCTGGAATGCGTGTACTGCAAGCAGCAGCTGGAAGATGAGATCGACGGC
 CCTGCTGGCCAGGCCGAACCCGACAGAGCCCACTACAATATCGTGACCTTC
 TGCTGCAAGTGCGACAGCACCCCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGT
 GGACATCCGGACCCTGGAAGATCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGT
 GCCCCATCTGCAGCCAGAAGCCCGGCACCACCCTGGAACAGCAGTACAAC
 AAGCCCCTGTGCGACCTGCTGATCCGGTGCATCAACTGCCAGAAACCCCTG
 TGCCCCGAGGAAAAGCAGCGGCACCTGGACAAGAAGCAGCGGTTCCACAA
 CATCCGGGGCAGATGGACAGGCAGATGCATGAGCTGCTGCAGAAGCAGCC
 GGACCAGACGGGAAACCCAGATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAG
 TACATGCTGGACCTGCAGCCCGAGACAACCGACCTGTACTGCTACGAGCA
 GCTGAACGACAGCAGCGAGGAAGAGGACGAGATTGACGGACCCGCTGGA
 CAGGCCGAGCCTGACCGGGCTCACTATAACATCGTGACATTTTGCTGTCAG

CTCTGTACTGAACTCCAGACAACAATTACGATATTATTCTCGAATGTGTG
TATTGTAAACAGCAGCTCCTGCGGAGAGAGGTGTACGACTTCGCCTTCCGG
GACCTCTGCATCGTGTATCGGGACGGCAACCCCTACGCCGTGTGCGACAA
GTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACA
GCCTGTACGGAACAACACTCGAACAGCAGTATAACAAACCACTCTGTGAT
CTGCTGATTCGCTGTATCAATTGTCAGAAGATGGAAACCCTGTGCCAGCGG
CTGAACGTGTGCCAGGACAAGATCCTGACCCACTACGAGAACGACAGCAC
CGACCTGCGGGACCACATCGACTACTGGAAGCACATGCGGCTGGAATGCG
CCATCTACTACAAGGCCAGAGAGATGGGCTTCAAGCACATCAACCACCAG
GTGGTGCCCAACCCTGGCCGTGTCCAAGAACAAGGCCCTGCAGGCCATCGA
GCTGCAGCTGACCCTGGAAACCATCTACAACAGCCAGTACAGCAACGAGA
AGTGGACCCTGCAGGACGTGTCCCTGGAAGTGTACCTGACCGCTCCCACCG
GCTGCATCAAGAAACACGGCTACACCGTGGAAGTGCAGTTCGACGGCGAC
ATCTGCAACACCATGCACTACACCAACTGGACCCACATCTACATCTGCGAA
GAGGCCAGCGTGACCGTGGTGGAAGGCCAGGTGGACTACTACGGCCTGTA
CTACGTGCACGAGGGCATCCGGACCTACTTCGTGCAGTTCAAGGACGACG
CCGAGAAGTACAGCAAGAACAAGTGTGGGAGGTGCACGCTGGCGGCCA
GGTCATCCTGTGCCCCACCAGCGTGTTACAGCAGCAACGAGGTGTCCAGCCC
CGAGATCATCCGGCAGCACCTGGCCAATCACCTGCCGCCACCCACACAA
AGGCCGTGGCCCTGGGCACCGAGGAAACCCAGACCACCATCCAGCGGCC
AGAAGCGAGCCCGACACCGGCAATCCCTGCCACACCACCAAGCTGCTGCA
CCGGGACAGCGTGGACAGCGCCCCTATCCTGACCGCCTTCAACAGCAGCC
ACAAGGGCCGGATCAACTGCAACAGCAACACCACCCCCATCGTGCACCTG
AAGGTGGACGCCAACACCCTGATGCGGCTGCGGTACAGATTCAAGAAGCA
CTGCACCCTGTACACCGCCGTGTCCTCCACCTGGCACTGGACCGGCCACAA
CGTGAAGCACAAGAGCGCCATCGTGACCCTGACCTACGACAGCGAGTGGC
AGCGGGACCAGTTCCTGAGCCAGGTCAAAATCCCCAAGACCATCACCGTG
TCCACCGGCTTCATGAGCATCTGATAA

SEQ ID NO: 7 (trình tự axit amin peptit dẫn đầu IgE)

MDWTWILFLVAAATRVHS

SEQ ID NO: 8 (trình tự nucleotit mã hóa cho peptit dẫn đầu IgE)

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCTGCCGCAACCCGGGTGCAC
AGC

SEQ ID NO: 9 (trình tự axit amin peptit dẫn đầu aa HAVT20)

MACPGFLWALVISTCLEFSMA

SEQ ID NO: 10 (trình tự nucleotit mã hóa cho peptit dẫn đầu HAVT20)

ATGGCCTGCCCCGGCTTTCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAA
TTCAGCATGGCC

SEQ ID NO: 11 (trình tự có chứa 2xTetO)

GAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTC
GAC

SEQ ID NO: 12 (trình tự có chứa CuO)

AACAAACAGACAATCTGGTCTGTTTGTA

SEQ ID NO: 13 (trình tự khởi động CMV có mặt trong các plasmid pAdApt26 và
pAdApt35)

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAAT
ATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTT
ATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTA
GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA
ACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG
CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA
CTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT
TTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCC
ATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA
GAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT
TTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGCCGGGAA
CGGTGCATTGGA

SEQ ID NO: 14 (TetR, trình tự nucleotit mã hóa cho trình tự axit amin của polypeptit TetR được biểu hiện bởi pcADNTM6/TR)

ATGTCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTT
AATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAGCT
AGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTT
GCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACACTTTTG
CCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAA
GTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAG
GTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCC
TTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGC
GCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAA
GTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATT
ATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTT
CTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTTAAATG
TGAAAGTGGGTCCGCGTACAGCGGATCCCGGGAATTCAGATCTTATTAA

SEQ ID NO: 15 (TetR, trình tự axit amin của polypeptit TetR được biểu hiện bởi pcADNTM6/TR)

MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGV EQPTLYWHVKNKRALL
DALAIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTR
PTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKE
ERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYSG
SREFRSY

SEQ ID NO: 16 (CymR, trình tự nucleotit mã hóa cho trình tự axit amin của polypeptit CymR)

ATGTCTCCCAAACGACGGACTCAAGCGGAAAGGGCAATGGAAACTCAGGG
TAAGCTGATTGCCGCGGCTCTGGGAGTGCTGCGAGAGAAAGGGTATGCCG
GGTTTCGCATAGCCGACGTTCTGGAGCTGCAGGCGTAAGCAGAGGAGCC
CAATCTCATCACTTTCCGACCAAGCTGGAGCTTTTGCTGGCTACCTTCGAA
TGGCTGTACGAGCAGATCACGGAAAGGAGTCGTGCTAGGCTGGCCAAGCT
GAAACCCGAGGATGATGTCATTCAGCAGATGCTGGACGATGCAGCCGAGT
TCTTCCTGGACGACGACTTCAGCATCAGTCTCGACCTCATCGTAGCCGCAG
ATCGCGATCCAGCTTTGCGCGAGGGCATAACAGAGAACAGTCGAGCGGAAT

CGGTTTGTGGTGGAGGACATGTGGCTTGGTGTTCTGGTGAGCAGAGGCCTC
 TCACGGGATGATGCCGAGGACATCCTGTGGCTGATCTTTAACTCCGTCAGA
 GGGTTGGCAGTGAGGTCCCTTTGGCAGAAGGACAAAGAACGGTTTGAACG
 TGTGCGAAACTCAACACTCGAGATTGCTAGGGAACGCTACGCCAAGTTCA
 AGAGATGA

SEQ ID NO: 17 (CymR, trình tự axit amin của polypeptit CymR)

MSPKRRTQAERAMETQGKLIAAALGVLREKGYAGFRIADVPGAAGVSRGAQ
 SHHFPTKLELLLATFEWL YEQITERSRARLAKLKPEDDVIQQMLDDAAEFFLD
 DDFSISLDLIVAADRDPALREGIQRRTVERNRFVVEDMWLGVLVSRGLSRDDAE
 DILWLIFNSVRGLAVRSLWQKDKERFERVRNSTLEIARERYAKFKR

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

KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN

SEQ ID NO: 19 (E7 HPV16 aa 43-77)

GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIR

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1.
2. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó polypeptit được mã hóa còn chứa trình tự dẫn đầu.
3. Phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polypeptit được mã hóa còn chứa ít nhất một epitop của protein E2 papillomavirut ở người (HPV).
4. Phân tử axit nucleic theo điểm 3, trong đó polypeptit được mã hóa có chứa protein E2 HPV16 mà có sự làm khuyết hoặc đột biến ở miền liên kết ADN của nó.
5. Phân tử axit nucleic theo điểm 4, trong đó polypeptit được mã hóa có chứa SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5.
6. Phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trình tự axit nucleic được tối ưu hóa bộ ba mã hóa.
7. Phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử axit nucleic này có chứa SEQ ID NO: 2.
8. Phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử axit nucleic này có chứa SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6.
9. Vector chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trình tự mã hóa polypeptit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động.
10. Vector theo điểm 9, trong đó vector này là adenovirut tái tổ hợp.
11. Vector theo điểm 9 hoặc 10, trong đó trình tự khởi động được ghép đôi có điều khiển với trình tự điều khiển chất kìm hãm, mà protein ức chế có thể liên kết với nó để ức chế sự biểu hiện của trình tự khởi động khi có mặt của protein kìm hãm này.
12. Vaccin có chứa vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, và tá được được dụng.
13. Polypeptit có chứa SEQ ID NO: 1.
14. Polypeptit theo điểm 13, trong đó polypeptit này có chứa SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 5.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Janssen Vaccines & Prevention B.V.
Archimedesweg 4, 2333 CN Leiden, the Netherlands
- <120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, VECTƠ CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC VÀ VACXIN CHỨA VECTƠ NÀY ĐỂ CHỐNG LẠI SỰ NHIỄM VIRUT PAPILLOMA TYP 16 Ở NGƯỜI (HPV16)
- <130> 0248 WO 00 ORD
- <160> 19
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
- <220>
<223> Polypeptit thiết kế E6E7SH-HPV16
- <400> 1

