

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5707326号  
(P5707326)

(45) 発行日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)  
 A 6 1 K 39/00 (2006. 01)  
 A 6 1 K 39/39 (2006. 01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006. 01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02 Z N A  
 A 6 1 K 39/00 H  
 A 6 1 K 39/39  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 33 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-525283 (P2011-525283)  
 (86) (22) 出願日 平成21年9月1日 (2009. 9. 1)  
 (65) 公表番号 特表2012-501351 (P2012-501351A)  
 (43) 公表日 平成24年1月19日 (2012. 1. 19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/055608  
 (87) 国際公開番号 W02010/027973  
 (87) 国際公開日 平成22年3月11日 (2010. 3. 11)  
 審査請求日 平成24年8月31日 (2012. 8. 31)  
 (31) 優先権主張番号 61/169, 908  
 (32) 優先日 平成21年4月16日 (2009. 4. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/093, 606  
 (32) 優先日 平成20年9月2日 (2008. 9. 2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509255598  
 アンティジェン・エクスプレス・インコー  
 ポレーテッド  
 ANTIGEN EXPRESS, INC  
 .  
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O  
 1 6 0 5, ウォーセスター, イノベーション  
 ン ドライブ 1, フォース フロアー,  
 バイオテック スリー  
 (74) 代理人 100087941  
 弁理士 杉本 修司  
 (74) 代理人 100086793  
 弁理士 野田 雅士  
 (74) 代理人 100112829  
 弁理士 堤 健郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルス / I i - k e y のハイブリッドおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I i - k e y 部位および H P V 1 6 型 E 7 部位から本質的に構成されるハイブリッドペ  
 プチドを含む組成物であって、

前記 I i - k e y 部位は、L R M K (アミノ酸1~4) 残基 [ 配列番号 : 9 ] およびこれ  
 に連続する 0 ~ 1 2 個の残基から本質的に構成され、

前記 H P V 1 6 型 E 7 部位は、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 26 ) [ 配列番号 : 2 ]、H P V  
1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番号 : 3 ]、H P V 1 6 型 E 7 ( 9 ~ 22 ) [ 配列番号 : 2 0 ]  
 または H P V 1 6 型 E 7 ( 10 ~ 22 ) [ 配列番号 : 2 1 ] の連続するアミノ酸配列から本質  
 的に構成され、

前記 I i - k e y 部位と前記 H P V 1 6 型 E 7 部位とが、約 2 0 個以下のアミノ酸の長  
 さのスペーサーで接続され、I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドを  
 形成している、組成物。

【請求項 2】

請求項 1 において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番  
 号 : 3 ] である、組成物。

【請求項 3】

請求項 1 において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが、  
 H P V 2 [ 配列番号 : 4 ]、H P V 3 [ 配列番号 : 5 ] および H P V 4 [ 配列番号 : 6 ]  
 からなる群から選択されたものである、組成物。

## 【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが H P V 4 [ 配列番号： 6 ] である、組成物。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項において、前記ハイブリッドペプチドが、さらに、薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。

## 【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組成物。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項において、前記スペーサーがポリメチレンリンカー ( a v a ) である、組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載された I i - k e y 部位および H P V 1 6 型 E 7 部位から本質的に構成されるアミノ酸配列を含む組成物。

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載された I i - k e y 部位および H P V 1 6 型 E 7 部位から本質的に構成されるアミノ酸配列を含む組成物であって、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) ペプチド [ 配列番号： 3 ] である組成物。

## 【請求項 10】

I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドを含む免疫応答刺激剤であって、

前記ハイブリッドペプチドは、I i - k e y 部位および H P V 1 6 型 E 7 部位から本質的に構成され、

前記 I i - k e y 部位は、L R M K ( アミノ酸 1 ~ 4 ) 残基 [ 配列番号： 9 ] およびこれに連続する 0 ~ 1 2 個の残基から本質的に構成され、

前記 H P V 1 6 型 E 7 部位は、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 26 ) [ 配列番号： 2 ]、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番号： 3 ]、H P V 1 6 型 E 7 ( 9 ~ 22 ) [ 配列番号： 2 0 ] または H P V 1 6 型 E 7 ( 10 ~ 22 ) [ 配列番号： 2 1 ] の連続するアミノ酸配列から本質的に構成され、

前記 I i - k e y 部位と前記 H P V 1 6 型 E 7 部位とが、約 2 0 個以下のアミノ酸の長さのスペーサーで接続されている、免疫応答刺激剤。

## 【請求項 11】

請求項 10 において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番号： 3 ] である、免疫応答刺激剤。

## 【請求項 12】

請求項 10 において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが H P V 2 [ 配列番号： 4 ]、H P V 3 [ 配列番号： 5 ] および H P V 4 [ 配列番号： 6 ] からなる群から選択されたものである、免疫応答刺激剤。

## 【請求項 13】

請求項 10 から 1 2 のいずれか一項において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが H P V 4 [ 配列番号： 6 ] である、免疫応答刺激剤。

## 【請求項 14】

請求項 10 から 1 3 のいずれか一項において、前記組成物が、さらに、薬学的に許容可能な担体を有する、免疫応答刺激剤。

## 【請求項 15】

請求項 10 から 1 4 のいずれか一項において、前記スペーサーがポリメチレンリンカー ( a v a ) である、免疫応答刺激剤。

## 【請求項 16】

請求項 10 から 1 5 のいずれか一項において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 の

10

20

30

40

50

ハイブリッドペプチドが核酸によってコードされており、当該核酸が前記対象に投与される、免疫応答刺激剤。

【請求項 17】

免疫応答刺激剤であって、

請求項 1 に記載された I i - k e y 部位および H P V 16 型 E 7 部位から本質的に構成されるアミノ酸配列を含む組成物、または請求項 1 に記載された I i - k e y 部位および H P V 16 型 E 7 (8~22) [配列番号：3] から本質的に構成されるアミノ酸配列を含む組成物で構成された、免疫応答刺激剤。

【請求項 18】

対象内の H P V 病原体に対するワクチンの力価を増強させるキットであって、前記キットは、

a) H P V 16 型 E 7 (8~26) [配列番号：2]、H P V 16 型 E 7 (8~22) [配列番号：3]、H P V 16 型 E 7 (9~22) [配列番号：20] または H P V 16 型 E 7 (10~22) [配列番号：21] の連続するアミノ酸配列から本質的に構成される M H C I クラスエピトープを有するペプチドを含むワクチンと、

b) i) I i - k e y タンパク質の L R M K 残基および i i) 前記 a) ステップのワクチンと同じ、H P V 16 型 E 7 (8~26) [配列番号：2] の連続するアミノ酸 8 個以上の配列から本質的に構成される M H C クラス I I のエピトープ含有ペプチドを含む、I i - k e y ハイブリッド構築物とで構成され、前記キットは

c) 前記対象の免疫応答を刺激するのに適した条件下で、前記 b) ステップの I i - k e y 構築物を投与し、当該対象の免疫系を予備刺激するステップと、

d) 前記 c) ステップの免疫応答をブーストするのに適した条件下で、前記 a) のワクチンまたは前記 c) ステップのハイブリッドを投与することにより、前記予備刺激を行わない場合よりも免疫応答の力価を増強させるステップと、において用いられる

ワクチン力価増強キット。

【請求項 19】

請求項 18 において、前記 H P V エピトープ含有ペプチドが、H P V 16 型 E 7 のエピトープ含有ペプチドである、ワクチン力価増強キット。

【請求項 20】

請求項 19 において、前記 H P V 16 型 E 7 のエピトープ含有ペプチドが、H P V 16 型 E 7 (8~22) [配列番号：3] である、ワクチン力価増強キット。

【請求項 21】

請求項 18 または 19 において、前記 I i - k e y ハイブリッド構築物が、H P V 2 [配列番号：4]、H P V 3 [配列番号：5] および H P V 4 [配列番号：6] からなる群から選択されたものである、ワクチン力価増強キット。

【請求項 22】

請求項 18 から 21 のいずれか一項において、前記 I i - k e y ハイブリッド構築物が H P V 4 [配列番号：6] である、ワクチン力価増強キット。

【請求項 23】

請求項 18 から 22 のいずれか一項において、前記ワクチンまたは I i - k e y 構築物が、さらに、薬学的に許容可能な担体を有する、ワクチン力価増強キット。

【請求項 24】

請求項 18 から 23 のいずれか一項において、前記 I i - k e y タンパク質の L R M K 残基およびクラス I I のエピトープ含有ペプチドを結びつけるスペーサーがポリメチレンリンカー (a v a) である、ワクチン力価増強キット。

【請求項 25】

請求項 18 から 24 のいずれか一項において、前記 I i - k e y 構築物が核酸によってコードされており、当該核酸が前記対象に投与される、ワクチン力価増強キット。

【請求項 26】

請求項 18 から 25 のいずれか一項において、前記ワクチンが、前記 a) および前記 b)

) のペプチドをコードする DNA ワクチンであり、かつ、そのコドン使用頻度が前記対象のコドン選択性と合致するように最適化されている、ワクチン力価増強キット。

【請求項 27】

請求項 18 から 26 のいずれか一項において、前記 a) のエピトープと前記 b) の I i - k e y ハイブリッドが共免疫される、ワクチン力価増強キット。

【請求項 28】

請求項 18 から 27 のいずれか一項において、前記ワクチンが、さらに、MHC クラス I の CTL エピトープを含む、ワクチン力価増強キット。

【請求項 29】

標的の HPV に対する免疫応答を引き起こすための組成物であって、

薬学的に許容可能な担体に含まれた I i - k e y のハイブリッドペプチドを有し、

前記 I i - k e y のハイブリッドペプチドは、

a) I i - k e y タンパク質の L R M K 残基と、

b) HPV 16 型 E 7 (8~26) [配列番号: 2]、HPV 16 型 E 7 (8~22) [配列番号: 3]、HPV 16 型 E 7 (9~22) [配列番号: 20]または HPV 16 型 E 7 (10~22) [配列番号: 21] の連続するアミノ酸配列によってコードされる、MHC クラス I エピトープと、

を含む、組成物。

【請求項 30】

請求項 29 において、前記 MHC クラス I エピトープが HPV 16 型 E 7 (8~22) [配列番号: 3] によってコードされる、組成物。

【請求項 31】

請求項 30 において、前記 I i - K e y / HPV 16 型 E 7 のハイブリッドが、HPV 2 [配列番号: 4]、HPV 3 [配列番号: 5] および HPV 4 [配列番号: 6] からなる群から選択されたものである、組成物。

【請求項 32】

請求項 29 から 31 のいずれか一項において、前記ハイブリッドペプチドが HPV 4 [配列番号: 6] である、組成物。

【請求項 33】

請求項 29 から 32 のいずれか一項において、さらに、HPV 16 型および HPV 18 型の CTL エピトープからなる群から選択されたエピトープを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

