

(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2009-534331

(P2009-534331A)

(43) 公表日 平成21年9月24日(2009.9.24)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	Z N A	4 B 02 4
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00		4 C 08 4
A61K 35/76 (2006.01)	A 61 K 35/76		4 C 08 7
A61P 31/20 (2006.01)	A 61 P 31/20		4 H 04 5
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-505766 (P2009-505766)	(71) 出願人	599082883 トランジェーヌ、ソシエテ、アノニム T R A N S G E N E S . A .
(86) (22) 出願日	平成19年4月17日 (2007. 4. 17)		フランス国イルキルシュ、グラフェンスター デン、セデックス、パルク、ディノバシイ オン、プールバール、ゴンティエ、ダンテ ルナシユ
(85) 翻訳文提出日	平成20年10月20日 (2008.10.20)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
(86) 國際出願番号	PCT/EP2007/003367	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行季
(87) 國際公開番号	W02007/121894	(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(87) 國際公開日	平成19年11月1日 (2007.11.1)	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(31) 優先権主張番号	06360013.4		
(32) 優先日	平成18年4月21日 (2006. 4. 21)		
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HPV - 18 を主体とするパピローマウイルスワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ヒトパピローマウイルス(HPV) 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペチド、又は HPV 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペチドをコードする核酸を含んでなる組成物の、HPV 18 以外の少なくとも 1 種類のパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を予防又は治療する薬剤を製造するための使用に関する。本発明が特に対象とするのは免疫療法であり、特に、子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)へ、そして最終的には子宮頸癌へ至る可能性のある HPV の持続感染の予防及び治療である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

H P V 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチド、又は H P V 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の、H P V 18 以外の少なくとも 1 種類のパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を予防又は治療する薬剤を製造するための使用。

【請求項 2】

H P V 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチド、又は H P V 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の、H P V 18 以外の少なくとも 1 種類のヒトパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を治療する薬剤を製造するための使用。 10

【請求項 3】

H P V 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチド、又は H P V 18 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の、H P V 18 以外の少なくとも 1 種類のヒトパピローマウイルスに対する免疫反応を誘発するための使用。

【請求項 4】

前記の H P V 18 以外の少なくとも 1 種類のヒトパピローマウイルスが、H P V 39、H P V 45、H P V 51、H P V 56、H P V 59、H P V 68、H P V 70、及び H P V 85 から成る群より選択される、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の使用。 20

【請求項 5】

前記の 1 若しくは 2 種類以上の H P V 18 初期ポリペプチドが、E 6 ポリペプチド、E 7 ポリペプチド、又は E 6 ポリペプチド及び E 7 ポリペプチドの両方である、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

前記の H P V 18 E 6 及び / 又は E 7 ポリペプチドが、非発癌性変異体である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記の H P V 18 E 6 ポリペプチドの非発癌性変異体が、配列番号 1 に示すアミノ酸配列と相同意又は同一であるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 6 に記載の使用。 30

【請求項 8】

前記の H P V 18 E 7 ポリペプチドの非発癌性変異体が、配列番号 2 に示すアミノ酸配列と相同意又は同一であるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 9】

前記の H P V 18 E 6 及び / 又は E 7 ポリペプチドが、細胞膜へアンカーされるように、膜アンカー配列及び分泌配列を組み込むことによって修飾される、請求項 5 乃至 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 10】

前記の膜アンカー配列及び / 又は分泌配列が、狂犬病ウイルス糖タンパク質、H I V ウィルス外被糖タンパク質、又は麻疹ウイルス F タンパク質から得られる、請求項 9 に記載の使用。 40

【請求項 11】

前記の H P V 18 E 6 ポリペプチドが、配列番号 3 に示すアミノ酸配列と相同意又は同一であるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記の H P V 18 E 7 ポリペプチドが、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と相同意又は同一であるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 13】

前記の組成物が、サイトカイン又はサイトカインをコードする核酸をさらに含んでなる

10

20

30

40

50

、請求項 1 乃至 1 2 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 4】

前記のサイトカインが I L 2 である、請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

前記の 1 若しくは 2 種類以上の H P V 1 8 初期ポリペプチドをコードする核酸が、ベクター内に含まれる、請求項 1 乃至 1 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記のベクターがワクシニアベクターである、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 7】

前記のワクシニアベクターが M V A ベクターである、請求項 1 6 に記載の使用。

10

【請求項 1 8】

前記の M V A ベクターが、7 . 5 K プロモーターの支配下に置かれた H P V 1 8 E 6 ポリペプチドをコードする核酸、7 . 5 K プロモーターの支配下に置かれた H P V 1 8 E 7 ポリペプチドをコードする核酸、及び H 5 R プロモーターの支配下に置かれたヒト I L 2 遺伝子を含んでなる、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 1 9】

前記の H P V 1 8 E 6 ポリペプチド、前記の H P V 1 8 E 7 ポリペプチド、及び前記のヒト I L 2 遺伝子をコードする核酸が、M V A ゲノムの欠失部位 I I I へ挿入される、請求項 1 8 に記載の使用。

【請求項 2 0】

前記の病理状態が、H P V の持続感染、前癌若しくは癌状態である、請求項 1 乃至 1 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 2 1】

前記の H P V と関連する癌状態が、子宮頸癌、肛門癌、又は口腔癌である、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記の H P V と関連する前癌状態が、子宮頸部上皮内腫瘍 (C I N) のグレード 1 、 2 、又は 3 である、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 3】

前記の組成物が、皮下経路又は筋肉内経路から投与される、請求項 1 乃至 2 2 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 2 4】

前記の組成物が、 5×10^5 p f u 乃至 5×10^7 p f u のワクシニアベクターを含んでなる用量で投与される、請求項 2 0 乃至 2 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 2 5】

前記の組成物が、請求項 1 7 、 1 8 、又は 1 9 に記載のように M V A ベクターを含んでなり、 5×10^5 p f u 乃至 5×10^7 p f u の用量で、1 週間の間隔をおいて皮下経路から 3 回投与される、請求項 2 4 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

本発明は、ヒトパピローマウイルス (H P V) 1 8 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチド、又は H P V 1 8 の 1 若しくは 2 種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の、H P V 1 8 以外の少なくとも 1 種類のパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を予防又は治療する薬剤を製造するための使用に関する。本発明が特に対象とするのは免疫療法であり、特に、子宮頸部上皮内腫瘍 (C I N) へ、そして最終的には子宮頸癌へ、至る可能性のある H P V の持続感染の予防及び治療である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

パピローマウイルスは、ヒトを含む数多くの高等生物中で確認されている、小さなDNAウイルスである（例えば、Pfister, 1987, in The papovaviridae: The Papillomaviruses, Salzman and Howley edition, Plenum Press, New York, p 1 38、参照）。このウイルスは、良性腫瘍から悪性腫瘍にわたる病理状態と関連している。良性腫瘍においては、ウイルスゲノムはエピソームであるが、一方、悪性腫瘍においては、HPVのDNAは宿主染色体へ組み込まれる（Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path. 19, 16 28）。