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

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

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

Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
50 55 60

Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
65 70 75 80

Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
85 90 95

Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu
100 105 110

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

Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp
 130 135 140

Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys
 145 150 155 160

Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His
 165 170 175

Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 180 185 190

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu
 195 200 205

Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
 210 215 220

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln
 225 230 235 240

Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln
 245 250 255

Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile
 260 265 270

Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
 275 280 285

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
 290 295 300

Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
 305 310 315 320

Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys
 325

<210> 2
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nt mã hóa cho polypeptit thiết kế E6E7SH-HPV16

<400> 2
 atgcaccaga aacggaccgc catgttccag gacccccagg aacggcccag aaagctgccc 60
 cagctgtgca ccgagctgca gaccaccatc cacgacatca tcctggaatg cgtgtactgc 120
 aagcagcagc tggaagatga gatcgacggc cctgctggcc aggccgaacc cgacagagcc 180
 cactacaata tcgtgacctt ctgctgcaag tgcgacagca ccctgctggct gtgctgtcag 240
 agcaccacag tggacatccg gaccctggaa gatctgtctga tgggcaccct gggcatcgtg 300
 tgccccatct gcagccagaa gcccggcacc accctggaac agcagtacaa caagcccctg 360
 tgcgacctgc tgatccggtg catcaactgc cagaaacccc tgtgccccga ggaaaagcag 420
 cggcacctgg acaagaagca gcggttccac aacatccggg gcagatggac aggcagatgc 480
 atgagctgct gcagaagcag ccggaccaga cgggaaaccc agatgcacgg cgacaccccc 540
 accctgcacg agtacatgct ggacctgcag cccgagacaa ccgacctgta ctgctacgag 600
 cagctgaacg acagcagcga ggaagaggac gagattgacg gacccgctgg acaggccgag 660
 cctgaccggg ctcaactataa catcgtgaca ttttgctgtc agctctgtac tgaactccag 720
 acaacaattc acgatattat tctcgaatgt gtgtattgta aacagcagct cctgcggaga 780
 gaggtgtacg acttcgcctt ccgggacctc tgcacgtgtg atcgggacgg caaccctac 840
 gccgtgtgcg acaagtgcct gaagttctac agcaagatca gcgagtaccg gcactactgc 900
 tacagcctgt acggaacaac actcgaacag cagtataaca aaccactctg tgatctgctg 960
 attcgtgta tcaattgtca gaagtataa 990

<210> 3
 <211> 693
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit thiết kế E2E6E7SH HPV16

<400> 3

Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu
 1 5 10 15

Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr
 20 25 30

Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu
 35 40 45

Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val
 50 55 60

Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp
 85 90 95

Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys
 100 105 110

His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr
 115 120 125

Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser
 130 135 140

Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val
 145 150 155 160

His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu
 165 170 175

Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val
 180 185 190

Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro
 195 200 205

Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr
 210 215 220

Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
 225 230 235 240

Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
 245 250 255

Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
 260 265 270

Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
 275 280 285

Val His Leu Lys Val Asp Ala Asn Thr Leu Met Arg Leu Arg Tyr Arg
 290 295 300

Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
 305 310 315 320

Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
 325 330 335

Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
 340 345 350

Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile Met His Gln
 355 360 365

Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu
 370 375 380

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

Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro
 405 410 415

Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 420 425 430

Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His
 435 440 445

Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile
 450 455 460

Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln
 465 470 475 480

Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln
 485 490 495

Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln
 500 505 510

Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys
 515 520 525

Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His Gly Asp Thr
 530 535 540

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp
 545 550 555 560

Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu
 565 570 575

Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
 580 585 590

Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile
 595 600 605

His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg
 610 615 620

Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg
 625 630 635 640

Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser
 645 650 655

Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr
 660 665 670

Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys
 675 680 685

Ile Asn Cys Gln Lys
 690

<210> 4

<211> 2085

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nt mã hóa cho polypeptit thiết kế E2E6E7SH HPV16

<400> 4

atggaaaccc tgtgccagcg gctgaacgtg tgccaggaca agatcctgac ccactacgag	60
aacgacagca ccgacctgcg ggaccacatc gactactgga agcacatgcg gctggaatgc	120
gccatctact acaaggccag agagatgggc ttcaagcaca tcaaccacca ggtggtgccc	180
accctggccg tgtccaagaa caaggccctg caggccatcg agctgcagct gaccctggaa	240
accatctaca acagccagta cagcaacgag aagtggaccc tgcaggacgt gtccctggaa	300
gtgtacctga ccgctccac cggctgcatc aagaaacacg gctacaccgt ggaagtgcag	360
ttcgacggcg acatctgcaa caccatgcac tacaccaact ggaccacat ctacatctgc	420
gaagaggcca gcgtgaccgt ggtggaaggc cagggtggact actacggcct gtactacgtg	480
cacgagggca tccggaccta cttcgtgcag ttcaaggacg acgccgagaa gtacagcaag	540
aacaaagtgt gggaggtgca cgctggcggc cagggtcatcc tgtgccccac cagcgtgttc	600
agcagcaacg aggtgtccag ccccgagatc atccggcagc acctggccaa tcaccctgcc	660
gccaccacaa caaaggccgt ggccctgggc accgaggaaa ccagaccac catccagcgg	720
cccagaagcg agcccagacac cggcaatccc tgccacacca ccaagctgct gcaccgggac	780
agcgtggaca gcgcccctat cctgaccgcc ttcaacagca gccacaaggg ccggatcaac	840
tgcaacagca acaccacccc catcgtgcac ctgaaggtgg acgccaacac cctgatgcgg	900
ctgcggtaca gattcaagaa gcactgcacc ctgtacaccg ccgtgtcctc cacctggcac	960

```

tggaccggcc acaacgtgaa gcacaagagc gccatcgtga ccctgacctg cgacagcgag 1020
tggcagcggg accagttcct gagccaggtc aaaatcccca agaccatcac cgtgtccacc 1080
ggcttcatga gcatcatgca ccagaaacgg accgccatgt tccaggaccc ccaggaacgg 1140
cccagaaagc tgccccagct gtgcaccgag ctgcagacca ccatccacga catcatcctg 1200
gaatgcgtgt actgcaagca gcagctggaa gatgagatcg acggccctgc tggccaggcc 1260
gaacccgaca gagccacta caatatcgtg accttctgct gcaagtgcga cagcacctg 1320
cggctgtgcg tgcagagcac ccacgtggac atccggaccc tggaagatct gctgatgggc 1380
accctgggca tcgtgtgccc catctgcagc cagaagcccg gcaccaccct ggaacagcag 1440
tacaacaagc ccctgtgcga cctgctgata cggtgcatca actgccagaa acccctgtgc 1500
cccgaggaaa agcagcggca cctggacaag aagcagcggg tccacaacat ccggggcaga 1560
tggacaggca gatgcatgag ctgctgcaga agcagccgga ccagacggga aaccagatg 1620
cacggcgaca cccccaccct gcacgagtac atgctggacc tgcagcccga gacaaccgac 1680
ctgtactgct acgagcagct gaacgacagc agcgaggaag aggacgagat tgacggaccc 1740
gctggacagg ccgagcctga ccgggctcac tataacatcg tgacattttg ctgtcagctc 1800
tgtactgaac tccagacaac aattcacgat attattctcg aatgtgtgta ttgtaaacag 1860
cagctcctgc ggagagaggt gtacgacttc gccttccggg acctctgcat cgtgtatcgg 1920
gacggcaacc cctacgccgt gtgcgacaag tgcctgaagt tctacagcaa gatcagcgag 1980
taccggcact actgctacag cctgtacgga acaacactcg aacagcagta taacaaacca 2040
ctctgtgata tgctgattcg ctgtatcaat tgtcagaagt gataa 2085

```

<210> 5

<211> 693

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit thiết kế E6E7E2SH HPV16

<400> 5

```

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

```

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

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

Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
50 55 60

Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
65 70 75 80

Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
85 90 95

Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Gly Thr Thr Leu
100 105 110

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

Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp
130 135 140

Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys
145 150 155 160

Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Met His
165 170 175

Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
180 185 190

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu
195 200 205

Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala
210 215 220

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln
225 230 235 240

Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln
245 250 255

Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile
260 265 270

Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
275 280 285

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
290 295 300

Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
305 310 315 320

Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu
325 330 335

Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr
340 345 350

Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys
355 360 365

Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu Met Gly Phe Lys His Ile Asn His
370 375 380

Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala
385 390 395 400

Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser
405 410 415

Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr
420 425 430

Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln
435 440 445

Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His
 450 455 460

Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val
 465 470 475 480

Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe
 485 490 495

Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp
 500 505 510

Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe
 515 520 525

Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala
 530 535 540

Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu
 545 550 555 560

Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly
 565 570 575

Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser
 580 585 590

Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn
 595 600 605

Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Val Asp Ala Asn
 610 615 620

Thr Leu Met Arg Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr
 625 630 635 640

Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His
 645 650 655

Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp
 660 665 670

Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr
 675 680 685

Gly Phe Met Ser Ile
 690

<210> 6
 <211> 2085
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nt mã hóa cho polypeptit thiết kế E6E7E2SH HPV16