子宮頸がんとは診断されるケースは毎年 470,000 にも及ぶ。子宮頸がんのほぼ 100% が高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV 16 型または HPV 18 型) に由来しており、これらのウイルスへの子宮頸部の持続感染が、子宮頸がんの必須原因であると考えられている (他種の肛門性器部のがんの 90% も HPV に由来する)。口腔がん、陰茎がんおよび一部の頸部がんについても、HPV 感染との関連性が疑われている。子宮頸がんなどの HPV 由来のがんの転移後に有効な治療は少なく、そのため、新たに効果的な治療法が早急に望まれている。

【0002】

HPV 感染の予防ワクチンは FDA (米国食品医薬品局) によって既に承認されている: ガーダシル (Gardasil) と呼ばれる、HPV 6 型、HPV 11 型、HPV 16 型および HPV 18 型の L1 タンパク質をターゲットとするウイルス様粒子は、女性の HPV 感染をほぼ 100% 予防する。この種のワクチンは、主に、ウイルスを中和する抗体を発生させる体液性免疫応答を誘導するものである。したがって、ガーダシルは、HPV 感染を予防するのに有効なワクチンである。しかしながら、この種のワクチンは、HPV 陽性がんの治療には有効でない。というのも、HPV 陽性がんを根治するには、CD4 陽性 T 細胞免疫および CD8 陽性 T 細胞免疫が誘導されなければならないからである。

## 【 0 0 0 3 】

蓄積されたデータによると、子宮頸がんおよび他種のＨＰＶ陽性がんに対しては、免疫療法が期待できることが分かっている。大半の子宮頸がんおよび他種のＨＰＶ陽性がんにおいてＨＰＶのＥ６遺伝子およびＥ７遺伝子の発現が見出されており、このことから、ＨＰＶ発がん蛋白Ｅ６，Ｅ７が、細胞形質転換の誘導および維持にとって重要な役割を担っていることが分かる。多くのＨＰＶ陽性癌での、これらの遺伝子の特異的な発現からみて、当該遺伝子が免疫療法の有力なターゲットであると予測される。

## 【 0 0 0 4 】

現在、数種類の治療ワクチンが研究されている：１）Ｅ６遺伝子および／またはＥ７遺伝子を含む組換えアデノウイルスなどのウイルスベクターベースのＤＮＡワクチン：このワクチンの利点は強力な免疫原だということである。短所は安全性およびコストである；２）プラスミドベースのＤＮＡワクチン：利点は、一般的に安全かつ製造コストが経済的だということである。しかし、インビボ（*in vivo*）でのトランスフェクション率が低いので免疫原性は弱い；３）ペプチドワクチン：利点は、極めて安全かつ経済的だということである。しかし、免疫原性が弱く、かつ、ＨＬＡ拘束性を有する；４）タンパク質ワクチン：安全面が大きな利点である。しかしながら、細胞の免疫誘導能が低い；５）樹状細胞（ＤＣ）ベースのワクチン：Ｅ７蛋白またはＥ６蛋白でパルスした自己樹状細胞の免疫原性は極めて強い。短所は、高コストな点と、接種ごとに必要とされる労働力が膨大な点である。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 5 】

以上の理由から、安全で効率のよい免疫療法が、ＨＰＶ陽性腫瘍の治療または予防に求められている。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 6 】

本明細書では、ＨＰＶ用のペプチドワクチンの効率を大幅に増強させる新規かつ非自明の方法も含め、本発明の実施形態を複数紹介する。本発明は、*I i - k e y* / ＨＰＶ（*I i* 鎖ＨＰＶ）のハイブリッドペプチドや当該ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組成物に関する。また、本発明は、本発明にかかる１種以上の化合物を対象に投与することによってＨＰＶ感染を予防する方法に関する。さらに、本発明は、ＨＰＶ感染が病因の少なくとも一部をなす疾患の治療に関する。このような疾患には、疣贅（またはイボ）や、子宮頸がん、陰茎がん、一部の頸部がんなどの前がん病変、がん病変などが含まれるが、これらに限定されない。本発明の他の構成において、本発明にかかるＨＰＶ配列を含む組成物は、ＨＰＶが病因の少なくとも一部をなす疾患の治療または予防のための、対象に対する予防接種やワクチン接種において有用である。

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、他の構成において、複数のＨＰＶ抗原のＭＨＣクラスⅡ提示エピトープを含むＤＮＡワクチンやペプチドワクチンの力価を増強させる方法に関する。本発明には、対象の免疫系を*I i - K e y* ハイブリッドペプチドで予備刺激し、後に投与されるＤＮＡワクチンまたはペプチドワクチンの力価を増強させることも包含される。*I i - K e y* ハイブリッド構築物は、*I i - K e y* のハイブリッドペプチドをコードする核酸構築物の形態で投与されてもよい。

## 【 0 0 0 8 】

例えば、*I i - K e y* / 抗原性エピトープハイブリッドの用途として、ワクチンプロトコルでのＨＰＶからの防御のための使用が挙げられるが、これに限定されない。ＨＰＶ由来の高度に保存されたＭＨＣクラスⅡエピトープと*I i - K e y* とで構成されたハイブリッドタンパク質を用いて、ナイーブＴヘルパー細胞を予備刺激しておくことにより、臨床試験を通過したか、または

*p r o b a b l e* な（候補に挙げられている）ＨＰＶ感染の予防・治療用のＨＰＶワクチンに対する免疫応答を増強させることができる。対象の免疫系

をこれらのハイブリッドペプチドで予備刺激しておいてから、DNAワクチンまたはタンパク質ワクチンで追加免疫することにより、ワクチンの投与数が少ない場合でも有効期間を延ばすことができる。あるいは、投与量を減少できるので、安全性が増強する。

#### 【0009】

本発明は、他の構成において、対象の免疫応答を予備刺激することによってDNAワクチンやペプチドワクチンの力価を増強させる組成物に関する。この組成物は、I i - K e y タンパク質の4つのアミノ酸残基(L R M K)とM H CクラスI I エピトープとで構成されるハイブリッドペプチドであり、前記M H CクラスI I エピトープは、H P V エピトープであると確実視されているか、その可能性があるものとする。

#### 【図面の簡単な説明】

10

#### 【0010】

【図1】H L A - D R 4 - t g (トランスジェニック)マウスに対して最も有効なH P V ハイブリッドを示すデータのグラフである。H L A - D R 4 トランスジェニックマウス(1グループあたり3匹)に対し、完全フロイントアジュバント(C F A)(マウスの全体積あたり100  $\mu$  l)に含有された60 nモルのペプチドで免疫化した。免疫化から3週間後、脾臓リンパ球を得て、インビトロ(i n v i t r o)でエピトープ単独のH P V 1、I i - K e y ハイブリッド(H P V 1 ~ H P V 6; ただし、図にはH P V 1(上図)およびH P V 4(下図)のみを示す)により刺激し、インターフェロン 分泌について、E L I S P O T アッセイ法を実施した。H P V 4で免疫されたマウスの脾臓におけるインターフェロン 分泌細胞の数は、H P V 1で免疫されたマウスの脾臓におけるインターフェロン 分泌細胞の数の約5倍超であった。再現試験(repeat study)でも同様の結果が得られた。

20

【図2】I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 エピトープの結合性ハイブリッドペプチドと、H P V 1 6 型 E 7 のエピトープを単独で含むペプチドとの比較を示すグラフである。100万個のH L A - D R 4 陽性H 9細胞を、H P V 1にH A タグを施したペプチドであるH P V 7 ( ) またはH P V 4にH A タグを施したペプチドであるH P V 1 7 ( ) と共に、図示の様々な濃度でインキュベートした。フローサイトメトリーによる解析後、ゲートにかかった細胞のパーセンテージ(百分率)を、ペプチド濃度に対してプロットした。なお、ペプチド処理に曝されなかった細胞の約98%が外れるよう、ゲーティングの設定をした。

30

【図3】H P V 4の投与量に依存する、M H CクラスI エピトープに対する細胞傷害性T細胞(C T L)の活性の増強を示すグラフである。H L A - D R 4 トランスジェニックマウスを、(A)ペプチドなし; (B)60 nモルのH P V 1 1 (H P V 1 6 型 E 7 (49~57)すなわちH - 2 D<sup>b</sup>拘束性のC T L エピトープ); (C)60 nモルのH P V 1 1 と15 nモルのH P V 4 ハイブリッド; (D)60 nモルのH P V 1 1 と30 nモルのH P V 4 ハイブリッド; または(E)60 nモルのH P V 1 1 と60 nモルのH P V 4 ハイブリッドで免疫化した。いずれのペプチドも、20  $\mu$  gのC p G (シトシン - リン酸 - グアニン)(マウス1匹あたり全体積150  $\mu$  l)と混合した後、不完全フロイントアジュバントで乳化させた。免疫化から3週間後、H P V 1 1 に特異的なC T L 活性を、免疫原性ペプチド(H P V 1 1)と高濃度のC F S E (カルボキシフルオレセインジアセテート)、または低濃度のC F S E 単独(ペプチドなし)と共にインキュベートされた細胞を用いて、インビボ(i n v i v o)アッセイ法で測定した。等しい個数からなるこれら二種類の細胞集団の混合物を同数用意し、マウスに尾静脈注射した。上図は、H P V 1 1 に特異的なC T L 殺傷を、フローサイトメトリーによる式:  $(1 - C F S E^{low} / C F S E^{high})$ を用いて、 $C F S E^{low} / C F S E^{high}$ の細胞比で表したものである。下図は、各グループのヒストグラムを示したものである。図示のデータは、脾臓細胞のプールから得たものである(1グループあたりマウス2匹)。

40

【図4】I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 エピトープのハイブリッドであるH P V 4と、エピトープ単独を含むペプチドであるH P V 1との間の、インビボ(i n v i v o)での特異的なC T L 活性を支援する能力の比較を示すグラフである。H L A - D R 4 トラン

50

スジェニックマウスを、(A) ペプチドなし；(B) 60 nモルのHPV 11 (HPV 16型E7 (49~57) すなわちH-2D<sup>b</sup>拘束性のCTLエピトープ)；(C) 30 nモルのHPV 1と60 nモルのHPV 11；または(D) 30 nモルのHPV 4と60 nモルのHPV 11で免疫した。いずれのペプチドも、図3と同様の条件で投与した。免疫化から3週間後、HPV 11に特異的なCTL活性を、インビボ(in vivo)アッセイ法で測定した(図3を参照)。図示のデータは、プールされた脾臓細胞(グループAは3匹のマウス、グループB、CおよびDはそれぞれ4匹のマウス)から得たものである。上図は、HPV 11に特異的なCTL殺傷を、フローサイトメトリーによる式： $(1 - CFSE^{low} / CFSE^{high})$ を用いて、 $CFSE^{low}$ の $CFSE^{high}$ に対する細胞比で表したものである。下図は、各グループのヒストグラムを示したものである。