【0003】

パピローマウイルスは、カプシドタンパク質に囲まれた塩基対約7900の二本鎖環状DNAを有する。ゲノムは、E1乃至E7のリーディングフレームを含む初期（E）領域、及び後期（L）領域を有する。後期領域は、ウイルスカプシドを形成する構造タンパク質L1及びL2をコードし、一方、初期遺伝子は、核内で主に見られる制御タンパク質をコードする。E1は、ウイルスゲノムの維持と複製に重要である2種類のタンパク質をコードする。E2は、E6及びE7の転写を指令するウイルスプロモーターを制御する活性化タンパク質及び抑制タンパク質をコードする（Bechtold et al., 2003, J. Virol. 77, 2021 2028）。E4にコードされたタンパク質は、細胞質内のケラチンネットワークに結合してこれを分断し、ウイルスの成熟化に際して重要な役割を担うことができる。E5タンパク質の役割に関しては依然として議論の余地があり、その発現は、ウイルスが宿主染色体へ組み込まれる際に失われることが多い。癌関連HPV遺伝子型のE6及びE7にコードされた遺伝子産物は、感染細胞の癌化に関与しており（Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610 613; Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1 9; Be dell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635 3640）、これは、これらのウイルスタンパク質が、各々、細胞腫瘍抑制遺伝子産物であるp53、及び網膜芽細胞腫（Rb）と結合できる能力によるものと推定される。HPV 16の天然E6ポリペプチドのp53との結合に関するアミノ酸残基は、118乃至122の残基（1番目のMet残基を+1とした場合、又は、好適に用いられるように、2番目のMet残基から始めた場合は、111乃至115の残基）であることが明らかにされており（Crook et al., 1991, Cell 67, 547 556）、HPV 16の天然E7ポリペプチドのRbとの結合に関するアミノ酸残基は、21乃至26の残基に位置する（Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099 4105; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442 4446）。これらの結合領域は、HPV 18のE6及びE7においても保存される（Pim et al., 1994, Oncogene 9, 1869 1876; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442 4446）。

【0004】

現在、100を超す種類のヒトパピローマウイルス（HPV）遺伝子型がクローニングされ、配列決定されている（Stoler, 2000, Int. J. Gynecol. Path. 19, 16 28）。性器粘膜に感染するHPV遺伝子型は40種類のみであり、そのうちの約15種類が、女性に生殖器の悪性腫瘍を起こす危険をもたらす。より詳細には、最も蔓延している2種類の遺伝子型であるHPV 16及びHPV 18は、浸潤性子宮頸癌の70%超で検出され、一方、HPV 31、HPV 33、及びHPV 45が合わせて、この症例の10%を占めている（Cohen et al., 2005, Science 308, 618 621）。

【0005】

子宮頸部をスクリーニングするプログラムは存在するが、国際癌研究機関のデータによると、世界中で毎年約50万人の女性が子宮頸癌と診断され、死亡者数は27万人を超えている。従来からの手法は依然として手術及び放射線療法であるが、最近の15年の間に

10

20

30

40

50

、例えばペプチド主体のワクチン(F e l t k a m p e t a l . , 1 9 9 3 , E u r . J . I m m u n o l . 2 3 , 2 2 4 2 2 2 4 9)、ウイルス様粒子(V L P)ワクチン、D N Aワクチン(O s e n e t a l . , 2 0 0 1 , V a c c i n e 1 9 , 4 2 7 6 4 2 8 6 ; S m a h e l e t a l . , 2 0 0 1 , V i r o l o g y 2 8 1 , 2 3 1 2 3 8)、及びウイルスベクターワクチン(E P 4 6 2 , 1 8 7 , D a e m e n e t a l . , 2 0 0 0 , G e n e T h e r . 7 : 1 8 5 9 1 8 6 6 ; H e e t a l . , 2 0 0 0 , V i r o l o g y 2 7 0 , 1 4 6 1 6 1 ; B o r y s i e w i c z e t a l . , 1 9 9 6 , L a n c e t 3 4 7 , 1 5 2 3 1 5 2 7)など、新しくワクチンを用いた方策も設計されてきた。

【 0 0 0 6 】

10

概念上、H P Vワクチンには、予防及び治療という2つの手法がある。予防的手法では、ウイルス感染の防止、すなわち、主に中和抗体の誘発によってウイルスが宿主細胞へ侵入する前にこれを阻止することを目的とする。通常、予防ワクチンは、ウイルス表面で発現されるカプシドタンパク質を標的とする。ワクチンのほとんどは、遺伝子組換えによって作製されたL 1タンパク質のV L P、又は最も蔓延しているH P V種のV L P混合物に基づいている。M e r c kとG l a x o S m i t h K l i n e (G S K)は、最近、フェーズI I Iの臨床試験に成功し、種特異的な子宮頸部感染の予防効力が1 0 0 %であったとの報告を発表した。H P V 1 6 及びH P V 1 8 のV L Pの混合物を投与した後の、発癌性のH P V 3 1 及びH P V 4 5 遺伝子型に対する干渉効果が報告されている(W O 2 0 0 4 / 0 5 6 3 8 9)。しかし、V L Pを主体とする予防ワクチンは、H P V感染によって発症した病理状態の軽減を引き起こすことは期待されない。

【 0 0 0 7 】

20

治療的手法は、主に細胞免疫反応を誘発することにより、発症したH P V感染を治療し、H P Vに関連する前癌及び癌の病理状態の軽減を引き起こすことを目的とする。通常、治療的方策は、H P Vに起因する腫瘍細胞によって発現されるE 6 及び / 又はE 7 肿瘍性タンパク質に対する免疫化に基づいている。現在までのところ、E 6 及びE 7 H P V抗原によってもたらされる免疫は遺伝子型に特異的であると考えられており、現在、臨床又は前臨床開発段階の治療ワクチンは、主に、最も蔓延している発癌性のH P V 1 6 に、及びそれよりは小さな規模でH P V 1 8 に焦点が当てられている。

【 0 0 0 8 】

30

しかし、理想的な治療ワクチンは、最も蔓延しているH P V遺伝子型だけでなく、残りの3 0 %の子宮頸癌に関与しているその他の蔓延度の低いH P V遺伝子型に対しても防御効果を発揮することが可能であるべきである。これは、各発癌性H P V遺伝子型に対する代替的なワクチン候補の開発によって達成することができる。しかし、この方策は、蔓延度の低いH P V遺伝子型に曝露した患者の数が限られているのに対して、監督官庁が求める臨床及び前臨床開発にかかるコストを考えた場合、あまり魅力的ではないと思われる。

【 0 0 0 9 】

40

H P Vは、その感染の慢性的かつ持続的な特性、高い蔓延性、及びH P Vに誘発された癌の著しい罹患率のため、何年にもわたって地球規模での健康に対する重大な脅威であり続けることが考えられる。従って、より広い適用範囲を有し、H P V 1 8 に加えて、その他の蔓延度の低い潜在的に発癌性であるH P V遺伝子型を含む複数のH P V遺伝子型に対して防御及び / 又は治療を行うことが可能なワクチンの開発が求められている。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 0 】

従って、本発明は、工業国並びに発展途上国において、パピローマウイルス感染又はパピローマウイルスに関連する前悪性及び悪性病変の予防と治療の改善についての著しい進歩に関する。

【 0 0 1 1 】

本技術的課題は、請求項で明示する態様を提供することによって解決される。

【 0 0 1 2 】

50

本発明のその他の及びさらなる局面、特徴、及び利点は、以下に述べる本発明の現時点
で好ましい態様から明らかとなるであろう。これらの態様は、開示の目的で示されるもの
である。

【0013】

従って、第一の局面では、本発明は、H P V 18以外の少なくとも1種類のパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を予防又は治療する薬剤を製造するための、H P V 18の1若しくは2種類以上の初期ポリペプチド、又はH P V 18の1若しくは2種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の使用を提供する。