<400> 6
 atgcaccaga aacggaccgc catgttccag gacccccagg aacggcccag aaagctgccc 60
 cagctgtgca ccgagctgca gaccaccatc cacgacatca tcctggaatg cgtgtactgc 120
 aagcagcagc tggaagatga gatcgacggc cctgctggcc aggccgaacc cgacagagcc 180
 cactacaata tcgtgacctt ctgctgcaag tgcgacagca ccctgcggct gtgcgtgcag 240
 agcaccacag tggacatccg gaccctggaa gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg 300
 tgccccatct gcagccagaa gcccggcacc accctggaac agcagtacaa caagcccctg 360
 tgcgacctgc tgatccggtg catcaactgc cagaaacccc tgtgccccga ggaaaagcag 420
 cggcacctgg acaagaagca gcggttccac aacatccggg gcagatggac aggcagatgc 480
 atgagctgct gcagaagcag ccggaccaga cgggaaaccc agatgcacgg cgacaccccc 540
 accctgcacg agtacatgct ggacctgcag cccgagacaa ccgacctgta ctgctacgag 600
 cagctgaacg acagcagcga ggaagaggac gagattgacg gacccgctgg acaggccgag 660
 cctgaccggg ctactataa catcgtgaca ttttgctgtc agctctgtac tgaactccag 720
 acaacaattc acgatattat tctcgaatgt gtgtattgta aacagcagct cctgcggaga 780
 gaggtgtacg acttcgcctt ccgggacctc tgcacgtgt atcgggacgg caaccctac 840
 gccgtgtgcg acaagtgcct gaagttctac agcaagatca gcgagtaccg gcactactgc 900
 tacagcctgt acggaacaac actcgaacag cagtataaca aaccactctg tgatctgctg 960
 attcgtgta tcaattgtca gaagatggaa accctgtgcc agcggctgaa cgtgtgccag 1020
 gacaagatcc tgaccacta cgagaacgac agcaccgacc tgcgggacca catcgactac 1080

tggaa gcaca tgcgg ctgga atgcg ccatac tactacaagg ccagagagat gggcttcaag 1140
 cacatcaacc accaggtggt gcccaccctg gccgtgtcca agaacaaggc cctgcaggcc 1200
 atcgagctgc agctgaccct ggaaaccatc tacaacagcc agtacagcaa cgagaagtgg 1260
 accctgcagg acgtgtccct ggaagtgtac ctgaccgctc ccaccggctg catcaagaaa 1320
 cacggctaca ccgtggaagt gcagttcgac ggcgacatct gcaacaccat gcactacacc 1380
 aactggaccc acatctacat ctgcgaagag gccagcgtga ccgtgggtgga aggccagggtg 1440
 gactactacg gcctgtacta cgtgcacgag ggcattccgga cctacttcgt gcagttcaag 1500
 gacgacgccg agaagtacag caagaacaaa gtgtgggagg tgcacgctgg cggccaggctc 1560
 atcctgtgcc ccaccagcgt gttcagcagc aacgaggtgt ccagccccga gatcatccgg 1620
 cagcacctgg ccaatcacc tgccgccacc cacacaaagg ccgtggccct gggcaccgag 1680
 gaaaccaga ccaccatcca gcggcccaga agcgagcccc acaccggcaa tccctgccac 1740
 accaccaagc tgctgcaccg ggacagcgtg gacagcgccc ctatcctgac cgccttcaac 1800
 agcagccaca agggccggat caactgcaac agcaacacca ccccatcgt gcacctgaag 1860
 gtggacgcca acaccctgat gcggctgcgg tacagattca agaagcactg caccctgtac 1920
 accgccgtgt cctccacctg gcactggacc ggccacaacg tgaagcacia gagcgccatc 1980
 gtgaccctga cctacgacag cgagtggcag cgggaccagt tcctgagcca ggtcaaaaac 2040
 cccaagacca tcaccgtgtc caccggcttc atgagcatct gataa 2085

<210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit dẫn đầu IgE

<400> 7

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

His Ser

<210> 8
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nt mã hóa cho peptit dẫn đầu IgE

<400> 8
 atggactgga cctggatcct gttcctgggtg gctgccgcaa cccgggtgca cagc 54

<210> 9
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit dẫn đầu HAVT20

<400> 9
 Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala
 20

<210> 10
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nt mã hóa cho peptit dẫn đầu HAVT20

<400> 10
 atggcctgcc ccggctttct gtgggccctg gtcacagca cctgtctgga attcagcatg 60
 gcc 63

<210> 11
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự có chứa 2xTetO

<400> 11
 gagctctccc tatcagtgat agagatctcc ctatcagtga tagagatcgt cgac 54

<210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự có chứa CuO

<400> 12
 aacaaacaga caatctgggc tgtttgta 28

<210> 13
 <211> 829
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Vùng khởi động CMV

<400> 13
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
 ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aacattaccg ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga 420
 cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg 480
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat 540
 caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatggggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660
 cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
 tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgttttg acctccatag 780
 aagacaccgg gaccgatcca gcctccgcgg ccgggaacgg tgcattgga 829

<210> 14
 <211> 657

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nt mã hóa cho polypeptit TetR

<400> 14

```

atgtctagat tagataaaag taaagtgatt aacagcgcat tagagctgct taatgaggtc      60
ggaatcgaag gtttaacaac ccgtaaactc gcccagaagc taggtgtaga gcagcctaca      120
ttgtattggc atgtaaaaaa taagcgggct ttgctcgacg ccttagccat tgagatgtta      180
gataggcacc atactcactt ttgcccttta gaaggggaaa gctggcaaga ttttttacgt      240
aataacgcta aaagtttttag atgtgcttta ctaagtcatc gcgatggagc aaaagtacat      300
ttaggtacac ggcctacaga aaaacagtat gaaactctcg aaaatcaatt agccttttta      360
tgccaacaag gtttttcact agagaatgca ttatatgcac tcagcgctgt ggggcatttt      420
actttagggt gcgtattgga agatcaagag catcaagtcg ctaaagaaga aagggaaaca      480
cctactactg atagtatgcc gccattatta cgacaagcta tcgaattatt tgatcaccaa      540
gggtgcagagc cagccttctt attcggcctt gaattgatca tatgcggatt agaaaaacaa      600
cttaaattgtg aaagtgggtc cgcgtacagc ggatcccggg aattcagatc ttattaa      657

```

<210> 15

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit TetR

<400> 15

```

Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu
1           5           10           15

```

```

Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln
20           25           30

```

```

Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys
35           40           45

```

```

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His
50           55           60

```

Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg
65 70 75 80

Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly
85 90 95

Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr
100 105 110

Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu
115 120 125

Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr
145 150 155 160

Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu
165 170 175

Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu
180 185 190

Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser Ala
195 200 205

Tyr Ser Gly Ser Arg Glu Phe Arg Ser Tyr
210 215

<210> 16

<211> 612

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nt mã hóa cho polypeptit CymR

<400> 16

atgtctccca aacgacggac tcaagcggaa agggcaatgg aaactcaggg taagctgatt 60

gccgcggctc tgggagtgct gcgagagaaa gggatatgccg ggtttcgcat agccgacgtt 120

cctggagctg caggcgtaag cagaggagcc caatctcatc actttccgac caagctggag 180
 cttttgctgg ctaccttcga atggctgtac gagcagatca cggaaaggag tcgtgctagg 240
 ctggccaagc tgaaacccga ggatgatgtc attcagcaga tgctggacga tgcagccgag 300
 ttcttcctgg acgacgactt cagcatcagt ctcgacctca tcgtagccgc agatcgcgat 360
 ccagctttgc gcgagggcat acagagaaca gtcgagcgga atcggtttgt ggtggaggac 420
 atgtggcttg gtgttctggg gagcagaggc ctctcacggg atgatgccga ggacatcctg 480
 tggctgatct ttaactccgt cagagggttg gcagtgaggt ccctttggca gaaggacaaa 540
 gaacggtttg aacgtgtgcg aaactcaaca ctcgagattg ctagggaacg ctacgccaag 600
 ttcaagagat ga 612