10

【発明を実施するための形態】

【0011】

本明細書に開示された、ハイブリッドペプチドを含む組成物およびその使用方法は、従来のペプチドワクチンおよび免疫賦活剤の短所を改善するものである。本発明にかかるハイブリッドペプチドのワクチンは、HPVエピトープ、Ii-keyペプチド(またはIi-keyペプチドの一部または改変物)、およびスペーサーを含む。以降、これをIi-Key/MHCクラスIIのハイブリッド構築物やIi-Key/MHCクラスIIのハイブリッドペプチドと称することがある。本発明にかかる組成物および方法は、Ii-Keyタンパク質とMHCクラスII分子との相互作用を利用することで、通常の抗原プロセッシングの経路をバイパスし、MHCクラスII分子結合溝へのHPVの抗原性エピトープの結合を促進させる。その後、抗原が免疫系に提示されることで、CD4陽性T細胞の特異的応答が刺激される。Ii-Key/MHCクラスIIのハイブリッドにより、免疫応答を刺激する力価が増強されるため、低効率のプロセスも許容可能となり、免疫系刺激剤を使用しなくても済む可能性が高まる。

20

【0012】

すなわち、本明細書には、ヒトのHPV感染、およびHPVの存在によって特徴付けられる関連疾患および/または関連がんを治療する組成物ならびに方法が開示されている。また、本明細書には、HPV感染を予防する組成物および方法が開示されている。技術分野の欄で述べたように、HPV感染が病因の少なくとも一部をなすと考えられているかまたはそうであることが確実とされているがんの種類には、子宮頸がん、陰茎がんなどが含まれる。HPV感染が関係する他の疾患には、例えば、疣贅などが含まれる。本発明にかかる方法は、例えば、薬学的に許容可能な担体に含まれたIi-Key/MHCクラスIIのハイブリッド構築物を用意すること、および免疫応答を刺激するのに適した条件下でそのハイブリッド構築物を患者にワクチン接種することを含む。このハイブリッド構築物は、Ii-Keyのハイブリッドペプチドとして投与されてもよいし、Ii-Keyのハイブリッドペプチドをコードする核酸の形態で投与されてもよい。

30

【0013】

Ii-Key/MHCクラスIIのハイブリッドペプチドは、Iiタンパク質のLRMK(および/またはその改変物；YRMK)のアミノ酸残基を含んでおり、当該アミノ酸残基は、HPVの断片を含むMHCクラスIIエピトープのN末端に直接または間接的に結合されている。Ii-keyの残基とHPVエピトープとの間(スペース)は、約2~20個のアミノ酸残基の長さに対応する範囲内の距離で離れているのが望ましいが、必ずしもそうである必要はない。このスペースには、様々なリンカー(またはスペーサー)が含まれてよく、そのようなリンカー(またはスペーサー)には、単純なポリメチレンリンカー(av a)、LRMKのC末端から伸長するIiの天然由来の配列や、HPVエピトープのN末端から伸長する当該HPVの天然由来の配列が含まれる。好適なリンカーの他の例およびIi-keyのハイブリッドペプチドの他の様々な実施形態は、2007年2月20日付発行の米国特許第7,179,645号明細書および2007年4月17日付発行の米国特許第7,205,274号明細書に記載されており、これらの米国特許の内容は参照をもって本願に取り入れたものとする。上記の方法により、CD4陽性T細胞の応答を刺激することができる。な

40

50

お、ハイブリッド構築物は、I i - K e y / H P V のハイブリッドペプチドをコードする核酸の形態で投与されてもよい。前述した選択肢の内容をより明らかにするには、本発明にかかる I i - k e y のハイブリッドペプチドについて詳細に説明する必要がある。

【 0 0 1 4 】

( リンカー )

【 0 0 1 5 】

本発明にかかるリンカー（またはスペーサー）は、ハイブリッドのN末端とC末端とを共有結合で結ぶ介在的化学構造であり、直線または略直線的に並べられると最大20個のアミノ酸の長さまで伸張する、共有結合原子群の可撓性の鎖である。つまり、本発明にかかるリンカーは、その配列にアミノ酸など（必ずしもアミノ酸でなくてもよい）が含まれる範囲に応じて、リンカーのアミノ酸残基に対して、スペースを占有する役割以上の付加的な機能性（functionality）をもたらす。

【 0 0 1 6 】

上述のリンカーの長さ（直線で最大20個のアミノ酸の長さ）は、第2の（さらなる）完全なエピトープ、例えば、完全なMHCクラスIIエピトープ、完全なMHCクラスIエピトープ、または完全なARD（抗体認識部位または抗原決定基）（antibody-recognized determinant）を含むのに十分な長さである。あるいは、これらのエピトープの一部を含むのに十分な長さである。また、上述のリンカーの長さは、MHCクラスIエピトープ、MHCクラスIIエピトープおよびARDからなる群から選択される複数のエピトープを互いに重複せずに含むことができる。

【 0 0 1 7 】

上記の介在的化学構造が1つ以上のエピトープ／抗原決定基を含む場合、その全体の長さは、所定の範囲内には落ち着くものの、当該エピトープ／抗原決定基が何であるかによって大きく影響される。上記の介在的化学構造が抗原としてニュートラル（実質的に抗体を生じさせないという意味）である場合については、米国特許出願第09/396,813号（現在の米国特許第6,432,409号）明細書を参照されたい。同文献の全内容は、参照をもって本明細書に取り入れたものとする。同文献に記載されているように、例えば、抗原としてニュートラルであるスペーサーは、直線で9個よりも短いアミノ酸長の主鎖ペプチドであるのが好ましい。最も好適なのは、スペーサーが、直線で4～6個のアミノ酸長の主鎖ペプチドである場合である。好ましくは、スペーサーは、ハイブリッドペプチドを増強させる他の構成成分に対して、空間的（立体的）に顕著な変化を伴う水素結合を形成しないものである。

【 0 0 1 8 】

抗原としてニュートラルなスペーサーのスペーサー領域には、アミノ酸の代わりに様々な種類の化学基が含まれていてもよい。その例は、米国特許第5,910,300号明細書に記載されており、その内容は、参照をもって本明細書に取り入れたものとする。好ましい一実施形態において、スペーサーは、ヘテロ原子が適度に介在した脂肪族鎖で構成されており、例えば、 $C_2 \sim C_6$ アルキレン、すなわち、 $=N-(CH_2)_2 \sim 6-N=$ などが挙げられる。あるいは、スペーサーは、疎水性配列、親油性配列、脂肪族配列、芳香族-脂肪族配列などの単位が交互に並び、O、N、Sなどのヘテロ原子が適度に介在したものである。このようなスペーサーの好ましい構成成分は、以下の種類の化合物から選択される：ステロール類、アルキルアルコール類、様々なアルキル基を有するポリグリセリド、アルキル-フェノール類、アルキル-アミン類、アミド類、疎水性ポリオキシアルキレンなど。他の例として、疎水性ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリヒドロキシ酸、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸などが挙げられる。スペーサーは、酸素原子によって互いに隔てられた、短い脂肪族鎖の繰り返し単位、例えば、プロピレン、イソプロピレン、ブチレン、イソブチレン、ペンタメチレンなどを含むものであってもよい。また、リンカーは、例えば、メチレン基（ $-CH_2-$ ）の繰り返し単位で構成されたものであってもよい。

【 0 0 1 9 】

また、スパーサー中に使用可能なペプチド配列は、米国特許第5,856,456号に記載されている。この米国特許の内容は、参照をもって本明細書に取り入れたものとする。一実施形態において、スパーサーは、内部で切断される化学基を含む。このような化学基は、プロテアーゼ、所定の化学基、または触媒活性を有するモノクローナル抗体によって、切断が触媒されるものであってもよいが、必ずしもこれらに限定されない。プロテアーゼ感受性を有する化学基の場合、トリプシントarget (カチオン性の側鎖を有する2種類のアミノ酸)、キモトリプシントarget (疎水性の側鎖を有するアミノ酸)、およびカテプシン (B、DまたはS) に感受性を示すものが好適である。本明細書において「トリプシントarget」とは、トリプシンやトリプシン様酵素によって認識されるアミノ酸配列を指す。本明細書において「キモトリプシントarget」とは、キモトリプシンやキモトリプシン様酵素によって認識されるアミノ酸配列を指す。また、触媒活性を有するモノクローナル抗体の化学的targetや化学的に切断可能なその他の化学基は、ペプチド合成、酵素触媒、および有機化学一般の分野における当業者にとって周知であり、通常の実験的方法を用いて合成したり、ハイブリッド構造体に組み込んだりすることができる。

#### 【0020】

ただし、本発明の全ての実施形態に、免疫原性がニュートラルである介在的化学構造またはスパーサーが含まれるわけではないことに留意されたい。すなわち、本発明には、前記介在的化学構造またはスパーサーが：1) MHCクラスIエピトープまたはその一部；および2) 抗体認識決定基またはその一部；からなる群から選択される実施形態も含まれる。

#### 【0021】

本発明にかかる *I i - k e y* のハイブリッドでは、全体的にペプチド様の性質を有するものから、実質的に非ペプチドの性質の部分を含むものまで、様々なスパーサーを含んでもよい。ホモログの中には、ペプチド様の性質を著しく低下させたものまたは実質的に非ペプチド性のものがあることを考えると、このようなホモログは、好適な特性、例えば、細胞膜内への侵入、可溶性、耐タンパク質分解性、抱合による不活性化に対する耐性、経口バイオアベイラビリティ、長いインビボ (*i n v i v o*) での半減期などを有する傾向が強い。

#### 【0022】

好適なスパーサーは、1つ以上の単純なポリメチレンリンカー (*a v a*) を有する。

#### 【0023】

幾つかの理由から、出来るだけ短い配列 (または長さ) が好ましい。そのような理由には、合成の単純性、合成コスト、タンパク質分解可能性の低さ、クリアランスや吸着につながる代謝変化可能性の低さなどが含まれる。よって、リンカーは、複数のエピトープが互いに重複するものであってもよい (すなわち、あるアミノ酸残基が、複数のエピトープの一構成成分であってもよい)。同様に、本発明にかかるHPVペプチドが含まれたC末端領域に、複数のエピトープ (MHCクラスI、MHCクラスIIまたはARD) が、互いに重複してまたは互いに重複せずに含まれていてもよい。