【0014】

より詳細には、本発明は、H P V 18の1若しくは2種類以上の初期ポリペプチド、又はH P V 18の1若しくは2種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の、H P V 18以外の少なくとも1種類のヒトパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を治療する薬剤を製造するための使用に関する。本発明はさらに、H P V 18以外の少なくとも1種類のヒトパピローマウイルスに起因する感染若しくは病理状態を治療する方法にも関し、その方法には、H P V 18の1若しくは2種類以上の初期ポリペプチド、又はH P V 18の1若しくは2種類以上の初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物を宿主生物へ投与することを含んでなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

この全出願を通して本明細書で用いる「1の(a)」及び「1の(an)」という用語は、状況に応じて特に他の意味を示さない限りにおいて、「少なくとも1の」、「少なくとも第一の」、「1若しくは2以上の」、又は「複数の」示された化合物若しくは工程、という意味で用いる。例えば、「1個の細胞(a cell)」という用語には、混合物を含む複数個の細胞が含まれる。より詳細には、少なくとも1の」、及び「1若しくは2以上の」は、1又は1よりも大きい数を意味し、特に1、2、又は3が好ましい。

【0016】

本明細書で用いる「及び/又は」という用語は、「及び」、「又は」、及び「該用語で接続された要素の全て若しくはその他のいずれかの組み合わせ」という意味を含む。

【0017】

本明細書で用いる「約」又は「およそ」という用語は、与えられた値又は範囲の20%以内、好ましくは10%以内、そしてより好ましくは5%以内であるということを意味する。

【0018】

「アミノ酸」及び「残基」という用語は同意である。これらの用語は、天然の、非天然の、及び/又は合成のアミノ酸を意味し、光学異性体であるD体又はL体、修飾アミノ酸、及びアミノ酸類似体を含む。

【0019】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書において交換可能に用いられ、ペプチド結合によって結合した9若しくは10個以上のアミノ酸を含んでなるアミノ酸残基のポリマーを意味する。このポリマーは、直鎖状、分岐鎖状、又は環状であってよく、天然のアミノ酸及び/又はアミノ酸類似体を含んでよく、非アミノ酸で区切られていてもよい。一般的な表記として、アミノ酸ポリマーが長鎖である場合(例: 50個超のアミノ酸残基)、ポリペプチド又はタンパク質と称することが好ましい。

【0020】

本発明に関連する範囲内において、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」、及び「ヌクレオチド配列」という用語は、交換可能に用いられ、ポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)(例:cDNA、ゲノムDNA、プラスミド、ベクター、ウイルスゲノム、単離DNA、プローブ、プライマー、及びこれらのいずれかの組み合わせ)、若しく

10

20

30

40

50

はポリリボヌクレオチド(RNA)分子(例:mRNA、アンチセンスRNA)、又は混合したポリリボヌクレオチド ポリデオキシリボヌクレオチドのいかなる長さでもよいポリマーを意味する。これらは、一本鎖若しくは二本鎖、直鎖状若しくは環状、天然若しくは合成のポリヌクレオチドを包含する。さらに、ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの非天然ヌクレオチドを含んでいてもよく(修飾の例として、USS5, 525, 711、US4, 711, 955、EPA302175、を参照)、非ヌクレオチド成分で区切られていてもよい。ヌクレオチドの修飾は、存在する場合は、重合の前に付与しても後に付与してもよい。

【0021】

本明細書で用いる「含んでなる(comprising)」という用語は、生成物、組成物、及び方法の定義に用いる場合、その生成物、組成物、及び方法が、示された化合物又は工程を有するが、それ以外も除外しない、という意味であることを意図している。「から本質的になる(consisting essentially of)」とは、その他の化合物又は工程で重要な意味を持つものは含まない、ということを意味するものとする。従って、列挙された化合物から本質的になる組成物は、微量不純物及び薬理学的に許容される担体は除外しない。「からなる(consisting of)」とは、微量成分であるその他の化合物又はわずかな構成要素であるその他の工程も、それ以上のものも除外する、ということを意味するものとする。例えば、ポリペプチドがアミノ酸配列「からなる」とは、そのポリペプチドが示されたアミノ酸配列以外のいかなるアミノ酸も含まない場合のことである。ポリペプチドがアミノ酸配列「から本質的になる」とは、そのアミノ酸配列に共に存在する追加的なアミノ酸残基が、数個、通常は約1乃至50個程度だけである場合のことである。ポリペプチドがアミノ酸配列を「含んでなる」とは、そのアミノ酸配列が、ポリペプチドの最終的なアミノ酸配列の少なくとも一部である場合のことである。そのようなポリペプチドは、数個から数百個の追加的なアミノ酸残基を有することができる。そのような追加的なアミノ酸残基は、とりわけ、ポリペプチドの輸送を担ったり、ポリペプチドの産生若しくは精製を促進したり、半減期を伸ばしたりすることなどができる。ヌクレオチド配列についても同じことが言える。

【0022】

本明細書で述べる、「単離された」という用語は、その天然の環境から精製若しくは取り出されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、又は核酸のことである。「精製された」という用語は、天然に共存する少なくとも1種類のその他の成分から分離されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、又は核酸のことである。

【0023】

「宿主細胞」という用語は、限定することなく、広い意味で理解されるべきであり、組織、器官、又は単離された細胞における特定の構成物に関する。このような細胞は、特有の種類の細胞、又は異なる種類の細胞の集団であってよく、培養細胞系、一次細胞、及び増殖性細胞を包含する。「宿主生物」という用語は、脊椎動物、特に、哺乳類に属する種類のことであり、特に、家畜、スポーツ用動物、及びヒトを含む靈長類のことである。

【0024】

「HPV」は、「ヒトパピローマウイルス」を意味する。その分類は、ゲノムの関連性に基づいている。現在のところ100を超える数のHPV遺伝子型が確認されており、単離された時系列順に従って番号が付与されている。慣例的に、オープンリーディングフレームE6、E7、及びL1を有するゲノムの約2000ヌクレオチドの長さの部分での互いの同一性が90%未満となる場合、2個の単離物は異なった種類から成る。入手可能なヌクレオチド配列を並べ合わせることによって、系統樹が構築された(Van Rans et al., 1992, J. Gen. Virol. 73, 2653; De Villiers et al., 2004, Virology 324, 17-27)。

【0025】

本明細書で用いる「初期ポリペプチド」という用語は、好ましくはE1、E2、E3、E4、E5、E6、及びE7ポリペプチドから成る群より選択される、本技術分野で認識

10

20

30

40

50

される非構造タンパク質のことである。本発明に関連して、本発明に従って用いられる組成物に含まれるか、又はその組成物に含まれる核酸によってコードされる1若しくは2種類以上の初期ポリペプチドは、H P V 18由来のものである。「由来する」という用語は、単離された、クローン化された、誘導体化された、又は関連した、という意味である。従って、本発明によると、1若しくは2種類以上のH P V 18初期ポリペプチドは、天然初期H P V 18ポリペプチド由来であってもよく、その誘導体由来であってもよい。「天然初期H P V 18ポリペプチド」という用語は、自然源で見られる若しくはそこから単離することができるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドのことであり、実験室で人の手によって人工的に修飾又は変性されたものとは異なる。そのような自然源としては、生物サンプル（例：H P V 18の感染患者からの血液、血漿、血清、膿内液及び子宮頸管液、組織切片、生体組織、婦人科サンプル）、培養細胞、並びに組換え物質（例：H P V 18ウイルス又はゲノム、ゲノムライブラリー又はc D N Aライブラリー、H P V 18ゲノムの断片を含むプラスミド、組換え初期H P V 18ポリペプチド、など）が挙げられる。従って、「天然初期H P V 18ポリペプチド」という用語は、天然由来の初期H P V 18ポリペプチド及びその断片を含むであろう。断片は、少なくとも9アミノ酸残基であることが好ましく、少なくとも1個の免疫原性エピトープ、特にTエピトープを含んでなる。このような断片は、単独で、又は組み合わせて（例：融合して）用いることができる。H P V 18初期遺伝子／ポリペプチドのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は文献に記載されており、専門のデータバンク、例えばG e n b a n kにおいて、各々、N C _ 0 0 1 3 5 7 及びX 0 5 0 1 5 の受託番号で入手可能である。しかし、天然初期H P V 18ポリペプチドはこれらの典型的な配列に限定されない。実際、アミノ酸配列は、別々のH P V 18の単離物間で異なる場合があり、この自然の遺伝的変異の範囲も、本発明の範囲に含まれる。