<210> 17
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit CymR

<400> 17

Met Ser Pro Lys Arg Arg Thr Gln Ala Glu Arg Ala Met Glu Thr Gln
 1 5 10 15

Gly Lys Leu Ile Ala Ala Ala Leu Gly Val Leu Arg Glu Lys Gly Tyr
 20 25 30

Ala Gly Phe Arg Ile Ala Asp Val Pro Gly Ala Ala Gly Val Ser Arg
 35 40 45

Gly Ala Gln Ser His His Phe Pro Thr Lys Leu Glu Leu Leu Leu Ala
 50 55 60

Thr Phe Glu Trp Leu Tyr Glu Gln Ile Thr Glu Arg Ser Arg Ala Arg
 65 70 75 80

Leu Ala Lys Leu Lys Pro Glu Asp Asp Val Ile Gln Gln Met Leu Asp
 85 90 95

Asp Ala Ala Glu Phe Phe Leu Asp Asp Asp Phe Ser Ile Ser Leu Asp
 100 105 110

Leu Ile Val Ala Ala Asp Arg Asp Pro Ala Leu Arg Glu Gly Ile Gln
 115 120 125

Arg Thr Val Glu Arg Asn Arg Phe Val Val Glu Asp Met Trp Leu Gly
 130 135 140

Val Leu Val Ser Arg Gly Leu Ser Arg Asp Asp Ala Glu Asp Ile Leu
 145 150 155 160

Trp Leu Ile Phe Asn Ser Val Arg Gly Leu Ala Val Arg Ser Leu Trp
 165 170 175

Gln Lys Asp Lys Glu Arg Phe Glu Arg Val Arg Asn Ser Thr Leu Glu
 180 185 190

Ile Ala Arg Glu Arg Tyr Ala Lys Phe Lys Arg
 195 200

<210> 18
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> aa41-65 E6 HPV16

<400> 18

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp
 1 5 10 15

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
 20 25

<210> 19
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> aa43-77 E7 HPV16

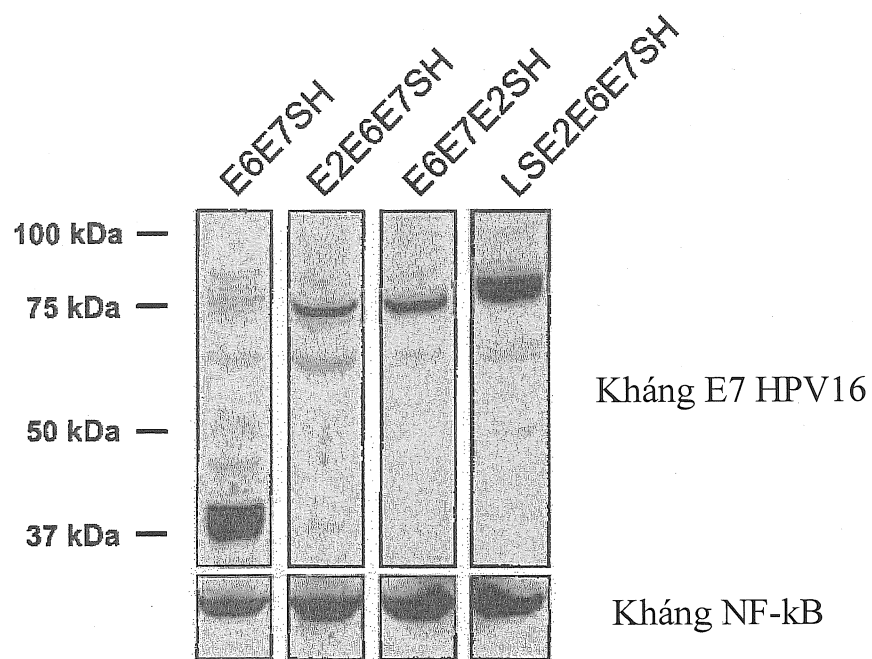
<400> 19

Gly	Gln	Ala	Glu	Pro	Asp	Arg	Ala	His	Tyr	Asn	Ile	Val	Thr	Phe	Cys
1				5					10					15	

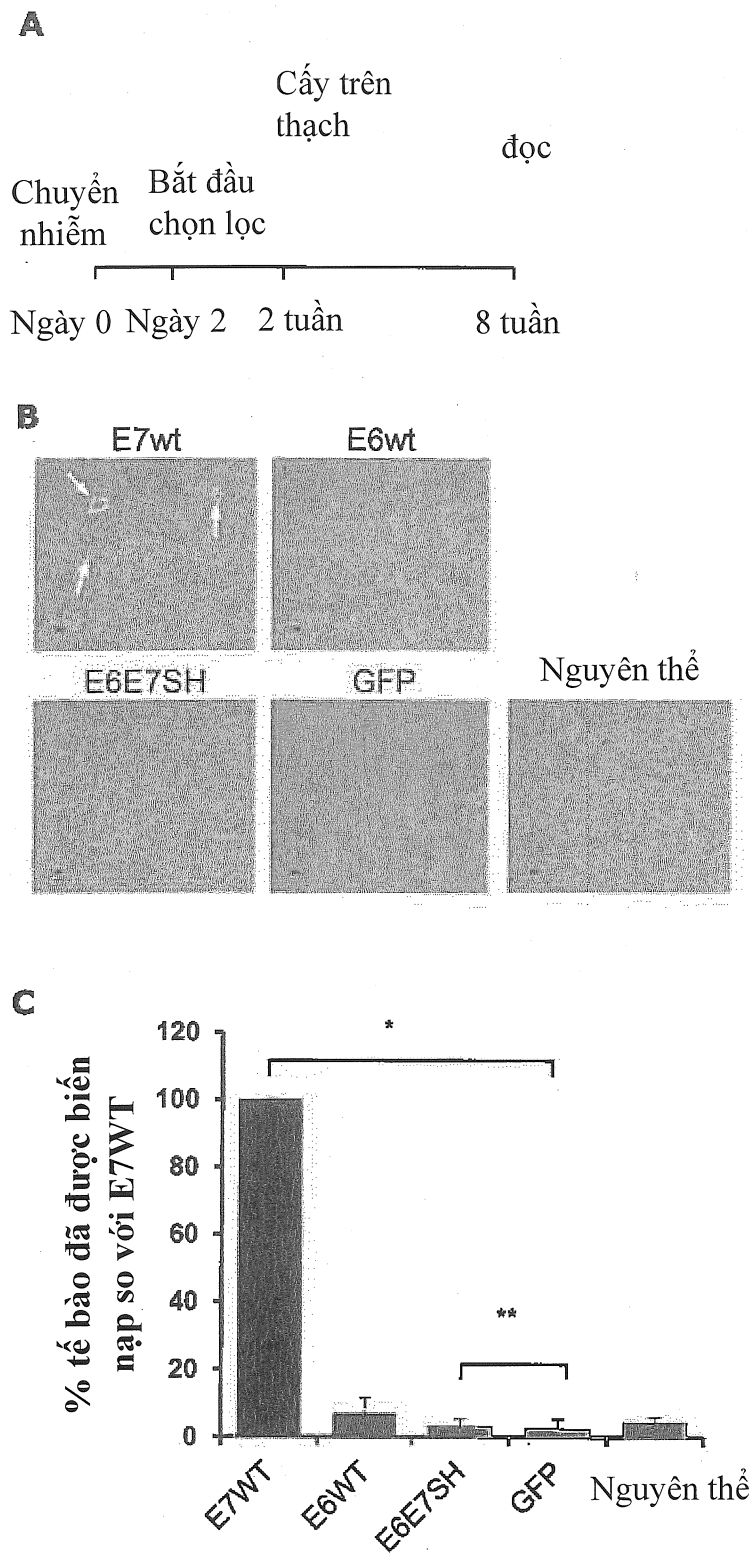
Cys	Lys	Cys	Asp	Ser	Thr	Leu	Arg	Leu	Cys	Val	Gln	Ser	Thr	His	Val
			20					25					30		