#### 【0024】

本発明にかかる *I i - k e y* のハイブリッドペプチド内の各種構成領域間の境界は、所定の範囲内に収まるものの、やや曖昧である。各種構成領域間の接合部をまたいで延在するエピトープも、本発明の範囲に包含される。つまり、例えば、あるエピトープの一部が、増強を達成するハイブリッドペプチド内の複数の構成要素またはドメイン (例えば、リンカー領域) のうちの1つに含まれている、と請求項に記載されている場合、これは当然、そのエピトープの残りの部分が、隣接するフランキング部位またはフランキング領域に含まれていることを意味している。パーシャル (*partial*) エピトープ (すなわち、非機能性 (*non-functional*) のエピトープ) に関しては、本発明では、スペースを占有する役割以外に有用性はないだろう。

#### 【0025】

機能性を備えた (*functional*) MHCクラスIエピトープ、MHCクラスIIエピトープ

プおよびA R Dは、互いに重複していても、それぞれの提示エピトープの完全な機能性 (functionality) を維持していることが知られている。ただし、ハイブリッド内の各エピトープの機能 (function) は、同一のペプチドにおいて同時に発現することはできない。というのも、ペプチドは、M H CクラスI 分子またはM H CクラスII 分子に結合しており、折り畳み構造の状態、抗体による認識を受けるからである。しかしながら、投与 (例えば、注射) されるペプチドの一群に、それぞれのペプチドをプロセッシングするM H C分子および/またはそれぞれのペプチドと細胞表面で結合するM H C分子が与えられた場合、促進性I i - K e yのハイブリッドペプチド内の三種類のいずれのエピトープも、免疫された動物内において効果的な抗原となることができる。

【0026】

(I i - K e y ペプチド)

【0027】

この分野での初期の研究では、哺乳類のI i - k e y ペプチド: L R M K L P K P P K P V S K M R (配列番号: 9) およびその改変物: Y R M K L P K P P K P V S K M R (配列番号: 10) に、M H CクラスII 拘束性の幾つかの抗原性ペプチドの、当該抗原性ペプチドを認識するT細胞ハイブリドーマへの提示に変化を引き起こす能力があることを証明した (米国特許第5,559,028号明細書; 米国特許第5,919,639号明細書; これら米国特許の開示内容は、参照をもって本明細書に取り入れたものとする)。I i - k e yのペプチドの改変バージョンを用いた過去の実験によると、I i - k e y ポリペプチドに対し、その活性に悪影響を及ぼすことなく様々な変更または改変が可能であることが分かっている。事実、そのような変更または改変により、当該ポリペプチドの抗原提示能が増強した事例が多く存在する。

【0028】

米国特許出願第09/396,813号 (現在の米国特許第6,432,409号) 明細書 (その内容は、参照をもって本願に取り入れたものとする) の実施例に詳述された結果は、I i - k e y ペプチドの、抗原提示促進活性を有するどのような改変物も、適切に組み込まれると本発明のハイブリッドペプチドの促進性に関して適切に機能することを示唆している。I i - k e y ペプチドの改変には、C末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失、N末端の保護、アミノ酸の置換や、環状ペプチドの挿入などが含まれる。I i - k e yのペプチドの欠失物であっても、少なくとも元来の配列からの4つの連続するアミノ酸 (L R M K) またはその置換バージョン (Y R M K) が残っていれば、機能活性 (functional activity) を示す。また、各残基部は、様々な天然由来または非天然由来のアミノ酸で置換されていてもよい。置換に使用可能な分子の例として、ペプチド模倣構造体、D - 異性体アミノ酸、N - メチル化アミノ酸、L - 異性体アミノ酸、修飾L - 異性体アミノ酸、環誘導体などが含まれる。また、創薬化学の当業者であれば、当該技術分野の技法を通常の実験法で適用することにより、ハイブリッドのN末端領域の他の改変物を得ることができる。このような技法の例として、合理的ドラッグデザイン、X線回折データや核磁気共鳴データ (およびその他の算出法 (computational methods)) からの構造的情報に基づく分子モデリング、コンビナトリアル化学合成生成物のスクリーニング、天然物の単離などが挙げられる。I i - k e y ペプチドにおいて、高い抗原提示促進活性を有することが知られている改変バージョンの例として、L R M K (配列番号: 11)、L R M K L P K (配列番号: 15)、L R M K L P K S (配列番号: 16)、L R M K L P K S A K P (配列番号17)、L R M K L P K S A K P V S K (配列番号: 18) などが挙げられる。I i - k e y ペプチドの他の改変物および改変バージョンは、米国特許第5,919,639号明細書および米国特許第5,559,028号明細書 (これら米国特許の全内容は、参照をもって本明細書に取り入れたものとする) に記載されている。I i - k e y ペプチドの、抗原提示促進活性があることが知られている改変バージョン (Y R M K L P K P P K P V S K M R (配列番号: 10)) は、以降、「I i - k e y のホモログ」と称する。本明細書において「I i - k e y のホモログ」という用語は、I i - k e y ペプチド自体も包含する。

【0029】

10

20

30

40

50

これらのような I i - K e y ペプチドは、M H C クラス I I 分子の抗原性ペプチド結合部位の端部に位置するアロステリック部位に結合することが、幾つかの実験法で証明されている (Xu, M., Arneimittelforschung. 1999 49:791 9を参照)。このアロステリック部位に対する結合プロセスにより、細胞表面の M H C クラス I I 分子への、内因性結合抗原性ペプチドの放出および交換が促進される。

#### 【 0 0 3 0 】

I i - K e y ペプチドのホモログは、マウスまたはヒトの M H C クラス I I 分子に作用することで、結合状態の抗原性ペプチドの放出、およびこの抗原性ペプチドと合成ペプチドとの交換を促進する (Adams, S., Arneimittelforschung. 1997 47:1069 1077; Xu, M., Arneimittelforschung. 1999 49:791 9を参照)。単純なポリメチレンリンカーまたは I i タンパク質の天然由来の配列の伸長物を介して抗原性エピトープペプチドに結合した I i - K e y ペプチドのハイブリッド構築物は、抗原性ペプチド単独と比べて、5 0 0 ~ 2 0 0 0 倍の提示能力を有する (Humphreys, R. E., Vaccine. 2000 18:2693 2697を参照)。この特性は、本明細書で述べるように、様々な疾患および健康状態の診断、治療モニタリングおよび治療にとって臨床的に有用である。I i - K e y / 抗原性エピトープのハイブリッドにおける I i - K e y 部位の活性は、インビトロ ( i n v i t r o ) でもインビボ ( i n v i v o ) でも見受けられる。この活性は、細胞表面の M H C クラス I I 分子と当該 I i - K e y 部位との相互作用に起因するものと考えられる。というのも、I i - K e y 化合物のインビトロ ( i n v i t r o ) での活性が、生きた抗原提示細胞およびパラホルムアルデヒド固定された抗原提示細胞のいずれにも見受けられるからである (Adams, S., Eur J. Immunol. 1995 25: 1693 1702)。ただし、この化合物はインビボ ( i n v i v o ) では有効 ( p o t e n t ) とされているので、外来抗原を処理する経路に取り込まれることにより、ポストゴルジすなわち抗原をチャージする区画 ( a n t i g e n c h a r g i n g c o m p a r t m e n t ) で M H C クラス I I 分子と結合する可能性がある。

#### 【 0 0 3 1 】

( H P V エピトープ )

#### 【 0 0 3 2 】

本発明は、特定の H P V エピトープや H P V エピトープ含有ペプチドに限定されないが、本発明にかかる H P V エピトープの例 ( それ単独で有用、またはエピトープ含有ペプチドの形態で有用なもの ) には、ペプチド : m h g d t p t l h e y m l d l q p e t t d l y c y e q l n d ( 配列番号 : 1 ) 内の、M H C クラス I I エピトープである H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 26 ) ( 配列番号 : 2 )、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) ( 配列番号 : 3 )、H P V 1 6 型 E 7 ( 9 ~ 22 ) ( 配列番号 : 2 0 )、H P V 1 6 型 E 7 ( 10 ~ 22 ) ( 配列番号 : 2 1 )、H P V 1 6 型 E 7 ( 11 ~ 22 ) ( 配列番号 : 2 2 )、H P V 1 6 型 E 7 ( 11 ~ 20 ) ( 配列番号 : 2 3 ) などが含まれる。また、本発明は、H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドに限定されない。本発明の他の構成では、M H C クラス I エピトープおよび M H C クラス I I エピトープである、H P V 1 6 型の他のエピトープ、および H P V 1 8 型のエピトープも使用可能である。本発明のさらに他の構成では、本発明にかかるワクチンおよび / または I i - k e y のハイブリッドに H P V 1 6 型のエピトープおよび H P V 1 8 型のエピトープの一方または両方が使用可能であり、また、これらのエピトープは同時投与または併用投与されてもよい。

#### 【 0 0 3 3 】

本発明にかかる方法は、I i - K e y / H P V のハイブリッド構築物を患者にワクチン接種することを含み、これにより、特定の H P V エピトープに特異的な C D 4 陽性 T 細胞応答が引き起こされたり増強したりする。後述の実施例に示す E L I S P O T アッセイ法の結果から分かるように、ネイティブな H P V ペプチドに比べて、本発明の H P V ペプチドに対する C D 4 陽性 T 細胞応答が増強している。また、ワクチンは、M H C クラス I エピトープを含み、任意で、M H C クラス I I エピトープを含むものであってもよい。

#### 【 0 0 3 4 】

一実施形態において、本発明は、ペプチド : m h g d t p t l h e y m l d l q p e t

t d l y c y e q l n d ( 配列番号 : 1 ) 内の、M H C クラス I I エピトープの形態の H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 26 ) ( 配列番号 : 2 )、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) ( 配列番号 : 3 )、またはその他のエピトープを含む化合物を、患者にワクチン接種もしくは投与すること、またはこの化合物と同一のアミノ酸配列をコードする D N A もしくは R N A を患者にワクチン接種することを含む。なお、ここで、化合物は、I i - k e y ハイブリッドでない。一般的に、このアミノ酸配列をコードする D N A もしくは R N A は、効率的な D N A の転写および / または R N A の翻訳を行うのに必要な、当業者にとって既知のプロモーター、イニシエーターなどと作用可能に連結 ( リンク ) されていてもよい。例えば、Sambrook 達による HYPERLINK "http://www.MolecularCloning.com" www.MolecularCloning.com を参照されたい。同様に、本発明にかかる I i - k e y / H P V のハイブリッドは、当該ハイブリッドをコードする D N A または R N A として投与されるものであってもよく、かつ、当該 D N A または R N A は、一般的に、必要なプロモーター、イニシエーターなどに作用可能に連結 ( リンク ) されていてもよい。