10

20

30

40

【0026】

初期H P V 18ポリペプチドの誘導体は、天然H P V 18初期ポリペプチドに対して、以下に示すような1若しくは2箇所以上の修飾（改変）を含む。修飾は、変異及び／若しくは化学部分の付加（例：アルキル化、アセチル化、アミド化、リン酸化など）という方法、又は一部分の標識という方法によって行うことができる。変異としては、1若しくは2個以上のアミノ酸残基の欠失、置換、若しくは付加、又はこれらの可能性のいずれかの組み合わせが挙げられる。いくつかの修飾を意図する場合は、連続する残基及び／又は非連続の残基を対象にすることができる。修飾は、部位特異的変異誘発（例：フランス、L e s U l l i s、A m e r s h a mのS c u l p t o r（商標）インビトロ変異誘発システムを用いる）、P C R変異誘発、及びD N Aシャフリングなど、当業者に公知である数多くの方法で行なうことができる。

【0027】

修飾された初期H P V 18ポリペプチドは、有利に、その完全長アミノ酸配列、又はそのより短い断片（例：少なくとも9、20、30、40、50、100アミノ酸の長さ）にわたって、対応する天然初期H P V 18ポリペプチドに対して高度のアミノ酸配列同一性を保持し、それは75%超、有利には80%超、望ましくは85%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、さらにより好ましくは97%超（例：配列同一性100%）である。2個のポリペプチド間の同一性パーセントは、これらの配列が共有する同一部位の数の関数であり、最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数と各ギャップの長さが考慮されている。本技術分野において、アミノ酸配列間の同一性パーセントを算出する様々なコンピュータプログラム及び数学アルゴリズムが入手可能であり、例えば、N C B Iで入手可能なW 2 H H U S A Rソフトウェア及びB l a s tプログラム（例：A l t s c h u l e t a l . , 1 9 9 7 , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 , 3 3 8 9 3 4 0 2 ; A l t s c h u l e t a l . , 2 0 0 5 , F E B S J . 2 7 2 , 5 1 0 1 5 1 0 9 ）などがある。

【0028】

本発明に従って使用する修飾された初期H P V 18ポリペプチドは、細胞性免疫反応

50

を刺激する能力などの、天然初期H P V 18 ポリペプチドの免疫原性作用を保持することが望ましい。

【0029】

一つの態様では、組成物を用いて、H P V 18 以外の少なくとも1種類のH P V 遺伝子型に起因する、特に肛門生殖器の管部、皮膚、若しくは口腔におけるH P V の感染及び/又は病理状態を治療する。一つの局面では、少なくとも1種類のヒトパピローマウイルスのゲノムは、H P V 18 ゲノムのE 6 又はE 7 ポリペプチドをコードする部分とのヌクレオチド配列の同一性が、90%未満であり、有利には87%未満、そして望ましくは86%未満であるが、50%超であり、有利には55%超であり、そして望ましくは60%超である。完全なH P V 18 E 6 又はE 7 のO R F に対して、おおよそ61%乃至おおよそ86%の同一性を共有することが好ましい。H P V ゲノムの部分間の同一性パーセントは、これらの2個の配列が共有する同一部位の数の関数であり、最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数と各ギャップの長さが考慮されている。本技術分野において、ヌクレオチド配列間の同一性パーセントを算出する様々なコンピュータプログラム及び数学アルゴリズムが入手可能である。そのようなH P V 遺伝子型の代表例としては、H P V 13、H P V 18、H P V 30、H P V 32、H P V 39、H P V 40、H P V 42、H P V 44、H P V 45、H P V 51、H P V 56、H P V 59、H P V 61、H P V 64、H P V 68、H P V 70、及びH P V 85 が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0030】

H P V 18 以外の少なくとも1種類のヒトパピローマウイルスとしては、H P V 39、H P V 45、H P V 51、H P V 56、H P V 59、H P V 68、H P V 70、及びH P V 85 から成る群、又はこれらの可能な組み合わせから選択されることが好ましく、特にH P V 45 が好ましい。これらのH P V 遺伝子型のヌクレオチド及びアミノ酸配列は文献に記載されており、表1に示すように、専門のデータバンクで入手可能である。

20

【0031】

表1：Genbank アクセション番号

【表1】

30

HPV18	X05015
HPV 39	M62849
HPV 45	X74479
HPV 51	NC_001533
HPV 56	X74483
HPV 59	NC_001635 (X77858)
HPV 68	X67161
HPV-70	U21941
HPV-85	AF131950

40

【0032】

別の態様では、本発明に従って使用される組成物は、H P V 18 E 6 ポリペプチド、H P V 18 E 7 ポリペプチド、若しくはH P V 18 E 6 ポリペプチド及びH P V 18 E 7 ポリペプチドの両方を、含んでなるか、又はコードする。上記で取り上げた

50

E 6 及び E 7 ポリペプチドの形質変化力に関する報告を考慮すると、各々、細胞腫瘍抑制遺伝子産物である p 5 3 及び R b との相互作用に関する領域において変異された非発癌性の変異体である修飾された H P V 1 8 E 6 及び / 又は E 7 ポリペプチドを用いることが好ましい。本発明は、 p 5 3 への結合性が変性されたか若しくは少なくとも著しく低減された H P V 1 8 E 6 ポリペプチドの使用、及び / 又は、 R b への結合性が変性されたか若しくは少なくとも著しく低減された H P V 1 8 E 7 ポリペプチド (Pim et al., 1994, Oncogene 9, 1869-1876; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446) の使用を包含する。本発明の目的に適した非発癌性である H P V 1 8 E 6 変異体は、おおよそ 1 1 3 位乃至おおよそ 1 1 7 位 (天然 H P V 1 8 E 6 ポリペプチドの第一番目のメチオニン残基から始めて) に位置する 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸残基が欠失しており、 1 1 3 乃至 1 1 7 の残基が完全に欠失していることが特に好ましい (NPAEK)。最も好ましい非発癌性である H P V 1 8 E 6 ポリペプチド変異体は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列と相同的若しくは同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は別の選択肢として本質的にそれからなるか、又は別の選択肢としてそれからなるものである。本発明の目的に適した非発癌性である H P V 1 8 E 7 変異体は、おおよそ 2 4 位乃至おおよそ 2 8 位 (+ 1 を天然 H P V 1 8 E 7 ポリペプチドの第一番目のアミノ酸とする) に位置する 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸残基が欠失しており、 2 4 乃至 2 8 の残基が完全に欠失していることが特に好ましい (DLLCH)。最も好ましい非発癌性である H P V 1 8 E 7 ポリペプチド変異体は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列と相同的若しくは同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は別の選択肢として本質的にそれからなるか、又は別の選択肢としてそれからなるものである。

