

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503375

(P2005-503375A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/00

H

4 C O 8 5

A 6 1 K 35/14

A 6 1 K 35/14

Z

4 C O 8 7

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/00

4 H O 4 5

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

C O 7 K 19/00

C O 7 K 19/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 118 頁)

(21) 出願番号 特願2003-516561 (P2003-516561)

(86) (22) 出願日 平成14年7月30日 (2002.7.30)

(85) 翻訳文提出日 平成16年1月30日 (2004.1.30)

(86) 国際出願番号 PCT/GB2002/003496

(87) 国際公開番号 W02003/011331

(87) 国際公開日 平成15年2月13日 (2003.2.13)

(31) 優先権主張番号 0118532.1

(32) 優先日 平成13年7月30日 (2001.7.30)

(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 503455558

イシス イノベーション リミテッド

イギリス国 オーエックス2 7ビーゼッ

ト オックスフォードシャー州 オックス

フォード サマータウン エバート プレ

ース エバート ハウス

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100108774

弁理士 橋本 一憲

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良された予防接種戦略に関する材料及び方法

(57) 【要約】

本発明は、初回刺激－追加刺激予防接種計画に基づく新規の予防接種戦略を提供する。本発明者らは、過去に多数のエピトープに対し初回刺激されたことがあるか又はそれらを被曝したことがある患者における免疫応答を追加刺激する改良された様式を決定した。その改良された方法は、追加刺激期において、エピトープが個々に投与されること、即ち別々のペプチド構築物上に保持されたエピトープが投与されることを必要とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体における免疫応答を追加刺激するための薬剤の調製における多数のエピトープの使用であって、個体が多数のエピトープのうちの少なくとも1個を過去に被曝したことがあり；薬剤が多数のペプチド（各ペプチドが該多数のエピトープのうちの1個を含む）を含む、使用。

【請求項 2】

個体が、自然に、又はエピトープのうちの1個もしくは複数個の投与により、多数のエピトープのうちの少なくとも1個を過去に被曝したことがある、請求項1記載の使用。

【請求項 3】

免疫応答がCD8+T細胞免疫応答である、請求項1又は請求項2に記載の使用。

【請求項 4】

各ペプチドが抗原提示細胞と会合している、請求項1～3のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項4記載の使用。

【請求項 6】

抗原提示細胞がリンパ球である、請求項4記載の使用。

【請求項 7】

薬剤がアジュバントをさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

各ペプチドが細胞の表面に呈示されている、請求項1又は請求項2に記載の使用。

【請求項 9】

個体における免疫応答を誘導するための第一及び第二の薬剤の調製における多数のエピトープの使用であって、第一の薬剤が、1個又は複数個のペプチド（各ペプチドが多数のエピトープのうちの1個又は複数個を含む）を含む初回刺激組成物であり；第二の薬剤が、多数のペプチド（各ペプチドが該多数のエピトープのうちの1個を含む）を含む追加刺激組成物であり；第二の薬剤が第一の薬剤の後に投与される、使用。

【請求項 10】

免疫応答がCD8+T細胞免疫応答である、請求項9記載の使用。

【請求項 11】

各ペプチドが抗原提示細胞と会合している、請求項9又は請求項10に記載の使用。

【請求項 12】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項11記載の使用。

【請求項 13】

抗原提示細胞がリンパ球である、請求項11記載の使用。

【請求項 14】

第一及び／又は第二の薬剤がアジュバントを含む、請求項9～13のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 15】

多数のエピトープが1個又は複数個の病原体に由来するものである、請求項1～14のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 16】

多数のエピトープが腫瘍細胞に由来するものである、請求項1～14のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 17】

個体における多数のエピトープに対する免疫応答を追加刺激する方法（個体が、多数のエピトープのうちの少なくとも1個を過去に被曝したことがある）であって、多数のペプチド（各ペプチドが該多数のエピトープのうちの1個を含む）を含む組成物をその個体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

個体が、自然に、又はエピトープのうちの1個もしくは複数個を含むペプチド1個もしくは複数個の投与により、多数のエピトープのうちの少なくとも1個を過去に被曝したことがある、請求項17記載の方法。

【請求項19】

個体が試験動物であり、かつエピトープが試験エピトープである、請求項17又は請求項18に記載の方法。

【請求項20】

被験エピトープの各々に対するCTL応答を決定する工程をさらに含む、請求項15記載の方法。

【請求項21】

試験動物が、ヒト免疫環境に近似した免疫環境を提供するトランスジェニック動物である、請求項19又は請求項20に記載の方法。

【請求項22】

試験動物がA2トランスジェニックマウスである、請求項21記載の方法。

【請求項23】

各ペプチドが抗原提示細胞と会合している、請求項17～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項23記載の使用。

【請求項25】

抗原提示細胞がリンパ球である、請求項23記載の使用。

【請求項26】

個体における多数のエピトープに対する免疫応答を誘導する方法であって、多数のエピトープのうちの1個又は複数個を含むペプチドを1個又は複数個含む初回刺激組成物を個体に投与し、次いで各々該多数のエピトープのうちの1個をコードするペプチドを複数個含む追加刺激組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項27】

個体が試験動物であり、かつエピトープが試験エピトープである、請求項26記載の方法。

【請求項28】

被験エピトープの各々に対するCTL応答を決定する工程をさらに含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】

試験動物が、ヒト免疫環境に近似した免疫環境を提供するトランスジェニック動物である、請求項27又は請求項28に記載の方法。

【請求項30】

試験動物がA2トランスジェニックマウスである、請求項29記載の方法。

【請求項31】

各ペプチドが抗原提示細胞と会合している、請求項26～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項31記載の使用。

【請求項33】

抗原提示細胞がリンパ球である、請求項31記載の使用。

【請求項34】

1個又は複数個のエピトープによる個体又は試験動物の予防接種の後に増幅された特異的なCTLを検出する能力を有するキメラ多量体MHC構造であって、結合メンバーにより単一構造内に共に維持された2個またはそれ以上のヒトMHC分子（MHC分子がマウス α 3ドメインを表す改変された α 3ドメインを含有している）を含む、キメラ多量体MHC構造。

【請求項35】

改変された α 3ドメインがマウス α 3ドメインである、請求項34記載のキメラ多量体MHC構造。

【請求項36】

10

20

30

40

50

予防接種において使用されるエピトープを呈示しているペプチドとさらに複合体化されている、請求項34又は請求項35に記載のキメラ多量体MHC構造。

【請求項37】

4個のヒトMHC分子を有する、請求項34～36のいずれか一項に記載のキメラ多量体MHC構造。

【請求項38】

ヒト α 1及び α 2ドメイン並びにマウス α 3ドメインを含む融合タンパク質である、請求項34～37のいずれか一項に記載のキメラ多量体MHC構造。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、予防接種戦略を改良するための材料及び方法に関する。具体的には、排他的には、本発明は、免疫系が、初回刺激組成物により誘導され、そして追加刺激組成物の投与により追加刺激される「初回刺激－追加刺激」予防接種プロトコルに関する。本発明は、さらに、予防接種計画を直接モニタリングし、新規のエピトープを決定するための道具としての、新規の四量体可溶性クラスI MHC／ペプチド複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

エキスピオアッセイ法において抗原CTL応答の頻度をモニタリングする能力の最近の進歩によって、異なる予防接種プロトコルを比較するための性能は急速に改良されつつある。特に、四量体可溶性クラスI MHC／ペプチド複合体（四量体）の使用は、ヒトCTL応答の迅速かつ正確な分析を可能にすることにより、新たなワクチンの開発を大きく加速する機会を提供する¹⁻³。

20

【0003】

同一の抗原性タンパク質をコードする非交差反応性ベクターの反復注射に基づく異種初回刺激－追加刺激予防接種プロトコルは、おそらくは組換え標的タンパク質に含まれているエピトープへの免疫応答の集束のため、強力なCTL応答をもたらすことが明らかとなっている⁴。プラスミドDNAによる初回刺激と、組換え欠陥ワクシニアウイルスMVAによる追加刺激との組み合わせが、高レベルの特異的免疫を生成させることが、最近の結果により証明されている⁵⁻¹⁰。

30

【0004】

α ウイルスは、予防接種プロトコルにおけるウイルスベクターとして精力的に研究されている¹¹⁻¹⁵。複製能のない α ウイルス、セムリキ森林熱ウイルス（SFV）は、コードされた外来抗原に対する抗体及びCTLを誘導する能力を有することが判明している^{14、15}。少数のウイルス構造タンパク質の発現は、ウイルス構造タンパク質ではなく組換えタンパク質に特異的な免疫応答が生成する確率を最大にすることから、SFVゲノムの小さいサイズ¹⁶のため、このウイルスは、予防接種戦略にとって極めて魅力的なベクターである。

【0005】

ウイルス及び腫瘍細胞が、抗原性タンパク質の変異又は欠失により特異的免疫応答を回避することは、いくつかの研究によって証明されている^{17、18}。ウイルス又は腫瘍の抗原喪失バリエーションの生成を最小限に抑えるためには、ワクチンにより誘導される免疫応答が、可能であれば別個のタンパク質によりコードされた、広範囲の異なるエピトープに対して特異的なものであるべきである。この原理によって、異なる特異性を有するCTLを同時に増幅することを目指して、CTLエピトープのストリングをコードするワクチンが作成されている。A2トランスジェニックマウスの予防接種により、ポリエピトープ構築物内にコードされた多数のエピトープが、各々特異的なCTLを初回刺激し得ることが示され、このことから、免疫療法臨床試験のためのこのアプローチの実行可能性が示唆された¹⁹⁻²²。しかしながら、これらのマウスにおけるCTL応答を直接モニタリングするためのアッセイ法の技術的な限界のため、多価構築物が、多くの特異性のCTLを有効なレベルにまで増幅する能力を有することは立証されていない。

40

50

【0006】

ポリエピトープワクチンは、ヒトにおける広域性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）応答を誘導する能力を有するであろうという期待が存在する。多数のエピトープの投与は、異なる特異性を有するCTLを同時に増幅することを目標としている。そのような多価構築物は、明白に有利な動物において、複数の特異性のCTLを同時に初回刺激する能力を有することが判明しているが、それらが、続いて、これらのCTL応答の各々を有効なレベルにまで追加刺激する能力を有するか否かは未だ不明である。

【0007】

免疫応答を誘起する効率がエピトープによって異なることは、既知である。ドミナントであると記載される、即ち、強力なCTL応答を刺激するエピトープも存在するし、比較的弱い応答を刺激するためサブドミナント（subdominant）であると記載されるものも存在する。しかしながら、広範囲のエピトープに対する免疫応答を誘起しようとする場合には、よりドミナントなエピトープが優先されサブドミナントエピトープが見落とされるということがないことが重要である。

【0008】

ワクチン計画の初回刺激段階において、よりドミナントなエピトープは、より弱いエピトープより大きなCTL応答を誘発する。これは、最初の多数のエピトープに対する初回刺激イベントの後のCTL応答が、必然的に、よりドミナントな種に対してはより大きく、サブドミナントの種に対してはより弱いことを意味する。しかしながら、本発明者らは、追加刺激期に同じ多数のエピトープがポリエピトープ構築物として投与された場合、状況が悪化することを見出した。これは、ポリエピトープが、初回刺激期とは異なるベクター／媒体で提供された場合ですら、当てはまると考えられる。本発明者らは、追加刺激段階においては、サブドミナントエピトープに対するCTL応答の増幅が有意に低下してしまう程に、サブドミナントエピトープに対するCTL応答より大きな速度で、よりドミナントなエピトープに対するCTL応答が増加することを見出した。これは、ドミナントエピトープに対して誘起されたCTLが、サブドミナントエピトープに対して誘起されたCTLを犠牲にして、さらに増幅されることを意味する。結果として、ドミナントエピトープに対して誘起されたCTLの割合は増加し、サブドミナントエピトープに対して誘起されたCTLの割合は極わずかにしか増加しない。これは、追加刺激期が、最初の初回刺激段階において増幅されたCTLの増殖を優先することにより、免疫応答を狭小化することを意味する。

【発明の開示】

【0009】

本発明者らは、驚くべきことに、多数のドミナントエピトープ及びサブドミナントエピトープに対する追加刺激期の可能性のある負の効果を克服するのに有益な新規の初回刺激－追加刺激計画を決定した。

【0010】

注目すべきことに、本発明者らは、初回刺激段階の後、応答を追加刺激するため、エピトープが、単一のポリエピトープ構築物として投与された場合とは対照的に、個々に使用された場合、広いCTL応答が、より均一に、有効なレベルにまで追加刺激され得ることを見出した。本発明者らは、個々のエピトープにより追加刺激することによって、ドミナントエピトープに対して誘起されたCTLが、サブドミナントエピトープに対して誘起されたCTLを犠牲にして追加刺激されることがなくなることを見出した。むしろ、それらは、同等に追加刺激される。

【0011】

特に、そして後で例証されるように、本発明者らは、初回刺激－追加刺激予防接種が狭いCTLレパートリーの増幅をもたらすことを証明するため、黒色腫エピトープのストリングをコードするDNA及びウイルスベクターを使用した。本発明者らは、追加刺激工程においては、ポリエピトープ構築物を提示している細胞の認識に関するCTLの競合によって、初回刺激時により効率的に増幅されたCTLの方へ応答が偏向することを見出した。対照的に、本発明者らは、追加刺激期に、APCが別々にエピトープを提示している場合には、ドミ

ナント決定基及びサブドミナント決定基に特異的なCTLの同時の増幅が得られることを見出した。これは、例えば、各々別々の抗原をコードしているウイルスの混合物を注射することにより、又はエピトープを別々に提示しているAPCの混合物を注射することにより、達成され得る。

【0012】

従って、本発明は、予防接種計画の初回刺激期にはポリエピトープ構築物を使用されるが、追加刺激期にはエピトープを個々にコードするか又は含む免疫原が使用される、多数のエピトープに対する特異的であるが広域性のCTL応答を誘導する方法を提供する。

【0013】

本発明は、追加刺激期において、初回刺激段階とは異なる様式でエピトープが免疫系へと提示される、異種初回刺激－追加刺激予防接種計画も提供する。これは、より詳細に後で説明される。

【0014】

エピトープが個々に投与された場合、多数のエピトープに対する特異的であるが広域性のCTL応答を誘導する追加刺激期の効果が極めて高くなることが決定されたことから、本発明が生まれた。

【0015】

従って、個体が多数のエピトープにより既に初回刺激されたことがある場合、本発明は、別々の構築物上にある、又は別々の媒体により保持された多数のエピトープを、個々に、即ち別々に投与することを含む、過去に誘導された（初回刺激された）免疫応答を追加刺激する方法を提供する。

【0016】

本明細書に記載された本発明の全ての面において、多数のエピトープとは、2より大きい、より好ましくは4より大きい、さらに好ましくは7より大きい、任意の数のエピトープと解釈され得る。多数のエピトープのうち、少なくとも2個、より好ましくは4個、さらに好ましくは7個のエピトープは、異なると思われる、即ち異なるアミノ酸配列を含むか、又は異なる抗体により認識されると思われる。しかしながら、多数のエピトープには、数十個又は数百個という程度の多くのエピトープが含まれることも好ましい。これらのエピトープのうちのいくつかは、極めて類似しており交差反応してもよい。

【0017】

従って、個体が、病原体（例えば、ウイルス、細菌等）又は腫瘍に感染しているか、又は何らかの様式でそれらと接触したことがある、即ちそれらを被曝したことがある場合には、個体の免疫系は、その病原体又は腫瘍により提示された多数のエピトープに対して自然に初回刺激されていると思われる。しかしながら、この免疫系の最初の初回刺激は、個体が病原体又は腫瘍に対する有効な防御を開始するのにはおそらく不十分であると思われる。しかしながら、本発明に従い、既に初回刺激された免疫応答は、別々の構築物（ペプチドもしくは核酸）又は別々の媒体により保持された多数のエピトープを個々に、即ち別々に投与することにより、追加刺激され得る。従って、この状況において、本発明は、広大な治療的可能性を有する。

【0018】

個体が特定のエピトープに対して初回刺激されているか否か（即ち、病原体の被曝により、又は腫瘍の結果として）を検出することは可能と思われるが、この工程は、必要ではないと思われる。

【0019】

時間、経費、及び手間を節約するためには、病原体又は腫瘍の被曝により多数のエピトープに対して初回刺激されていると推測される全ての患者を、初回刺激された患者として治療することが好ましいと思われる。

【0020】

従って、本発明の第一の面において、過去に多数のエピトープのうちの少なくとも1個、好ましくは多数のエピトープの全部に対して初回刺激されたことがあるか、又はそれらを

被曝したことがある個体における免疫応答を追加刺激する方法が提供される。前記の方法は、多数の構築物（各々、前記の多数のエピトープのうちの1個をコードしているか又は含んでいる）をその個体へ投与する工程を含む。その構築物は、問題のエピトープを含むペプチドをコードする能力を有する核酸配列であってもよいし、又は直接投与され得るエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質／ポリペプチドであってもよい。その核酸配列は、問題のエピトープのうちの1個又は複数個を含むペプチドをコードする能力を有するDNA、RNA、又はcDNAであり得る。構築物がペプチドをコードする核酸配列であるか又はペプチド自体であるかに関わらず、個体の免疫系へと効率的に提示され得るよう、構築物を保持する媒体を使用することが好ましい。好ましくは、構築物は、核酸発現ベクター、例えばウイルスベクター、又はAPC、例えば樹状細胞もしくはリンパ球、例えばB細胞のような別々の媒体により、各々提示されるか又は保持される。媒体は、免疫応答の誘導を補助するアジュバントとして作用してもよい。APCは、ペプチド構築物を発現させるために使用されてもよいし、又は投与前にパルス処理されてもよい。

10

【0021】

本発明の第一の面に係る方法は、「第二の」又はさらなる追加刺激組成物を投与することをさらに含み得る。この組成物も、前記の多数のエピトープのうちの1個を各々含む個々の構築物を含むと思われる。ここでも、構築物は、ペプチドであってもよいし、又は前記のペプチドをコードする能力を有する核酸配列であってもよい。

【0022】

第二の又はさらなる追加刺激組成物の投与は、投与されたエピトープに対する個体の免疫応答を追加刺激するのみならず、個体が未だ病原体又は腫瘍の被曝によって自然に初回刺激されていない薬剤内に存在する任意のエピトープに対する「第一の」追加刺激を提供するという利益を有する。換言すると、第二の／さらなる追加刺激組成物は、個体が過去に被曝したことがない、薬剤（「第一の」追加刺激組成物）内に提示された任意のエピトープが、効率的に初めて追加刺激されることを保証する。

20

【0023】

又は、本発明は、病原体又は腫瘍に関連した抗原に対して個体を免疫するため、即ち予防的ワクチンとして使用されてもよい。この状況において、個体の免疫系は、まずその病原体に特徴的な多数のエピトープにより初回刺激され、次いで免疫系がその病原体に対する有効な防御を誘起するのを補助するため、追加刺激されなければならない。これは、初回刺激－追加刺激計画として既知である。しかしながら、前記のように、本発明者らは、あらゆる各エピトープに対する免疫応答を最大にするためには、追加刺激段階において、エピトープが個々に投与されなければならないことを見出した。さらに、本発明者らは、異種初回刺激－追加刺激計画が、当技術分野において既に記載されている同種初回刺激－追加刺激法より好ましいことも決定した。従って、追加刺激段階において、初回刺激段階で使用された媒体とは異なる非交差反応性の別の媒体、例えばウイルスベクターを使用して、多数のエピトープを投与することも好ましい。

30

【0024】

従って、本発明の第二の面において、個体における多数のエピトープに対する免疫応答、好ましくはCD8+T細胞免疫応答を誘導する方法が提供される。前記の方法は、前記の多数のエピトープをコードしているか又は含んでいる構築物を含む初回刺激組成物を個体へ投与し、次いで複数個の個々の構築物（各々、前記の多数のエピトープのうちの1個を含んでいる）を含む追加刺激組成物を投与する工程を含む。

40

【0025】

第二の面によると、構築物は、ペプチド（タンパク質／ポリペプチド）であってもよいし、又は前記のペプチドをコードする核酸配列であってもよい。この構築物も、エピトープを個体の免疫系へと効率的に呈示する能力を有する媒体を使用して投与されることが好ましい。従って、構築物が核酸配列である場合、これは、核酸発現ベクター、即ちプラスミドベクター又はウイルスベクターに含まれていてもよい。これらのベクターは、同様に、抗原提示細胞（APC）のような細胞に含まれていてもよい。

50

【0026】

構築物がペプチドである場合には、細胞、より好ましくはAPCを、媒体として使用することが好ましいかもしれない。それは、これらの細胞が、ペプチドを免疫系へ効率的に呈示する能力を有するためである。APCの例には、樹状細胞及びリンパ球が含まれる。

【0027】

媒体を使用した個体への構築物の投与は、より詳細に後で記載される。

【0028】

初回刺激組成物は、多数のエピトープをコードする核酸を各々含有している核酸ベクター1個又は複数個を含み得る。又は、初回刺激組成物は、多数のエピトープを含有しているペプチド又は抗原を含んでいてもよい。

10

【0029】

この第二の面において、初回刺激組成物は、エピトープのストリング、即ちポリエピトープ構築物を含む。しかしながら、本方法は、その代わりに、多数のエピトープのうちの1個又は複数個をコードしているか又は含んでいる構築物1個又は複数個の投与を含んでいてもよい。しかしながら、この状況において、初回刺激－追加刺激計画は、異種初回刺激－追加刺激計画であることが好ましい。換言すると、初回刺激組成物が個々のエピトープを含む場合、追加刺激組成物は、好ましくは、異なる非交差反応性の媒体を使用して、その個々のエピトープを保持するか又は提示する。

【0030】

例えば、核酸構築物が使用される場合には、初回刺激期と追加刺激期とで異なるウイルスベクターが使用され得る。同様に、ペプチド構築物の場合には、初回刺激期と追加刺激期とで異なるAPC細胞が使用され得る。例えば、初回刺激にはB細胞を使用し、追加刺激には樹状細胞を使用するということが可能である。