10

#### 【 0 0 3 5 】

( I i - K e y / H P V のハイブリッドおよびその使用 )

本発明にかかる方法は、M H C クラス I I エピトープが H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 26 ) ( 配列番号 : 2 ) および / または H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) ( 配列番号 : 3 ) である、I i - K e y / M H C クラス I I のハイブリッド構築物を含む化合物を、患者にワクチン接種または投与することを含む。

#### 【 0 0 3 6 】

20

他の実施形態において、本発明は、H P V 感染の治療もしくは予防、および / または H P V 感染によって引き起こされたかまたは H P V 感染によって悪化した疾患の治療もしくは予防に用いられる、M H C クラス I I エピトープ ( 配列番号 : 2 および / または配列番号 : 3 ) を含むハイブリッド構築物、または薬学的に許容可能な担体に含まれた前記 I i - K e y / M H C クラス I I のハイブリッド構築物を有する医薬組成物を提供する。この I i - K e y / M H C クラス I I のハイブリッド構築物は、配列番号 : 2 または配列番号 : 3 の M H C クラス I I エピトープの N 末端に連結された I i タンパク質の L R M K 残基を含む。L R M K 残基と M H C クラス I I エピトープとの間 ( スペース ) は、約 2 ~ 2 0 個のアミノ酸残基の長さに対応する距離で離れているのが望ましい。このスペースには、様々なリンカーが含まれてもよく、そのようなリンカーには、単純なポリメチレンリンカー ( a v a )、I i の L R M K の C 末端から伸長した天然由来の配列や、M H C クラス I I エピトープの N 末端から延びる、H P V の天然由来の配列が含まれる。前記 I i - K e y / M H C クラス I I のハイブリッド構築物は、同一のハイブリッドペプチドをコードする D N A も含んでいてもよい。詳細には、本発明は、ハイブリッド構築物の M H C クラス I I エピトープがペプチド : m h g d t p t l h e y m l d l q p e t t d l y c y e q l n d ( 配列番号 : 1 ) に含まれるものである組成物も包含する。本発明にかかる組成物は、後述の表 2 に示された任意の配列を有するアミノ酸配列またはそれをコードする D N A を有するハイブリッド構築物を含む。後述の実施例での E L I S P O T 法の結果によると、I i - K e y / H P V のハイブリッド構築物をワクチン接種されたマウス被験体 ( 対象 ) では、ネイティブな H P V ペプチドに比べて、C D 4 陽性 T 細胞応答が増強する。

30

40

#### 【 0 0 3 7 】

本発明にかかる抗原提示能力が増強しているハイブリッドの生成に使用するために選択された上記のようなエピトープ / 抗原決定基は、さらに改変されてもよい。すなわち、本明細書に開示された、増強ハイブリッドのエピトープ / 抗原決定基は、天然ポリペプチド、その配列の改変物、ペプチド模倣構造体、および非天然由来のアミノ酸またはアミノ酸の改変物である化学構造を含んでもよい。また、増強ハイブリッドの抗原性エピトープ / 抗原決定基に対し、様々な化学的な改変または変更を施してもよい。例えば、抗原性エピトープ / 抗原決定基の結合特異性が維持される範囲で、非天然由来のアミノ酸の全体もしくは一部、または他の主鎖部位もしくは側鎖部位を組み込んでよい。このような化学構造は、天然由来のタンパク質配列から導き出された抗原性ペプチドに比べて構造的類似性

50

を少ししか持たないか、ほぼ持たないか、または全く持たない。また、このような改変または変更は、T細胞受容体による認識に影響を及ぼさない。改変または変更によっては、抗原性エピトープの認識を増強させる可能性も考えられる（例えば、改変または変更前は認識を行わなかったT細胞受容体のサブセットが、認識を行うようになる可能性がある）。

#### 【0038】

本発明は、さらに、HPV感染の治療もしくは予防、および/またはHPV感染によって引き起こされたかまたはHPV感染によって悪化した疾患の治療もしくは予防に用いられる、アジュバントと、MHCクラスIIエピトープまたはI i - K e y / MHCクラスIIのハイブリッド構築物とを有し、薬学的に許容可能な担体に含まれた医薬組成物を提供10する。このI i - K e y / MHCクラスIIのハイブリッド構築物は、HPVの断片を含むMHCクラスIIエピトープのN末端に連結された、I i - K e y タンパク質のLRMK残基を含む。前記構築物は、これと同一のハイブリッドペプチドをコードするDNAを含むものであってもよい。この組成物は、アジュバントGM-CSF（顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子）を含むものであってもよいが、これに限定されない。

#### 【0039】

CD4陽性Tヘルパー細胞は、CD8陽性細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の活性化および維持に重要な役割を担っている。そのため、抗原特異的なCD4陽性T細胞の活性化は、ワクチンデザインにとって重要である。HPV陽性がんの効果的な治療ワクチンは、安全で経済的に製造でき、かつ、効率的であるのが望ましいが、ペプチドワクチンの場合、安全で経済的に製造可能である。本発明の一実施形態は、ペプチドワクチンの効率を大20幅に増強させる新規的かつ進歩的な技術に関する。I i - K e y の機能基（functional group）であるLRMKをポリメチレンリンカーを介してMHCクラスIIエピトープにリンクすることにより、実施例の双方のマウスモデルにおいて、そのエピトープに対するCD4陽性T細胞応答の大幅な増強が達成され、かつ、臨床試験においても同様の活性が見受けられた。

#### 【0040】

後述の実施例では、I i - K e y のハイブリッド技術を用いて、HPV陽性がんの効果的なペプチド免疫療法を実現した。すなわち、HLA-DR拘束性の有効なHPV16型のE7エピトープ：HPV16型（8~22）を決定した。HPV16型E7（8~22）につ30いて、I i - K e y / HPV16型E7（8~22）のハイブリッドのホモログシリーズ（複数のホモログ）を合成し、スパーサーの長さが、HPV16型のE7（8~22）に特異的なCD4陽性Tリンパ球の応答に与える影響を試験した。HLA-DR4トランスジェニックマウスを、完全フロイントアジュバント（CFA）中に含まれている状態で、I i - K e y / HPV16型E7（8~22）のハイブリッド、HPV16型E7（8~22）エピトープのみを含んだペプチド（HLA-A2拘束性のCTLEピトープ）、およびHPV16型E7（11-20）エピトープのみを含んだペプチド（HLA-A2拘束性のCTLEピトープ）で免疫化した。IFN-（インターフェロン-ガンマ）ELISPOTアッセイ法で測定したところ、I i - K e y のハイブリッドは、EPV16型E7（8~22）エピトープのみを含んだペプチドに比べて、HLA-DR4モデル系におけるCD440陽性T細胞活性が5倍増強した。したがって、I i - K e y のハイブリッドは、子宮頸がんやHPV感染に関連する他の種類のがんも含め、HPV16型陽性がんに対する、安全、シンプルかつ効果的なHPVペプチド免疫療法を提供する。

#### 【0041】

I i - K e y / MHCクラスIIのハイブリッドワクチンは、抗原特異的なCD4陽性T細胞刺激を長期にわたって誘導することができる。I i - K e y とのハイブリダイゼーションによりもたらされるTヘルパー細胞の活性の増強は、ペプチドワクチンのデザインにとって重要な進歩である。さらに、上述のようなTヘルパー細胞の抗原特異的な刺激メカニズムでは、I i - K e y のハイブリッドの技術を、他の方法（例えば、ISCOMA41ATRIX（登録商標）（CSL Behring社製；米国ペンシルバニア州キングオ

10

20

30

40

50

ブブラシャ) )と共に使用することができる。これにより、MHCクラスIIワクチンペプチドの力価をさらに増強させることができる。

【0042】

当業者であれば、ハイブリッド構築物を有する組成物を、I i - K e y のハイブリッドペプチドの形態で投与してもよいし、アミノ酸ベースの、I i - K e y のハイブリッドペプチドをコードする核酸構築物として投与してもよいことを理解できるであろう。当業者であれば、通常の実験法を用いて、ハイブリッドペプチド内の残基を様々な天然由来のアミノ酸または非天然由来のアミノ酸に置換することができる。置換に利用可能な分子の例として、ペプチド模倣構造体、D異性体アミノ酸、Mメチル化アミノ酸、L異性体アミノ酸、修飾L-異性体アミノ酸、環誘導体などが挙げられる。

10

【0043】

(共刺激)

【0044】

一構成において、本発明は、対象内の病原体に対するワクチンの力価を増強させる方法に関する。この方法では、ワクチンが用意される。ワクチンは、例えば、従来の加熱死滅されたウイルスまたは化学的に不活性化されたウイルスを含むことができる。あるいは、ワクチンは、病原体から単離されたタンパク質またはタンパク質の断片を含むものであってもよい。ワクチンは、DNA組換え技術で生成されたペプチドもしくはタンパク質、または合成ペプチドを含むものであってもよい。本発明は、ウイルスまたは細菌といった病原体に対するワクチンの力価を増強させる方法を包含する。詳細には、本発明は、病原体がHPV16型E7株を含むHPVウイルスである方法を包含する。ワクチンの限られた供給量で出来るだけ多くの個人を免疫できるように、および/または副作用を最小限に抑えるようにしながら、ワクチンの力価を増強させるのが望ましい。

20

【0045】

本明細書に開示した結果は、ワクチンを投与する前にI i - k e y のハイブリッド構築物を用いて対象の免疫系を予備刺激することにより、予備刺激しなかった場合に比べてワクチンの力価が驚くべきほど効果的に増強することを証明している。I i - k e y の配列は既述のとおりである。本発明において使用されるI i - k e y 構築物は、少なくとも、I i - k e y 配列のLRMK残基が、前述のハイブリッド構築物内のMHCクラスIIエピトープにリンカーを介して接続されたものであってもよい。リンカーは、免疫応答を最大限に増強させるサイズで、I i - k e y 領域とMHCクラスIIエピトープとの間のスペースを占める。一般的に、このスペーサー(またはリンカー)は、I i - k e y 領域とMHCクラスIIエピトープとの間で約15~25個のアミノ酸残基のアミノ酸配列により提供されるのに相当するスペースを占める。このリンカーは、必ずしもアミノ酸で構成される必要はない。ただし、リンカーがアミノ酸で構成されている場合、ハイブリッド構築物の製造は容易になる。前述のとおり、アミノ酸のリンカー部位の代替物については先行技術を参照されたい。

30

【0046】

対象の免疫系は、前述したタイプのI i - k e y 構築物を用いて予備刺激される。一般的に、I i - k e y のハイブリッド構築物は、注射用に製剤化される。この製剤は、生理学的に適合可能なバッファと、任意で、アジュバントとを含む。数多くのアジュバントが当該技術分野において知られており、どのアジュバントを選ぶかは、日常的な実験事項である。典型的には、I i - k e y 構築物製剤の投与は、筋肉注射または皮下注射によって行われる。