【 0 0 3 3 】

好ましい局面では、本発明で用いる 1 若しくは 2 種類以上の H P V 1 8 初期ポリペプチドは、 M H C クラス I 及び / 若しくは M H C クラス I I による提示を改善するために、並びに / 又は、抗 H P V 免疫を刺激するために、さらに修飾される。 H P V 1 8 E 6 及び E 7 ポリペプチドは核タンパク質であり、対応する H P V 1 6 のポリペプチドの治療効果は、膜提示 (membrane presentation) によって向上されることがすでに示されている (例えば、 W O 9 9 / 0 3 8 8 5 を参照)。従って、少なくとも 1 種類の H P V 1 8 初期ポリペプチドを修飾して細胞膜にアンカーされるようになることが得策であろう。膜へのアンカリングは、膜アンカー配列 (membrane anchoring sequence) を H P V 1 8 初期ポリペプチドへ組み込むことによって容易に達成され、天然ポリペプチドがそれを有さない場合は、分泌配列 (すなわち、シグナルペプチド) が組み込まれる。 H P V 1 8 E 6 及び / 又は E 7 ポリペプチドは、膜アンカー配列及び分泌配列を組み込むことによって修飾されることが好ましい。膜アンカー配列及び分泌配列は本技術分野で公知である。簡単に述べると、分泌配列は、膜提示された、又は分泌されたポリペプチドの N 末端に存在し、その小胞体 (ER) への移行を開始させる。配列は通常 1 5 乃至 3 5 の実質的に疎水性であるアミノ酸を含んでなるが、これらは、次に、 ER に存在する特定のエンドペプチダーゼによって除去され、成熟ポリペプチドを生成する。膜アンカー配列は、通常、疎水性が高いという性質を持ち、ポリペプチドを細胞膜へアンカーする働きを有する (例えば、 Branden and Tooze, 1991, in Introduction to Protein Structure p. 202-214, NY Garland)。

【 0 0 3 4 】

本発明に関連して用いることができる膜アンカー配列及び分泌配列の選択肢は膨大である。これらの配列は、狂犬病ウイルスの糖タンパク質、 H I V ウィルスの外被糖タンパク質、麻疹ウイルスの F タンパク質など、その配列を含んでなる、膜へアンカーされた及び / 又は分泌されたいかなるポリペプチド (例：細胞ポリペプチド又はウイルスポリペプチド) からも得ることができ、あるいは合成されたものでもよい。本発明に従って用いられる初期 H P V 1 8 ポリペプチドの各々に挿入された膜アンカー配列及び / 又は分泌配列

10

20

30

40

50

の由来は、共通であっても異なっていてもよい。分泌配列の挿入部位は、翻訳開始コドンの下流側のN末端が好ましく、膜アンカー配列の挿入部位は、例えば停止コドンのすぐ上流側などのC末端が好ましい。さらに、リンカーペプチドを用いて、本発明に用いる初期HPV 18ポリペプチドへ分泌配列を結合することができ、又は、初期HPV 18ポリペプチドを膜アンカー配列へ結合することもできる。リンカーペプチドは本技術分野で公知である。通常、リンカーペプチドは2乃至20個のアミノ酸を含み、アラニン、グリシン、プロリン、及び/又はセリンを含む。

【0035】

本発明で用いるHPV 18 E6ポリペプチドは、麻疹ウイルスのFタンパク質の分泌シグナル及び膜アンカーシグナルを挿入することによって修飾されることが好ましく、特に、配列番号3に示すアミノ酸配列と相同的若しくは同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は別の選択肢として本質的にそれからなるか、又は別の選択肢としてそれからなるポリペプチドが好ましい。任意に、若しくは組み合わせて、本発明で用いるHPV 18 E7ポリペプチドは、狂犬病ウイルスの糖タンパク質の分泌シグナル及び膜アンカーシグナルを挿入することによって修飾されることが好ましく、特に、配列番号4に示すアミノ酸配列と相同的若しくは同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は別の選択肢としてそれからなるポリペプチドが好ましい。

【0036】

別の、そしてより好ましい局面では、1若しくは2種類以上の免疫賦活薬であるポリペプチド、又はそのような免疫賦活薬であるポリペプチドをコードする1若しくは2種類以上の核酸を用いることによって、本発明で用いる組成物の治療効果を向上させることもできる。例えば、HPV 18初期ポリペプチドを、カルレティキュリン(Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678)、マイコバクテリウムツベルクローシス(Mycobacterium tuberculosis)熱ショックタンパク質70(HSP70)(Chen et al., 2000, Cancer Res. 60, 1035-1042)、ユビキチン(Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71, 8497-8503)、又はシュードモナスエルジノーサ(Pseudomonas aeruginosa)外毒素Aの転座領域(translocation domain)(ETA(dIII))(Huang et al., 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703)などの細菌性毒素、などといったポリペプチドと結合させることが有利である場合もある。別の選択肢として、本発明で用いる組成物は、サイトカイン、又はサイトカインをコードする核酸をさらに含んでなることができる。適切なサイトカインとしては、これらに限定されないが、(IL) 2、IL 7、IL 15、IL 18、IL 21、及びIFNgが挙げられ、特にIL 2が好ましい。

【0037】

別の、そして好ましい態様によると、本発明に従って用いる組成物は、上記で示すように、1又は2種類以上のHPV 18初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる。好ましくは：

配列番号1若しくは配列番号3に示すアミノ酸配列と相同的若しくは同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は別の選択肢として本質的にそれからなるか、又は別の選択肢としてそれからなるHPV 18 E6ポリペプチド；及び、

配列番号2若しくは配列番号4に示すアミノ酸配列と相同的若しくは同一であるアミノ酸配列を含んでなるか、又は別の選択肢として本質的にそれからなるか、又は別の選択肢としてそれからなるHPV 18 E7ポリペプチド、

を少なくともコードする核酸である。

【0038】

必要に応じて、本発明に用いる核酸分子は、例えばヒト宿主細胞若しくは人体など、特定の宿主細胞若しくは生物中でのHPV 18初期ポリペプチドの発現が高レベルとなる

10

20

30

40

50

ように最適化することができる。通常、哺乳類宿主細胞中であまり使われないコドンに対応する1若しくは2個の「天然の」(例:HPV)コドンを、同じアミノ酸をコードするより頻繁に使用される1若しくは2個のコドンで置換することによってコドン最適化を行う。これは、従来の変異誘発又は化学合成技術(例:合成核酸を得る結果となる)によって達成することができる。一部分の置換でも発現の増加を達成することができるため、あまり使われないコドンに対応する天然コドンすべてを置換する必要はない。さらに、制限部位の導入に適応するために、最適化コドンの使用に厳密に沿った方法からの若干の変形も可能である。