20

【0031】

これは本発明の好ましい態様であり、同種初回刺激－追加刺激計画も、ペプチド構築物を使用する場合には特に、本発明の範囲内であることが理解されなければならない。

【0032】

全ての初回刺激核酸構築物が、組換え構築物、例えば組換えウイルス構築物、DNA構築物、RNA構築物のような遺伝子構築物、又はそのような構築物によりトランスフェクトもしくは形質導入された細胞であることも好ましい。さらに、初回刺激組成物には、別々のペプチド又はタンパク質、及びそのようなペプチド又はタンパク質が細胞外又は細胞内に負荷された細胞が含まれ得る。ペプチドは、担体タンパク質又はアジュバントとの融合構築物の一部を形成していてもよい。これらは、融合タンパク質として作製され得る。

30

【0033】

追加刺激組成物又は初回刺激組成物が、ペプチド又はタンパク質を含む場合、これらは、（ペプチド又はタンパク質のAPCへの細胞内送達を含む）ペプチド及び／又はタンパク質によるパルス処理を施された抗原提示細胞（APC）、例えば樹状細胞又はリンパ球（B細胞）を使用して送達され得る。APCは、ペプチド又はタンパク質でパルス処理された後、APCの活性化を補助するためウイルスにより感染されてもよい。即ち、この場合、ウイルスはペプチドのためのアジュバントとして作用する。

40

【0034】

セファロースビーズ又はキチン（chitine）ビーズのような粒子も、APCを模倣し、免疫系の刺激のためペプチド／MHC複合体及び共刺激分子を呈示するために使用され得る。

【0035】

APCに由来するエキソソーム（exosome）又はその他の細胞成分体も、ペプチドエピトープの送達のため、（ペプチド又はタンパク質のエキソソームへの細胞内送達を含む）ペプチド及び／又はタンパク質によるパルス処理を施され得る。

【0036】

ペプチド又はタンパク質を、個体へ直接、好ましくは別々の位置において投与することも可能である。このようにして投与されるペプチド又はタンパク質には、好ましくは、初回

50

刺激期又は追加刺激期のいずれかに、アジュバントが添加される。

【0037】

媒体として核酸ベクターが提供される場合、エピトープをコードする核酸は、核酸の発現による個体における前記の抗原の産生のため、制御配列と機能的に連結されていることが好ましい。

【0038】

初回刺激組成物が多数のエピトープを提示するため、広いが特異的なCTL応答が、個体の免疫系により誘導される。

【0039】

初回刺激組成物とは対照的に、追加刺激組成物は、常に、エピトープを個々に提示する。このことにより、既存の記憶CTL応答が、追加刺激期における同一構築物に含まれている他のエピトープに対するCTL応答を有意に低下させるという、本発明者らにより決定された問題が克服される。 10

【0040】

初回刺激組成物（使用される場合）又は追加刺激組成物は、核酸構築物を使用する場合、エピトープをコードする核酸構築物を保持するための任意の媒体、例えばアデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターのようなウイルスベクターをさらに含み得る。ウイルスベクターは、修飾型複製欠損ベクター、例えば修飾型ウイルス・アンカラ（Ankara）（MVA）であってもよいし、又はアビポックス（avipox）ベクター、例えば鶏痘（fowlpox）、カナリアポックス（Canarypox）等であってもよい。好ましいベクターには、複製能のないαウイルス、セムリキ森林熱ウイルス（SFV）が含まれる。その他の適切なベクターは、当業者には明らかであると思われる。 20

【0041】

初回刺激組成物は、抗原をコードするDNAを含み得る。DNAは、哺乳動物細胞における複製能を有しない環状プラスミドの形態であってもよい。抗原の発現は、好ましくは、哺乳動物細胞において活性なプロモーター、例えばサイトメガロウイルス前初期（CMV IE）プロモーターにより駆動されると思われる。

【0042】

CD8⁺ T細胞免疫応答は、DNAワクチン、Ty-VLP、又は組換え修飾型ワクシニアウイルス・アンカラ（MVA）を使用して初回刺激され得る。後述の実施例において、本発明者らは、初回刺激期に、組換えMVA、裸プラスミドDNA、ワクシニアウイルス、及びセムリキ森林熱ウイルス（SFV）を使用した本発明の態様を記載する。しかしながら、他のベクター（ウイルスベクター又はその他のベクター）も同様に使用され得ることが、当業者には明らかであると思われる。 30

【0043】

前述のように、追加刺激期には、初回刺激期に使用されたものとは異なる非交差反応性の、核酸発現ベクター、例えばウイルスベクターのような媒体を、エピトープを呈示するために使用することが好ましい。後述の実施例において、初回刺激期にはプラスミドDNAが媒体ベクターとして使用され、追加刺激期にはワクシニアベクター、MVAベクター、及び／又はSFVベクターが媒体として使用された。追加刺激期には複数個のベクターが媒体として使用されられると思われるが、これらは、同一であってもよいし、又は異なってもよい。 40

【0044】

従って、本発明の第一及び第二の面により、自己抗原又は腫瘍抗原を含む病原体に対して個体を予防接種する方法として使用され得る新規の予防接種計画が提供される。NY-ESO-1抗原、チロシナーゼ抗原、及びMelan-A抗原の使用が以下に例証される。しかしながら、その他の抗原も既知であるか、又は当業者により決定され得る。

【0045】

さらに、本発明は、予防接種の戦略又は計画を試験し確立するための予防接種モデルとしての重要な有用性を有する。従って、予防接種モデルによって、多数のエピトープに対す 50

る特異的であるが広域性のCTL応答を最大にする予防接種計画が確立され得る。

【0046】

臨床試験においてヒトで試験する前に、マウスのような実験動物でワクチン計画を試験するのが通常である。トランスジェニックマウスは、従来、特定の抗原又はエピトープに対する応答を試験するために使用されている。ヒト環境と可能な限り等しい生物学的環境を提供することが重要である。従って、ヒトのMHC分子を発現する能力を有するトランスジェニックマウスが作製される。後述の実施例において、本発明者らは、二つの型のトランスジェニックマウスを使用した。

【0047】

第一に、ヒト $\beta 2m$ のC末端が、キメラ重鎖 (HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 、H-2D^b $\alpha 3$ 膜貫通ドメイン及び細胞質内ドメイン) のN末端に共有結合的に連結されている、トランスジェニック単鎖組織適合性クラスI分子を発現するHHD A2トランスジェニックマウスを使用した。これらのマウスのH-2D^b 遺伝子及びマウス $\beta 2m$ 遺伝子は、相同的組み換えにより破壊されており、血清学的に検出可能なマウス組織適合性クラスI分子の細胞表面発現は完全に欠如している。

【0048】

第二に、本発明者らは、マウス $\beta 2m$ と非共有結合的に会合しているキメラ重鎖 (HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 、H-2K^b $\alpha 3$ 膜貫ドメイン及び細胞質ドメイン) を発現するA2-K^b マウスを使用した。

【0049】

従って、これらのトランスジェニックマウスは、いずれも、 $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ のドメインがヒトA2 MHCに由来し、 $\alpha 3$ ドメインがマウスのH-2K^b又はH-2D^bに由来するキメラMHCを発現する。これらのマウスは、A2トランスジェニックマウスと呼ばれる。しかしながら、本発明は、HLA-A1、HLA-A3、又はHLA-A4トランスジェニックマウス、即ちA2トランスジェニックマウスと類似の様式でヒトクラスI分子を発現するその他の任意のマウスモデルにおいても、同様に実施され得る。

【0050】

従って、本発明は、多数の被験エピトープをコードする核酸を含む一次組成物を試験動物へ投与し、続いて、前記の多数の被験エピトープのうちの1個を各々含有している核酸ベクターを複数個含む追加刺激組成物を投与する工程;及び被験エピトープの各々に対するCTL応答を決定する工程を含む、予防接種計画を試験する方法をさらに提供する。

【0051】

好ましくは、試験動物は、可能な限りヒトの免疫環境に近似した免疫環境を提供するトランスジェニック動物であると思われる。好ましい試験動物は、本明細書に記載されたようなA2トランスジェニックマウスである。

【0052】

前述のように、初回刺激ベクターは、好ましくは、DNAプラスミド又はウイルスベクターである。しかしながら、追加刺激ベクターは、好ましくは、初回刺激ベクターとは異なる。好ましい態様において、初回刺激ベクターはDNAであり、追加刺激ベクターはワクシニア、MVA、及び/又はSFVの群より選択される。SFVは、DNA初回刺激ベクターの後又はMVAと共に追加刺激ベクターとして使用された場合、優れた結果が達成されることを本発明者らが決定したように、追加刺激期のための好ましいベクターである。SFVは、MVAと交差反応せず、従って、これらの免疫原ベクターは効率的に併用され得る。本発明者らは、ウイルスベクターの一部であるか否かに関わらず、核酸構築物が、抗原がその表面上に提示されるよう哺乳動物細胞と会合して投与され得ることも見出した。抗原がそれらの表面上に提示される場合、そのような細胞は、抗原提示細胞 (APC) として既知である。従って、APCという用語には、腫瘍細胞のような細胞が含まれる。構築物を保持するためのAPCの使用は、追加刺激段階において特に好ましい。従って、可能な追加刺激試薬には、ウイルス性もしくは非ウイルス性の核酸構築物によりトランスフェクトもしくは形質導入された樹状細胞もしくはリンパ球、又は抗原を呈示している腫瘍細胞のようなAPCが含まれる。

【0053】

本発明の第一の面の特定の態様において、初回刺激組成物の投与の後に追加刺激組成物が投与される。ここで、初回刺激組成物と追加刺激組成物とは、例えば以下に例証されるように相互に異なっている。しかしながら、前記のような本発明の方法において、第二及び第三の追加刺激組成物が投与されてもよい。一つの態様において、三重免疫計画は、多数のエピトープを発現するDNA;続いて、多数の初回刺激エピトープのうちの1個を各々含むSFVベクターが多数使用された第一の追加刺激組成物としてのSFV;続いて、多数の初回刺激エピトープのうちの1個を各々含むMVAベクターが多数使用された第三の追加刺激組成物としてのMVAを使用する。又は、SFV追加刺激組成物が、MVA追加刺激組成物の後に投与されてもよい。

10

【0054】

同様に、ペプチドが直接投与される場合には、ペプチドでパルス処理されたAPC、エキソソーム、又はAPC模倣体が、いくつかの連続的な追加刺激工程のために使用され得る。これは、連続的な注射により達成され得る。

【0055】

いかなる場合にも、良好な送達を保証するため、数回、初回刺激組成物及び追加刺激組成物を（例えば注射により）投与することが好ましい。

【0056】

多数のエピトープを発現するベクターによる初回刺激の後、多数の初回刺激エピトープのうちの1個又は複数個を含む組換えウイルス（即ち、SFV又はMVAのいずれか）の混合物が使用され、その後、多数の初回刺激エピトープのうちの1個を各々コードするペプチドの注射に基づくさらなる追加刺激が行われてもよい。ペプチドは、好ましくは、5～15アミノ酸長であり、より好ましくは5～12アミノ酸長であり、より好ましくは5～10アミノ酸長である。9アミノ酸長のペプチドが好ましい。ペプチドは、天然に存在するものであってもよいし、又は合成のものであってもよい。

20

【0057】

本発明者らは、予防接種の計画又は戦略を試験する方法を増強するためには、誘発されたCTL応答の、正確で、効率的で、かつ高速の試験が必要とされることを認識した。これを考慮して、本発明者らは、予防注射を受けたHLA A2トランスジェニックマウスにおいて増幅されたHLA A2拘束性CTLの頻度を直接モニタリングするための、新規の四量体に基づく技術を開発した。これは、本発明の第一の面と関連して、ヒトCTL応答の迅速かつ正確な分析を可能にすることにより、新たなワクチンの開発を大きく加速すると思われる。

30

【0058】

特に、本発明者らは、マウスH2K^b α3ドメインを含有しているキメラA2クラスI分子を設計することにより、A2トランスジェニックマウスの血中のA2拘束性CTL応答を直接モニタリングするための技術を開発した。この技術により、多数の異なるベクター内にコードされたポリエピトープ構築物を使用した初回刺激－追加刺激計画により誘導されたCTLの頻度、及びこれらCTLの頻度とそれらのインビボ細胞障害活性との相関を正確にモニタリングすることが可能となる。これは、CTL応答を解明するためにマウスを屠殺する必要がないため、各研究におけるマウスの数を大きく低下させるという長所を有している。

40

【0059】

従って、本発明のさらなる面において、1個又は複数個のエピトープによる個体又は試験動物の予防接種の後に増幅された特異的なCTLを検出する能力を有する多量体MHC構造が提供される。その多量体MHC構造は、ストレプトアビジンのような結合メンバーにより単一構造内に共に維持された2個またはそれ以上のMHC分子、好ましくは4個の分子を含む。ここで使用されるストレプトアビジンは、CTLの四量体との結合の検出のために蛍光標識され得る。多数のMHC分子が近傍に維持されるため、それらは、目的のエピトープに対して誘起されたCTLが検出されるよう、ペプチドの形態でそのエピトープを呈示するために効率的に使用され得る。効率的に初回刺激された場合、CTLは、呈示されたペプチド／エピトープを認識し、その構造に結合すると思われる。この結合は、通常、標識された抗体、

50

例えば抗CD8抗体と組み合わせられる、フローサイトメトリーのような既知の技術により検出され得る。

【0060】

しかしながら、本発明者らは、MHCがヒト起源であるのに対し、試験動物は非ヒト、通常マウスであり、従ってヒトMHCに効率的に結合しないマウスCD8を有すると考えられるため、前記の予防接種モデルにおけるCTL応答を試験するための、これらの多量体MHC構造、好ましくは四量体の使用には限界があることを見出した。

【0061】

この問題を克服するため、本発明者らは、MHCのヒト $\alpha 3$ ドメインがマウス $\alpha 3$ ドメインに交換されたキメラ多量体MHC構造を考案した。 $\alpha 3$ ドメインがCD8分子と結合するため、キメラ多量体MHC構造は、非キメラ構造より、被験エピトープに対するCTL応答を検出する効果が高い。

10

【0062】

従って、本発明は、各MHC分子が、ヒト $\alpha 3$ ドメインの代わりにマウス $\alpha 3$ ドメインを表わすよう改変された $\alpha 3$ ドメインを含有している、結合メンバーにより近傍に維持された少なくとも2個のヒトMHC分子を含むキメラ多量体MHC構造をさらに提供する。好ましくは、ヒト $\alpha 3$ ドメインはマウス $\alpha 3$ ドメインに交換されている。キメラ多量体MHC構造は、被験エピトープを呈示するペプチドと複合体化されてもよい。

【0063】

マウス $\alpha 3$ ドメインは、融合タンパク質の作出により、又はマウス $\alpha 3$ ドメインに特徴的なアミノ酸もしくはアミノ酸をコードするヌクレオチドの挿入、欠失、もしくは置換によるヒト $\alpha 3$ ドメインの変異により、ヒト $\alpha 3$ ドメインと交換するためにヒトMHCへ挿入され得る。理想的には、キメラMHCは、ヒト $\alpha 1$ ドメイン及びヒト $\alpha 2$ ドメインをコードする核酸が、マウス $\alpha 3$ ドメインをコードする核酸と共に発現される融合タンパク質として作製される。このようにして、キメラMHC融合タンパク質は作製される。

20

【0064】

次いで、多量体キメラMHC構造は、被験エピトープを呈示するペプチドと会合させられ得る。キメラMHCにより呈示されるペプチドの数は、多量体構造内のMHC分子の数に依存すると思われる。本発明者らは、4個のペプチド／エピトープが近傍で呈示されることを可能にするとと思われる四量体を作製した。従って、この構造は、問題のエピトープに対するCTL応答の存在を検出するために使用され得る。例えば、四量体はペプチド／エピトープを呈示し、そして試験動物より得られた生物学的試料（例えば、血液）に添加された場合、エピトープを認識する任意のCTLが、マウスCD8の補助によってその四量体に結合すると思われる。マウスCD8は、ヒト $\alpha 3$ ドメインより良好にマウス $\alpha 3$ ドメインに結合するため、本発明に係るキメラMHC四量体とのCTLの結合は、非キメラMHC四量体との結合より安定している。

30

【0065】

四量体のCTLとの結合は、例えば、蛍光標識された四量体を使用することにより検出され得る。さらに、標識されたCD8抗体が、検出を補助するために使用されてもよく、標識及び染色の技術は、当業者に既知である。

40

【0066】

キメラ多量体MHC構造は、前記の予防接種計画によるCTL応答のモニタリングにおいて極めて有用であるのみならず、特定のタンパク質内のエピトープを迅速かつ効率的に決定するためにも使用され得る。

【0067】

例えば、DNA及び／又は組換えウイルスによりコードされた明確な腫瘍又はウイルスの（1個又は複数個の）抗原性タンパク質により免疫されたA2トランスジェニックマウスは、その（1個又は複数個の）抗原性タンパク質に由来するペプチドと会合したキメラ多量体MHCクラスI分子を使用することにより、特異的なCTL応答を開始させる能力に関してモニタリングされ得る。このプロトコールにより、抗原性タンパク質内にコードされた新規のペプ

50

チドエピトープの迅速な同定が可能となると思われる。

【0068】

本発明者らの発見は、複数個のエピトープに特異的な多数のCTLを同時に増幅することができる最適化されたワクチンの設計にとって重要である。それらは、迅速で、効率的で、かつ信頼性のあるエピトープの試験を可能にし、そして最も効率的な予防接種計画の設計を可能にする予防接種モデルの提供に関しても重要である。

【0069】

本発明者らは、試験動物における試験エピトープに対するCTL応答を効率的に検出するために使用され得る新規のキメラMHC多量体も考案した。

【0070】

以下、添付の図面を参照しつつ、本発明の面及び態様を例として例示する。さらなる面及び態様が、当業者には明らかとなると思われる。この書類において言及された全ての文献が、参照として本明細書に組み込まれる。

【0071】

詳細な説明

材料及び方法

プラスミドDNA構築物

研究の全体にわたり使用されたDNAベクターpSG2は、SV40複製開始点及びネオマイシン耐性マーカ含有しているBamHI断片を除去し、CMVプロモーターを、イントロンAを含有している同プロモーターのより長いバージョンに交換することにより、pRc/CMV (Invitro 20 gen, Paisley, UK) から派生した。得られたプラスミドは、マルチクロニングサイト及びウシ成長ホルモンポリA配列の前に、真核細胞における発現のためのイントロンAを含むCMVプロモーターを含有している。このプラスミドは、哺乳動物細胞における複製能を有しない。mel3配列 (表1) をコードする遺伝子が、標準的な方法を使用してマルチクロニングサイトへ導入された。注射用のプラスミドDNAは、陰イオン交換クロマトグラフィー (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して精製され、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で1mg DNA/mlに希釈された。

【0072】

組換えワクシニアウイルス及びMVAの作製

組換え及び非組換えのMVAは、10%ウシ胎仔血清 (FCS) が補足された最小必須培地において増殖したニワトリ胚繊維芽細胞 (CEF) において、常法により繁殖させられ滴定された。組換えMVAは、ワクシニアシャトルベクターpSC11へmel3ポリエピトープストリング (表1) をクロニングすることにより、記載されたようにして作成された。1細胞当たり0.05 pfuの多重度でMVAにより感染されたCEFが、記載されたようにして²³、リポフェクチン (Gibco) 及びシャトルプラスミドによりトランスフェクトされた。ワクシニアP7.5プロモーターがポリエピトープの発現を駆動する。組換えMVAは8回プラーク精製された。

【0073】

mel3、全長NY-ESO-1 (Dennis L. Panicali, Therion Biologics Corporation, MA 02149, USAより譲り受けた)、又はチロシナーゼを発現するワクシニアウイルス (WR株) は、以前に記載されたようにして²⁴、ベクターpSC11を使用して、mel3ポリエピトープ構築物、N 40 Y-ESO-1及びチロシナーゼの全長cDNAをチミジンキナーゼ遺伝子へクロニングすることにより作成された。

【0074】

組換えSFVの作製

mel3ポリエピトープストリングが、トランスファーベクターpSFV4.2-mel3へクロニングされた。このベクターから作製されたRNAが、組換えSFVmel3粒子を構築するために使用された。組換えSFVストックは、以前に記載されたようにして¹⁶、作成され精製された。

【0075】

ヒトCTLクロンの作製及びCTLアッセイ法

ヒトCTLクロンは、記載されたようにして²⁵、単離された。簡単に説明すると、5%ヒト 50

血清、100U/ml IL-2が補足されたイスコブ（Iscove）培地中の 10^5 個の照射済みB細胞を含有している、PBS中100ng/mlの抗CD3及び抗CD28の両方で予めコーティングされたU底96穴プレートへ、四量体／CD8二重陽性染色CTL培養物が単一細胞として分取された。増殖性クローンを、 $>10^7$ 個にまで増幅し、標準的な Cr^{51} 放出アッセイ法のためのエフェクターとして使用した。本発明者らは、HLA A2拘束性CTLの標的としてMVA mel3により感染されたJY B細胞を使用し、HLA-A1拘束性エペトープに関してはXY B細胞を使用し、 D^b 拘束性インフルエンザ核タンパク質の標的としてH-2b陽性MC57細胞を使用した。本発明者らは、標的に対して3倍希釈でCTLクローンを滴定した。

【0076】

四量体合成

蛍光四量体HLA-A2.1／ペプチド複合体は、以前に記載されたようにして¹、合成された。A2-Kb／ペプチド複合体は、A2.1分子の $\alpha 1$ ドメイン及び $\alpha 2$ ドメイン並びにH-2D^b分子の $\alpha 3$ ドメインのキメラ重鎖をヒト $\beta 2$ -ミクログロブリンと共に使用して、類似の方式で合成された。

【0077】

PBLの単離及び四量体染色

赤血球溶解緩衝液（Invitrogen、Paisley、UK）を使用して、尾静脈から採取された血液より、新鮮なPBLが単離された。四量体染色については、 3×10^5 個の細胞が、10% FCSが補足されたRPMI1640（Sigma、St Louis、MO）20 μ lに再懸濁させられた。細胞は、37°Cで15分間、四量体と共にインキュベートされた。次いで、PBLは、4°Cで15分間、ラット抗マウスCD8 α （PharMingen、San Diego、CA）と共にインキュベートされた。細胞は、PBSで2回洗浄され、FACScan（Becton Dickinson、Mountain View、CA）分析のためPBSに再懸濁させられた。