Asp	Ile	Arg
		35

1/16

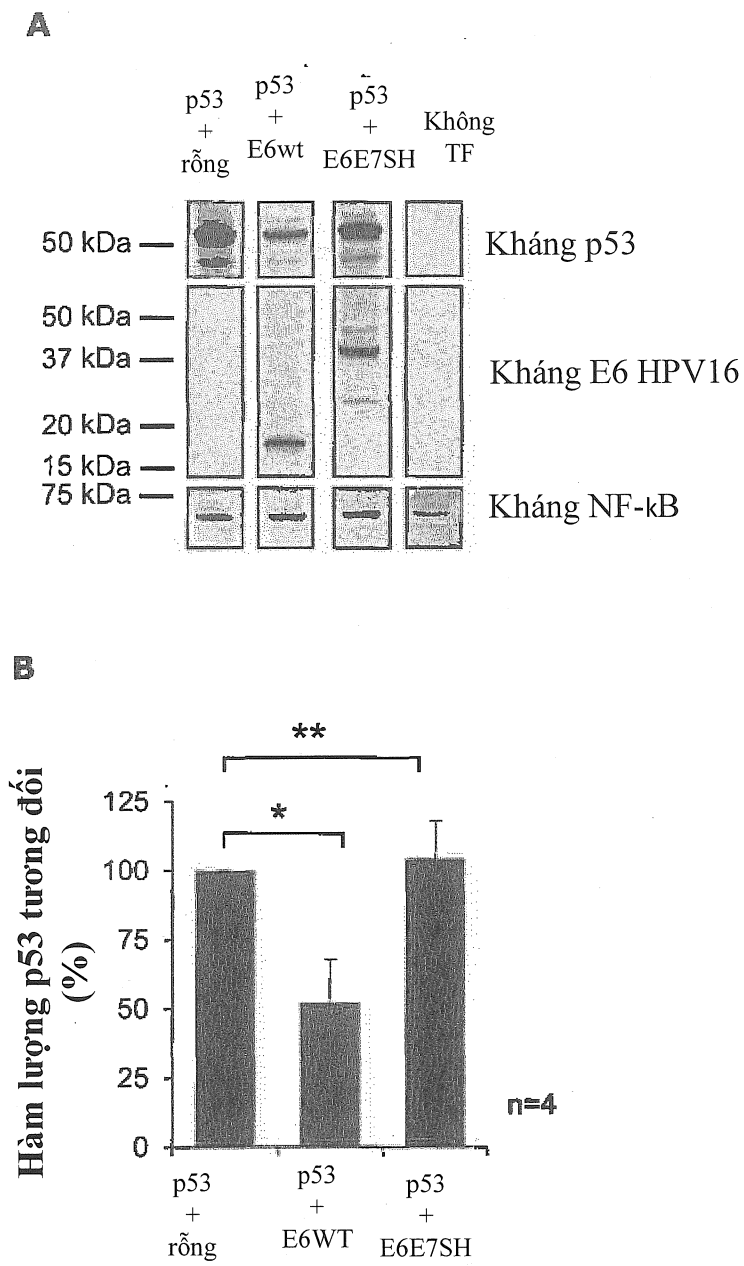
**Hình 1**

2/16



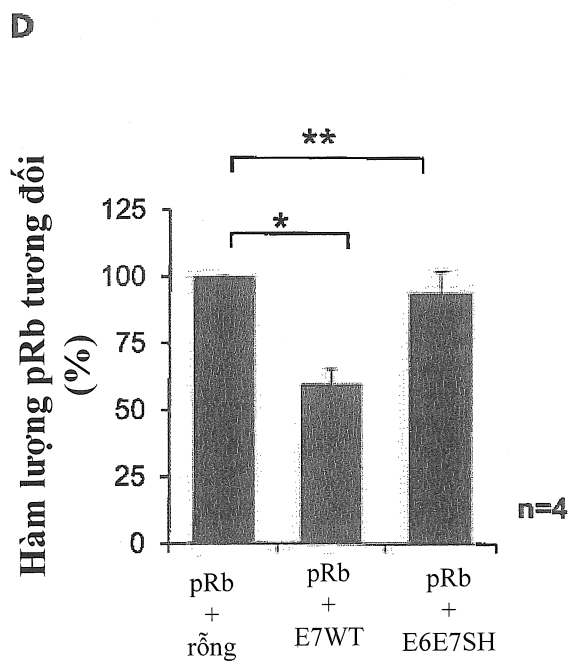
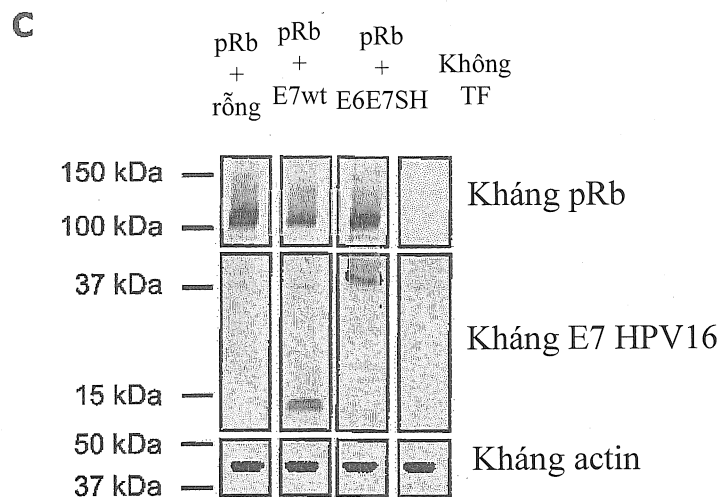
Hình 2

3/16

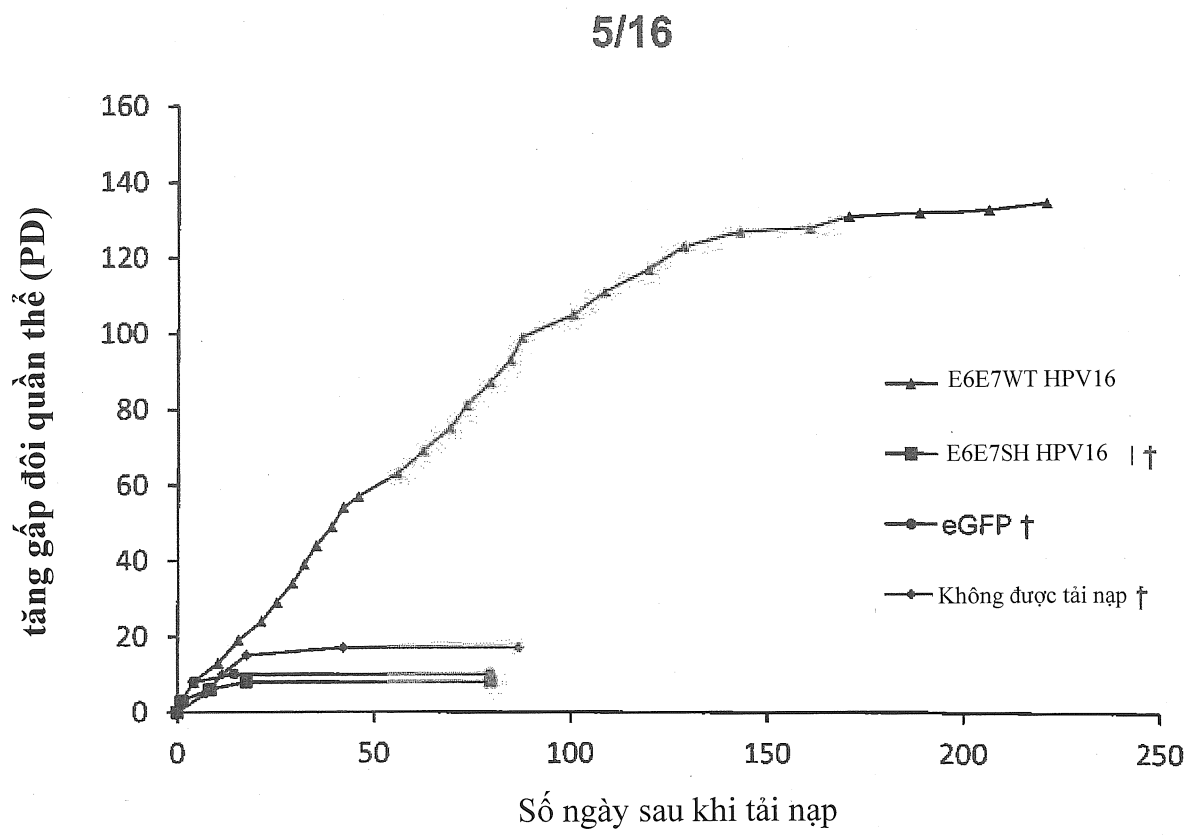


Hình 3

4/16

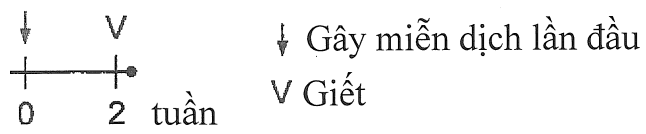
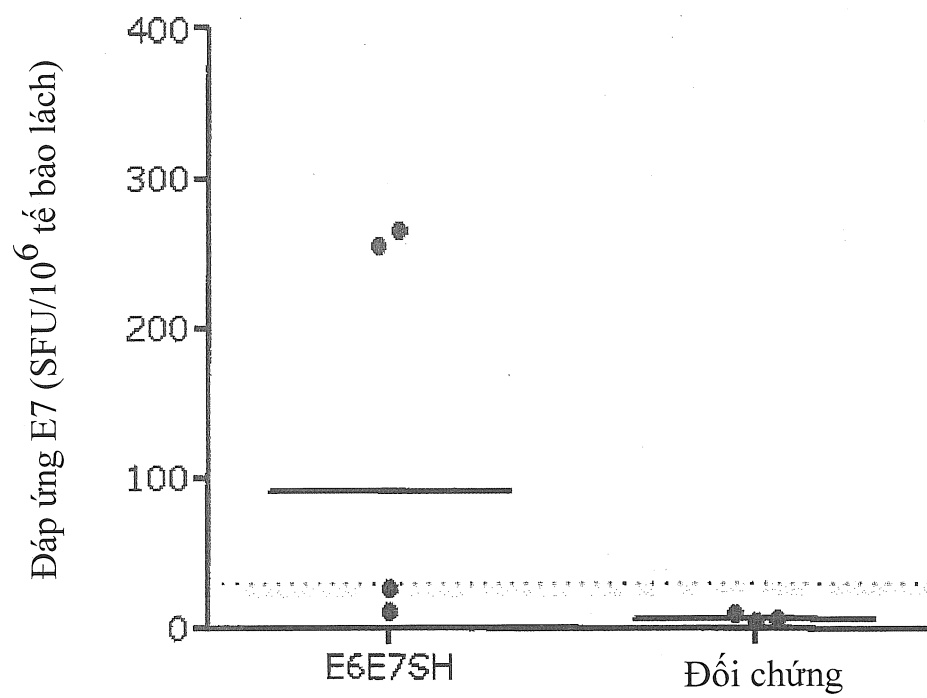