40

【0047】

生物には、I i - k e y のハイブリッドの投与に対して当該生物の免疫系が応答を生じる十分な時間を経た後、ワクチン組成物が投与される。典型的に、ワクチン組成物は、I i - k e y 製剤と同様に、生理学的に適合可能なバッファ及び、任意で加えられるアジュバントが投与される。他の構成では、I i - k e y のハイブリッドが、I i - k e y のハイブリッドを用いた予備刺激後のワクチンとして使用される。そのI i - k e y のハイ

50

ブリッドは、免疫応答を予備刺激するのに用いられたものと同じのハイブリッドであってもよいし、そうでなくてもよい。後述する結果によると、I i - k e y のハイブリッド構築物を用いた予備刺激後、H P V ワクチン組成物の力価は、著しい増強を示している。これらの結果は、後述の実施例で詳細に説明する。また、予備刺激用の I i - k e y のハイブリッドと、ワクチン組成物とを、共投与してもよい（すなわち、同時投与または共刺激してもよい）。

【 0 0 4 8 】

当業者であれば、I i - k e y のハイブリッド構築物およびワクチン組成物のいずれも、それぞれ、I i - k e y 構築物をコードする核酸構築物の形態、アミノ酸ベースのワクチンをコードする核酸構築物の形態で投与されてよいことを理解できるであろう。DNA ワクチンは、対象のコドン選択性（codon preference）と合致するように最適化されたコドンであってもよい。DNA 構築物がコードされた生成物を用いて免疫応答を刺激するために、DNA 構築物を投与する方法、およびそのような構築物に関する文献は豊富に存在する。そのような構築物の多くはウイルスベースであるが、機械的な導入法（例えば、遺伝子銃技術など）を利用してよい。

【 0 0 4 9 】

以上のように本発明を説明したが、当業者にとって、本発明の精神または範囲を逸脱することなく種々の変形または変更が可能であることは明白である。

また、本発明は、以下の態様を含んでいてもよい。

〔 態 様 1 〕

I i - k e y 部位および H P V 1 6 型 E 7 部位から本質的に構成されるハイブリッドペプチドを含む組成物であって、

前記 I i - k e y 部位は、L R M K（アミノ酸1～4）残基〔配列番号：9〕およびこれに連続する0～12個の残基から本質的に構成され、

前記 H P V 1 6 型 E 7 部位は、配列番号：1に含まれる H P V 1 6 型 E 7 の連続するアミノ酸8個以上の配列から本質的に構成され、

前記 I i - k e y 部位と前記 H P V 1 6 型 E 7 部位とが、約20個以下のアミノ酸の長さのスペーサーで接続されている、組成物。

〔 態 様 2 〕

H P V 1 6 型 E 7（8～26）ペプチド〔配列番号：2〕からなるアミノ酸を含む組成物。

〔 態 様 3 〕

H P V 1 6 型 E 7（8～22）ペプチド〔配列番号：3〕からなるアミノ酸を含む組成物。

〔 態 様 4 〕

態様1において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 1 6 型 E 7（8～22）〔配列番号：3〕である、組成物。

〔 態 様 5 〕

態様1において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が、H P V 2、H P V 3および H P V 4 からなる群から選択されたものである、組成物。

〔 態 様 6 〕

態様1において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 4 である、組成物。

〔 態 様 7 〕

態様1において、前記ハイブリッドペプチドが、さらに、薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。

〔 態 様 8 〕

態様1に記載の I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、組成物。

〔 態 様 9 〕

態様1において、前記スペーサーがポリメチレンリンカー（a v a）である、組成物。

10

20

30

40

50

[ 態様 1 0 ]

免疫応答を刺激する方法であって、

I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドを対象に投与すること、または I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが対象に投与されるようにすること、

を含み、

前記ハイブリッドペプチドは、I i - k e y 部位および H P V 1 6 型 E 7 部位から本質的に構成され、

前記 I i - k e y 部位は、L R M K (アミノ酸 1 ~ 4) 残基 [ 配列番号 : 9 ] およびこれに連続する 0 ~ 1 2 個の残基から本質的に構成され、

前記 H P V 1 6 型 E 7 部位は、配列番号 : 1 に含まれる H P V 1 6 型 E 7 の連続するアミノ酸 8 個以上の配列から本質的に構成され、

前記 I i - k e y 部位と前記 H P V 1 6 型 E 7 部位とが、約 2 0 個以下のアミノ酸の長さのスペーサーで接続されている、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 1 ]

免疫応答を刺激する方法であって、

H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番号 : 3 ] から本質的に構成されるアミノ酸配列を含む組成物を対象に投与すること、または H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番号 : 3 ] から本質的に構成されるアミノ酸配列を含む組成物が対象に投与されるようにすること、を含む、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 2 ]

態様 1 0 において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) [ 配列番号 : 3 ] である、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 3 ]

態様 1 0 において、前記 H P V 1 6 型 E 7 部位が H P V 2 、 H P V 3 および H P V 4 からなる群から選択されたものである、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 4 ]

態様 1 0 において、前記ハイブリッドペプチドが H P V 4 である、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 5 ]

態様 1 0 において、前記組成物が、さらに、薬学的に許容可能な担体を有する、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 6 ]

態様 1 0 において、前記スペーサーがポリメチレンリンカー ( a v a ) である、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 7 ]

態様 1 0 において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが核酸によってコードされており、当該核酸が前記対象に投与される、免疫応答刺激方法。

[ 態様 1 8 ]

対象内の H P V 病原体に対するワクチンの力価を増強させる方法であって、

a ) H P V 1 6 型および H P V 1 8 型からなる群から選択された M H C I I クラスエピトープを有するペプチドを含むワクチンを用意するステップと、

b ) i ) I i - k e y タンパク質の L R M K 残基および i i ) 前記 a ) ステップの M H C クラス I I のエピトープ含有ペプチドを含む、I i - k e y ハイブリッド構築物を用意するステップと、

c ) 前記対象の免疫応答を刺激するのに適した条件下で、前記 b ) ステップの I i - k e y 構築物を投与し、当該対象の免疫系を予備刺激するステップと、

d ) 前記 c ) ステップの免疫応答をブーストするのに適した条件下で、前記 a ) のワクチンまたは前記 c ) ステップのハイブリッドを投与することにより、前記予備刺激を行わない場合よりも免疫応答の力価を増強させるステップと、

を含む、ワクチン力価増強方法。

10

20

30

40

50

[ 態様 1 9 ]

態様 1 8 において、前記 H P V エピトープ含有ペプチドが、H P V 1 6 型 E 7 のエピトープ含有ペプチドである、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 0 ]

態様 1 9 において、前記 H P V 1 6 型 E 7 のエピトープ含有ペプチドが、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 2 2 ) [ 配列番号 : 3 ] である、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 1 ]

態様 1 9 において、前記 H P V 1 6 型 E 7 が、H P V 2、H P V 3 および H P V 4 からなる群から選択されたものである、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 2 ]

態様 1 8 において、前記ハイブリッドペプチドが H P V 4 である、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 3 ]

態様 1 8 において、前記組成物が、さらに、薬学的に許容可能な担体を有する、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 4 ]

態様 1 8 において、前記スペーサーがポリメチレンリンカー ( a v a ) である、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 5 ]

態様 1 8 において、前記 I i - k e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドペプチドが核酸によってコードされており、当該核酸が前記対象に投与される、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 6 ]

態様 1 8 において、前記ワクチンが、前記 a ) ステップおよび前記 b ) ステップのペプチドをコードする D N A ワクチンであり、かつ、そのコドン使用頻度が前記対象のコドン選択性と合致するように最適化されている、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 7 ]

態様 1 8 において、前記 a ) ステップのエピトープと前記 b ) ステップの I i - k e y ハイブリッドが共免疫される、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 8 ]

態様 1 8 において、前記ワクチンが、さらに、M H C クラス I の C T L エピトープを含む、ワクチン力価増強方法。

[ 態様 2 9 ]

標的の H P V に対する免疫応答を引き起こすための組成物であって、  
薬学的に許容可能な担体に含まれた I i - k e y のハイブリッドペプチドを有し、  
前記 I i - k e y のハイブリッドペプチドは、  
a ) I i - k e y タンパク質の L R M K 残基と、  
b ) H P V 1 6 型および H P V 1 8 型的一方または両方によってコードされる、M H C クラス I I エピトープと、  
を含む、組成物。

[ 態様 3 0 ]

態様 2 9 において、前記 M H C クラス I I エピトープが I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ハイブリッドである、組成物。

[ 態様 3 1 ]

態様 3 0 において、前記 I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドが、H P V 2、H P V 3 および H P V 4 からなる群から選択されたものである、組成物。

[ 態様 3 2 ]

態様 2 9 において、前記ハイブリッドペプチドが H P V 4 である、組成物。

[ 態様 3 3 ]

態様 2 9 において、さらに、H P V 1 6 型および H P V 1 8 型の C T L エピトープから

10

20

30

40

50

なる群から選択されたエピトープを含む、組成物。

【実施例】

【0050】

( I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 のハイブリッドの治療ワクチン )

【0051】

[ 方法 ]

【0052】

< H L A - D R 拘束性 のエピトープ の予測 >

【0053】

コンピュータアルゴリズム ( 例えば、HYPERLINK "http://www.syfpeothi.de/scripts/MHCServer.dll/home.

htm" www.syfpeithi.de/scripts/MHCServer.dll/home.

htmなどを)を用いて、HPV16型E7の配列(GenBank/PubMedのA433253)に含まれる、HLA-DR拘束性エピトープの候補を分析した。このアルゴリズム方法により、HPV16型E7タンパク質のアミノ酸8~26(配列番号:2)によって表されるペプチドが特異的でない(Promiscuous)HLA-DRエピトープ(HLA-DRの多くの型で提示可能なエピトープ)を含むことが判明した。

【0054】

【表1】

表1. HPV16型E7配列における最初の30個のアミノ酸とエピトープ

HPV16型E7 (1~30)	Mhgdtpthelymldlqpettdlycyeqld (配列番号:1)
HPV16型E7 (8~26)	Lhymldlqpettdlycy (配列番号:2)
HPV16型E7 (8~22)	Lhymldlqpettdl (配列番号:3)

【0055】

( I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 2 2 ) のハイブリッドのデザインおよび合成 )