【0039】

本発明で用いるHPV 18初期ポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞又は生物中での発現に適した形態であることが好ましく、このことは、E6ポリペプチドをコードする核酸配列及び/又はE7ポリペプチドをコードする核酸配列が、宿主細胞又は生物中での発現に必要な1若しくは2種類以上の調節エレメントの支配下に置かれることを意味している。本明細書で用いる「調節エレメント」という用語は、複製、重複化、転写、スプライシング、翻訳、安定化、及び/又は核酸若しくはその誘導体の一つの(すなわち、mRNA)の宿主細胞への輸送を含む、任意の宿主細胞中の核酸の発現を可能にしたり、又はこれに寄与したり、又はこれを調節したりするいかなる配列をも意味する。調節エレメントの選択が、宿主細胞、ベクター、及び所望の発現レベルなどの要因に依存し得ることは、当業者には理解されるであろう。

10

【0040】

プロモーターは特に重要であり、本発明は、多くの種類の宿主細胞中で核酸の発現を指令する構成的プロモーター、及び特定の宿主細胞中のみでの発現、又は特定の現象若しくは外的要因(例:温度、栄養添加剤、ホルモン、又はその他のリガンド)に反応しての発現だけを指令する構成的プロモーターの使用を包含する。適切なプロモーターは文献に広く記載されており、より詳細には、RSV(ラウス肉腫ウイルス)、SV40(サルウイルス40)、CMV(サイトメガロウイルス)、及びMLP(主要後期プロモーター)プロモーターなどのウイルスプロモーターを挙げることができる。ポックスベクターに用いられる好ましいプロモーターとしては、これらに限定されないが、ワクシニアプロモーターである7.5K、H5R、TK、p28、p11、及びK1L、初期及び後期ポックスウイルスプロモーターの間であるキメラプロモーター、並びに、Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23, 1094-1097)、Hammond et al. (1997, J. Virological Methods 66, 135-138)、及び、Kumar and Boyle (1990, Virology 179, 151-158)、に記載のものなどの合成プロモーターが挙げられる。

20

30

【0041】

当業者であれば、核酸の発現を制御する調節エレメントが、宿主細胞又は生物中の、転写(例:ポリA転写終結配列)、mRNA輸送(例:核移行シグナル配列)、プロセッシング(例:スプライシングシグナル)、安定化(例:イントロン、並びに非コード5'及び3'配列)、及び翻訳(例:三連リーダー配列(tripartite leader sequence)、リボソーム結合部位、シャインダルガノ配列、など)の適切な開始、調節、及び/又は終結のための追加的なエレメントをさらに含んでなることができることは理解されるであろう。

40

【0042】

別の好ましい態様によると、本発明に従って用いられる核酸は、ベクター中に含まれる。本明細書で用いる「ベクター」という用語は、ウイルスベクター並びに非ウイルスベクター(例:プラスミドDNA)を意味し、染色体外ベクター(例:エピソーム)、多コピーベクター、及び組み込みベクター(すなわち、宿主染色体に組み込まれるベクター)を含む。本発明に関連して特に重要であるのは、遺伝子治療ベクター(すなわち、核酸を宿主生物へ送達することができるベクター)、並びに種々の発現系に用いられる発現ベクタ

50

ーである。適切な非ウイルスベクターとしては、pREP4、pCEP4 (Invitrogen)、pCI (Promega)。pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840)、pVAX、及びpgWiz (Gene Therapy System Inc.; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76, 12735-12746)などのプラスミドが挙げられる。適切なウイルスベクターは、種々の異なるウイルス（例：レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、泡状ウイルス、など）から誘導することができる。本明細書で用いる「ウイルスベクター」という用語は、ベクターDNA並びにそれから産生されたウイルス粒子を包含する。ウイルスベクターは自己複製型であっても、又は遺伝子的な無能化による複製欠損型若しくは複製障害型であってもよい。本発明で用いる「自己複製型」という用語は、複製性の向上又は特定の宿主細胞中（例：腫瘍細胞）での選択的な複製のために遺伝子操作された選択的複製型、及び条件複製型のウイルスベクターを包含する。

10

【0043】

一つの局面では、本発明で用いるベクターは、アデノウイルスベクターである（概説として、"Adenoviral vectors for gene therapy" , 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Pressを参照）。このベクターは、種々のヒト又は動物源から誘導することができ、アデノウイルス血清型1乃至51のいずれの血清型も用いることができる。特に好ましいのは、ヒトアデノウイルス2型(Ad2)、5型(Ad5)、6型(Ad6)、11型(Ad11)、24型(Ad24)、及び35型(Ad35)である。このようなアデノウイルスは、American Type Culture Collection (ATCC、メリーランド州、Rockville)から入手可能であり、数多くの刊行物の主題としてその配列、構成、及び作製方法が述べられており、当業者はこれらを利用することができる（例えば、US6,133,028; US6,110,735; WO02/40665; WO00/50573; EP1016711; Vogels et al., 2003, J. Virol. 77, 8263-8271、を参照）。

20

【0044】

本発明で用いるアデノウイルスベクターは、自己複製型であってよい。自己複製型アデノウイルスの数多くの例が、当業者には容易に入手可能である（Hernandez Alcocer et al., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis et al., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany et al., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727）。例えば、E1A CR2領域中の欠失（例：WO00/24408）、並びに/又は、天然E1及び/若しくはE4プロモーターの組織特異的、腫瘍特異的、若しくは細胞状態に特異的なプロモーターによる置換により、野生型アデノウイルスゲノムから遺伝子操作することができる（例：US5,998,205、WO99/25860、US5,698,443、WO00/46355、WO00/15820、及びWO01/36650）。

30

【0045】

別の選択肢として、本発明で用いるアデノウイルスベクターは、複製欠損型である（例えば、WO94/28152; Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032参照）。好ましい複製欠損型のアデノウイルスベクターは、E1欠失がおよそ459位乃至3328位、又はおよそ459位乃至3510位にわたる（受託番号M73260でGeneBankに、及びChroboczek et al., 1992, Virol. 186, 280-285に開示されるヒトアデノウイルス5型の配列を基準にして）E1欠損型である（例：US6,136,594、及びUS6,013,638）。アデノウイルスゲノムの一部（非必須のE3領域、又は他の必須であるE2、E4領域の全部若しくは一部）をさらに欠失させることによって、クローニング能力をさらに向上させることができる。核酸の挿入は、Chartier et al

40

50

. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810) に記載のように、アデノウイルスゲノムのいずれかの部位における相同組換えによって行うことができる。例えば、HPV 18 E6 ポリペプチドをコードする核酸を E1 領域に置き換えて、及び HPV 18 E7 ポリペプチドをコードする核酸を E3 領域に置き換えて挿入することができ、又はその逆も可能である。

【0046】

別の、そして好ましい局面では、本発明で用いるベクターは、ポックスウイルスベクターである（例えば、Cox et al. in "Viruses in Human Gene Therapy" Ed. J. M. Hos, Carolina Academic Press を参照）。ポックスウイルス科に属するいかなる種類からも得ることができるが、特に、カナリアポックス、鶏痘、及びワクシニアウイルスであり、後者が好ましい。適切なワクシニアウイルスとしては、これらに限定されないが、コペンハーゲン株 (Goebel et al., 1990, Virol. 179, 247-266 and 517-563; Johnson et al., 1993, Virol. 196, 381-401)、ワイス株 (Wyeth strain)、及び非常に弱毒化された修飾アンカラ (Ankara) (MVA) 株 (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16) である。MVA ゲノムの完全な配列の同定及びコペンハーゲンゲノムとの比較により、MVA ゲノム中で 7箇所の欠失 (I から VII) が発生していることが正確に識別されており (Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396)、そのいずれをも用いて、HPV 18 初期ポリペプチドをコードする核酸を挿入することができる。10