【0078】

動物及び免疫プロトコール

HHDマウスは、ヒト $\beta 2m$ のC末端が、キメラ重鎖（HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 、H-2D^b $\alpha 3$ 膜貫通ドメイン及び細胞質内ドメイン）のN末端に共有結合的に連結されているトランスジェニック単鎖組織適合性クラスI分子を発現している²⁰。これらのマウスのH-2D^b遺伝子及びマウス $\beta 2m$ 遺伝子は、相同的組み換えにより破壊されており、血清学的に検出可能なマウス組織適合性クラスI分子の細胞表面発現は完全に欠如している。A2-K^bマウスは、マウス $\beta 2m$ と非共有結合的に会合したキメラ重鎖（HLA-A2.1 $\alpha 1$ $\alpha 2$ 、H-2K^b $\alpha 3$ 膜貫通ドメイン及び細胞質ドメイン）を発現している。それらは、さらに、C57BL/6に由来する（H-2^b）クラスIa及び1bマウス組織適合性分子のフルセットを発現している²⁶。使用された全てのA2トランスジェニックマウスが、本発明者らの動物施設において交配された。4～6週齢の雌C57/BL6マウスは、ハーラン・オーラック（Harlan Orlac）（Shaws Farm、Blackthorn、UK）より得られた。プラスミドDNA（25～50 μ g／筋肉）がPBSに溶解させられ、全身麻酔下の各頸骨筋へ注射された。DNA注射後10日目に、PBSで $10^6 \sim 10^7$ pfuに希釈され、外側尾静脈へ静脈（i.v.）注射された組換えワクシニアウイルスにより、マウスが追加刺激された。又は、新鮮に単離された脾臓細胞が、37°Cで0.1% BSAが補足されたRPMI中で、90分間、mel3ワクシニア、全長チロシナーゼワクシニア、及び全長NY-ESO-1ワクシニアにより別々に感染された（感染多重度5）。細胞が3回洗浄され、 6×10^7 個/mlの濃度で無菌PBSに再懸濁させられ、合わせられ、外側尾静脈へ注射された。マウスは 6×10^6 個の脾臓細胞を受容した。

【0079】

インフルエンザウイルスA型（PR8）により初回刺激されたマウスは、鼻腔内インフルエンザ注射により感染された（20HAU／匹）。30日後、マウスは、前記のようにして、DNA.mel3、続いてMVA.mel3を注射された。SFV-mel3による初回刺激又は追加刺激については、 10^8 個のウイルス粒子が無菌PBSで希釈され、外側尾静脈へ注射された。

【0080】

インビボ死滅

10

20

30

40

50

HHDマウスから新鮮に単離された脾臓細胞が、2時間、 10^{-6} Mの濃度の異なるペプチドと共にRPMI培地中で別々にインキュベートされた。次いで、インビボの異なる集団の同時の追跡を可能にするため、異なる濃度のカルボキシフロオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (CFSE、Molecular Probes、Eugene、Oregon) により各細胞プールが標識された²⁷ (Hermans, I.F., Yang, J. 及び Ronchese, F. の未発表の結果)。標識された細胞がプールされ、 10^7 個/匹で尾静脈へ注射された。5-(及び-6-)-((4-クロロメチル)ベンゾイル)アミノ)テトラメチルローダミン (CellTracker Orange、Molecular Probes、Eugene、Oregon) により標識されたペプチドを含まない対照集団が、未パルス処理細胞と比較された、ペプチドでパルス処理された標的の死滅を査定するために共注射された。マウスは、異なるエピトープに対するCTL頻度を決定するため、蛍光色素標識標的の注射の時点で採血された。注射後5時間目に新鮮に単離されたPBMCのFACS分析を使用して、ペプチド/蛍光色素標識細胞の消失が追跡された。セルトラッカーオレンジ (Cell Tracker Orange) で標識された未パルス処理集団に対する相対死滅率が計算された。 $100 - (100 \times (\text{パルス処理} \% / \text{未パルス処理} \%))$ 。WinMDI 2.8及びセルクエスト (CellQuest) 3.3ソフトウェアが、facsデータを分析するために使用された。

10

【0081】

結果

5個のHLA-A2黒色腫エピトープ及び2個のHLA-A1黒色腫エピトープのストリングが、4個の別個のベクター；a) 裸プラスミドDNA (mel3.DNA)；b) ワクシニアウイルス (mel3-ワクシニア)；c) 修飾型ワクシニア・アンカラ・ウイルス (mel3.MVA)；d) セムリキ森林熱ウイルス (mel3-SFV) ヘクローニングされた。ヒト及びマウスのクラスI分子により拘束されたCTL応答のモニタリングを保証するため、本発明者らは、H-2DbクラスI分子により拘束されたインフルエンザ核タンパク質 (NP) 由来の付加的なエピトープを導入した。アミノ末端NP366-374エピトープの提示は、近隣のアミノ酸残基の影響を受ける場合があることが以前に示されているため²⁴、本発明者らは、ポリエピトープ構築物のカルボキシル末端にインフルエンザNP366-374エピトープを発現させることに決定した。ここで使用されたポリエピトープ構築物の配列は、表1に示されている。

20

【0082】

MVAによりコードされたポリエピトープの効率的な提示

30

最初の実験は、mel.3構築物に含まれる各エピトープのA2結合親和性を比較するために実施された。これらの実験の結果から、mel3ペプチドエピトープが、A2分子に対する広範囲の結合親和性を有することが証明された。異なる濃度におけるインフルエンザマトリックスエピトープ58-66の提示を阻害する能力 (データ示さず) により定義されたように、Melan-A 26-35ペプチド類似体²⁸が、最も高い結合親和性を有し、NY-ESO-1 157-165ペプチド及びチロシナーゼ1-9ペプチドは、有意に低い親和性を有していた。最適な隣接残基がクラスI拘束性エピトープの提示を保証するのに重要であることが、本発明者ら及び他の研究者らによって以前に証明されている²⁴、²⁹。mel.3ペプチドエピトープが適切なプロセッシングを受けることを確証するため、そしてA2分子との結合に関する競合が、低親和性エピトープのCTL認識を減損させないことを査定するため、mel.3ワクシニアを標的細胞に感染させ、ポリエピトープmel.3カセットに含まれる7個のエピトープの各々が、特異的CTLへと同時に提示されることを証明した (図1)。本発明者らは、プロテアソーム依存性の分解が、MAGE3 A2エピトープ271-279の提示を減損させることを以前に示した³⁰。従って、mel3ワクシニアによる標的細胞の感染が、MAGE3 271-279特異的CTLによる溶解に対してそれらを感作する能力を有していることが観察されたのは、驚くべきことであった。さらなる実験によって、小胞体常在性プロテアーゼによるmel.3構築物のプロセッシングと一致して、mel3構築物に含まれるMAGE3 271-279エピトープのプロセッシングが、全長MAGE3タンパク質に含まれるもののプロセッシングとは異なり、ラクタシステイン (lactacystein) 抵抗性であり、非TAP依存性であることが証明された (データ示さず)。

40

【0083】

50

ポリエピトープによりコードされたワクチンで予防接種されたマウスにおけるインフルエンザNP366-374特異的CTL応答

mel3ワクシニア感染細胞によるNP366-374エピトープの効率的な提示のため、本発明者らは、強力なNP366-374特異的CTL応答を誘導する異なる予防接種戦略の能力をC57/B6マウスにおいて査定することにした（図2）。NP特異的CTL応答のエキスピボモニタリングを、Db/インフルエンザNP366-374四量体を使用してPBLにおいて実施した。本発明者らは、同種初回刺激追加刺激予防接種プロトコルを異種のものと比較し（図2）、DNA又はMVAによる初回刺激によるCTL誘導の動力学を分析した（データ示さず）。これらの実験の結果より、異種予防接種戦略が、長期持続性のワクチン駆動CTL応答を誘導する能力を有し、その頻度が、同一抗原送達系の反復注射に基づく戦略により得られた頻度より最大100倍大きいことが確認された（図2）。 10

【0084】

A2トランスジェニックマウスにおけるA2拘束性CTLの増幅

インビボのA2拘束性CTL応答を初回刺激するmel.3ポリエピトープ構築物の能力を試験するため、A2トランスジェニックマウスを、DNA-mel.3により初回刺激し、MVA-mel.3、ワクシニアmel.3、又はSFV-mel3により追加刺激した。

【0085】

最初の実験は、Kb α 3ドメインを含有しているキメラA2.1分子並びに内因性のD^b分子及びK^b分子を発現するA2.1トランスジェニックマウス（A2/Kbマウス）²⁶を使用して実施した。A2拘束性応答を、D^b拘束性インフルエンザNP366-374応答と同時にモニタリングすることができるよう、本発明者らは、PBL中の関連CTLを直接検出する能力も有する新規のA2/Kb四量体を使用した。A2/Kb四量体及びD^b四量体による同時染色により、DNA.mel3によるA2/Kbマウスの初回刺激、それに続くMVA-mel.3が、melan-A 26-35及びインフルエンザNP 366-374に特異的なCTL応答を誘導することが証明された（図3）。対照的に、その他のmel.3エピトープに特異的な応答は、エキスピボ四量体染色により検出不可であった（データ示さず）。 20

【0086】

インフルエンザNPエピトープ366-374及びmelan-Aエピトープ26-35に対するCTL応答を同時にモニタリングすることが可能であることから、本発明者らは、過去のインフルエンザウイルスの被曝が、A2/Kbマウスにおいてmelan-A 26-35特異的CTLを増幅する初回刺激一追加刺激プロトコルの能力を損なうか否かを研究することとした。強力なNP366-374特異的CTL応答を生成させるため、A2トランスジェニックマウスをインフルエンザウイルスにより免疫し、その後、DNA.mel3、続いてMVA-mel3を与えた（図3）。mel3ポリエピトープ構築物による予防接種前のNP366-374特異的CTLの増幅によって、melan-A特異的CTLの増幅が有意に低下することが、これらの実験の結果より証明された（図3）。melan-A特異的CTL応答を誘導するmel3初回刺激一追加刺激の能力に対する既存のflu特異的CTLの阻害効果（図3）より、異種予防接種戦略におけるT細胞の干渉が、広範囲の免疫応答の誘導を損なう可能性が浮上した。内因性マウスクラスI分子の存在により、A2KbマウスにおけるA2拘束性レパートリーは有意に狭小化され、従って、異なるワクチンによりコードされた決定基に特異的なA2拘束性CTL間の相互作用を研究する能力が妨げられる。 30 40

【0087】

この理由のため、本発明者らは、A2トランスジェニックマウスHHD²⁰において、初回刺激追加刺激プロトコルにおけるワクチン駆動CTL応答の階層をモニタリングすることにした。HHDマウスは、A2Kbトランスジェニックマウスとは異なり、Db-/-及び β -2m-/-の背景でヒト β -2ミクログロブリンに連結されたA2.1クラスI分子を発現しており、A2/Kbトランスジェニックマウスよりはるかに大きいA2拘束性T細胞レパートリーを有する²⁰。

【0088】

HHDマウスの初回刺激一追加刺激予防接種は多数の黒色腫特異的CTLを誘導する

DNA.mel3によるHHDマウスの初回刺激によって、予防接種を受けた全てのマウスにおいて、Melan-A特異的CTLが、エキスピボ四量体染色により検出可能な頻度にまで増幅された（ 50

データ示さず)。対照的に、NY-ESO-1及びチロシナーゼに特異的なCTLの増幅は、免疫されたマウスのうちの少ない割合においてのみ検出可能であり、チロシナーゼ1-9及びMAGE3 271-279に対する応答は、血液四量体染色において検出されなかった(データ示さず)。

【0089】

付加的な実験により、全長NY-ESO-1をコードするワクシニアウイルスにより追加刺激されたDNA.mel3初回刺激マウスにおける有意なNY-ESO-1 CTL応答により示されるように、NY-ESO-1特異的CTL応答が、DNA.mel3注射により初回刺激されることが確認された(データ示さず)。対照的に、DNA.mel3により初回刺激することなくNY-ESO-1ワクシニアウイルスを注射した場合、NY-ESO-1 CTLの頻度は、はるかに低かった。DNA.mel3で初回刺激されたマウスにチロシナーゼワクシニアを注射した場合にも、類似の結果が得られた(データ示さず)。

【0090】

melan-A 26-35特異的CTLが、単一DNA予防接種後のドミナントなワクチン駆動CTL応答であったという観察より、初回刺激-追加刺激予防接種プロトコルにおける異なるワクチンによりコードされた決定基に特異的なCTL間の相互作用を研究する機会が与えられた。本発明者らは、ワクシニア.mel3(図4a)、MVA.mel3(図4b)、又はSFV-mel3(図4c)のいずれかによるDNA.mel3初回刺激HHDマウスの追加刺激によって、melan-A特異的CTLが、全CD8+T細胞の70~80%にまで増幅されることを観察した。NY-ESO-1エピトープ及びチロシナーゼエピトープに特異的な応答は、Melan-A特異的応答より有意に低かったが、それらの頻度はCD8+T細胞の2~30%の範囲であり、このことから、DNA初回刺激、及びコンピテントウイルス(即ち、Vac.mel3)又はインコンピテントウイルス(MVA.mel3及びSFV-mel3)のいずれかによる追加刺激によって、3個の別個の黒色腫特異的エピトープに特異的なCTLの頻度が有意に増強されることが確認された。本発明者らは、インビボの関連ペプチドでパルス処理された蛍光色素標識脾細胞を死滅させる能力により示されたように、ワクチン駆動CTLが細胞障害性であることを確認した(図4d)。これらの結果より、DNA.mel3により初回刺激され、3個の別個のウイルスベクターにより追加刺激されたHHDマウスにおけるmelan-A、NY-ESO-1、及びチロシナーゼに特異的な累積応答が、CD8+集団の大多数の特異性を担っていることが証明された。

【0091】

mel.3発現APCに関するワクチン駆動CTLの競合

melan-A特異的CTLを誘導する能力に対する既存のflu記憶CTL応答の阻害効果(図3)が証明されたため、本発明者らは、DNA初回刺激後の免疫応答を支配している多数のmelan-A特異的CTLが、ウイルス追加刺激中のNY-ESO-1及びチロシナーゼに特異的なCTLの増幅に干渉する能力を有するか否かを研究しようとした。

【0092】

抗原提示細胞の表面における抗原認識に関する競合によって、頻度がより高いCTL集団の免疫優性(immunodominance)が起こることが知られている³¹⁻³³。本発明者らは、DNA.mel3初回刺激後のmelan-A CTLのより高い数が、インビボでmel3ワクシニア感染APCの迅速な死滅又は遮蔽をもたらし、同APC集団により発現されたNY-ESO-1エピトープ及びチロシナーゼエピトープに特異的なCTLの刺激が妨げられるのだと推論した。

【0093】

この推論より、NY-ESO-1タンパク質及びチロシナーゼタンパク質を発現しているAPCを、mel3構築物を発現しているAPCから分離することにより、より高頻度のNY-ESO-1及びチロシナーゼに特異的なCTL応答が入手され得るか否かを査定した。1) DNA.mel3により初回刺激され、全長チロシナーゼタンパク質及び全長NY-ESO-1タンパク質をコードするワクシニアウイルスの混合物により追加刺激されたマウスにおけるNY-ESO-1及びチロシナーゼに特異的なCTLの増幅(図5a); 2) 全長NY-ESO-1、チロシナーゼ、及びmel3構築物をコードするワクシニアウイルスによりエクスピボで感染された脾細胞の等分物3個のDNA.mel3初回刺激マウスへの養子移植によるmelan-A、NY-ESO-1、及びチロシナーゼに特異的なCTLの同時の増幅(図5b、パネルa、b、及びc)(一方、mel3ワクシニアにより感染された脾細胞の

10

20

30

40

50

養子移植は、Melan-A特異的CTLの増幅をもたらした（図5b、パネルd、e、及びf））により示されたように、これらの実験の結果より、この仮説が確認された。

【0094】

本発明者らは、全長チロシナーゼ、全長NY-ESO-1、及びmel3構築物をコードする組換えウイルスの混合物によるDNA.mel3初回刺激マウスの追加刺激によって、melan-A₂₆₋₃₅、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅、及びチロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇に特異的なCTLが同時に増幅されることを証明した（図6a及びb）。広い特異性を有する多数のCTLを同時に増幅するための良好な予防接種戦略の同定は、この型の最適化された追加刺激戦略により誘導されるT細胞免疫が、ポリエピトープ初回刺激追加刺激戦略に基づく予防接種よりも効率的に標的細胞のインビボ死滅を提供することが示されたため（図6c及びd）、重要な臨床的用途を有する。

10

【0095】

Melan-A特異的CTLの免疫優性は、追加刺激の際に抗原を分離することにより破られうる。別々に感染された脾細胞が多価応答を追加刺激するために使用された場合には、関連ペプチドが別々に提示され、Melan-A、チロシナーゼ、及びNY-ESO-1に特異的なCTLが同時に増幅された。このアプローチを単純化するため、本発明者らは、ペプチドでパルス処理された樹状細胞を、MVA.mel3初回刺激応答を追加刺激するために使用した。追加刺激のために使用された細胞は、ペプチドの混合物でパルス処理されたもの（図7a）、又は別々にパルス処理されたもの（図7b）であった。本発明者らは、APCの別々のパルス処理が、ペプチドの混合物によるAPCのパルス処理よりも優れていることを示している。このアプローチは、多価CTL応答が、ワクシニアウイルス内にコードされたポリエピトープ構築物によって効率的に初回刺激され、ペプチドでパルス処理されたAPによって効率的に追加刺激され得ることも証明している。

20

【0096】

考察

エキスポアッセイ法における抗原特異的CTL応答のモニタリングの最近の進歩によって、異なる予防接種プロトコルの比較の性能は急速に改良されつつあるため、ワクチン開発には非常に勢いがある。腫瘍及びウイルスの抗原エスケープバリエーションの生成を最小限に抑えるためには、ドミナントエピトープ及びサブドミナントエピトープの両方を含むいくつかのエピトープに特異的なワクチン駆動CTLの増幅を保証することが重要である。いくつかの論文が、ウイルス抗原³⁴⁻³⁶及び組織適合性抗原^{33、37、38}に特異的なCTLの免疫優性を担う原因を検討している。しかしながら、どのようにすれば、最適なワクチン戦略によって、ドミナントエピトープ及びサブドミナントエピトープに特異的なCTLを同時に増幅し得るかは、未だ確立されていない。

30

【0097】

これらの疑問を解明するため、本発明者らは、黒色腫CTLエピトープのストリング（表1）をコードする4個の別個のベクターを設計し、A2トランスジェニックマウス及び野生型B6マウスにおいて、ワクチン特異的なCTL応答を誘発する異なる予防接種戦略の能力を比較した。ドミナント決定基及びサブドミナント決定基に特異的なCTLを増幅する能力を有する戦略を同定するため、A2分子に対する高い結合親和性を有するペプチドエピトープ及び低い結合親和性を有するペプチドエピトープを、同一構築物内に連結した。より具体的には、本発明者らは、インビボでの増強された免疫原性を有することが以前に示されている修飾型melan-A類似体26-35²⁸、及びA2分子に対するはるかに低い結合親和性を有することが示されているNY-ESO-1ペプチド157-165³⁹を含めた（表1）。

40

【0098】

mel3予防接種を受けたマウスにおけるワクチン駆動CTLの階層

本発明者らは、初回刺激－追加刺激計画で予防接種を受けたA2トランスジェニックマウスにおいて増幅されたA2拘束性CTLの頻度を直接モニタリングするための新規の四量体に基づく技術を開発した。マウスCD8のA2分子に対する結合親和性を増加させるため、マウスH-2K^bα3ドメインを含有しているA2分子（A2/K^b分子）を設計し、四量体A2K^b分子が、四量体A2分子と比較して、マウスA2拘束性CTLに対する増加した染色効率を有し、A2トランス

50

ジェニックマウスの大きな割合においてA2拘束性CTLを同定し得ることを証明した。

【0099】

A2Kbマウスにおける免疫応答を研究する過程で、本発明者らは、Db分子の発現が、強力なインフルエンザNP366-374特異的応答をもたらし、それが、その他のmel3によりコードされたエピトープに特異的なCTLの増幅を有意に減損させることを証明した。異なるワクチンによりコードされた決定基に特異的なA2拘束性CTL間の相互作用を研究するため、本発明者らは、A2Kbトランスジェニックマウスとは異なりDb-/-背景でA2分子を発現するA2トランスジェニックマウスHHD20を免疫した。

【0100】

いくつかの論文が、最近、ポリエピトープ構築物による予防接種を受けたA2トランスジェニックマウスにおける免疫応答を研究しているが^{19、20、40}、A2トランスジェニックマウスにおけるポリエピトープワクチン駆動CTLの階層が、エクスピボ四量体染色によりモニタリングされた発表はこれが最初である。

【0101】

本発明者らは、いくつかの予防接種戦略を比較し、非交差反応性ベクターの注射に基づく免疫（異種初回刺激－追加刺激プロトコル）が、同種ベクターの注射に基づく免疫より高いレベルのワクチン特異的免疫応答を保証することを確認した（図2）。同一ウイルスの反復注射により予防接種されたマウスにおけるCTL応答が、非交差反応性ベクターによる予防接種時のCTL頻度と比較して低いのは、ウイルス構造タンパク質に対する中和抗体の存在、及びウイルスタンパク質に特異的なCTLの存在によるのかもしれない（図2）。プラスミドDNAによりコードされる限定された数のタンパク質は、DNA初回刺激が組換えタンパク質に対する免疫応答に集束することを保証し、一方ウイルスによる追加刺激がこの応答を良好に増幅し、組換えタンパク質に特異的なCTLを高レベルにもたらし得ることが示唆されている。しかしながら、本発明者らは、MVA.mel3又はSFV.mel3のいずれかによる初回刺激が、それぞれインフルエンザウイルス又はMVA.mel3による追加刺激により、NP366-374特異的CTLの有意な増幅をもたらすことを示した（図2）。このことから、CTLを初回刺激する能力が、DNAベクターに特有のものではないことが証明された。