【0056】

I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 2 2 ) のハイブリッドのホモロググループを合成し、インビボ(in vivo)において当該ハイブリッドのスペーサーの長さがHLA-DR4トランスジェニックマウスのHPV16型E7(8~22)に対する特異的なCD4陽性Tリンパ球の応答の増強性に対して与える影響を試験した。本明細書では、I i - k e y 配列を、LRMKLPKPKPKVSKMR(配列番号:9)と定義する。このI i - k e y 配列の最初の4つのアミノ酸であるI i - K e y 断片(LRMK(配列番号:11))を、可撓性のポリメチレンスペーサー(a v a : 5 - アミノ吉草酸、すなわち、5アミノペンタン酸)スペーサーを介して、HPV16型E7(8~22)エピトープの様々なアミノ酸のN末端に連結した。本発明にかかるI i - k e y / H P V のハイブリッドの調製(製造)において、前記I i - k e y 断片に隣接する領域で、I i - k e y 配列に含まれる他のアミノ酸を挿入してもよい。いずれのペプチドも、エキソペプチダーゼを阻害するために、Nアセチル化やCアミド化を施した。また、いずれのペプチドも、21st Century Biochemicals社(米国マサチューセッツ州マールボロ)によって95%超の純度で合成されたものであった。このエピトープは、大半の場合、ヒトHLA-DR4対立遺伝子によって拘束されるものであり、かつ、HLA-DR4発現トランスジェニックマウスは市場で簡単に入手できるので、HLA-DR4での活性について先ず試験した。最初に、スペーサーの長さの影響を試験した。a v a リンカーを、M

H C クラス I I エピトープ結合溝の p 1 部位を占領すると予測されるアミノ酸 ( H P V 配列に含まれる位置 1 1 のチロシン ) から始めて、様々な距離に位置するアミノ酸に結合させた。詳細には、 a v a リンカーを、 P 1 部位に対応するチロシンから 1 ~ 3 番目のアミノ酸、および当該チロシン ( エピトープ中の P 1 と予測されるアミノ酸 ) にそれぞれ結合させた。 H P V 1 はエピトープのみを含むコントロールペプチド ( 対照ペプチド ) であり、 H P V 2、H P V 3、H P V 4 および H P V 5 は、互いに異なる長さのスペーサーを有するハイブリッドとした。 H P V 6 は、予め臨床試験で試験済みの H L A - A 2 拘束性の C T L エピトープとした。この実験の目的は： 1 ) I i - K e y のハイブリッドを用いた C D 4 陽性 T ヘルパー細胞の抗原特異的な刺激の増強を試験すること；および 2 ) H L A - D R 4 陽性の子宮頸がん患者への臨床試験に使用するために、 I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) のハイブリッドの中から、 H L A - D R 4 トランスジェニックマウスにおいて最も有効なものを決定すること；であった。臨床試験に使用するための、 I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 22 ) の最も有効なハイブリッドを決定した後、今後は、他種の H L A - D R 対立遺伝子のトランスジェニックマウスに対し、どのハイブリッドが有効であるかについて研究を続ける予定である。

【 0 0 5 7 】

【 表 2 】

表 2. 構築物の配列およびハイブリッドの配列

構築物	配列
H P V 1	lheymlqlpettdl (配列番号： 3 )
H P V 2	LRMK·ava·lheymlqlpettdl (配列番号： 4 )
H P V 3	LRMK·ava·heymlqlpettdl (配列番号： 5 )
H P V 4	LRMK·ava·eymlqlpettdl (配列番号： 6 )
H P V 5	LRMK·ava·ymldlqlpettdl (配列番号： 7 )
H P V 6	ymldlqlpett (配列番号： 8 )
H P V 7	lheymlqlpettdl ggypdvdpdya (配列番号： 1 2 )
H P V 1 7	LRMK·ava· eymlqlpettdl ggypdvdpdya (配列番号： 1 3 )
H P V 1 1	rahynivtf (配列番号： 1 4 )

【 0 0 5 8 】

( マウスの免疫化 )

【 0 0 5 9 】

H L A - D R 4 - I E トランスジェニックマウス ( 1 グループあたり 3 匹のマウス ) について、 3 0 n モルの H P V 1 6 E 7 / M H C クラス I I のハイブリッド、エピトープの

みを含むペプチド、またはCTLエピトープペプチドを尾根に皮下注射して免疫した。ペプチドは、生理食塩水に溶解させた後、同一体積の完全フロイントアジュバント(CFA)で乳化させたものを用いた。マウスの尾根への皮下注射による免疫化は、28ゲージの針で漏れを生じずに行った。免疫化から3週間後、脾臓リンパ球を取り出し、HPV1(HPV16E7(8~22)エピトープのみを含むペプチド: HPV1)およびHPV6(CTLエピトープ)によるインビトロ(in vitro)刺激に対するインターフェロン分泌について、ELISPOTアッセイ法を実施した。

#### 【0060】

(ELISPOTアッセイ法)

脾臓リンパ球をELISPOTアッセイ法で使用した。各グループ内の免疫された動物の脾臓プール由来のリンパ球を大量培養したもの(0.5~1.0×10<sup>6</sup>細胞/ウェル)を、96ウェル(穴)のイムノスポットを有する200枚のプレート上で、2.7nモルのHPV16E7(8~22)エピトープのみを含むペプチドおよびCTLエピトープ(HPV6)によって42時間刺激した。このELISPOTアッセイ法を、BD Pharmingen社のインターフェロン分泌用のセット(カタログ番号551859)を用いて、この製造元の説明書に従って実行した。概略を述べると、プレートをサイトカインキャプチャー抗体によって4で一晩コーティングした。そして、そのプレートを、10%ウシ胎児血清(FBS)含有RPMI-1640バッファーによって室温で2時間ブロッキングし、0.05%Tween20含有リン酸緩衝液(洗浄用バッファー)で4回洗浄した。精製CD4陽性T細胞の懸濁液を、サイトカイン抗体で予備コーティングされたプレートに添加した。精製CD4陽性T細胞を大量培養法で36時間培養するか、または一晩インキュベーションした後、プレートを洗浄用バッファーで5回洗浄した。ビオチン化されたサイトカイン検出用抗体(2μg/mL)を添加し、室温で2時間静置した。プレートを洗浄用バッファーで4回洗浄し、アビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体(アビジンHRP)を、上市されている保存溶液から1:100で希釈したものを添加し、室温で1時間インキュベーションした。アビジンHRPを、洗浄用バッファーによる4回の洗浄およびリン酸緩衝液による2回の洗浄によって除去した。HRP-3-アミノ-9-エチルカルバゾール基質(BD Pharmingen社製)を用いて室温で30分間反応させることにより、スポットが生じた。プレートは、滅菌水を用いて2回洗浄してから室温で1~2時間乾燥させた。

#### 【0061】

(結果)

#### 【0062】

[無差別である(promiscuous)HLA-DRエピトープの決定]

#### 【0063】

アルゴリズムの予測によると、HPV16型E7(8~26)(配列番号:2)に、有望なHLA-DR拘束性の幾つかの互いに重複するエピトープが含まれているとのことである:そのうちの1つは、P1部位に結合する11番目のチロシンから始まり、別のものは、同様にP1部位に結合する12番目のメチオニンから始まる。当該エピトープは、他種のHLA-DR対立遺伝子によっても拘束される。3つの有望なエピトープに対するアルゴリズムの詳細な予想スコアは、次のとおりである:8番目のロイシンから始まるエピトープ(P1部位は11番目のチロシン)は、HLA-DRB1\*0401(スコア=28)およびHLA-DRB1\*0301(スコア=18)によって拘束された。9番目のヒスチジンから始まるエピトープ(P1部位は12番目のメチオニン)は、HLA-DRB1\*0101(スコア=22)、HLA-DRB1\*0401(スコア=20)およびHLA-DRB1\*0501(スコア=18)によって拘束された。10番目のグルタミン酸から始まるエピトープ(P1部位は13番目のロイシン)は、HLA-DRB1\*0301(スコア=20)、HLA-DRB1\*0701(スコア=22)およびHLA-DRB1\*1501(スコア=24)によって拘束された。

#### 【0064】

【 H L A - D R 4 トランスジェニックマウスのデータ 】  
 【 0 0 6 5 】

下記の表 3 から、I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 2 2 ) ( 配列番号 : 3 ) の数種類のハイブリッドが、インビボ ( i n v i v o ) の C D 4 陽性活性に対して、より高い特異的な刺激活性を示したことが分かる ( H L A - D R 4 トランスジェニックマウスは他種の M H C クラス I I 対立遺伝子や H L A - A 2 対立遺伝子を有さない。また、H P V 6 は他種の M H C クラス I 対立遺伝子によって拘束されなかった )。これらの中でも、特に、H P V 4 は、H L A - D R 4 トランスジェニックマウスにおいて高い活性を有する H P V 1 ( エピトープのみを含むペプチド ) の 5 倍の免疫応答の増強を示し ( 表 3 )、アルゴリズムによる予測を裏付けた。H P V 5 の免疫活性は低く、このことは、10 番目のグルタミン酸が、H L A - D R 4 トランスジェニックマウスをインビボ ( i n v i v o ) で刺激するにあたって、H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 2 2 ) エピトープにおいて必要なアミノ酸である可能性、または H P V 4 における L R M K とエピトープとの間のスペースが最適であることを示している。H P V 2 および H P V 3 は、それぞれ、インターフェロンの応答の 2 倍、3 倍の増強を示し、このことから、I i - K e y モチーフとエピトープとの間のスペースが重要であること、およびスペースの長さの選択の融通性が読み取れる。この結果から、H P V 4 が最も有効なハイブリッドペプチドの候補であり ( H P V 3 も優秀であるが )、子宮頸がんまたは他種の H P V 1 6 型陽性がんの H L A - D R 4 陽性患者への臨床試験において有望であると考えられる。このグループのハイブリッドを、さらに、他種の H L A - D R 対立遺伝子のトランスジェニックマウスで試験し、当該他種の H L A - D R 対立遺伝子において最も有効な I i - K e y / H P V 1 6 型 E 7 ( 8 ~ 2 2 ) を決定する予定である。

【 0 0 6 6 】

【表 3】

表 3. 完全フロイントアジュバントに含有された H P V のハイブリッドで免疫された H L A - D R 4 トランスジェニックマウス ( 1 グループあたり 3 匹のマウス ) の脾臓細胞を用いた E L I S P O T アッセイ法

インビボ免疫化で 用いた構築物	インビトロで H P V 1 及び H P V 6 によって刺激された インターフェロンのスポットの数 ( 1 0 <sup>6</sup> 細胞あたりの数 )		
	培地のみ	H P V 1	H P V 6
コントロール ( 対照 )	2 2	2 0	1 8
H P V 1	5 8	1 4 2	1 4 0
H P V 2	6 2	2 1 2	6 2
H P V 3	5 2	2 2 4	5 0
H P V 4	7 6	4 2 2	1 4 8
H P V 5	2 6	8 2	2 6
H P V 6	4 4	2 8	4 4