Hình 3 - tiếp



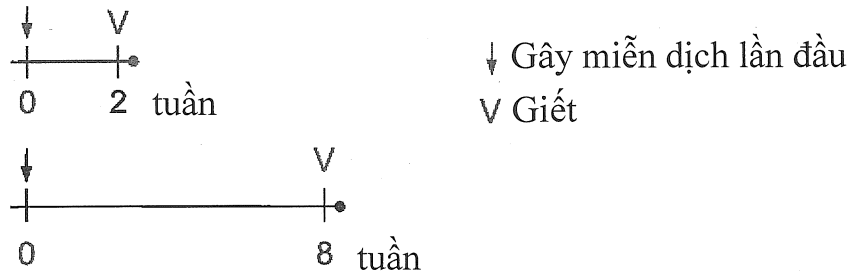
Hình 4

6/16

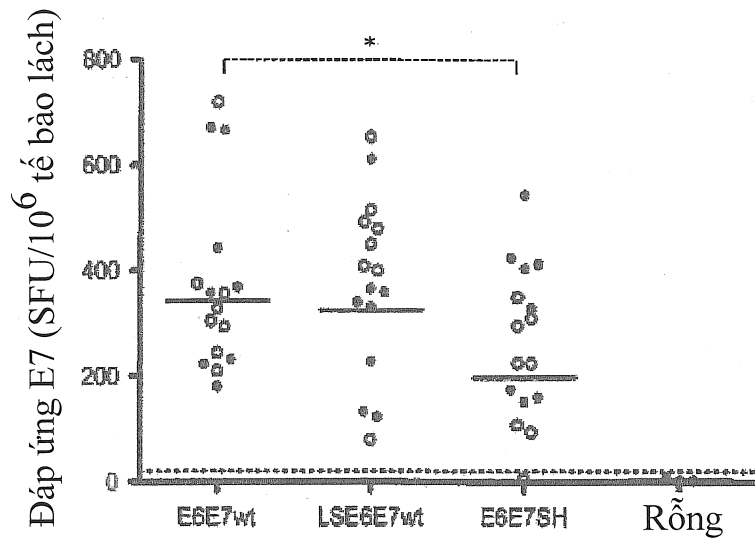
A**B****Hình 5**

7/16

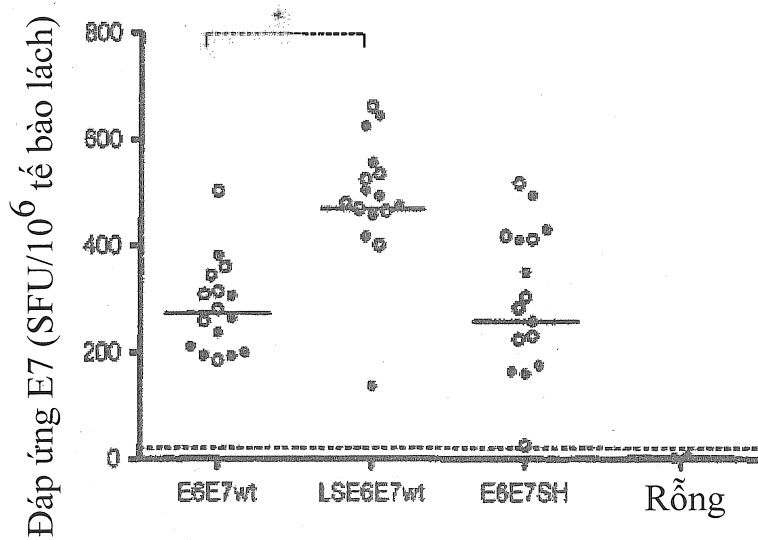
A



B

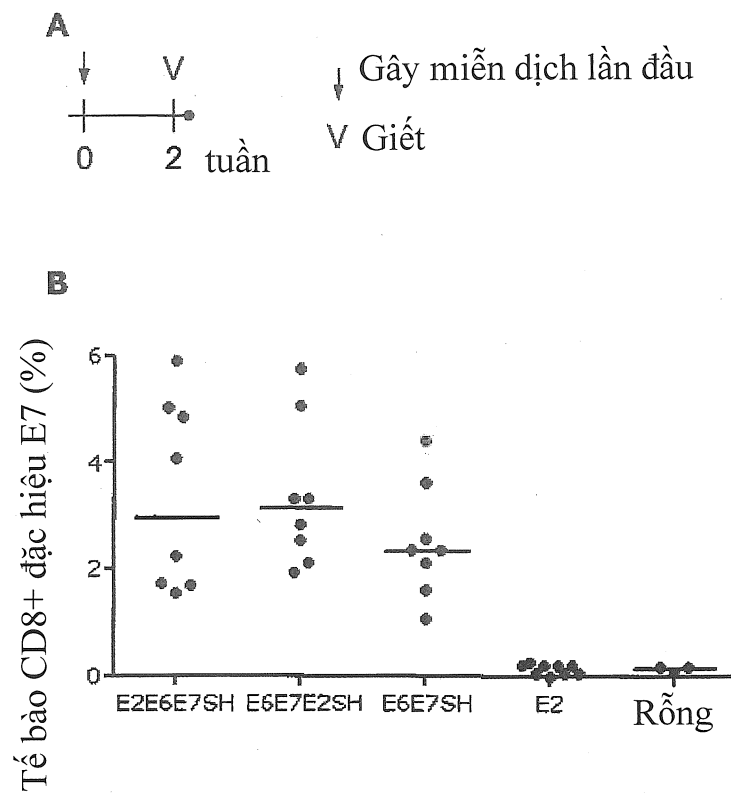


C



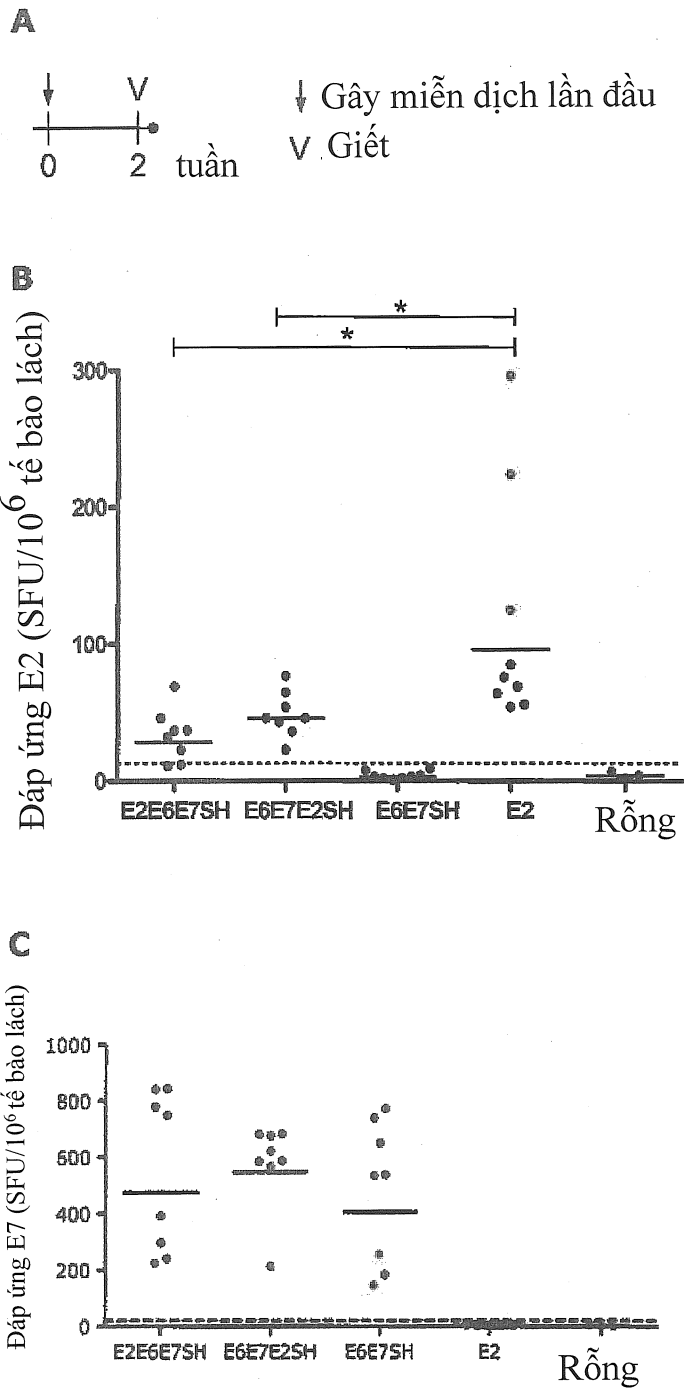
Hình 6

8/16



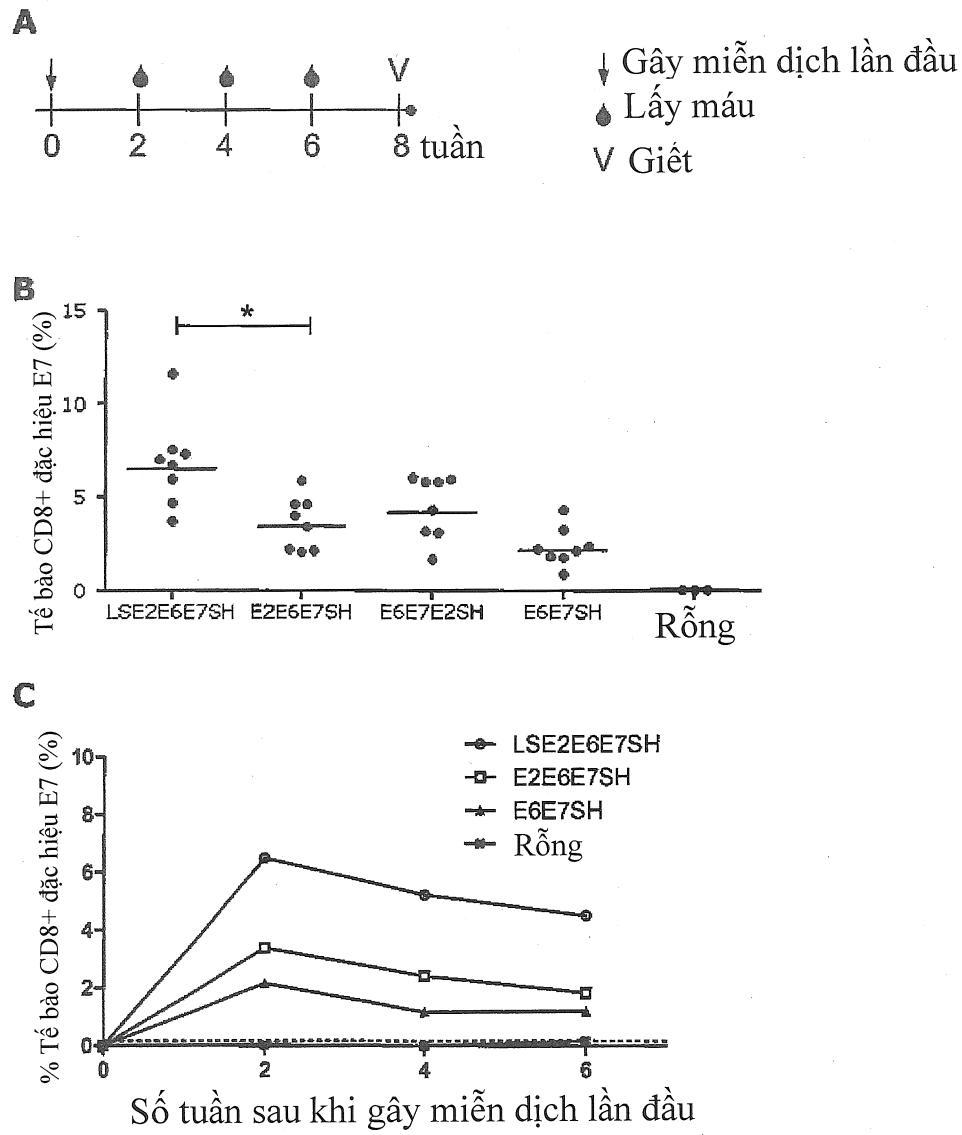
Hình 7

9/16



Hình 8

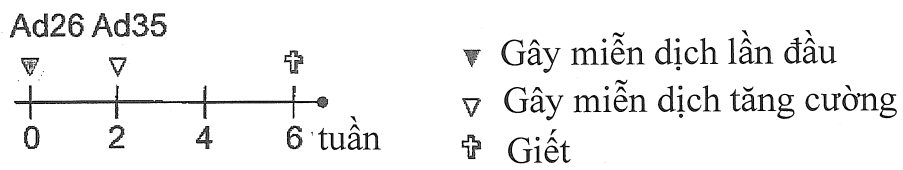
10/16