【0047】

発現に必要な核酸及び関連する調節エレメントをポックスウイルスゲノムへ挿入する基本技術は、数多くの文献に記載されており、当業者が入手可能である (Paul et al., 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini et al., 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; US4,769,330; US4,772,848; US4,603,112; US5,100,587、及びUS5,179,993)。通常は、ウイルスゲノムと挿入核酸を有するプラスミドとの両方に存在するオーバーラップ配列間の相同組換え（すなわち、所望の挿入部位を隣接させる）によって行われる。20

【0048】

核酸は、組換えポックスウイルスが生存し、感染性を保持するように、ポックスウイルスゲノムの非必須遺伝子座位に挿入することが好ましい。非必須領域は、非コード遺伝子間領域か、又は、不活性化若しくは欠失がウイルスの増殖、複製、若しくは感染性を著しく悪化させることのない遺伝子である。例えば、ポックスウイルスゲノムの欠失された配列に対応する相補配列を有するヘルパー細胞系を用いることなどによって、欠損した機能がウイルス粒子産生の途中で提供されるのであれば、必須ウイルス遺伝子座位への挿入も考慮してよい。30

【0049】

コペンハーゲンワクシニアウイルスを用いる場合、HPV 18 初期ポリペプチドをコードする核酸をチミジンキナーゼ遺伝子 (tk) 中へ挿入することが好ましい (Hruby et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3411-3415; Weir et al., 1983, J. Virol. 46, 530-537)。しかし、適切な挿入部位は他にもあり、例えば、赤血球凝集素遺伝子 (Guo et al., 1989, J. Virol. 63, 4189-4198)、K1L 遺伝子座位、u 遺伝子 (Zhou et al., 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190)、又は種々の自然欠失若しくは人工欠失が文献で報告されているワクシニアウイルスゲノムの左末端 (Altenburger et al., 1989, Archives Virol. 105, 15-27; Moss et al. 1981, J. Virol. 40, 387-395; Panicali et al., 1981, J. Virol. 41, 10-16) に挿入することができる。40

50

981, J. Virol. 37, 1000 1010; Perkus et al., 1
 989, J. Virol. 63, 3829 3836; Perkus et al., 1
 990, Virol. 179, 276 286; Perkus et al., 1991
 , Virol. 180, 406 410)などである。

【0050】

MVAを用いる場合、HPV 18初期ポリペプチドをコードする核酸は、識別されている欠失部位I乃至VIIのいずれか、並びにD4R遺伝子座位に挿入することができるが、欠失部位II又はIIIへの挿入が好ましい(Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031 1038; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032 1040)。 10

【0051】

鶏痘ウイルスを用いる場合、HPV 18初期ポリペプチドをコードする核酸は、チミジンキナーゼ遺伝子内への挿入も考えられるが、ORF7及び9の間に位置する遺伝子間領域へ導入することが好ましい(例えば、EP314569、及びUSS, 180, 675を参照)。

【0052】

上述のように、本発明で用いる組成物は、サイトカイン発現核酸をさらに含んでなることができる。その運搬体としては、1若しくは2種類以上のHPV 18初期ポリペプチドをコードするベクター、又は由来が同一であっても異なっていてもよい独立したベクターを用いることができる。 20

【0053】

本発明の好ましい態様は、7.5Kプロモーターの支配下に置かれたHPV 18 E6ポリペプチド、7.5Kプロモーターの支配下に置かれたHPV 18 E7ポリペプチド、及びH5Rプロモーターの支配下に置かれたヒトIL 2遺伝子をコードするMVAベクターを含んでなる組成物の使用に関する。好ましくは、HPV 18 E6ポリペプチド、HPV 18 E7ポリペプチド、及びヒトIL 2をコードする核酸は、MVAゲノムの欠失部位IIに挿入される。

【0054】

さらに、本発明で用いる組成物は、動物/ヒトの体内での分解を防ぐため、及び/又は、宿主細胞若しくは生物へのベクターのトランスフェクション/感染を促進するために、脂質(例:カチオン性脂質、リポソーム、WO98/44143に記載の脂質)、ヌクレアーゼ阻害剤、ハイドロゲル、ヒアルロニダーゼ(WO98/53853)、コラゲナーゼ、カチオン性ポリマー、多糖類、キレート化剤(EP890362)などの1若しくは2種類以上の安定化剤を含むことができる。このような安定化剤は、単独で用いても組み合わせて用いてもよい(例:カチオン性脂質と中性脂質)。 30

【0055】

上述の核酸又はベクターを含んでなる感染性ウイルス粒子は、所定のプロセスで作製することができる。典型的なプロセスは:

(a)ウイルスベクターを適切な細胞系へ導入する工程と、

(b)前記細胞系を適切な条件下で培養し、前記感染性ウイルス粒子を產生させる工程と、 40

(c)產生されたウイルス粒子を前記細胞系の培養物から回収する工程と、

(d)場合によっては、前記の回収された感染性ウイルス粒子を精製する工程と、を含んでなる。

【0056】

ウイルスベクターが複製欠損型である場合、感染性粒子は通常、トランス(in trans)で非機能性ウイルス遺伝子を提供する補完細胞系(complementation cell line)内で、又はヘルパーウイルスを用いることによって作製される。例えば、E1欠失アデノウイルスベクターを補完する適切な細胞系としては、293細胞(Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36, 59 50

72)、並びにPER C6細胞(Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917)が挙げられる。ポックスウイルスベクターの増殖に適した細胞はトリの細胞であり、最も好ましいのは、受精卵から得られたニワトリ胚から調製された初代ニワトリ線維芽細胞(CEF)である。

【0057】

感染性ウイルス粒子は、培養上清から、又は溶解後の細胞から(例:化学的手法、凍結/解凍、浸透圧ショック、機械的ショック、超音波処理、などによる)回収することができる。ウイルス粒子は、ブラーク精製を連続して行うことで単離し、その後、本技術分野の技術(クロマトグラフィー法、塩化セシウム若しくはショ糖勾配上での超遠心)を用いて精製することができる。

10

【0058】

本発明は、特定の標的宿主細胞が優先的に標的とされるように修飾されたベクター又はウイルス粒子の使用も包含する(例えば、Wickam et al., 1997, J. Virol. 71, 8221-8229; Arnberg et al., 1997, J. Virol. 71, 239-244; Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668; WO94/10323; WO02/96939、及びEP1146125、参照)。標的化されたベクター及びウイルス粒子に特有の特徴は、その表面に、細胞特異的マーカー(例:HPV感染細胞)、組織特異的マーカー(例:子宮頸部に特異的なマーカー)、並びにウイルス(例:HPV)抗原などの表面に露出した細胞性成分を認識してこれに結合する能力を有するリガンドが存在することである。適切なリガンドの例としては、HPVの抗原性ドメインに対する抗体又はその断片が挙げられる。リガンドは、通常、ウイルス表面に存在するポリペプチド中(例:アデノウイルス線維、ペントン、pIX、又はワクシニアp14遺伝子産物)へ遺伝子的に挿入される。