【 0 0 6 7 】

図 1 に、H L A - D R 4 トランスジェニックマウスにおいて最も有効な H P V ハイブリッドを明らかにするための、同様の実証研究のデータを示す。このデータは、インビトロ ( i n v i t r o ) でエピトープ単独 ( H P V 1 ) または H P V 4 によって刺激した後、H P V 1 または I i - k e y のハイブリッド ( 構築物 H 2 ~ 構築物 H 6 ) で追加免疫したマウスの脾細胞におけるインターフェロン 生成を示したものである。H P V 4 で免疫化されたマウスは、エピトープ単独 ( H P V 1 ) で免疫化されたマウスに比べて、インターフェロン 分泌細胞の数が約 5 倍超であった。

## 【 0 0 6 8 】

[ H L A - D R 4 エピトープと I i - K e y モチーフとの連結により、H L A - D R 4 分子に対する当該エピトープの結合能が増強した ]

## 【 0 0 6 9 】

H P V 4 のハイブリッドペプチドの力価の増強のメカニズムを明らかにするために、H L A - D R 4 陽性 H 9 リンパ腫細胞に対する結合親和性を、H P V 4 と H P V 1 とで比較した。抗 H A モノクローナル抗体を用いて、H 4 の結合モニタリングが可能な H A タグに接続された 2 種類のペプチド ( H P V 7 および H P V 1 7 ) を合成した。詳細には、H P V 7 ( 配列番号 : 1 2 ) は、H P V 1 の C 末端を 2 つのグリシン残基のスペーサーと H A タグ ( Y P Y D V P D Y A ( 配列番号 : 1 9 ) ) とで伸長させたものであり、H P V 1 7 ( 配列番号 : 1 3 ) は、H P V 4 の C 末端を 2 つのグリシン残基のスペーサーと H A タグとで同様に伸長させたものである。まず、これら 2 種類のペプチドを、様々な濃度で、 $1 \times 10^6$  個の H L A - D R 4 陽性ヒトリンパ腫細胞 ( H 9 細胞 ) と培養媒体で 1 時間インキュベートした。H 9 細胞と抗 H A タグモノクローナル抗体とを反応させ、F I T C ( フルオレセインイソシアネート ) 標識された二次抗体で染色することにより、結合効率をモニタリングした。H P V 1 7 は、中間の濃度 (  $10 \mu\text{M}$  から  $50 \mu\text{M}$  ) において H P V 7 に比べて結合効率が優れていることが分かった ( 表 4 および図 2 ) 。最大濃度 (  $100 \mu\text{M}$  ) では、いずれの種類のペプチドも、同様の結合効率を示す。

## 【 0 0 7 0 】

## 【 表 4 】

表 4. H L A - D R 4 陽性細胞 ( H 9 細胞 ) に対する、H P V のエピトープ単独 ( H P V 7 ) の結合能および I i - K e y / H P V のハイブリッド ( H P V 1 7 ) の結合能。以下の数字はゲーティングされた陽性細胞のパーセンテージ ( 百分率 ) を指し、ペプチドを全く加えなかった場合の値は 1. 8 3 % である。

	1 n モル	1 0 n モル	2 5 n モル	5 0 n モル	1 0 0 n モル
構築物 H P V 7	3. 8 8	7. 4 2	1 2. 2	2 5. 6 2	3 9. 4 9
構築物 H P V 1 7	5. 9 9	1 2. 5 6	2 4. 8 8	4 1. 3 2	4 4. 6 9
ペプチド なし	1. 8 3				

## 【 0 0 7 1 】

[ I i - K e y / H P V のハイブリッド ( H P V 4 ) は、共免疫された H P V の C T L エピトープの力価を、投与量依存的に増強させた。 ]

## 【 0 0 7 2 】

次に、H P V 4 と H - 2 D<sup>b</sup> 拘束性の C T L エピトープである H P V 1 1 ( H P V 1 6 型 E 7 ( 49 ~ 57 ) ( R A H Y N I V T F ( 配列番号 : 2 4 ) ) ( Feltkamp, M. C., et al., Eur. J. Immunol. 1993, 23:2242-2249 ) ) とで共免疫することによって C D 4 陽性 T 細胞活性が増強し、より強力な C T L 応答が誘導されることを示す。H P V 1 1 と様々な濃度の H P V 4 とを用いて H L A - D R 4 トランスジェニックマウスを免疫した。インビボ ( i n v i v o ) C T L アッセイにより、C T L エピトープである H P V 1 6 型 E 7 ( 49 ~ 57 ) が H L A - D R 4 トランスジェニックマウスにおいて免疫原性を有し、エピトープ特異的な細胞殺傷を引き起こすことが証明された。H P V 1 6 型 E 7 ( 49 ~ 57 ) は、H P V 4 のハイブリッドと共免疫されることにより、その活性が大幅に増強した。なお、3 0 n モルの H P V 4 を投与された動物において、最大の活性が確認された ( 表 5 および

図3)。ELISPOTのデータは、CTLエピトープの活性の増強がHPV4の活性に比例していることを明らかに示している (data not shown)。つまり、これは、MHCクラスIIによって誘導されるTヘルパー細胞の活性が、ペプチドワクチンによるCTL活性の誘導に重要であることを証明している。

【0073】

【表5】

表5. CTLエピトープ：HPV11を支援するHPV4の投与量変化

免疫	HPV11に特異的なCTL殺傷 (%)
コントロール (対照)	0
HPV11	19
HPV4 (15 $\mu$ g) +HPV11	28
HPV4 (30 $\mu$ g) +HPV11	74
HPV4 (60 $\mu$ g) +HPV11	61

10

20

【0074】

[ I i - Key のハイブリッドは、共免疫されたHPVのCTLエピトープの活性を増強するにあたって、ペプチド単独を含む親ペプチドよりも効果的であった。 ]

【0075】

この実験では、I i - Key のハイブリッドHPV4が、HPVのCTLエピトープの活性を増強するにあたって、エピトープ単独を含むHPV (HPV1) よりも効果的であるか否かについて試験した。HLA-DR4トランスジェニックマウスを、HPV11 (HPV16型E7 (49~57)) のCTLエピトープ単独、HPV11のCTLエピトープと30 nモルのHPV1、またはHPV11のCTLエピトープと30 nモルのHPV4で免疫した。インビボ (in vivo) のCTL分析は、共免疫されたCTLエピトープの活性を増強させるにあたって、HPV4がHPV1よりも効果的であることを示した。具体的に述べると、HPV11に特異的な細胞殺傷レベルは、HPV1およびHPV11で共免疫されたマウスに比べて、HPV4およびHPV11で共免疫されたマウスにおいて2倍であった (表6および図4)。

30

【0076】

【表 6】

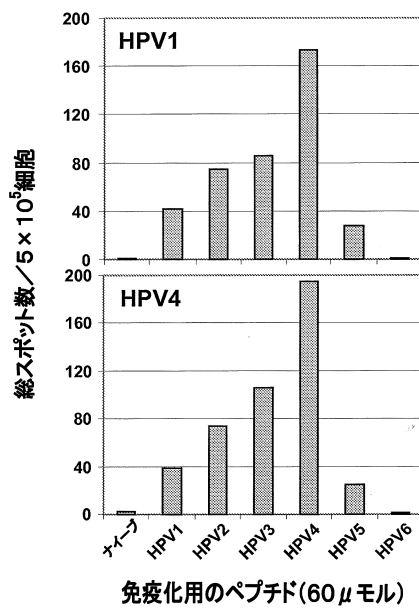
表 6. CTLエピトープ: HPV11の活性を増強するにあたってのHPV1とHPV4との間の力価の比較

共免疫	HPV11に対して特異的なCTL活性 (%)
CpGのみ	0
HPV11	14
HPV1 +HPV11	32.5
HPV4 +HPV11	60

10

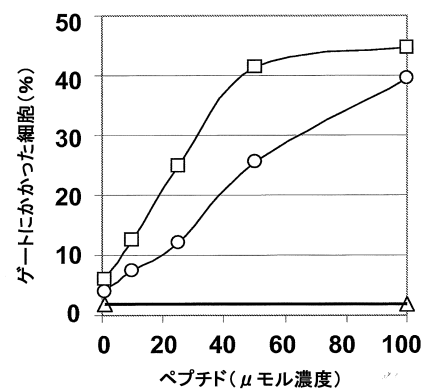
【図 1】

FIG. 1



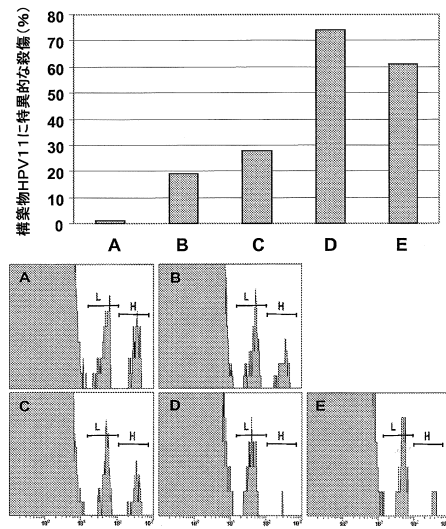
【図 2】

FIG. 2



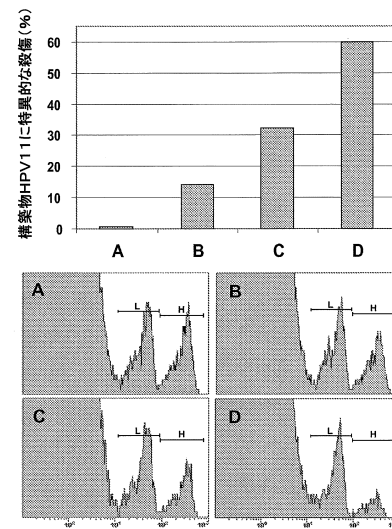
【図 3】

FIG. 3



【図 4】

FIG. 4



【配列表】

0005707326000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20

(74)代理人 100142608

弁理士 小林 由佳

(72)発明者 クー・ミンツェン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 5 3 2, ノースボロー, サデウス メイソン ロード  
1 4

(72)発明者 ホーフ・エリック・フォン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 8 1, ウエルズリー, レッドウィング ロード 3  
3

審査官 平井 裕彰

(56)参考文献 特表2 0 0 3 - 5 2 0 7 8 1 ( J P , A )

INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, 2001, Vol. 91, p. 612-618

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 ~ 3 8 / 5 8
3 9 / 0 0 ~ 3 9 / 4 4
4 8 / 0 0