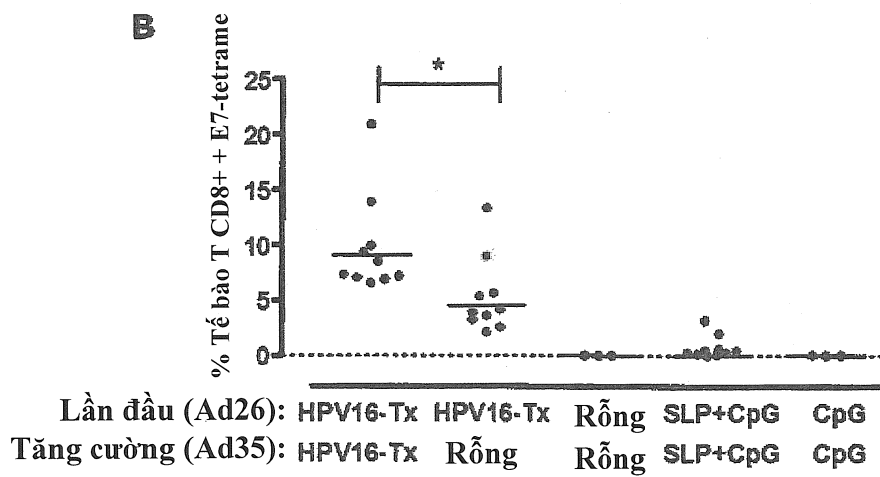
Hình 9

11/16

A



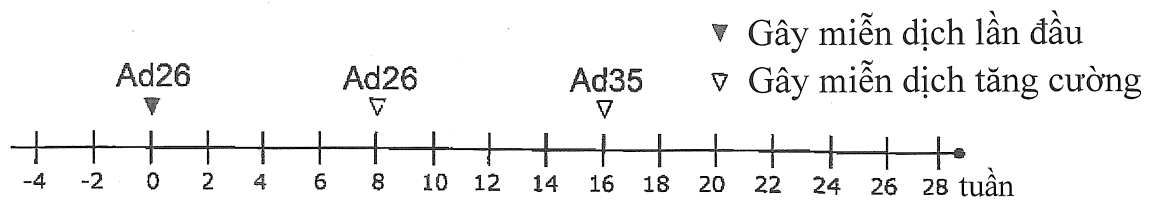
B



Hình 10

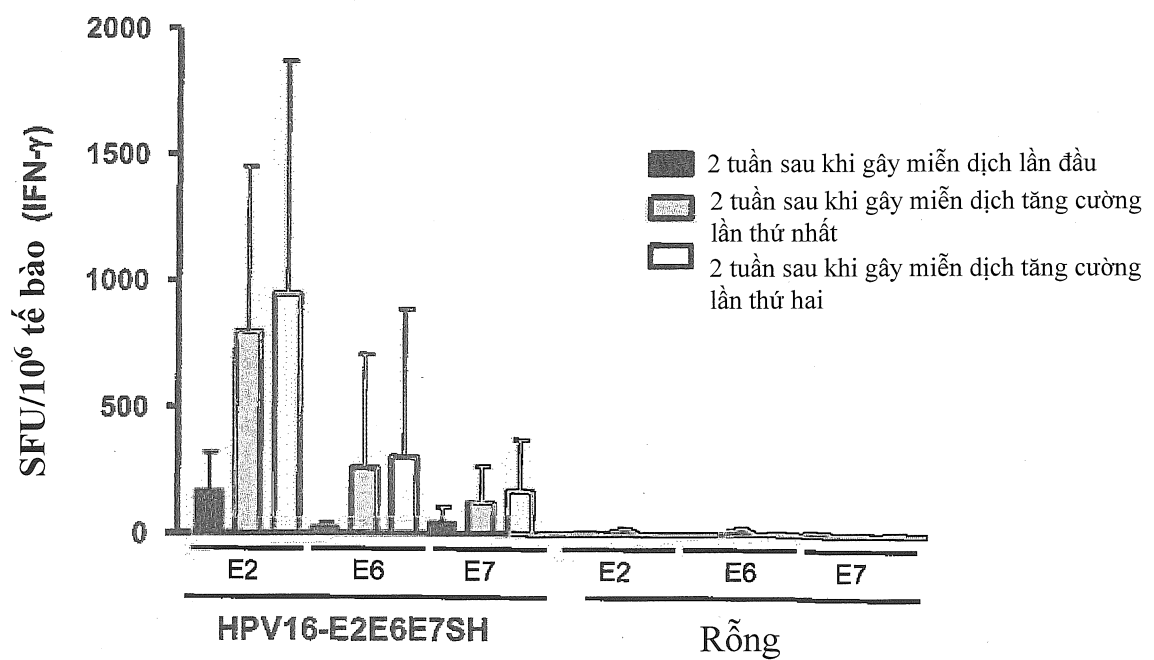
12/16

A



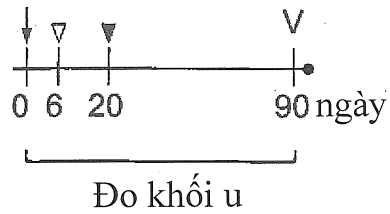
B

Đáp ứng E2, E6 và E7 HPV16

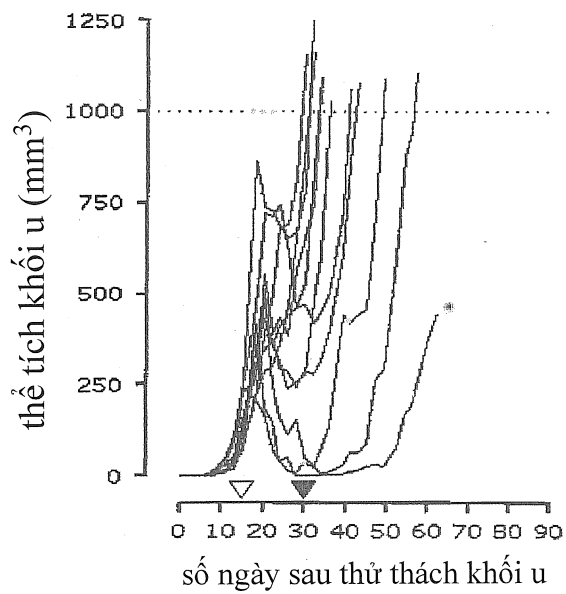
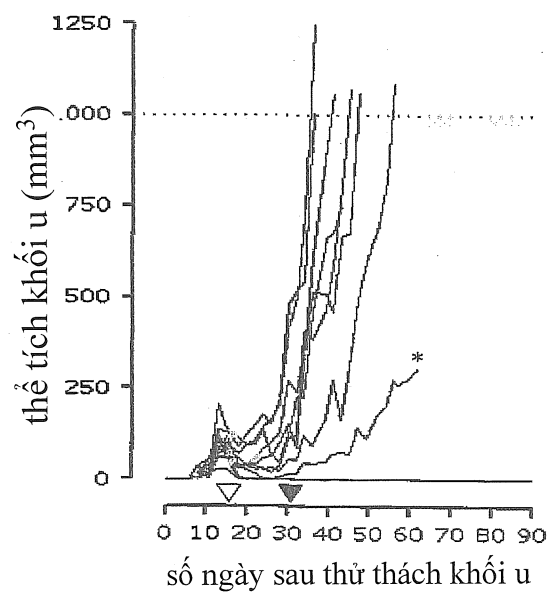
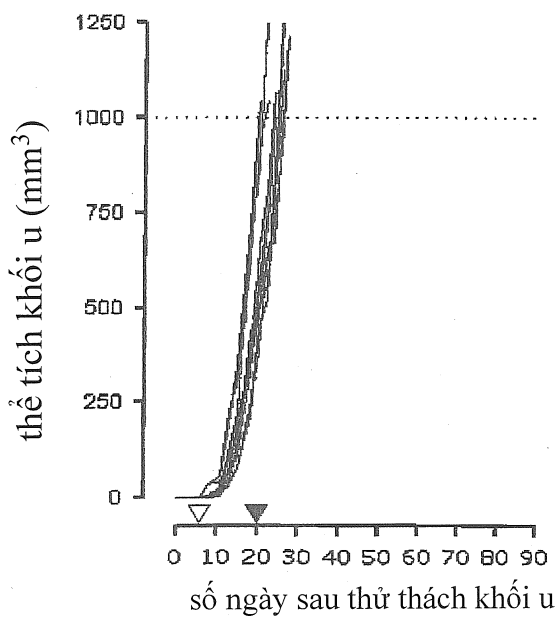
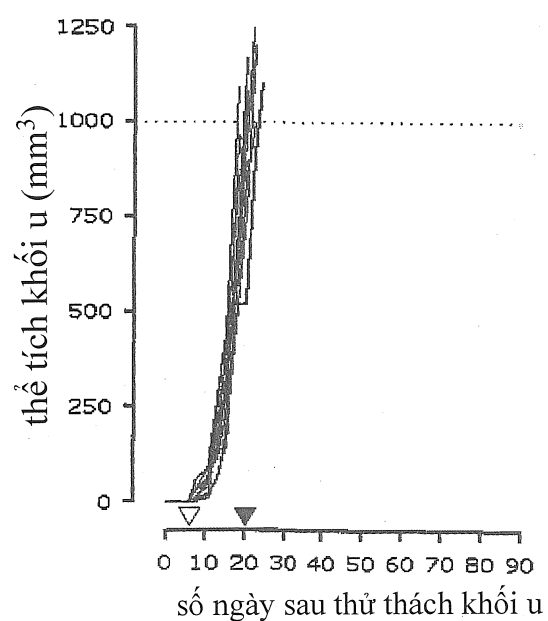