【0102】

HHD A2トランスジェニックマウスにおいては、内因性マウスクラスI分子により拘束されるCTLの欠如のため、異種初回刺激追加刺激によって、melan-A特異的CTLが全CD8+T細胞の最大90%にまで著しく増幅され（図4a）、従って、HHDマウスのA2拘束性レパートリーの大きな割合が、ワクチンによりコードされたCTL決定基へと再指向された。melan-A特異的CTL応答の免疫優性には、いくつかの要因が寄与している可能性がある。増加したA2分子及びTCRに対する結合親和性が、好都合な細胞内プロセッシングと組み合わせられたために、DNA.mel3初回刺激マウスにおいて、melan-Aエピトープ26-35へとCTL応答が偏向したのかもしれない。

【0103】

ドミナントエピトープに特異的なT細胞応答による非ドミナントエピトープに特異的なT細胞応答の「抑制」は、両方の型の決定基が同一APC上に提示された場合にのみ観察されることが、以前の研究によって示されている^{32、33、38}。多数のAPCの注射によって、サブドミナントエピトープに特異的なT細胞の増幅が起こった⁴¹。本発明者らは、melan-Aエピトープ26-35の免疫優性が、ポリエピトープ構築物ではなく、異なる組換えウイルスの混合物（図5a）又は全長タンパク質をコードする個々のワクシニアウイルスによりインビトロで感染された脾細胞（図5b）の注射に基づく追加刺激戦略により克服されることを証明した。

【0104】

患者における予防接種戦略のための意義

いくつかの臨床試験が、現在、ポリエピトープ構築物を用いた異種初回刺激追加刺激予防接種プロトコルを使用しているため、これらの結果は重要である。本発明者らは、多数のワクチン特異的CTLを誘発する異種初回刺激追加刺激プロトコルの能力を確認し、異

10

20

30

40

50

種初回刺激－追加刺激プロトコールにおいて、イムノドミナントCTL応答の頻度が、比較的ドミナントでない決定基に特異的なCTL応答の頻度を超えて有意に増幅されることを証明している。多数のメカニズムがワクチンに応答するCTLレパートリーを狭小化する原因となり得るが、本発明者らの結果は、抗原提示細胞（APC）に関するT細胞の競合に基づく免疫優性のモデルと一致している^{32、33、38}。未感作マウスへのvac.mel3の注射によって、リンパ球増加症が誘導され、CD8+の頻度が0.5%から30%へとシフトすることは、ワクシニアウイルスに対する強力なCTL応答を示しており、注目に値する。血中で誘導されたCD8+T細胞のうち、50%もが、Melan-A 26-35に特異的であり（データ示さず）、これは、melan-A 26-35が、ウイルスの構造、転写、及び複製を担う200個を超えるワクシニアタンパク質の中で最もイムノドミナントなウイルス発現エピトープのうちの一つであることを証明している。この観察は、Melan-Aエピトープ26-35をコードするウイルスに基づくワクチンの設計にとって重要な臨床的意義を有する。本発明者らは、SFVが、MVAと組み合わせて初回刺激ベクターとして使用されてもよいし（図2）、DNAと組み合わせて追加刺激に使用されてもよい（図4C）ことを証明したため、初回刺激－追加刺激プロトコールにおける組換えSFVの使用は、極めて魅力的である。これらの結果は、マーカーにおける、組換えSFVによる初回刺激及びMVAによる追加刺激により誘導されるサル免疫不全ウイルス特異的免疫応答の増強を証明している最近発表された報告11を支持する。

10

【0105】

本発明者らは、既存の記憶CTL応答が、同一構築物に含まれる他のエピトープに特異的なCTL応答を有意に低下させることを証明した（図3b）。いくつかのグループが、予防接種試験において、イムノドミナントなインフルエンザペプチドエピトープを陽性対照として使用しているが、本発明者らの結果は、既存の記憶CTL応答が、他のワクチンによりコードされたCTL決定基に特異的なCTL応答を減損させる可能性があるため、DNA又はウイルスに基づくワクチンは、再発性ウイルスにより発現されるエピトープをコードすべきではないことを示唆している。

20

【0106】

本発明者らは、さらに、T細胞競合が、初回刺激－追加刺激予防接種戦略におけるT細胞応答の修飾において役割を果たしている可能性が高いことを示した。本発明者らの研究は、初回刺激されたCTLの偏向したレパートリーへの異なるエピトープの同時の提示が、単一のCTL特異性のドミナントな増幅をもたらすことを強く示唆している。しかしながら、初回刺激された応答を、エピトープを別々に提示するAPCにより追加刺激することにより、複数の特異性のCTLがインビボで有効なレベルにまで比較可能に増幅される。

30

【0107】

従って、本発明者らは、とりわけ、異なる予防接種プロトコールの、多価A2拘束性CTL応答を最適に誘導する能力を検討するための新規の系を提供した。本発明によれば、広域性のCTL応答を誘導するための方法は、多価構築物の使用を初回刺激期に制限し、追加刺激期には個々のエピトープをコードする別々のベクター、又は別々のタンパク質／ペプチドを使用すべきである。

【0108】

参考文献

40

1. Altman, J.D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-6. (1996).
2. Romero, P. et al. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1641-50. (1998). 10
3. Dunbar, P.R. et al. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr Biol* 8, 413-6. (1998).
4. Ramshaw, I.A. & Ramsay, A.J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21, 163-5. (2000). 20
5. Schneider, J. et al. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4, 397-402. (1998). 30
6. Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S.C., Hill, A.V. & McMichael, A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine* 16, 426-35. (1998).

7. Hanke, T. & McMichael, A. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett* 66, 177-81. (1999).
8. Hanke, T. et al. Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine* 17, 589-96. (1999). 10
9. Schneider, J. et al. Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol Rev* 170, 29-38. (1999).
10. Amara, R.R. et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69-74. (2001). 20
11. Nilsson, C. et al. Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Vaccine* 19, 3526-36. (2001).
12. Vidalin, O. et al. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology* 276, 259-70. (2000). 30
13. Berglund, P., Fleeton, M.N., Smerdou, C. & Liljestrom, P. Immunization with recombinant Semliki 40

Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497-507. (1999).

14. Mossman, S.P. et al. Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. *J Virol* 70, 1953-60. (1996). 10
15. Zhou, X., Berglund, P., Zhao, H., Liljestrom, P. & Jondal, M. Generation of cytotoxic and humoral immune responses by nonreplicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3009-13. (1995). 20
16. Smerdou, C. & Liljestrom, P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J Virol* 73, 1092-8. (1999).
17. Dunbar, P.R. et al. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 165, 6644-52. (2000). 30
18. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74, 181-273 (2000).

19. Mateo, L. et al. An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy. *J Immunol* 163, 4058-63. (1999).
20. Firat, H. et al. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 29, 3112-21. (1999). 10
21. Loirat, D., Lemonnier, F.A. & Michel, M.L. Multiepitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J Immunol* 165, 4748-55. (2000). 20
22. Sandberg, J.K. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef epitopes recognized in HLA-A2 transgenic mice in response to DNA and peptide immunization. *Virology* 273, 112-9. (2000).
23. Carroll, M.W. et al. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* 15, 387-94. (1997). 30
24. Gileadi, U., Gallimore, A., Van der Bruggen, P. & Cerundolo, V. Effect of epitope flanking residues on the presentation of N-terminal cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Eur J Immunol* 29, 2213-22. (1999). 40

25. Dunbar, P.R. et al. Cutting edge: rapid cloning of tumor-specific CTL suitable for adoptive immunotherapy of melanoma. *J Immunol* 162, 6959-62. (1999).
26. Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A. & Chesnut, R.W. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J Exp Med* 173, 1007-15. (1991). 10
27. Barchet, W. et al. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8(+) T cells in vivo. *Eur J Immunol* 30, 1356-63. (2000). 20
28. Men, Y. et al. Assessment of immunogenicity of human Melan-A peptide analogues in HLA- A*0201/Kb transgenic mice. *J Immunol* 162, 3566-73. (1999).
29. Velders, M.P. et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol* 166, 5366-73. (2001). 30
30. Valmori, D. et al. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med* 189, 895-906. (1999). 40

31. Perkins, D.L., Berriz, G., Kamradt, T., Smith, J.A. & Geftter, M.L. Immunodominance: intramolecular competition between T cell epitopes. *J Immunol* 146, 2137-44. (1991).
32. Kedl, R.M. et al. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 192, 1105-13. (2000). 10
33. Pion, S. et al. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur J Immunol* 27, 421-30. (1997).
34. Belz, G.T., Stevenson, P.G. & Doherty, P.C. Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *J Immunol* 165, 2404-9. (2000). 20
35. Bousso, P., Lemaitre, F., Bilsborough, J. & Kourilsky, P. Facing two T cell epitopes: a degree of randomness in the primary response is lost upon secondary immunization. *J Immunol* 165, 760-7. (2000). 30
36. Chen, W., Anton, L.C., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12, 83-93. (2000). 40

37. Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17, 51-88 (1999).
38. Grufman, P., Wolpert, E.Z., Sandberg, J.K. & Karre, K. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur J Immunol* 29, 2197-204. (1999). 10
39. Chen, J.L. et al. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* 165, 948-55. (2000). 20
40. Woodberry, T. et al. Immunogenicity of a human immunodeficiency virus (HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes. *J Virol* 73, 5320-5. (1999).
41. Sandberg, J.K. et al. Superdominance among immunodominant H-2Kb-restricted epitopes and reversal by dendritic cell-mediated antigen delivery. *J Immunol* 160, 3163-9. (1998). 30

【 0 1 0 9 】

(表 1) ポリCTLエピトープ構築物

mel.3 構築物のスクレオチド配列及びアミノ酸配列			抗原	エピトープ	拘束
aga-tct-gcc-gcc-acc--					
atg-tta-cta-gct-gtt-ttg-tac-tgc-ctg-			チロシナーゼ	1-9	(A2)
M L L A V L Y C L					
gaa-cta-gca-ggg-atc-ggc-ata-ttg-aca-gtg-			Melan-A	26-35(*)	(A2)
E L A G I G I L T V					
tat-atg-gat-gga-aca-atg-tcc-cag-gta-			チロシナーゼ	369-377	(A2)
Y M D G T M S Q V					
gga-tct-			(リンカー)		
G S					
gaa-gtc-gat-cca-atc-gga-cat-ttg-tac-			Mage-3	167-175	(A1)
E V D P I G H L Y					
ttc-ctg-tgg-ggt-cca-aga-gcc-ctc-gtt-			Mage-3	271-279	(A2)
F L W G P R A L V					
gaa-gca-gac-ccc-acc-gga-cac-tcc-tat-			Mage-1	161-169	(A1)
E A D P T G H S Y					
gga-tct-			(リンカー)		
G S					
cag-ctt-tcc-ctg-ttg-atg-tgg-atc-acg-cag-tgc-ttt-ctg-			NY-ESO-1	155-167	(A2)
Q L S L L M W I T Q C F L					
gct-tca-aat-gaa-aac-atg-gat-gct-atg-tga.			インフルエンザ核タンパク質	366-374	(Db)
A S N E N M D A M					

(*) この配列は、2 位において修飾されたペプチド類似体に相当する (Menら)

ポリCTLエピトープ遺伝子 (mel3) は、エピトープの単一のストリングとして構築された。mel3カセットは、4個の別個のベクター；裸DNA、ワクシニアウイルスWR、MVA、及びSFVヘクロニングされた。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】 mel3 CTLの効率的なプロセッシング及び提示。HLA A2及びHLA A1陽性B細胞に、mel 50

10

20

30

40

3. MVAを感染させ、mel.3ポリCTL構築物に含まれる各エピトープに特異的なCTLクローンの標的として使用した。各CTLクローンの特異性及び特異的溶解の割合(%)が、各パネルの上に示されている。標的細胞は、関連ペプチドでパルス処理されたか(+ペプチド)、未パルス処理であるか(-ペプチド)、mel3 MVA (MVA.mel3) 又は無関連ワクシニア (ir r vac) のいずれかにより感染された。マウスNP366-374特異的CTLを、mel3.MVAにより感染されたマウスMC57繊維芽細胞に対するエフェクター細胞として使用した。各バーは、異なるエフェクター／標的比に対応している(黒いバー10:1、白いバー3:1、点付きバー1:1)。

【図2】同種及び異種の初回刺激追加刺激予防接種戦略により免疫されたマウスにおけるエクスピボのNP 366-374特異的CTLの頻度。各パネルは、異なる予防接種手法に対応している。 10

【図3】DNA.mel3及びそれに続くMVA.mel3によるA2/kbマウスの初回刺激—追加刺激。A. A2/kbトランスジェニックマウスにおけるDb及びA2拘束性CTLの同時生成。マウスを、DNA-mel3によりi.m.初回刺激し、10日後、MVA-mel3によりi.v.追加刺激した。DB/NP366-374及びA2/melan-A 26-35のエクスピボ四量体分析を実施した。MVA追加刺激から3日後の予防注射を受けた各マウスにおける四量体陽性細胞の頻度が示されている。B. ポリCTLエピトープ構築物に含まれる単一の決定基に特異的な既存の記憶CTL応答の効果。A2/Kbマウスをインフルエンザウイルスによりi.n.免疫し、その後、DNA.mel3、続いてMVA.mel3を注射した。Db/NP366-374及びA2/melan-A 26-35のエクスピボ四量体分析を実施した。MVA追加刺激から3日後の予防注射を受けた各マウスにおける四量体陽性細胞の頻度が示されている。 20

【図4】初回刺激—追加刺激ワクチン駆動CTLの階層。HHDマウスを、DNA.mel3により初回刺激し、vac.Mel3 (A)、MVA.mel3 (B)、又はSFV.mel.3 (C) のいずれかにより追加刺激した。melan-A、チロシナーゼ、及びNY-ESO-1に特異的な応答の頻度を、エクスピボ四量体染色により同時に測定した。DNA.mel3で初回刺激されSFV.mel3で追加刺激されたマウス(C群)に、melan-Aペプチド、チロシナーゼペプチド、又はNY-ESO-1ペプチドのいずれかでパルス処理された蛍光色素標識脾細胞を注射した。インビボ死滅の割合(%)が示されている(D)。

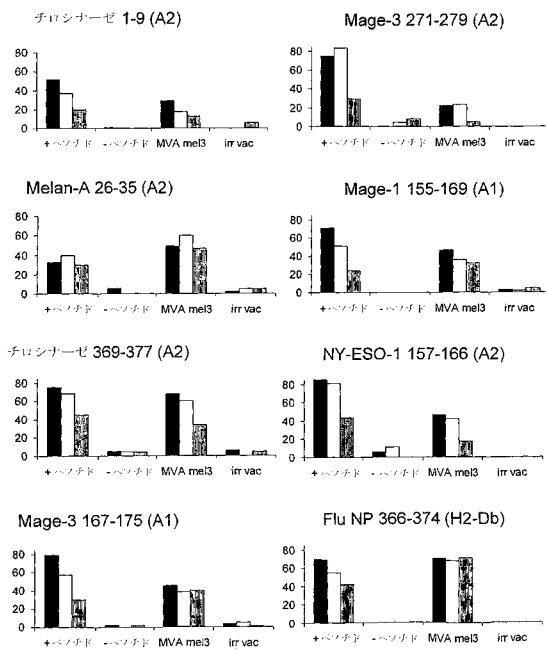
【図5】Melan-A特異的CTL応答の免疫優性は、ポリワクシニアによる追加刺激、又はインビトロ感染脾細胞の養子移植により克服され得る。DNA.mel3初回刺激HHDマウスを、全長チロシナーゼ及び全長NY-ESO-1をコードするワクシニアウイルスの混合物により追加刺激した(A)。又は、DNA mel3初回刺激HHDマウスに、全長チロシナーゼワクシニア、全長NY-ESO-1ワクシニア、及びmel3.ワクシニアにより別々にインビトロで感染された脾細胞の等分物3個(B、パネルa、b、及びc)、又はmel3ワクシニアにより感染された脾細胞(B、パネルd、e、及びf)のいずれかを注射した。melan-A、チロシナーゼ、及びNY-ESO-1に特異的な応答の頻度を、エクスピボ四量体染色により同時に測定した。 30

【図6】ポリウイルスによる追加刺激は、melan-A₂₆₋₃₅特異的CTLの免疫優性を克服する。DNA.mel3初回刺激HHDマウスを、全長チロシナーゼ、全長NY-ESO-1をコードするワクシニアウイルス、及びSFV.mel3の混合物(A)、又はSFV.mel3 (B) のいずれかにより追加刺激した。melan-A₂₆₋₃₅、チロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇、及びNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅に特異的な応答の頻度を、エクスピボ四量体染色により同時に測定した。マウス6匹中1匹の染色が示されている。C及びD; 各マウスに、melan-A₂₆₋₃₅ペプチド、チロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇ペプチド、又はNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドのいずれかでパルス処理された蛍光色素標識脾細胞を注射し、インビボ溶解の%を計算した。パネルCは、全長チロシナーゼ、全長NY-ESO-1をコードするワクシニアウイルス、及びSFV.mel3の混合物により追加刺激されたDNA.mel3初回刺激HHDマウスにおけるインビボ死滅に対応しており、パネルDは、SFV.mel3により追加刺激されたDNA.mel3初回刺激HHDマウスにおけるインビボ死滅に対応している。 40

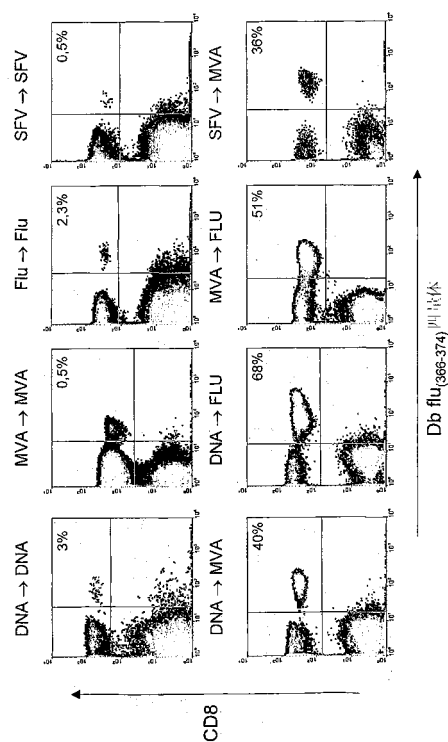
【図7】実験は、MVA.mel3により初回刺激され、ペプチドパルス処理樹状細胞(DC)により追加刺激されたマウスからのA2K^b四量体染色を示す。二つのマウス群が示されている。A群(3匹)は、3個のペプチド(Melan-A、チロシナーゼ、及びNY-ESO-1)の混合物でパルス処理されたDCを受容し、B群(4匹)は、単一のペプチドでパルス処理されたDCの混合物 50

を受容した。図面の左側には、各群の1匹のマウスからの3個のエピトープに対する個々の1つの応答が示されている。図面の右側には、各群の四量体陽性CTLの平均割合(%)が示されている。エラーバーは、平均の標準偏差を示す。実験は、ペプチドパルス処理DCが、組換えMVAにより初回刺激された多価CTL応答を効率的に追加刺激し得ることを示している(図4A、B、及びCを比較)。実験は、さらに、ペプチドの混合物でパルス処理されたDCと比較して、追加刺激のための別々にペプチドパルス処理されたDCの混合物が、多価応答を追加刺激する効果がより高いことを証明している。

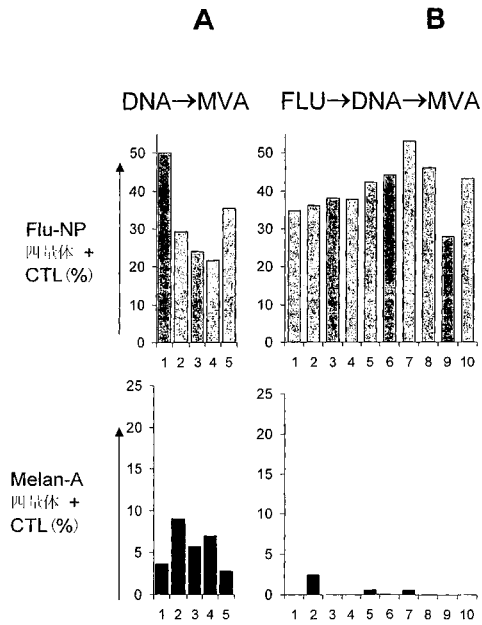
【図1】



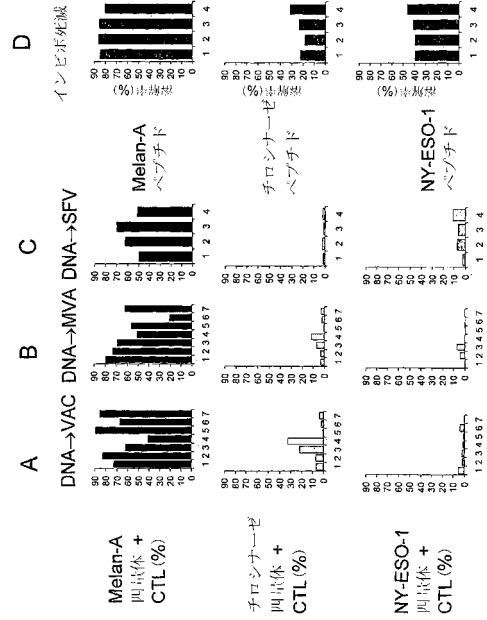
【図2】



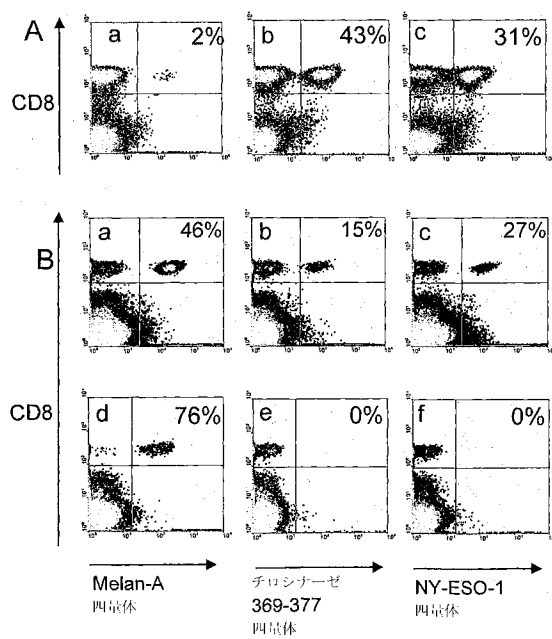
【 図 3 】



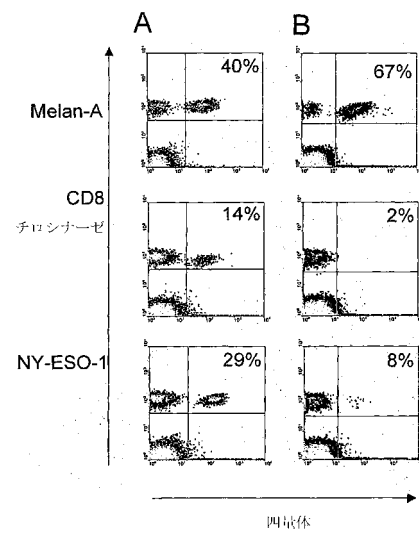
【図 4】



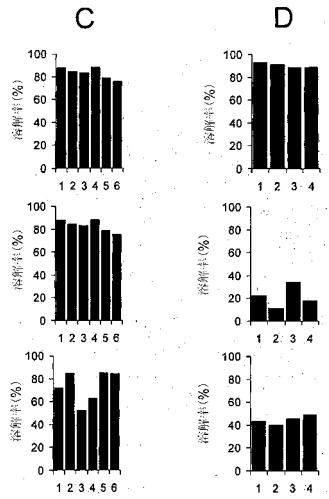
【図 5】



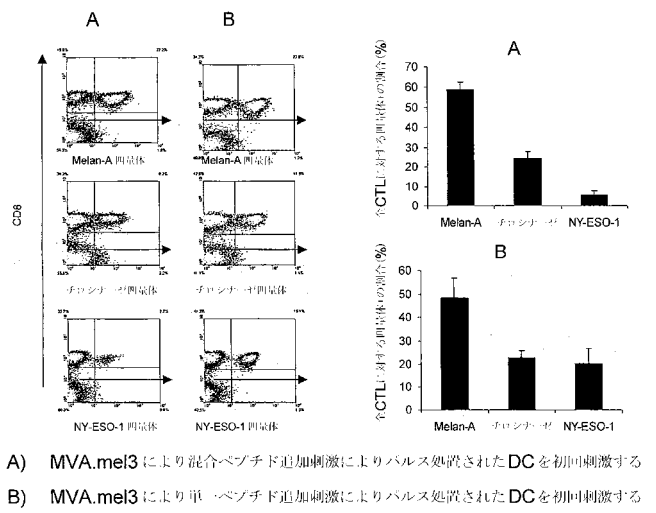
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7】