Hình 11

13/16

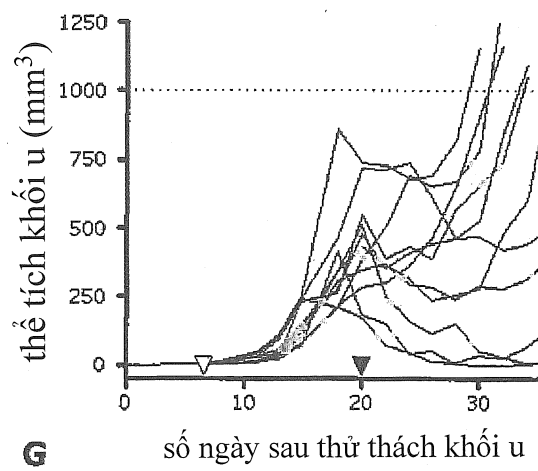
A

↓ TC-1
▽ Gây miễn dịch lần đầu
▼ Gây miễn dịch tăng cường
● Giết

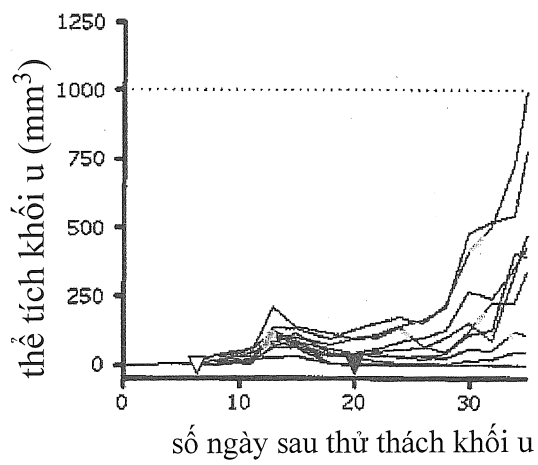
B**C****D****E****Hình 12**

14/16

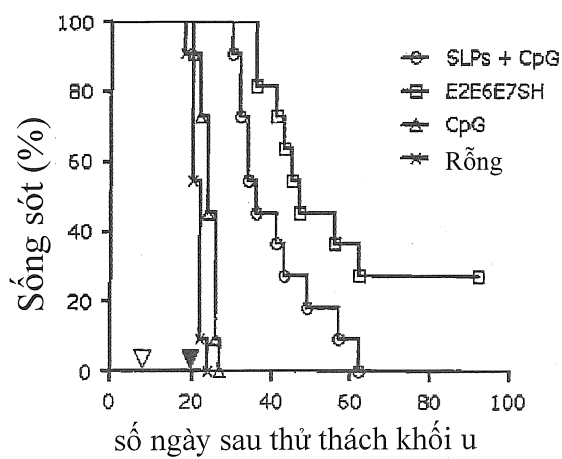
F



G

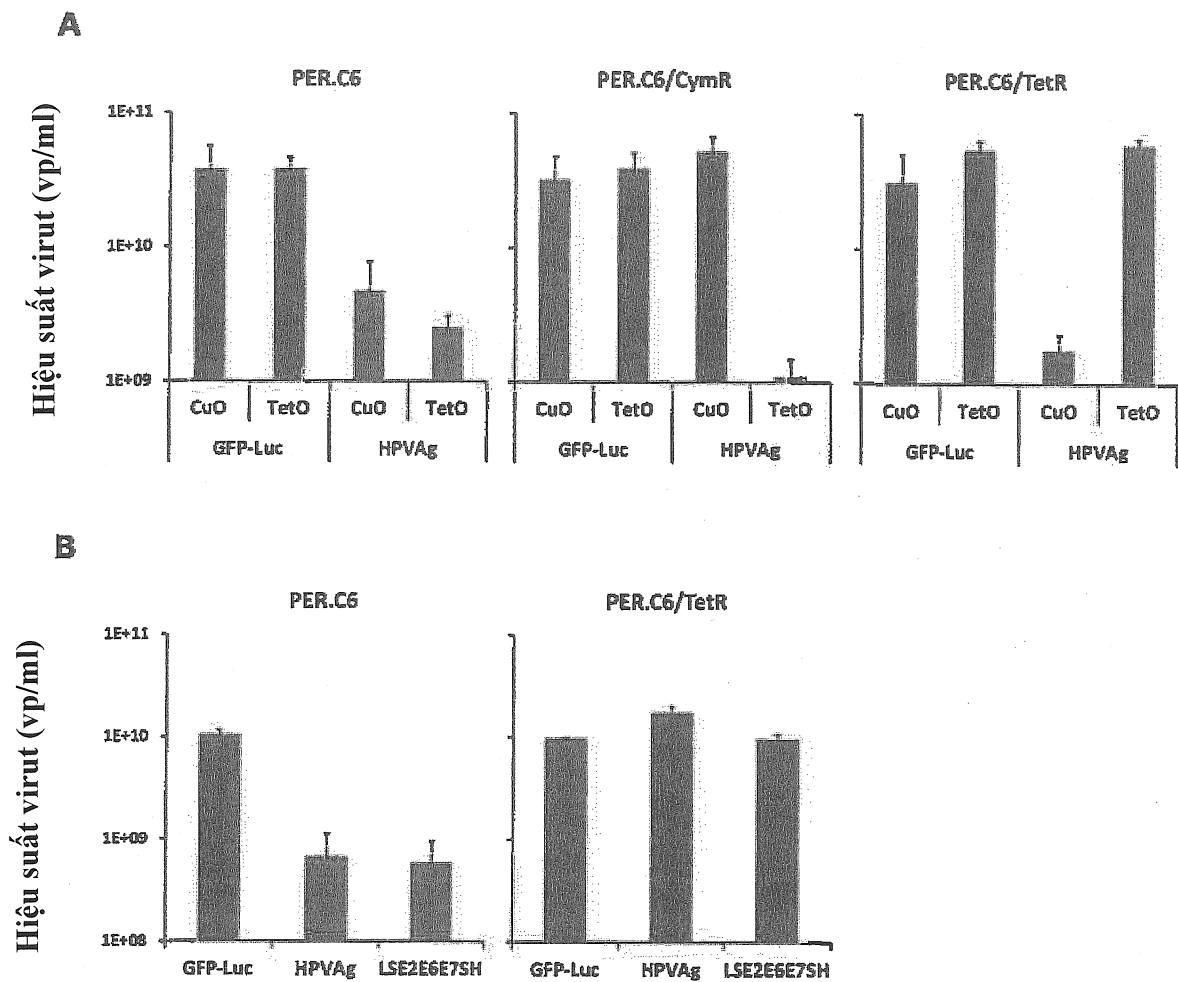


H



Hình 12 - tiếp

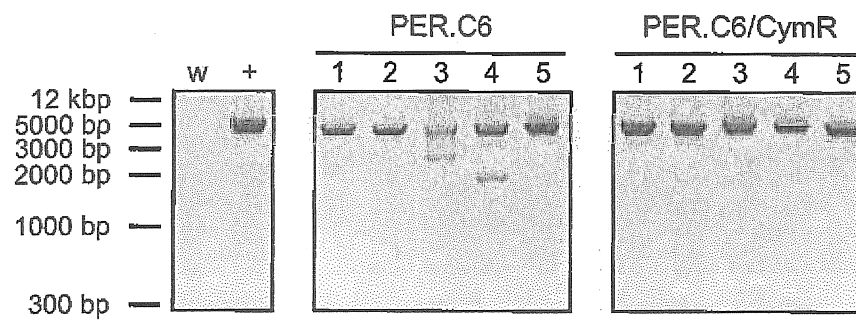
15/16



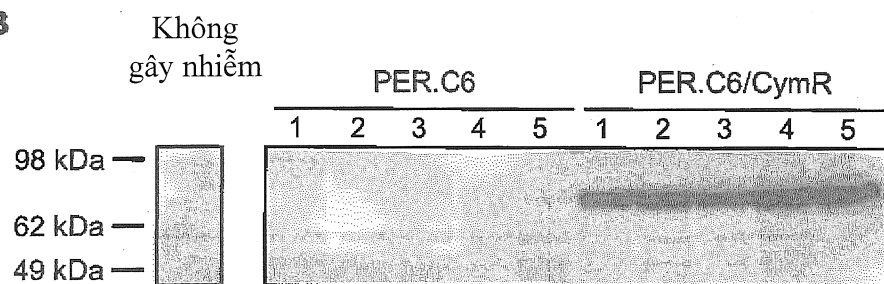
Hình 13

16/16

A



B



Hình 14