- A) MVA.mel3により混合ペプチド追加刺激によりバルス処置されたDCを初回刺激する
 B) MVA.mel3により単一ペプチド追加刺激によりバルス処置されたDCを初回刺激する

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/011331 A2

(51) International Patent Classification: A61K 39/00

(74) Agents: CRIPPS, Joanna, E. et al.; Mewburn Ellis, York House, 25 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/03496

(22) International Filing Date: 30 July 2002 (30.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0118532.1 30 July 2001 (30.07.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): ISIS INNOVATION LIMITED [GB/GB]; Ewert House, Ewert Place, Sannernertown, Oxford, Oxfordshire OX2 7SG (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(ii)) for US only

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/011331 A2

(54) Title: MATERIALS AND METHODS RELATING TO IMPROVED VACCINATION STRATEGIES

(57) Abstract: The invention provides novel vaccination strategies based on a prime-boost vaccination regimen. The inventors have determined improved ways of boosting an immune response in a patient previously primed or exposed to a plurality of epitopes. The improved method requires the epitopes in the boosting phase to be administered individually, i.e. held on separate peptide constructs.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

MATERIALS AND METHODS RELATING TO IMPROVED VACCINATION
STRATEGIES

The present invention relates to materials and methods
5 for improving vaccination strategies. Particularly, but
not exclusively, the invention relates to "prime-boost"
vaccination protocols in which the immune system is
induced by a priming composition and boosted by
administration of a boosting composition. The invention
10 further relates to novel tetrameric soluble class I
MHC/peptide complexes as a tool for directly monitoring
vaccination regimens and determining novel epitopes.

Recent advances in our ability to monitor frequency of
15 antigen CTL responses in ex-vivo assays are rapidly
improving our capacity to compare different vaccination
protocols. In particular, the use of tetrameric soluble
class I MHC/peptide complexes (tetramers) provides an
opportunity to greatly accelerate development of new
20 vaccines by allowing rapid and accurate analysis of human
CTL responses 1-3.

It has become clear that heterologous prime-boost
vaccination protocols, based on repeated injections of
25 non-cross reactive vectors encoding the same antigenic

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

2

protein, result in strong CTL responses, probably due to focusing of the immune response towards epitopes contained within the recombinant target proteins⁴.

Recent results have demonstrated that combination of
5 priming with plasmid DNA and boosting with recombinant defective vaccinia virus MVA generate high levels of specific immunity⁵⁻¹⁰.

Alphaviruses have been extensively studied as viral
10 vectors in vaccination protocols¹¹⁻¹⁵. The replication incompetent alphavirus, Semliki Forest Virus (SFV), has proven to be capable of inducing antibodies and CTL directed against the encoded foreign antigens^{14,15}. The small size of the SFV genome¹⁶ makes this virus a very
15 attractive vector for vaccination strategies, as expression of a small number of viral structural proteins maximise the chances of generating an immune response specific to recombinant proteins, rather than to viral structural proteins.

20

Several studies have demonstrated that viruses and tumour cells evade specific immune responses by mutating or deleting antigenic proteins^{17,18}. In order to minimise the generation of virus or tumour antigen loss variants,

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

3

vaccine induced immune responses should be specific to a broad range of different epitopes, possibly encoded by distinct proteins. This rationale has led to the generation of vaccines encoding strings of CTL epitopes, aimed at simultaneously expanding CTL with different specificity. Vaccination of A2 transgenic mice has shown that multiple epitopes encoded within poly-epitope constructs can each prime specific CTL, suggesting the feasibility of this approach for immunotherapy clinical trials 19-22. However, due to the technical limitations of assays for directly monitoring CTL responses in these mice, evidence is lacking that polyvalent constructs are capable of expanding CTL of many specificities to effective levels.

15

There is hope that poly-epitope vaccines will be capable of inducing broad based cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses in humans. The administration of a plurality of epitopes is aimed at simultaneously expanding CTL with different specificity. Although such polyvalent constructs have proven capable of simultaneously priming CTL of multiple specificities in animals which is clearly advantageous, it remains unclear whether they are capable of subsequently boosting each of these CTL responses to effective levels.

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

4

It is known that some epitopes are more efficient at raising an immune response than others. Some epitopes may be described as dominant, i.e. they provoke a strong CTL response, while others may be described as subdominant in that they provoke a weaker response. However, when trying to raise an immune response to a broad range of epitopes it is important that the subdominant epitopes are not overlooked in favour of more dominant epitopes.

10

During the priming stage of a vaccine regimen the more dominant epitopes provoke a greater CTL response than the weaker epitopes. This means that after an initial priming event to a plurality of epitopes, the CTL response is inevitably greater for the more dominant species and weaker for the subdominant species. However, the present inventors have found that the situation is made worse when the same plurality of epitopes is administered as a poly-epitope construct during the boosting phase. This appears to be true even when the poly-epitope is provided in a different vector/vehicle than the priming phase.

15

20

25

The inventors have found that during the boosting stage, the CTL response to the more dominant epitopes is increased at a greater rate than the CTL response to the subdominant epitope, to the extent that the expansion of

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

5

the CTL response to the subdominant epitopes is significantly reduced. This means that the CTLs raised to the dominant epitopes are expanded further at the expense of the CTLs raised to the subdominant epitopes. As a
5 consequence, the proportion of CTLs raised to the dominant epitopes is increased whereas the proportion of CTLs raised to the subdominant epitopes is only marginally increased. This means that the boosting phase narrows the immune response by favouring proliferation of
10 CTL expanded in the initial priming stage.

The present inventors have surprisingly determined a novel prime-boost regimen that helps to overcome the potentially negative effect of the boosting phase on a
15 plurality of dominant and subdominant epitopes.

Remarkably, the inventors have found that a broad CTL response can be more uniformly boosted to effective
levels if, following the priming stage, the epitopes are
20 used individually to boost the response as opposed to being administered as a single poly-epitope construct. By boosting with the individual epitopes, the inventors have found that the CTLs raised against the dominant epitopes are not boosted at the expense of the CTLs raised against

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

6

the subdominant epitopes. Rather, they are boosted equally.

Specifically, and as exemplified below, the inventors
5 have used DNA and viral vectors encoding a string of
melanoma epitopes, to demonstrate that prime-boost
vaccinations result in the expansion of a narrow CTL
repertoire. At the boosting step the inventors found
that CTL competition for recognition of cells presenting
10 the poly-epitope construct skews the response towards
those CTL expanded more efficiently during priming. In
contrast, the inventors have found that simultaneous
expansion of CTL specific to dominant and subdominant
determinants is obtained when APCs were presenting the
15 epitopes separately during the boosting phase. This
could be accomplished, for example, by injecting a
mixture of viruses each encoding a separate antigen or by
injecting a mixture of APC presenting the epitopes
separately.

20

Thus, the invention provides a method of inducing a
specific but broad based CTL response to a plurality of
epitopes, where poly-epitope constructs are used in the
priming phase of a vaccination regimen but immunogens

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

7

encoding or comprising the epitopes individually are used for the boosting phase.

5 The invention also provides a heterologous prime-boost vaccination regimen where epitopes in the boosting phase are presented to the immune system in a different way than in the priming stage. This is explained in more detail below.

10 The present invention arises from the determination that the boosting phase is considerably more effective in inducing a specific but broad based CTL response to a plurality of epitopes if those epitopes are administered individually.

15 Thus, if an individual has already been primed by a plurality of epitopes, the invention provides a method of boosting the previously induced (primed) immune response comprising administering the plurality of epitopes
20 individually, i.e. separately, on separate constructs or carried by separate vehicles.

In all aspects of the invention described herein, a plurality of epitopes may be taken to any number of
25 epitopes greater than 2, more preferably, greater than 4.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

8

and still more preferably greater than 7. Of the plurality of epitopes, at least two, more preferably four and even more preferably seven epitopes will be different i.e. comprise a different amino acid sequence or be
5 recognised by different antibodies. However, it is also preferably that the plurality of epitopes comprise many epitopes in the order of tens or hundreds. It is likely that some of these epitopes will be very similar and may cross-react.

10

Thus, if an individual has been infected by, or in some way come in contact with i.e. been exposed to, a pathogen (e.g. virus, bacteria etc) or a tumour, then the individual's immune system will have been naturally
15 primed against a plurality of epitopes presented by the pathogen or tumour. However, this initial priming of the immune system may well be insufficient for the individual to mount an effective defence against the pathogen or tumour. However, in accordance with the present
20 invention, the already primed immune response may be boosted by administering the plurality of epitopes individually, i.e. separately, carried by separate constructs (peptide or nucleic acid) or separate vehicles. Thus, in this context, the present invention
25 has vast therapeutic potential.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

9

Although it would be possible to detect whether an individual had been primed to a particular epitope, i.e. through exposure to a pathogen or as a result of a tumour, this step would not be necessary.

In order to save time, cost and trouble, it would be preferable to treat every patient suspected of having been primed to a plurality of epitopes by exposure to a pathogen or a tumour as a primed patient.

Accordingly, in a first aspect of the present invention, there is provided a method for boosting an immune response in an individual, said individual having been previously primed against or exposed to at least one of said plurality of epitopes, preferably all of said plurality of epitopes; said method comprising administering to the individual a plurality of constructs, each encoding or comprising one of said plurality of epitopes. The construct may be a nucleic acid sequence capable of encoding a peptide comprising the epitope in question or it may be a peptide or protein/polypeptide comprising the epitope which can be administered directly. The nucleic acid sequence may be DNA, RNA or cDNA capable of encoding a peptide comprising

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

10

one or more of the epitopes in question. Whether the construct is nucleic acid sequence encoding the peptide or a peptide itself, it is preferable to use a vehicle to carry the construct so that it can be efficiently presented to the individual's immune system. Preferably, the constructs are each presented or carried by separate vehicles such as a nucleic acid expression vector, e.g. a viral vector, or APC, e.g. dendritic cells or lymphocytes e.g. B cells. The vehicles may also act as adjuvants to help with the inducing immune response. The APCs may be used to express peptide constructs or they may be pulsed prior to administration.

The method in accordance with the first aspect of the present invention, may further comprise administering a "second" or further boosting composition. This composition will also comprise individual constructs, each comprising one of said plurality of epitopes. Again, the constructs may be peptides or nucleic acid sequences capable of encoding said peptides.

The administration of a second or further boosting composition has the benefit of not only further boosting the individual's immune response to the administered epitopes but also providing a "first" boost to any

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

11

epitopes present in the medicament that had not been already primed naturally by the individual through exposure to the pathogen or tumour. In other words, the second/further boosting composition ensures that any epitopes presented in the medicament ("first" boosting composition) that the individual had not previously been exposed to, would effectively be boosted for the first time.

Alternatively, the present invention may be used to immunise an individual against a pathogen or tumour associated antigen, i.e. as a preventative vaccine. In this situation, the individual's immune system must first be primed by a plurality of epitopes characteristic of the pathogen and then boosted to help the immune system raise an effective defence against the pathogen. This is known as a prime-boost regimen. However, as described above, the inventors have found that to maximise the immune response against each and every one of the epitopes, the epitopes must be administered individually in the boosting stage. Further, the inventors have also determined that a heterologous prime-boost regimen is preferable to the homologous prime-boost methods already described in the art. Thus, it also preferable to administer the plurality of epitopes during the boosting

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

12

stage using separate vehicles, e.g. viral vectors, that are different to and non cross-reactive with vehicles which may have been used in the priming stage.

5 Thus, in a second aspect of the present invention, there is provided a method of inducing an immune response, preferably a CD8+ T cell immune response, to a plurality of epitopes in an individual, said method comprising the steps of administering to the individual a priming
10 composition comprising a construct encoding or comprising said plurality of epitopes and then administering a boosting composition which comprises a plurality of individual constructs each comprising one of said plurality of epitopes.

15 In accordance with the second aspect, the construct may be a peptide (protein/polypeptide) or a nucleic acid sequence encoding said peptide. it is also preferably, that the constructs are administered using a vehicle
20 capable of efficiently displaying the epitopes to the individual's immune system. Thus, where the construct is a nucleic acid sequence, this may be contained within a nucleic acid expression vector, i.e. a plasmid or viral vector. These vectors may likewise be contained within a
25 cell such as an Antigen Presenting Cell (APC).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

13

Where the construct is a peptide, it may be preferable to use a cell, more preferably an APC as a vehicle as these cells are capable of displaying peptides efficiently to the immune system. Examples of APCs include dendritic cells and lymphocytes.

The administration of the constructs to an individual using vehicles is described in more detail below.

The priming composition may comprise one or more nucleic acid vectors, each containing nucleic acid encoding a plurality of epitopes. Alternatively, the priming composition may comprise peptides or antigens containing a plurality of epitopes.

In this second aspect, the priming composition comprises a string of epitopes, i.e. a polyepitope construct. However, the method may alternatively include the administration of one or more constructs encoding or comprising one or more of the plurality of epitopes. However, in this situation, it is preferable that the prime-boost regimen is a heterologous prime-boost regimen. In other words, if the priming composition comprises individual epitopes, the boosting composition

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

14

preferably carried or presents its individual epitopes
using different and non-cross reactive vehicles.

For example, where nucleic acid constructs are used
5 different viral vectors may be used in the priming and
boosting phase. Likewise, for peptide constructs,
different APC cells may be used between the priming and
boosting phase, e.g. B cells for priming and dendritic
cells for boosting.

10 This is a preferred embodiment of the invention and it
must be appreciated that homologous prime-boost prime-
boost regimens are also within the scope of the present
invention, particularly when using peptide constructs.

15 It is also preferred that all priming nucleic acid
constructs are recombinant constructs for example, any
genetic constructs like recombinant viral constructs, DNA
constructs, RNA constructs, or cells transfected or
20 transduced with such constructs. Further the priming
composition may comprise separate peptides or proteins
and cells that are extra- or intracellularly loaded with
such peptides or proteins. The peptides may form part of
a fusion construct with a carrier protein or adjuvant.
25 These may be produced as fusion proteins.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

15

Where the boosting or priming compositions comprise peptides or proteins, these may be delivered using Antigen Presenting Cells (APCs) for example dendritic cells or lymphocytes (B cells), pulsed with peptide and/or protein (including intracellular delivery of peptides or proteins into the APC). The APCs once pulsed with peptide or protein may also be infected by virus in order to help activate the APC, i.e. the virus in this case acts as an adjuvant for the peptide.

Particles such as sepharose beads or chitine beads may also be used to mimic APCs and display peptide/MHC complexes and co-stimulatory molecules for stimulation of the immune system.

Exosomes or other subcellular bodies derived from APCs may also be pulsed with peptide and/or protein (including intracellular delivery of peptides or proteins into the exosomes) for delivery of the peptide epitopes.

It is also possible to administer the peptide or protein directly into the individual preferably at separate locations. The peptide or protein administered in this

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

16

way is preferably accompanied by an adjuvant in either the priming or boosting phases.

Where a nucleic acid vector is provided as a vehicle, it is preferable that the nucleic acid encoding the epitopes is operably linked to regulatory sequences for production of said antigen in the individual by expression of the nucleic acid.

As the priming composition presents a plurality of epitopes, a broad but specific CTL response is induced by the individual's immune system.

In contrast to the priming composition, the boosting composition presents the epitopes always individually. This overcomes the problem determined by the inventors that pre-existing memory CTL responses significantly reduce CTL response to other epitopes contained within the same construct during the boosting phase.

The priming composition if used, or the boosting composition when using nucleic acid constructs, may further comprise any vehicle for carrying the nucleic acid construct encoding the epitopes e.g. a viral vector, such as adenovirus vectors, Herpes simplex virus vectors,

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

17

vaccinia virus vector. The viral vector may be a modified, replication-deficient vector, e.g. modified virus Ankara (MVA), or it may be an avipox vector e.g. fowlpox, Canarypox and so on. Preferred vectors include the replication incompetent alphavirus Semliki Forest Virus (SFV). Other appropriate vectors will be apparent to those skilled in the art.

The priming composition may comprise DNA encoding the antigen. The DNA may be in the form of a circular plasmid that is not capable of replicating in mammalian cells. Expression of the antigen will preferably be driven by a promoter active in mammalian cells, e.g. cytomegalovirus immediate early (CMV IE) promoter.

The CD8⁺ T cell immune response may be primed using a DNA vaccine, Ty-VLPs or recombinant modified Vaccinia virus Ankara (MVA). In the examples provided below, the inventors describe embodiments of the invention using a recombinant MVA naked plasmid DNA vaccinia virus, and semliki forest virus (SFV) during the priming phase. However, it will be apparent to the skilled person that other vectors, viral or otherwise, may equally be used.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

18

As mentioned above, it is preferable to use a different, non-cross reactive vehicle, such as a nucleic acid expression vector, e.g. a viral vector, for displaying epitopes during the boosting phase than that used during the priming phase. In the examples provided below, 5 plasmid DNA was used as a vehicle vector during the priming phase and vectors vaccinia, MVA and/or SFV were used as vehicles during the boosting phase. As multiple vectors will be used as vehicles during the boosting 10 phase, these may be the same or different.

Thus, in accordance with the first and second aspect of the invention, there is provided a novel vaccination regimen that can be used as a method of vaccinating an individual against pathogens including self antigens or 15 tumour antigens. Exemplified below are the use of NY-ESO-1, Tyrosinase and Melan-A antigens. However, other antigens will be known or may be determined by the skilled person.

20

Further, the invention has an important utility as a vaccination model for testing and establishing vaccination strategies or regimens. Thus, the vaccination model allows vaccination regimens to be

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

19

established which maximise a specific but broad based CTL response to a plurality of epitopes.

It is usual to test vaccine regimens on laboratory animals such as mice prior to testing on humans in clinical trials. Transgenic mice have been used in the past to test responses to particular antigens or epitopes. It is important to provide a biological environment that is as equivalent to the human environment as is possible. Therefore, transgenic mice are produced which have the ability to express human MHC molecules. In the examples provided below, the inventors have used two forms of transgenic mice.

Firstly, they have used HHD A2 transgenic mice which express a transgenic monochain histocompatibility class I molecule in which the C terminus of the human $\beta 2m$ is covalently linked to the N terminus of a chimeric heavy chain (HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$, H-2D^b $\alpha 3$ transmembrane and intracytoplasmic domains). The H-2D^b and mouse $\beta 2m$ genes of these mice have been disrupted by homologous recombination resulting in complete lack of serologically detectable cell surface expression of mouse histocompatibility class I molecules.

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

20

Secondly, the inventors have used A2-K^b mice which express a chimeric heavy chain (HLA-A2.1 α 1- α 2, H-2K^b α 3 transmembrane and cytoplasmic domains) in non-covalent association with mouse β 2m.

5

Thus, both of these transgenic mice express a chimeric MHC where the α 1 and α 2 domains are derived from human A2 MHC and the α 3 domain is from murine H-2K^b or H-2D^b. These mice are referred to as A2 transgenic mice. However, the present invention may equally well be performed on HLA-A1, HLA-A3 or HLA-A4 transgenic mice, i.e. any other murine model expressing human class I molecules in a similar way as A2 transgenic mice do.

10

15

Therefore, the invention further provides a method of testing a vaccination regime comprising the steps of administering a primary composition to a test animal, said primary composition comprising a nucleic acid encoding a plurality of epitopes under test, subsequently administering a boosting composition, said boosting composition comprising a plurality of nucleic acid vectors each containing one of the said plurality of epitopes under test; and determining the CTL response to each of the epitopes under test.

20

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

21

Preferably, the test animal will be a transgenic animal that provides an immune environment as close to the human immune environment as possible. The preferred test animal is an A2 transgenic mouse as described herein.

5

As discussed above, the priming vector preferably is a DNA plasmid or viral vector. However, the boosting vectors are preferably different to the priming vector.

10

In a preferred embodiment the priming vector is DNA, and the boosting vector is selected from the group of vaccinia, MVA and/or SFV. SFV is the preferred vector for the boosting phase as the inventors have determined that excellent results are achieved when used following DNA priming vector or with MVA as the boosting vector.

15

SFV does not cross-react with MVA and therefore these immunogen vectors can be effectively used together. The inventors have also found that the nucleic acid constructs whether as part of a viral vector or not, may be administered in association with a mammalian cell,

20

such that the antigens are presented on its surface. Such cells are known as Antigen Presenting Cells (APCs) when antigen is presented on their surface. Thus, the term APC includes cells such as tumour cells. The use of APCs to carry the construct is particularly preferable during the boosting stage. Thus, possible boosting

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

22

reagents include APCs, such as dendritic cells or lymphocytes transfected or transduced with the viral or non-viral nucleic acid construct or tumour cells displaying antigen.

5

In particular embodiments of the first aspect of the present invention, administration of a priming composition is followed by boosting compositions, the priming composition and the boosting composition being different from one another, e.g. as exemplified below. However, a second and third boosting composition may be administered within the method of the present invention as mentioned above. In one embodiment, a triple immunisation regimen employs DNA expressing a plurality of epitopes; followed by SFV as a first boosting composition where a plurality of SFV vectors are used each comprising one of the plurality of priming epitopes; followed by MVA as a third boosting composition where a plurality of MVA vectors are used each comprising one of the plurality of priming epitopes. Alternatively, the SFV boosting composition may be administered after the MVA boosting composition.

10

15

20

25

Likewise, where peptides are administered directly, peptide pulsed APCs, exosomes or APC mimics may also be

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

23

used for several sequential boosting steps. This may be achieved by sequential injections.

5 In all cases, it is preferable to administer (e.g. by injection) the priming and boosting composition several times to ensure successful delivery.

10 Priming with vectors expressing a plurality of epitopes can be followed by a mixture of recombinant virus (i.e. either SFV or MVA) comprising one or more of the plurality of priming epitopes and followed by a further boosting based on the injection of peptides, each, encoding one of the plurality of priming epitopes. The peptides will preferably be between 5 and 15 amino acids
15 in length, more preferably between 5 and 12 amino acids in length, more preferably between 5 and 10 amino acids in length. 9 amino acid long peptides are preferred. The peptides may be naturally occurring or they may be synthetic.

20

In order to enhance the method of testing vaccination regimens or strategy, the inventors have appreciated that accurate, efficient and fast testing of the provoked CTL response is required. With this in mind, the present
25 inventors have developed a novel tetramer based technique

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

24

to directly monitor the frequency of HLA A2 restricted CTL expanded in vaccinated HLA A2 transgenic mice. In association with the first aspect of the present invention, this will greatly accelerate development of new vaccines by allowing rapid and accurate analysis of human CTL responses.

Specifically, the inventors have developed a technique for directly monitoring A2 restricted CTL responses in the blood of A2 transgenic mice by engineering chimeric A2 class I molecules containing the mouse H2K^b alpha 3 domain. This technique allows accurate monitoring of the frequency of CTL induced by prime-boost regimens using poly-epitope constructs encoded within a number of different vectors and the correlation of the frequency of these CTL with their cytotoxic activity in vivo. This has the advantage of reducing the number of mice in each study considerably as they do not have to be killed for their CTL responses to be addressed.

Thus, in a further aspect of the invention, there is provided a multimeric MHC structure that is capable of detecting specific CTLs expanded following vaccination of an individual or test animal with one or more epitopes. The multimeric MHC structure comprises two or more MHC

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

25

molecules, preferably four molecules, held together in a single structure by a binding member such as streptavidin. The streptavidin used here may be fluorescently labelled for the detection of the CTLs binding the tetramer. As a plurality of MHC molecules are held in close proximity, they can be effectively used to display the epitope of interest in the form of a peptide so as to detect CTLs raised to that epitope. If effectively primed, the CTLs will recognise the displayed peptide/epitope and bind to the structure. This binding can be detected by known techniques such as flow cytometry, usually in combination with labelled antibodies e.g. anti CD8 antibodies.

However, the inventors have found that the use of these multimeric MHC structures, preferably tetramers, for testing the CTL responses in the vaccination model described above is limited as the MHC is of human origin whereas the test animal will be non-human, usually mouse, and therefore will have murine CD8 which does not effectively binding to human MHC.

To overcome this problem, the inventors have devised a chimeric multimeric MHC structure where the human $\alpha 3$ domain of the MHC is replaced with a murine $\alpha 3$ domain.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

26

As the $\alpha 3$ domain binds the CD8 molecule, the chimeric multimeric MHC structure is more efficient at detecting the CTL response to the epitope under test than the non-chimeric structure.

Therefore, the invention further provides a chimeric multimeric MHC structure comprising at least two human MHC molecules held in close proximity by a binding member, wherein each MHC molecule contains an altered $\alpha 3$ domain so as to represent a murine $\alpha 3$ domain instead of a human $\alpha 3$ domain. Preferably, the human $\alpha 3$ domain is replaced by a murine $\alpha 3$ domain. The chimeric multimeric MHC structure may also be complexed with peptides displaying the epitope under test.

The murine $\alpha 3$ domain may be inserted into the human MHC to replace the human $\alpha 3$ domain, by creating a fusion protein, or by mutating the human $\alpha 3$ domain by insertion, deletion, or substitution of amino acids or nucleotides encoding amino acids characteristic of the murine $\alpha 3$ domain. Ideally, the chimeric MHC is produced as a fusion protein where nucleic acid encoding the human $\alpha 1$ domain and human $\alpha 2$ domains is expressed along with nucleic acid encoding the murine $\alpha 3$ domain. In this way a chimeric MHC fusion protein will be produced.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

27

The multimeric chimeric MHC structure can then be associated with a peptide displaying the epitope under test. The number of peptides being displayed by the chimeric MHC will depend on the number of MHC molecules in the multimeric structure. The inventors have produced tetramers which will allow four peptides/epitopes to be displayed in close proximity. Thus, this structure can be used to detect the presence of a CTL response to the epitope in question. For example, the tetramer will display the peptide/epitope and when added to a biological sample (e.g. blood) obtained from the test animal, any CTLs recognising the epitope will bind to the tetramer with the aid of murine CD8. As the murine CD8 binds more successfully to murine $\alpha 3$ domain than human $\alpha 3$ domain, the binding of the CTL to the chimeric MHC tetramer according to the present invention is more stable than binding to a non-chimeric MHC tetramer.

The binding of the tetramer to the CTL can be detected by using, for example a fluorescently labelled tetramer. In addition, labelled CD8 antibody can be used to aid in the detection labelling and staining techniques are known to the skilled person.

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

28

As well as being extremely useful in monitoring the CTL response in accordance with the vaccination regimens mentioned above, the chimeric multimeric MHC structures can also be used to quickly and efficiently determine epitopes in a particular protein.

For example, A2 transgenic mice immunised with defined tumour or viral antigenic protein(s) encoded by DNA and/or recombinant viruses can be monitored for their ability to mount a specific CTL response by using the chimeric multimeric MHC class I molecules associated with peptides derived from the antigenic protein(s). This protocol will make possible the rapid identification of novel peptide epitopes encoded within antigenic proteins.

The inventors' findings are of importance for the design of optimised vaccines capable of simultaneously expanding high numbers of CTL specific for multiple epitopes. They are also important with regard to providing a vaccination model which allows quick, efficient and reliable testing of epitopes and allows design of the most efficient vaccination regimen.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

29

The inventors have also devised a novel chimeric MHC multimer which can be used to efficiently detect a CTL response to a test epitope in a test animal.

5 Aspects and embodiments of the present invention will now be illustrated, by way of example, with reference to the accompanying figures. Further aspects and embodiments will be apparent to those skilled in the art. All documents mentioned in this text are incorporated herein
10 by reference.

Brief Description of the Drawings

Table 1 Poly-CTL epitope construct. The poly-CTL epitope
15 gene (mel3) was constructed as a single string of epitopes. Mel3 cassette was cloned into four distinct vectors: naked DNA, vaccinia virus WR, MVA and SFV.

Fig. 1 efficient processing and presentation of mel3 CTL.
20 HLA A2 and HLA A1 positive B cells were infected with mel3. MVA and used as targets of CTL clones specific to each epitope contained within the mel.3 poly-CTL construct. Specificity of each CTL clone and percentage of specific lysis are shown above each panel. Target
25 cells were pulsed with relevant peptide (+ peptide).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

30

unpulsed (- peptide), infected either with mel3 MVA (MVA.mel3) or an irrelevant vaccinia (irr vac). Mouse NP 366-374 specific CTL were used as effectors cells against mouse MC57 fibroblasts infected with mel3.MVA.

5

Each bar corresponds to a different effector to target ratio: black bars 10:1, open bars 3:1 dotted bars 1:1.

Fig. 2 Ex-vivo frequency of NP 366-374 specific CTL in mice immunised with homologous and heterologous prime boost vaccination strategies. Each panel corresponds to a different vaccination procedure.

Fig. 3 Prime-boost of A2/Kb mice with DNA.mel3 followed by MVA.mel3.

A. Simultaneous generation of Db and A2 restricted CTL in A2/Kb transgenic mice. Mice were primed i.m. with DNA-mel3 and boosted 10 days later i.v. with MVA-mel3. Ex-vivo tetramer analysis of DB/NP366-374 and A2/melan-A 26-35 was carried out. Frequency of tetramer positive cells is shown in each vaccinated mouse after 3 days from MVA boost.

B. Effect of pre-existing memory CTL response specific to a single determinant contained within the poly-CTL epitope construct. A2/Kb mice were immunised

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

31

i.n. with influenza virus and subsequently injected with DNA.mel3 followed by MVA.mel3. Ex-vivo tetramer analysis of Db/NP366-374 and A2/melan-A 26-35 was carried out.

Frequency of tetramer positive cells is shown in each

5 vaccinated mouse after 3 days from MVA boost.

Fig. 4 Hierarchy of prime-boost vaccine driven CTL. HHD

mice were primed with DNA.mel3 and boosted with either

vac. Mel3 (A), MVA.mel3 (B) or SFV.mel.3 (C). Frequency

10 of melan-A, tyrosinase and NY-ESO-1 specific responses

were simultaneously measured by ex-vivo tetramer

staining. DNA.mel3 primed SFV.mel3 boosted mice (group C)

were injected with fluorochrome labelled splenocytes

pulsed with either the melan-A, tyrosinase or NY-ESO-1

15 peptide. The percentage of in vivo killing is shown (D).

Fig. 5 Immunodominance of Melan-A specific CTL response

can be overcome by poly-vaccinia boosting or by adoptive

transfer of in vitro infected splenocytes. DNA.mel3

20 primed HHD mice were either boosted with a mixture of

vaccinia viruses encoding the full length tyrosinase and

full length NY-ESO-1 (A). Alternatively, DNA mel3 primed

HHD mice were injected either with three aliquotes of

splenocytes separately infected in vitro with full length

25 tyrosinase, full length NY-ESO-1 and mel3. Vaccinia (B,

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

32

panels a, b and c) or with splenocytes infected with mel3 vaccinia (B, panels d, e and f). Frequency of melan-A, tyrosinase and NY-ESO-1 specific responses were simultaneously measured by ex-vivo tetramer staining.

5

Fig. 6 Poly-virus boosting overcomes the immunodominance of melan-A₂₆₋₃₅ specific CTL. DNA.mel3 primed HHD mice were boosted with either a mixture of vaccinia viruses encoding the full length tyrosinase, full length NY-ESO-1 and SFV.mel3 (A) or with SFV.mel3 (B). Frequencies of melan-A₂₆₋₃₅, tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ and NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ specific responses were simultaneously measured by ex-vivo tetramer staining. Staining of a single mouse out of six is shown. C and D: Each mouse was injected with fluorochrome labeled splenocytes pulsed with either the melan-A₂₆₋₃₅, tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ or NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptide and the % of in vivo lysis was calculated. Panel C corresponds to the in vivo killing in DNA.mel3 primed HHD mice boosted with a mixture of vaccinia viruses encoding the full length tyrosinase, full length NY-ESO-1 and SFV.mel3, while panel D corresponds to the in vivo killing in DNA.mel3 primed HHD mice boosted with SFV.mel3.

10
15
20

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

33

Fig. 7 The experiment shows A2K^b tetramer stains from mice primed with MVA.mel3 and boosted with peptide pulsed dendritic cells (DCs). Two groups of mice are shown:

Group A (three mice) received DCs pulsed with a mixture

of 3 peptides (Melan-A, Tyrosinase and NY-ESO-1), and

Group B (four mice) received a mixture of DCs pulsed with

single peptides. On the left hand side of the figure, one individual response to three epitopes is shown from one

mouse in each group. On the right hand side of the figure

the average percentage of tetramer positive CTL in each

group is shown. The error bars indicate the standard

deviation of the mean. The experiment shows that peptide

pulsed DCs can efficiently boost poly valent CTL

responses primed by recombinant MVA (compare Fig. 4A, B

and C) The experiment further demonstrates, that a

mixture of separately peptide pulsed DCs for boosting is

more efficient in boosting a poly-valent response when

compared to DCs pulsed with a mixture of peptides.

Detailed Description

Materials and methods

Plasmid DNA construct

The DNA vector pSG2, used throughout the study, was

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

34

derived from pRc/CMV (Invitrogen, Paisley, UK) by removing the BamHI fragment that contains the SV40 origin of replication and neomycin resistance marker and replacing the CMV promoter with a longer version of the same promoter containing intron A. The resulting plasmid contains the CMV promoter with intron A for expression in eukaryotic cells, followed by a multiple cloning site and the bovine growth hormone poly-A sequence. The plasmid is incapable of replication in mammalian cells. The gene encoding the mel3 sequence (Table 1) was introduced into the multiple cloning site using standard methods. Plasmid DNA for injection was purified using anion-exchange chromatography (Qiagen, Hilden, Germany) and diluted in phosphate buffered saline (PBS) at 1 mg DNA/ml.

15

Generation of recombinant Vaccinia virus and MVA

Recombinant and non-recombinant MVA were routinely propagated and titrated in chicken embryo fibroblasts (CEF) grown in minimal essential medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS). Recombinant MVA were made as described by cloning the mel3 poly-epitope string (Table 1) into the vaccinia shuttle vector pSC11. CEF infected with MVA at a multiplicity of 0.05 pfu per cell were transfected with lipofectin (Gibco) and shuttle plasmid as described 23. The Vaccinia P7.5 promoter drives

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

35

expression of the polypeptide. Recombinant MVA were
plaque purified 8 times.

Vaccinia viruses (WR strain) expressing mel3, full length
5 NY-ESO-1 (kindly provided by Dennis L. Panicali, Therion
Biologics Corporation, MA 02142, USA) or tyrosinase were
made by cloning the mel3 poly-epitope construct, the NY-
ESO-1 and tyrosinase full length cDNA into the thymidine
kinase gene using the vector pSC11 as previously
10 described 24.

Generation of recombinant SFV

The mel3 poly-epitope string was cloned into the transfer
vector pSFV4.2-mel3. RNA produced from this vector was
15 used to construct recombinant SFVmel3 particles.
Recombinant SFV stocks were made and purified as
described previously 16.

Generation of human CTL Clones and CTL assays

20 Human CTL clones were isolated as described 25. Briefly,
tetramer/CD8 double positive stained CTL cultures were
sorted as single cells into U-bottom 96-well plates,
previously coated with anti-CD3 and anti CD28 both at
100ng/ml in PBS, containing 10^5 irradiated B cells in
25 Iscove's medium supplemented with 5% human serum, 100

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

36

U/ml IL-2. Proliferating clones were expanded to $> 10^7$ cells and used as effectors for standard Cr⁵¹ release assays. The inventors used JY B cells infected with MVA mel3 as targets for HLA A2 restricted CTL; XY B cells for HLA-A1 restricted epitopes and H-2b positive MC57 cells as targets for the D^b restricted Influenza Nucleoprotein. We titrated CTL clones in three fold dilutions against targets

10 Tetramer synthesis

Fluorescent tetrameric HLA-A2.1/peptide complexes were synthesised as previously described ¹. A2-Kb/peptide complexes were synthesised in an analogous fashion using a chimeric heavy chain of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domain of the A2.1 molecule and the $\alpha 3$ domain of the H-2D^b molecule with human $\beta 2$ -micro globulin.

Isolation of PBL and Tetramer stains

Fresh PBL were isolated from blood taken from tail vein using red cell lysis buffer (Invitrogen, Paisley, UK). For tetramer stains 3×10^5 cells were resuspended in 20 μ l RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 10% FCS. Cells were incubated with tetramer for 15 minutes at 37°C. PBL were then incubated with rat anti mouse CD8 α

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

37

(Pharmingen, San Diego, CA) for 15 minutes at 4°C. Cells were washed twice in PBS and resuspended in PBS for FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) analysis.

5 Animals and Immunization protocols

HHD mice express a transgenic monochain histocompatibility class I molecule in which the C terminus of the human $\beta 2m$ is covalently linked to the N terminus of a chimeric heavy chain (HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$, H-

10 2D^b $\alpha 3$ transmembrane and intracytoplasmic domains) 20.

The H-2D^b and mouse $\beta 2m$ genes of these mice have been disrupted by homologous recombination resulting in complete lack of serologically detectable cell surface expression of mouse histocompatibility class I molecules.

15 A2-K^b mice express chimeric heavy chain (HLA-A2.1 alpha 1 alpha 2, H-2 K^b alpha 3 transmembrane and cytoplasmic domains) in non-covalent association with mouse $\beta 2m$. They additionally express a full set of C57BL/6-derived (H-2^b) class Ia and Ib mouse histocompatibility molecules 26.

20 All A2 transgenic mice used were bred in the inventors' animal facility. Female C57/BL6 mice 4-6 weeks old were obtained from Harlan Orlac (Shaws Farm, Blackthorn, UK). Plasmid DNA (25-50 μ g/muscle) was dissolved in PBS and injected into each musculus tibialis under general

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

38

anaesthesia. 10 days after DNA injection, mice were boosted with recombinant vaccinia viruses, which were diluted in PBS and 10^6 - 10^7 pfu and injected intravenously (i.v.) into the lateral tail vein. Alternatively freshly isolated spleen cells were separately infected (multiplicity of infection of 5) with mel3, full length tyrosinase and NY-ESO-1 vaccinia for 90 minutes in RPMI supplemented with 0.1% BSA at 37°C. Cells were washed 3 times and re suspended in sterile PBS at a concentration of 6×10^7 cells/ml combined and injected into lateral tail vein. Mice received 6×10^6 spleen cells.

Mice primed with influenza virus A (PR8) were infected by intra-nasal influenza injection (20 HAU/mouse). 30 days later mice were injected with DNA.mel3 followed by MVA.mel3, as described above. For priming or boosting with SFV-mel3 10^8 virus particles were diluted in sterile PBS and injected into the lateral tail vein.

In vivo killing

Freshly isolated spleen cells from HHD mice were separately incubated in RPMI medium with different peptides at a concentration of 10^{-6} M for 2 h. Each cell pool was then labelled with a different concentration of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE,

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

39

Molecular Probes, Eugene, Oregon) to allow simultaneous tracking of the different populations in vivo ²⁷,

Hermans, I.F., Yang, J. and Ronchese, F. Unpublished results. Labelled cells were pooled and injected at 10⁷

5 cells/mouse into the tail vein. A control population without peptide that had been labelled with 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine (CellTracker Orange, Molecular Probes, Eugene, Oregon) was co-injected to assess killing of peptide pulsed
10 targets relative to unpulsed cells. Mice were bled at the time of injection of flurochrome labelled targets to determine their CTL frequencies to different epitopes. Disappearance of peptide/flurochrome labelled cells was tracked using FACS analysis of freshly isolated PBMC 5 h
15 after the injection. Percentage killing was calculated relatively to the unpulsed population labelled with Cell Tracker Orange. $100 - (100 \times (\% \text{pulsed} / \% \text{unpulsed}))$. WinMDI 2.8 and CellQuest 3.3 software was used to analyse the facs data.

20

Results

A string of 5 HLA-A2 and 2 HLA-A1 melanoma epitopes was cloned into four distinct vectors: a) naked plasmid DNA (mel3. DNA); b) vaccinia virus (mel3-vaccinia); c)

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

40

Modified Vaccinia Ankara virus (mel3. MVA); d) Semliki Forest Virus (mel3-SFV). To ensure monitoring of CTL responses restricted by human and mouse class I molecules, the inventors introduced an additional epitope from the influenza Nucleoprotein (NP) restricted by H-2Db class I molecules. Since they had previously shown that presentation of amino-terminal NP366-374 epitope can be affected by neighbouring amino acid residues 24, the inventors decided to express the influenza NP 366-374 epitope at the carboxyl terminal end of the poly-epitope construct. Sequence of the poly-epitope constructs used in the paper are shown in **Table 1**.

Efficient presentation of MVA encoded poly-epitopes

Initial experiments were carried out to compare the A2 binding affinity of each epitope contained within the mel.3 construct. The results of these experiments demonstrated that mel3 peptide epitopes had a broad range of binding affinities for A2 molecules. The Melan-A 26-35 peptide analogue ²⁸ had the highest binding affinity, while the NY-ESO-1 157-165 and tyrosinase 1-9 peptides had a significantly lower affinity, as defined by their ability to inhibit at different concentrations presentation of the influenza Matrix epitope 58-66 (data not shown). The inventors and others have previously

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

41

demonstrated that optimal flanking residues are important to ensure presentation of class I restricted epitopes 24,29. To establish that mel.3 peptide epitopes were properly processed, and to assess that competition for binding to A2 molecules did not impair CTL recognition of lower affinity epitopes, they infected target cells with mel.3 vaccinia and demonstrated that each of the 7 epitopes contained within the poly-epitope mel.3 cassette was simultaneously presented to specific CTL (**Fig. 1**).

The inventors had previously shown that proteasome dependent degradation impairs presentation of the MAGE3 A2 epitope 271-279³⁰. It was therefore surprising to observe that infection of target cells with mel3 vaccinia was capable of sensitising them for lysis by MAGE3 271-279 specific CTL. Further experiments demonstrated that processing of the MAGE3 271-279 epitope contained within the mel3 construct, unlike its processing within the full length MAGE3 protein, was lactacystein resistant and TAP independent (data not shown), consistent with processing of mel.3 construct by Endoplasmic reticulum resident proteases.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

42

Influenza NP 366-374 specific CTL responses in mice
vaccinated with poly-epitope encoded vaccines

Efficient presentation of the NP366-374 epitope by mel3 vaccinia infected cells prompted the inventors to assess in C57/B6 mice the ability of different vaccination strategies to induce a strong NP366-374 specific CTL response (Fig. 2). Ex-vivo monitoring of the NP specific CTL response was carried out in PBL using Db/Influenza NP366-374 tetramers. The inventors compared homologous vs heterologous prime boost vaccination protocols (Fig. 2), and analysed the kinetics of CTL induction by DNA or MVA priming (data not shown). The results of these experiments confirmed that heterologous vaccination strategies are capable of inducing long lasting vaccine driven CTL responses, with frequencies up to 100 times greater than frequencies obtained by strategies based on repeated injections of the same antigen delivery system (Fig. 2).

Expansion of A2 restricted CTL in A2 transgenic mice

To test the ability of the mel.3 poly-epitope constructs to prime A2 restricted CTL responses in vivo, A2 transgenic mice were primed by DNA-mel.3 and boosted by MVA-mel.3, vaccinia mel.3, or SFV-mel3.

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

43

Initial experiments were carried out using A2.1 transgenic mice, which express chimeric A2.1 molecules containing the Kb $\alpha 3$ domain, and endogenous D^b and K^b molecules (A2/Kb mice) ²⁶. To enable monitoring of the A2 restricted responses at the same time as the D^b restricted Influenza NP366-374 response, the inventors employed novel A2/Kb tetramers, which were also capable of detecting the relevant CTL directly in PBL. Simultaneous staining with A2/Kb and D^b tetramers demonstrated that priming of A2/Kb mice with DNA.mel3, followed by MVA-mel.3, induced melan-A 26-35 and Influenza NP 366-374 specific CTL responses (**Fig. 3**). In contrast, responses specific to other mel.3 epitopes were not detectable by ex vivo tetramer stainings (data not shown).

The ability to simultaneously monitor CTL responses against the influenza NP epitope 366-374 and melan-A epitope 26-35 prompted the inventors to study whether previous exposure to influenza virus may compromise the ability of prime-boost protocols to expand melan-A 26-35 specific CTL in A2-Kb mice. In order to generate a strong NP366-374 specific CTL response, A2 transgenic mice were immunised with influenza virus and subsequently received DNA.mel3 followed by MVA-mel3 (**Fig. 3**). The results of these experiments demonstrated that expansion of NP366-

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

44

374 specific CTL, prior vaccination with mel3 poly-epitope constructs, significantly reduced the expansion of melan-A specific CTL (**Fig. 3**). The inhibitory effect of pre-existing flu specific CTL on the ability of mel3 prime-boost to induce melan-A specific CTL response (**Fig. 3**) raised the possibility that T cell interference during heterologous vaccination strategies may compromise the induction of a broad range immune response. The presence of endogenous mouse class I molecules significantly narrows the A2 restricted repertoire in A2Kb mice, hence hampering the ability to study the interplay between A2 restricted CTL specific to different vaccine encoded determinants.

This reasoning led the inventors to monitor the hierarchy of vaccine driven CTL responses upon prime boost protocols in the A2 transgenic mice HHD²⁰. HHD mice, unlike A2Kb transgenic mice, express A2.1 class I molecules linked to human β -2 microglobulin in a Db^{-/-} and β -2m^{-/-} background, and have a much larger A2 restricted T cell repertoire than A2/Kb transgenic mice²⁰.

Prime-boost vaccination of HHD mice induces large numbers of melanoma specific CTL

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

45

Priming of HHD mice with DNA.mel3 led to the expansion of Melan-A specific CTL to frequencies detectable by ex-vivo tetramer staining in all vaccinated mice (data not shown). In contrast, expansion of NY-ESO-1 and tyrosinase specific CTL was only detectable in a small proportion of immunised mice, while responses to the Tyrosinase 1-9 and Mage3 271-279 were not detected in blood tetramer stainings (data not shown).

Additional experiments confirmed that NY-ESO-1 specific CTL responses were primed by DNA.mel3 injection, as shown by the significant NY-ESO-1 CTL response in DNA.mel3 primed mice boosted with vaccinia virus encoding the full length NY-ESO-1 (data not shown). In contrast, injection of NY-ESO-1 vaccinia virus, without priming with DNA.mel3, led to a much lower frequency of NY-ESO-1 CTL. Similar results were obtained upon injection of tyrosinase vaccinia in mice primed with DNA mel3 (data not shown).

The observation that the melan-A 26-35 specific CTL was the dominant vaccine driven CTL response after a single DNA vaccination, presented an opportunity to study the interplay between CTL specific to different vaccine encoded determinants in prime-boost vaccination

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

46

protocols. The inventors observed that boosting of DNA.mel3 primed HHD mice with either vaccinia.mel3 (**Fig. 4a**), MVA.mel3 (**Fig. 4b**), or SFV-mel3 (**Fig. 4c**), led to the expansion of melan-A specific CTL, up to 70-80% of total CD8+ T cells. Although responses specific to NY-ESO-1 and tyrosinase epitopes were significantly lower than the Melan-A specific responses, their frequencies ranged between 2 and 30% of CD8+ T cells, confirming that DNA priming and boosting with either replication competent (i.e. Vac.mel3) or incompetent viruses (MVA.mel3 and SFV-mel3) significantly enhance the frequency of CTL specific to three distinct melanoma specific epitopes. The inventors confirmed that vaccine driven CTL were cytolytic, as shown by their ability to kill fluorochrome labelled splenocytes pulsed with relevant peptides in vivo (**Fig. 4d**). These results demonstrated that the cumulative response specific to melan-A, NY-ESO-1 and tyrosinase in HHD mice primed with DNA.mel3 and boosted with three distinct viral vectors accounted for the specificity of the majority of CD8+ population.

Competition of vaccine driven CTL for mel.3 expressing

APC

Since the inventors demonstrated the inhibitory effect of

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

47

a pre-existing flu memory CTL response on the ability to induce melan-A specific CTL (**Fig. 3**), they sought to study whether the high numbers of melan-A specific CTL, dominating the immune response after DNA priming, were
5 capable of interfering with the expansion of NY-ESO-1 and tyrosinase specific CTL during the virus boosting.

It is known that competition for antigen recognition on the surface of antigen presenting cells leads to the
10 immunodominance of higher frequency CTL populations 31-33. The inventors reasoned that the higher numbers of melan-A CTL after DNA.mel 3 priming may lead either to rapid killing or shielding of mel3 vaccinia infected APC in vivo, resulting in a hampered stimulation of CTL
15 specific to NY-ESO-1 and tyrosinase epitopes expressed by the same APC population.

This reasoning led them to assess whether a higher frequency NY-ESO-1 and tyrosinase specific CTL responses
20 could be obtained by separating the APC expressing NY-ESO-1 and tyrosinase proteins from the APC expressing the mel3 construct. The results of these experiments confirmed this hypothesis, as shown by: 1) expansion of NY-ESO-1 and Tyrosinase specific CTL in DNA.mel3 primed
25 mice and boosted with a mixture of vaccinia viruses,

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

48

encoding the full length tyrosinase and full length NY-ESO-1 proteins (Fig. 5a); 2) simultaneous expansion of melan-A, NY-ESO-1 and tyrosinase specific CTL upon adoptive transfer into DNA.mel3 primed mice of three aliquotes of splenocytes infected ex-vivo with vaccinia viruses encoding full length NY-ESO-1, tyrosinase and mel3 construct (Fig. 5b, panels a,b and c), while adoptive transfer of splenocytes infected with mel3 vaccinia led to the expansion of Melan-A specific CTL (Fig 5b panels d, e and f).

The inventors have demonstrated that boosting of DNA.mel3 primed mice with a mixture of recombinant viruses, encoding the full length tyrosinase, full length NY-ESO-1 and the mel3 construct, led to the simultaneous expansion of melan-A₂₆₋₃₅, NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ specific CTL (Fig. 6a and b). The identification of successful vaccination strategies to simultaneously expand large numbers of CTL with a broad specificity has important clinical applications, as we showed that T cell immunity induced by this type of optimised boosting strategies provides a more efficient in vivo killing of target cells than vaccinations based on poly-epitope prime boost strategies (Fig. 6 c and d).

25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

49

Immunodominance of Melan-A specific CTL could be broken by separating the antigens during the boost. When separately infected splenocytes were used to boost a polyvalent response relevant peptides were separately presented and resulted in simultaneous expansion of Melan-A, Tyrosinase and NY-ESO specific CTL. To simplify this approach the inventors used peptide pulsed dendritic cells to boost an MVA.mel3 primed response. The cells used for boosting were either pulsed with a mixture of peptides (Fig. 7a) or separately pulsed (Fig. 7b). The inventors show that separate pulsing of APC is superior to pulsing APC with a mixture of peptides. This approach also demonstrates, that poly-epitope constructs encoded in vaccinia virus can efficiently prime and APC pulsed with peptide can efficiently boost a polyvalent CTL response.

Discussion

There is a tremendous momentum in vaccine development, as recent advances in the monitoring of antigen specific CTL responses in ex-vivo assays are rapidly improving our capacity to compare different vaccination protocols. In order to minimise the generation of tumour and virus antigen escape variants, it is important to ensure the expansion of vaccine driven CTL specific to several

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

50

epitopes, including both dominant and subdominant determinants. Several papers have dissected the causes responsible for immunodominance of CTL specific to viral 34-36, and histocompatibility antigens 33,37,38. However, 5 it remains to be established how optimal vaccine strategies can lead to the simultaneous expansion of CTL specific to dominant and subdominant epitopes.

To address these questions the inventors engineered 4 distinct vectors encoding a string of melanoma CTL 10 epitopes (**Table 1**), and compared in A2 transgenic and wild type B6 mice the ability of different vaccination strategies to elicit vaccine specific CTL responses. In order to identify strategies capable of expanding CTL 15 specific to dominant and subdominant determinants, peptide epitopes with high and low binding affinity for A2 molecules were linked in the same construct. More specifically, the inventors included the modified melan-A analogue 26-35, previously shown to have an enhanced 20 immunogenicity in vivo ²⁸ and the NY-ESO-1 peptide 157-165, shown to have a much lower binding affinity to A2 molecules ³⁹ (**Table 1**).

Vaccine driven CTL Hierarchy in mel3 vaccinated mice

25 The inventors have developed a novel tetramer based

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

51

technique to directly monitor the frequency of A2 restricted CTL expanded in A2 transgenic mice vaccinated in a prime-boost regimen. To increase the binding affinity of mouse CD8 to A2 molecules, they engineered A2 molecules containing the mouse H-2K^b alpha 3 domain (A2/K^b molecules), and demonstrated that tetrameric A2K^b molecules have an increased staining efficiency for mouse A2 restricted CTL and can identify A2 restricted responses in a large proportion of A2 transgenic mice, as compared with tetrameric A2 molecules.

While studying the immune response in A2Kb mice, the inventors have demonstrated that expression of Db molecules results in a strong influenza NP366-374 specific response, which significantly impairs the expansion of CTL specific to other mel3 encoded epitopes. In order to study the interplay between A2 restricted CTL specific to different vaccine encoded determinants, the inventors immunised the A2 transgenic mice HHD 20, which, unlike A2Kb transgenic mice, express A2 molecules in a Db-/- background.

Although several papers have recently studied the immune response in A2 transgenic mice vaccinated with poly-epitope constructs 19,20,40, this is the first publication in which the hierarchy of poly-epitope vaccine driven CTL in A2 transgenic mice has been

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

52

monitored by ex-vivo tetramer staining.

The inventors compared several vaccination strategies and confirmed that immunisations based on the injection of non-cross reactive vectors (heterologous prime-boost protocols) ensure higher levels of vaccine specific immune responses than immunisations based on the injections of homologous vectors (**Fig. 2**). The presence of neutralising antibodies against viral structural proteins and the presence of CTL specific to viral proteins may account for the lower CTL responses in mice vaccinated with repeated injections of the same virus, as compared with CTL frequencies upon vaccination with non-cross reactive vectors (**Fig. 2**). It has been suggested that the limited number of proteins encoded by plasmid DNA ensures that DNA priming focuses the immune response towards the recombinant protein, while virus boosting successfully expand this response, resulting in high levels of CTL specific to the recombinant protein. However, the inventors have shown that priming with either MVA.mel3 or SFV.mel3 led to a significant expansion of NP366-374 specific CTL upon boosting with influenza virus or MVA.mel3, respectively (**Fig. 2**), demonstrating that the ability to prime CTL is not unique to DNA vectors.

In HHD A2 transgenic mice, due to the lack of CTL

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

53

restricted by endogenous mouse class I molecules, heterologous prime boost resulted in a tremendous expansion of melan-A specific CTL up to 90% of total CD8+ T cells (**Fig. 4a**), hence redirecting a large proportion of HHD mice's A2 restricted repertoire towards vaccine encoded CTL determinants. Several factors may contribute to the immunodominance of the melan-A specific CTL response. It is possible that a combination of an increased binding affinity for A2 molecules and for TCR, together with a favourable intracellular processing, may skew CTL responses towards the melan-A epitope 26-35 in DNA.mel3 primed mice.

Previous studies have shown that "suppression" of T cell responses specific to non dominant epitopes by T cell responses specific to dominant epitopes is observed only when both types of determinants are presented on the same APC^{32,33,38}. Injection of large numbers of APC resulted in the expansion of T cells specific to the sub-dominant epitopes 41. The inventors have demonstrated that immunodominance of the melan-A epitope 26-35 was overcome by boosting strategies based on the injection of either a mixture of different recombinant viruses (**Fig. 5a**) or splenocytes infected in vitro by individual vaccinia viruses encoding full length proteins, rather than a poly-epitope construct (**Fig. 5b**).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

54

Implications for vaccination strategies in patients.

These results are of importance, since several clinical trials are currently using heterologous prime boost vaccination protocols with poly-epitope constructs. While the inventors confirm the ability of heterologous prime-boost protocols in eliciting large numbers of vaccine specific CTL, they demonstrate that during heterologous prime-boost protocols, frequency of immunodominant CTL responses is significantly expanded over frequency of CTL responses specific to less dominant determinants. Although there are numerous mechanisms which may account for a narrowing of the CTL repertoire which responds to a vaccine, the inventors' results are consistent with a model of immunodominance based on competition of T cells for antigen presenting cells (APCs) 32,33,38. It is worth noting that the injection of vac.mel3 into naïve mice induces lymphocytosis with a shift of CD8+ frequency from 0.5% up to 30%, indicating a strong CTL response to the vaccinia virus. Of the CD8+ T cells induced in the blood as many as 50% are specific for Melan-A 26-35 (data not shown), demonstrating that melan-A 26-35 is one of the most immunodominant epitopes expressed by the virus amongst more than 200 vaccinia proteins responsible for the viruses' structure,

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

55

transcription and replication. This observation has important clinical implications for the design of viral-based vaccines encoding the Melan-A epitope 26-35. The use of recombinant SFV in prime-boost protocols is very attractive, as the inventors have demonstrated that SFV can be used both as priming vector in combination with MVA (**Fig. 2**) and for boosting in combination with DNA (**Fig. 4C**). These results compliment a recently published report demonstrating in macaques the enhancement of simian immunodeficiency virus-specific immune responses induced by priming with recombinant SFV and boosting with MVA 11.

The inventors demonstrated that pre-existing memory CTL responses significantly reduce CTL responses specific to other epitopes contained within the same construct (**Fig. 3b**). As several groups have used immunodominant influenza peptide epitopes as positive controls during vaccination trials, the inventors' result suggest that DNA or virus based vaccines should not encode epitopes expressed by recurrent viruses, as pre-existing memory CTL response may compromise the induction of CTL responses specific to other vaccine encoded CTL determinants.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

56

The inventors have further shown that T cell competition is likely to play a role in modifying T cell responses in prime-boost vaccination strategies. The inventors' work strongly suggests that simultaneous presentation of different epitopes to a skewed repertoire of primed CTL leads to dominant expansion of a single CTL specificity. However, boosting the primed response with APC separately presenting the epitopes results in comparable expansion of CTL of multiple specificities to effective levels in vivo.

Thus, the present inventors have, amongst other things provided a novel system for dissecting the ability of different vaccination protocols to optimally induce polyvalent A2-restricted CTL responses. In accordance with the present invention, methods for inducing a broad-based CTL response should restrict the use of polyvalent constructs to the priming phase and use separate vectors encoding individual epitopes, or separate proteins/peptides for the boosting phase.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

57

References

1. Altman, J.D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-6. (1996).
- 5 2. Romero, P. et al. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1641-50. (1998).
- 10 3. Dunbar, P.R. et al. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr Biol* 8, 413-6. (1998).
4. Ramshaw, I.A. & Ramsay, A.J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved
15 vaccination. *Immunol Today* 21, 163-5. (2000).
5. Schneider, J. et al. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with
20 modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4, 397-402. (1998).
6. Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S.C., Hill, A.V. & McMichael, A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in
25 mice. *Vaccine* 16, 426-35. (1998).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

58

7. Hanke, T. & McMichael, A. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett* 66, 177-81. (1999).
8. Hanke, T. et al. Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine* 17, 589-96. (1999).
9. Schneider, J. et al. Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol Rev* 170, 29-38. (1999).
10. Amara, R.R. et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69-74. (2001).
11. Nilsson, C. et al. Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Vaccine* 19, 3526-36. (2001).
12. Vidalin, O. et al. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology* 276, 259-70. (2000).
13. Berglund, P., Fleeton, M.N., Smerdou, C. & Liljestrom, P. Immunization with recombinant Semliki

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

59

Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497-507. (1999).

14. Mossman, S.P. et al. Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. *J Virol* 70, 1953-60. (1996).
15. Zhou, X., Berglund, P., Zhao, H., Liljestrom, P. & Jondal, M. Generation of cytotoxic and humoral immune responses by nonreplicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3009-13. (1995).
16. Smerdou, C. & Liljestrom, P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J Virol* 73, 1092-8. (1999).
17. Dunbar, P.R. et al. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 165, 6644-52. (2000).
18. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74, 181-273 (2000).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

60

19. Mateo, L. et al. An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy. *J Immunol* 163, 4058-63. (1999).
20. Firat, H. et al. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 29, 3112-21. (1999).
21. Loirat, D., Lemonnier, F.A. & Michel, M.L. Multiepitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J Immunol* 165, 4748-55. (2000).
22. Sandberg, J.K. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef epitopes recognized in HLA-A2 transgenic mice in response to DNA and peptide immunization. *Virology* 273, 112-9. (2000).
23. Carroll, M.W. et al. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* 15, 387-94. (1997).
24. Gileadi, U., Gallimore, A., Van der Bruggen, P. & Cerundolo, V. Effect of epitope flanking residues on the presentation of N-terminal cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Eur J Immunol* 29, 2213-22. (1999).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

61

25. Dunbar, P.R. et al. Cutting edge: rapid cloning of tumor-specific CTL suitable for adoptive immunotherapy of melanoma. *J Immunol* 162, 6959-62. (1999).
- 5 26. Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A. & Chesnut, R.W. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J Exp Med* 10 173, 1007-15. (1991).
27. Barchet, W. et al. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8(+) T cells in vivo. *Eur J Immunol* 30, 1356-63. (2000).
- 15 28. Men, Y. et al. Assessment of immunogenicity of human Melan-A peptide analogues in HLA- A*0201/Kb transgenic mice. *J Immunol* 162, 3566-73. (1999).
29. Velders, M.P. et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. 20 *J Immunol* 166, 5366-73. (2001).
30. Valmori, D. et al. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med* 189, 895-906. (1999).
- 25

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

62

31. Perkins, D.L., Berriz, G., Kamradt, T., Smith, J.A. & Geffer, M.L. Immunodominance: intramolecular competition between T cell epitopes. *J Immunol* 146, 2137-44. (1991).
- 5 32. Redl, R.M. *et al.* T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 192, 1105-13. (2000).
33. Pion, S. *et al.* On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur J Immunol* 27, 421-30. (1997).
- 10 34. Belz, G.T., Stevenson, P.G. & Doherty, P.C. Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *J Immunol* 165, 2404-9. (2000).
- 15 35. Bousso, P., Lemaitre, F., Bilsborough, J. & Kourilsky, P. Facing two T cell epitopes: a degree of randomness in the primary response is lost upon secondary immunization. *J Immunol* 165, 760-7. (2000).
- 20 36. Chen, W., Anton, L.C., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12, 83-93. (2000).

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

63

37. Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17, 51-88 (1999).
- 5 38. Grufman, P., Wolpert, E.Z., Sandberg, J.K. & Karre, K. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur J Immunol* 29, 2197-10 204. (1999).
39. Chen, J.L. et al. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* 165, 948-55. (2000).
40. Woodberry, T. et al. Immunogenicity of a human 15 immunodeficiency virus (HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes. *J Virol* 73, 5320-5. (1999).
41. Sandberg, J.K. et al. Superdominance among 20 immunodominant H-2Kb-restricted epitopes and reversal by dendritic cell-mediated antigen delivery. *J Immunol* 160, 3163-9. (1998).

Table 1

Nucleotide and amino acid sequence of mel.3 construct	Antigen	Epitope	Restriction
aga-tct-gcc-gcc-acc-- atg-tta-cta-gct-ggt-ttg-tac-tgc-ctg- M L L A V L Y C L	Tyrosinase	1-8	(A2)
gaa-cta-gca-ggg-ata-ttg-aca-gtg- E L A G I G I L T V	Melan-A	26-35(*)	(A2)
tat-atg-gat-gga-aca-atg-tcc-cag-gta- E L L D G I H S Q V	Tyrosinase (Linker)	369-377	(A2)
gga-tcc- G S			
gaa-gtc-gat-cca-ata-gga-cat-ttg-tac- E V D F I G H L Y	Mage-3	167-175	(A1)
ttc-ctg-tgg-ggt-cca-aga-gcc-ctc-gtt- F L W G P R A L V	Mage-3	271-279	(A2)
gaa-gca-gac-ccc-acc-gga-cac-tcc-tat- E A D P T G H S Y	Mage-1 (Linker)	161-169	(A1)
gga-tct- G S			
cag-ctt-tcc-ctg-ttg-atg-tgg-ata-acc-cag-tgc-ttt-ctg- Q L S L L M W I T Q C F L	NY-ESO-1	156-167	(A2)
gct-cca-aat-gaa-aac-atg-gat-gct-atg-tga A S N E N M D A N	Influenza Nucleoprotein	366-374	(Db)

(*) this sequence corresponds to the peptide analogue modified at position 2 (Men et al.)

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

65

Claims:

1. Use of a plurality of epitopes in the preparation of a medicament for boosting an immune response in an individual, said individual having been previously exposed to at least one of said plurality of epitopes; said medicament comprising a plurality of peptides, each peptide comprising one of said plurality of epitopes.
2. Use according to claim 1 wherein said individual has been previously exposed to at least one of said plurality of epitopes either naturally or by administration of one or more of said epitopes.
3. Use according to claim 1 or claim 2 wherein said immune response is a CD8+ T cell immune response.
4. Use according to any one of the preceding claims wherein each peptide is associated with an antigen presenting cell.
5. Use according to claim 4 wherein the antigen presenting cell is a dendritic cell.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

66

6. Use according to claim 4 wherein the antigen present cell is a lymphocyte.
- 5 7. Use according to any one of the preceding claims wherein the medicament further comprises an adjuvant.
8. Use according to claim 1 or claim 2 wherein each peptide is displayed on the surface of a cell.
- 10 9. Use of a plurality of epitopes in the preparation of first and second medicaments for inducing an immune response in an individual, said first medicament being a priming composition comprising a one or more peptides each
- 15 peptide comprising one or more of said plurality of epitopes; and said second medicament being a boosting composition which comprises a plurality of peptides each peptide comprising one of said plurality of epitopes, wherein the second medicament is administered after the
- 20 first medicament.
10. Use according to claim 9 wherein the immune response is a CD8+ T cell immune response.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

67

11. Use according to claim 9 or claim 10 wherein each peptide is associated with an antigen presenting cell.

5 12. Use according to claim 11 wherein the antigen presenting cell is a dendritic cell.

13. Use according to claim 11 wherein the antigen presenting cell is a lymphocyte.

10 14. Use according to any one of claims 9 to 13 wherein the first and/or second medicament comprise an adjuvant.

15 15. Use according to any one of the preceding claims wherein said plurality of epitopes are derived from one or more pathogens

16. Use according to any one of claims 1 to 14 wherein said plurality of epitopes are derived from a tumour cell.

20 17. A method of boosting an immune response to a plurality of epitopes in an individual, said individual having been previously exposed to at least one of said plurality of

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

68

epitopes; said method comprising the steps of administering to the individual a composition comprising a plurality of peptides each peptide comprising one of said plurality of epitopes.

5

18. A method according to claim 17 wherein the individual has been previously exposed to at least one of said plurality of epitopes either naturally or by administering one or more peptides comprising one or more of said epitopes.

10

19. A method according to claim 17 or claim 18 wherein the individual is a test animal and the epitopes are test epitopes.

15

20. A method according to claim 15 further comprising the step of determining the CTL response to each of the epitopes under test.

20

21. A method according to claim 19 or claim 20 wherein the test animal is a transgenic animal that provides an immune environment close to the human immune environment.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

69

22. A method according to claim 21 wherein the test animal is an A2 transgenic mouse.

23. A method according to any one of claims 17 to 22 wherein each peptide is associated with an antigen presenting cell.

24. A method according to claim 23 wherein the antigen presenting cell is a dendritic cell.

25. A method according to claim 23 wherein the antigen presenting cell is a lymphocyte.

26. A method of inducing an immune response to a plurality of epitopes in an individual, said method comprising the steps of administering to the individual a priming composition comprising one or more peptides comprising one or more of said plurality of epitopes and then administering a boosting composition which comprises a plurality peptides each encoding one of said plurality of epitopes.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

70

27. A method according to claim 26 wherein the individual is a test animal and the epitopes are test epitopes.

28. A method according to claim 27 further comprising the step of determining the CTL response to each of the epitopes under test.

29. A method according to claim 27 or claim 28 wherein the test animal is a transgenic animal that provides an immune environment close to the human immune environment.

30. A method according to claim 29 wherein the test animal is an A2 transgenic mouse.

31. A method according to any one of claims 26 to 30 wherein each peptide is associated with an antigen presenting cell.

32. A method according to claim 31 wherein the antigen presenting cell is a dendritic cell.

33. A method according to claim 31 wherein the antigen presenting cell is a lymphocyte.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

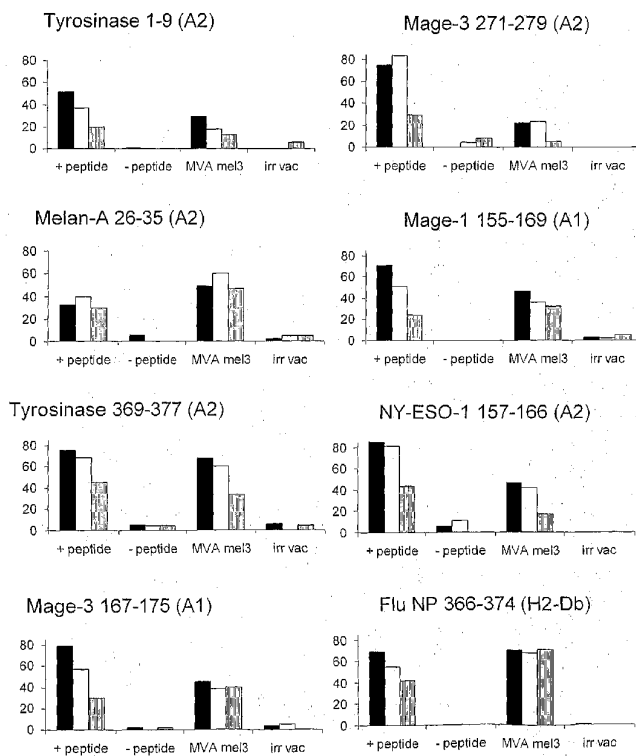
71

34. A chimeric multimeric MHC structure that is capable of detecting specific CTLs expanded following vaccination of an individual or test animal with one or more epitopes, wherein said multimeric MHC structure comprises two or more human MHC molecules held together in a single structure by a binding member, said MHC molecules containing an altered $\alpha 3$ domain representing a murine $\alpha 3$ domain
35. A chimeric multimeric MHC structure according to claim 34 wherein said altered $\alpha 3$ domain is a murine $\alpha 3$ domain.
36. A chimeric multimeric MHC structure according to claim 33 or claim 35 further complexed with peptides displaying the epitopes used in the vaccination.
37. A chimeric multimeric MHC structure according to any one of claims 4 to 36 having four human MHC molecules.
38. A chimeric multimeric MHC structure according to any one of claims 34 to 37 wherein the chimeric MHC molecules are fusion proteins comprising human $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains and a murine $\alpha 3$ domain.

WO 03/011331

PCT/GB02/03496

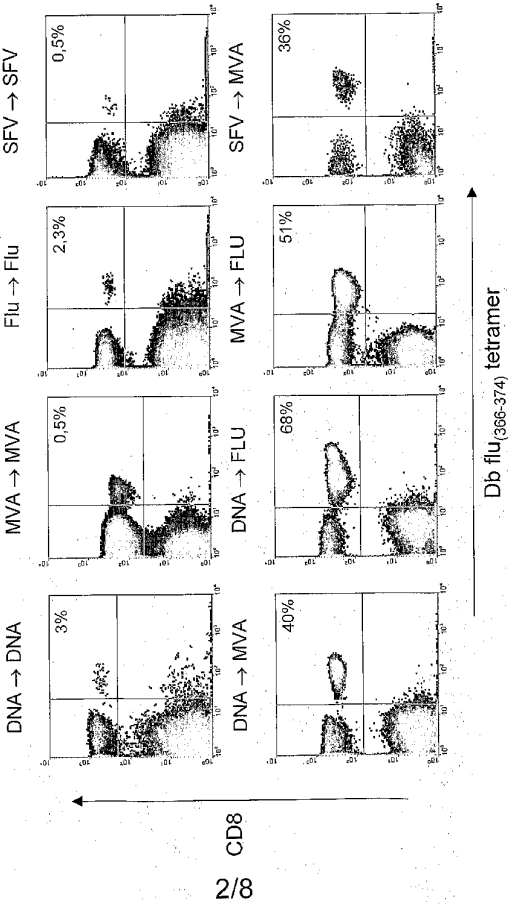
Figure 1



WO 03/011331

PCT/GB02/03496

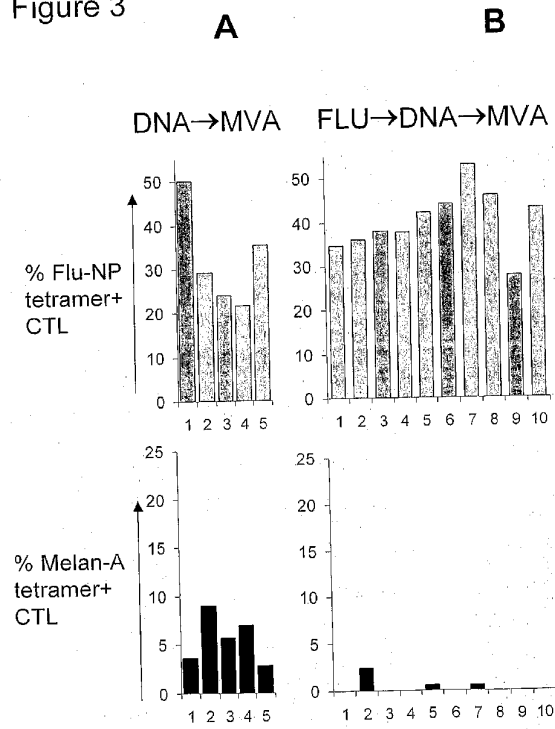
Figure 2



WO 03/011331

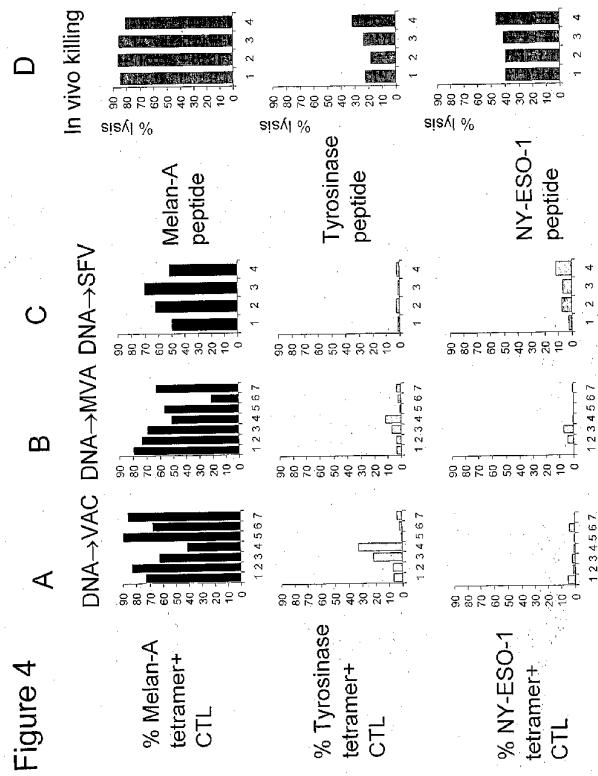
PCT/GB02/03496

Figure 3



WO 03/011331

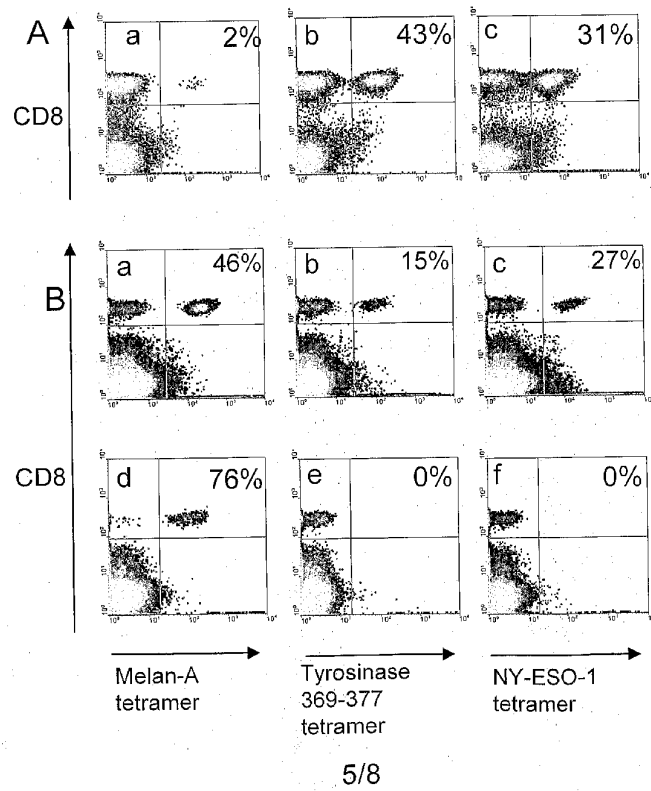
PCT/GB02/03496



WO 03/011331

PCT/GB02/03496

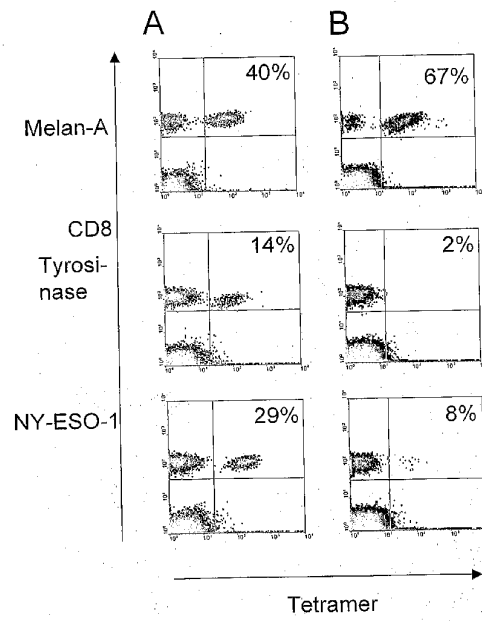
Figure 5



WO 03/011331

PCT/GB02/03496

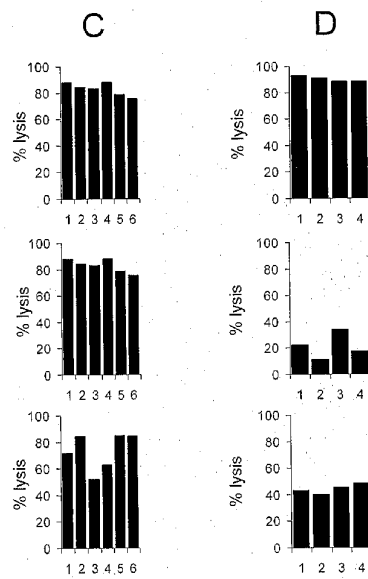
Figure 6A



WO 03/011331

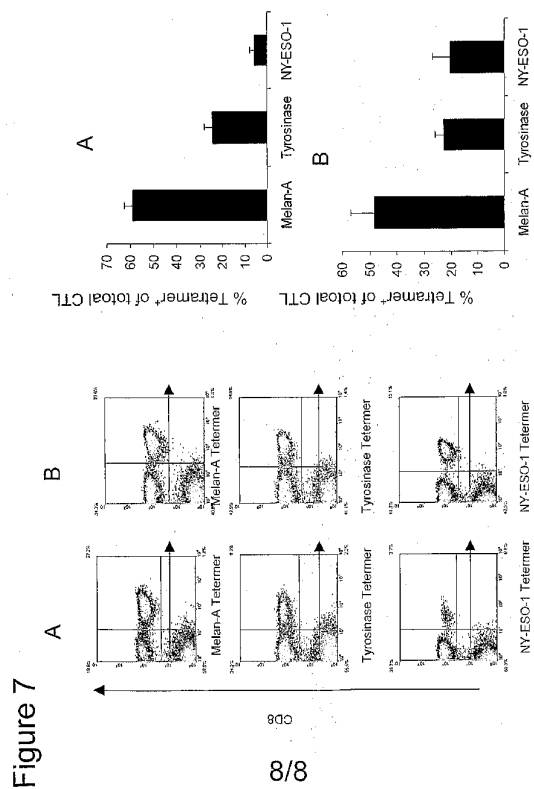
PCT/GB02/03496

Figure 6B



WO 03/011331

PCT/GB02/03496



A) MVA.mel3 prime DC pulsed with mixed peptides boost

B) MVA.mel3 prime DC pulsed with single peptides boost

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/011331 A3

(51) International Patent Classification: A61K 39/00, C07K 14/74 (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/GB02/03496

(22) International Filing Date: 30 July 2002 (30.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0118532.1 30 July 2001 (30.07.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): ISIS INNOVATION LIMITED [GB/GB], Ewert House, Ewert Place, Summertown, Oxford, Oxfordshire OX2 7SG (GB).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CERUNDOLO, Vincenzo [IT/GB], Nuffield Department of Medicine, Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, Oxfordshire OX3 9DS (GB). PALMOWSKI, Michael, J. [DU/GB], Nuffield Department of Medicine, Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, Oxfordshire OX3 9DS (GB). MAN-LIK CHOI, Edward [CN/GB], Nuffield Department of Medicine, Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, Oxfordshire OX3 9DS (GB).

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 25 September 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(74) Agents: CRIPPS, Joanna, E. et al.; Mewburn Ellis, York House, 23 Kingsway, London, Greater London WC2B 6HP (GB).

WO 03/011331 A3

(54) Title: MATERIALS AND METHODS RELATING TO IMPROVED VACCINATION STRATEGIES

(57) Abstract: The invention provides novel vaccination strategies based on a prime-boost vaccination regimen. The inventors have determined improved ways of boosting an immune response in a patient previously primed or exposed to a plurality of epitopes. The improved method requires the epitopes in the boosting phase to be administered individually, i.e. held on separate peptide constructs.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inten. Application No. PC/1/55 02/03496
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/00 C07K14/74		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation: to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHNEIDER J ET AL: "ENHANCED IMMUNOGENICITY FOR CD8+ T CELL INDUCTION AND COMPLETE PROTECTIVE EFFICACY OF MALARIA DNA VACCINATION BY BOOSTING WITH MODIFIED VACCINIA VIRUS ANKARA" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 397-402, XP000739989 ISSN: 1078-8956 the whole document --- -/-	1-38
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 June 2003		Date of mailing of the international search report 30/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 840-3010		Authorized officer: Moreau, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: application No
 PCT/JP 02/03496

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHNEIDER J ET AL: "INDUCTION OF CD8+ T CELLS USING HETEROLOGOUS PRIME-BOOST IMMUNISATION STRATEGIES" IMMUNOLOGICAL REVIEWS, MUNKSGAARD, XX, vol. 170, August 1999 (1999-08), pages 29-38, XP000981910 ISSN: 0105-2896 the whole document ----	1-38
A	HANKE T ET AL: "Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 16, no. 5, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 439-445, XP004106957 ISSN: 0264-410X the whole document ----	1-38
A	HANKE T ET AL: "Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 6, February 1999 (1999-02), pages 589-596, XP004153817 ISSN: 0264-410X the whole document ----	1-38
A	WO 01 21201 A (ISIS INNOVATION LIMITED) 29 March 2001 (2001-03-29) the whole document ----	1-38
A	WO 98 56919 A (ISIS INNOVATION LIMITED) 17 December 1998 (1998-12-17) the whole document ----	1-38
A	WO 00 40261 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 13 July 2000 (2000-07-13) the whole document ----	1-38
A	MATED L ET AL: "An HLA-A2 polypeptide vaccine for melanoma immunotherapy." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 OCT 1999, vol. 163, no. 7, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 4058-4063, XP002244411 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document -----	1-38

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int nal application No. T/GB 02/03496
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 17-33 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:		
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: application No
 PCT/JP 02/03496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO 0121201 A	29-03-2001	AU 7302400 A	24-04-2001
		BR 0014138 A	21-05-2002
		CA 2384806 A1	29-03-2001
		CN 1391609 T	15-01-2003
		EP 1214416 A2	19-06-2002
		WO 0121201 A2	29-03-2001
		JP 2003509470 T	11-03-2003
WO 9856919 A	17-12-1998	AT 230437 T	15-01-2003
		AU 737780 B2	30-08-2001
		AU 8026698 A	30-12-1998
		CN 1266459 T	13-09-2000
		DE 69810459 D1	06-02-2003
		DK 979284 T3	22-04-2003
		EP 0979284 A2	16-02-2000
		WO 9856919 A2	17-12-1998
		JP 2002506346 T	26-02-2002
WO 0040261 A	13-07-2000	AU 2720600 A	24-07-2000
		EP 1140162 A2	10-10-2001
		WO 0040261 A2	13-07-2000

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 セランドロ ヴィンセンツォ

イギリス国 オックスフォードシャー オックスフォード ジョン ラドクリフ ホスピタル イ
ンスティテュート オブ モルキュラー メディシン ナッフィールド デパートメント オブ
メディシン

(72)発明者 パルモウスキ マイケル ジェイ.

イギリス国 オックスフォードシャー オックスフォード ジョン ラドクリフ ホスピタル イ
ンスティテュート オブ モルキュラー メディシン ナッフィールド デパートメント オブ
メディシン

(72)発明者 マン・リック チョイ エドワード

イギリス国 オックスフォードシャー オックスフォード ジョン ラドクリフ ホスピタル イ
ンスティテュート オブ モルキュラー メディシン ナッフィールド デパートメント オブ
メディシン

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA04 BA01 BA07 BA51 BB11 CC01 EE03 EE06 FF19
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB63 CA04 CA16 DA02 DA20 DA32
MA66 NA14 ZB05 ZB26 ZB32
4H045 AA11 BA41 CA40 DA86 EA31