20

【0059】

本発明で用いる組成物は、適切ないかなる方法でも作製することができ、例えば、標準的な直接ペプチド合成技術(例:Bodanszky, 1984 in Principles of peptide synthesis, Springer Verlag)、及び適切な宿主細胞中の組換えDNA技術が挙げられる。例えば、HPV 18 E6及びE7初期ポリペプチドをコードする核酸は、HPV含有細胞、cDNA及びゲノムライブリー、ウイルスゲノム、又はその核酸を含有することが公知の先行技術のいかなるベクターからも、従来の分子生物学又はPCR技術によって直接単離することができる。必要であれば、核酸はさらに、所定の変異誘発技術によって修飾することもできる。別の選択肢として、本発明で用いる核酸は、自動化プロセスによる化学合成によって作製することもできる(例:例えば、Edge, 1981, Nature 292, 756; Nambair et al., 1984, Science 223, 1299; Jay et al., 1984, J. Biol. Chem. 259, 6311、に記載のように、重複合成オリゴヌクレオチド(overlapping synthetic oligonucleotide)からの構築)。当業者であれば、HPV 18初期ポリペプチドを適切な宿主細胞中で作製するのに使用可能な数多くの発現システム、及び宿主細胞へベクター又は感染性ウイルス粒子を導入する方法に精通している。

30

【0060】

本発明に従う組成物の好ましい使用は、種々の疾患及び病理状態、特にその中でも、上記で挙げたHPV遺伝子型の少なくとも1種類に起因するHPV感染と関連するものを治療するための使用である。本発明は予防についても包含するが、特に治療に有用であり、例えば、HPV持続感染の治療、HPV感染患者に発症することのある前癌状態並びに癌状態の治療などである。HPVに関連する癌状態の例としては、子宮頸癌、肛門癌、及び口腔癌が挙げられる。HPVに関連する前癌状態は、子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)のグレード1、2、又は3を含む、軽度病変から重度病変に及ぶ。

40

【0061】

50

本明細書で述べるモダリティに従った宿主生物への投与により、本発明の組成物は治療を受けた宿主生物へ治療上の利点をもたらす。治療上の利点は、治療前と比較することにより数多くの方法で立証することができ、例えば、集団レベルでは、H P V 感染の頻度の減少やH P V 感染と通常関連する病理状態の進行の遅延（例：C I N 病変若しくは子宮頸癌の進行の遅延）によって、又は、個人レベルでは、H P V ウイルス血症の減少、及び／若しくはウイルス遺伝子発現の阻害（例：H P V E 6 若しくはE 7 を発現するR N A の減少）、及び／若しくは臨床成績の改善（例：H P V に関連する病変の安定化、部分的若しくは完全な回復）、及び／若しくは液性であれ、細胞性であれ、若しくはその両方であれ、抗H P V 反応を高める結果となる免疫システムの刺激（例：抗H P V 抗体及び／若しくはT 細胞性免疫の産生）、及び／若しくは、従来の治療に対するその宿主生物の反応の改善によって立証することができる。例えば、本発明に従って用いられる組成物は、H P V 陽性の女性への投与に統いて、（i）1 若しくは2 回以上の陽性の検出に統いてH P V 陰性が検出された場合、（ii）重度であるC I N 2 / 3 グレードの病変が軽度であるC I N 1 グレードへ軽減された場合、又は（iii）浸潤性子宮頸癌の安定化若しくは軽減が見られた場合に、利点をもたらすことになる。治療後は、少なくとも6 ヶ月間にわたる患者の定期的な経過観察を行うことが望ましい。

【0062】

H P V の存在は、生物学的液体中（例：膣内液又は子宮頸管液、血液、血清、血漿）、従来の子宮頸部サンプリングデバイスで採取した婦人科サンプル中、組織切片中において、及び生体組織中において確認することができる。サンプル中にあるH P V のD N A 及びR N A の存在を評価する様々な方法が当業者にとって使用可能であり、例えば、L i P A システム（W O 9 9 / 1 4 3 7 7 ; L a b o B i o m e d i c a l p r o d u c t s 、オランダ）、P r e T e c t H P V P r o o f e r （N o r C h i p A S 、ノルウェイ）、H y b r i d C a p t u r e I I システム（D i g e n e C o r p . 、U S A ）、T h i n P r e p システム（C y t y c C o r p o r a t e 、マサチューセッツ州、M a r l b o r o u g h ）、及びP C R / R T P C R システムなどである。適切なプライマーは、当業者に公知であり、又は対象であるH P V 遺伝子型のヌクレオチド配列に基づいて容易に合成することができる。適切な抗体を用いた免疫原性アッセイ（例：E L I S A ）によって行ってもよい。H P V に起因する病変の軽減又は安定化は、一定の期間にわたって病変部の実際の大きさを測定することによって確認することができる。一定期間にわたる病変部の大きさは、直接観察（例：コルポスコピー）、放射線画像法、免疫画像法、又は超音波法を用いて評価することができる。さらに、種々のインビトロの方法を用いて宿主生物中のH P V に関連する病変の安定化又は軽減を予測することができ、例えば、異型細胞の存在を推定する細胞学的解析、及び組織学的解析などである。抗H P V 免疫反応の刺激の推定は、免疫反応を誘発又は刺激するための組成物の使用に関連して下記で述べるような多くの通常の技術によって行うことができる。

【0063】

適切に、本発明の組成物は薬理学的に許容される媒体（v e h i c l e ）をさらに含み、医薬組成物を提供する。本明細書で用いる「薬理学的に許容される媒体」とは、医薬投与に適合するあらゆる担体、溶媒、希釈剤、賦形剤、アジュバント、分散媒、被覆剤、抗菌剤及び抗真菌剤、並びに吸収遅延剤などを含むことを意図したものである。組成物に含まれる薬理学的に許容される媒体は、さらに、製造、及び凍結温度（例：- 7 0 、- 2 0 ）、冷蔵温度（例：4 ）、若しくは室温（例：2 0 ）における、又は凍結乾燥状態での長期保存（すなわち、少なくとも1 ヶ月）の条件下でその安定性を保持させるものでなければならない。

【0064】

本発明で用いる組成物は、ヒトへの使用に適するように生理的p H 又はわずかに塩基性のp H （例：約p H 7 乃至約p H 9 の間）に適切に緩衝される。適切なバッファーとしては、リン酸バッファー（例；P B S ）、重炭酸バッファー、及び／又はトリスバッファーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

さらに、組成物は、ヒト又は動物への使用に適した希釈剤を含んでもよい。そのような希釈剤は、等張性、低張性、又は弱い高張性であることが好ましく、イオン強度は比較的低いことが好ましい。代表例としては、滅菌水、生理食塩水（例：塩化ナトリウム）、リンゲル液、グルコース、トレハロース、若しくはショ糖の溶液、ハンクス液、及びその他の生理的平衡塩類水溶液（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins、の最新版を参照）が挙げられる。

【0066】

組成物は、例えば、浸透圧モル濃度、粘度、透明性、色、無菌性、安定性、製剤溶解速度の改変又は維持、ヒト若しくは動物の生物内への放出若しくは吸収の改変又は維持、血液閥門を通っての輸送若しくは特定の器官（例：肝臓）への透過の促進などを含む、所望の医薬的若しくは薬力学的特性を与えるために、その他の薬理学的に許容される賦形剤を含有してもよい。適切な賦形剤にはアミノ酸が含まれる。

10

【0067】

さらに、組成物は、ヒトの全身若しくは粘膜投与に適した従来のアジュvantと組み合わせて使用してもよい。

【0068】

組成物は、全身、局所、及び局部投与を含む種々の投与方法によって宿主生物へ投与することができる。適切な投与経路としては、これらに限定されないが、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内、腫瘍内、血管内、及び動脈内注射が挙げられる。注射による投与は、従来のシリンジと針により、又は本技術分野で使用可能なその他の適切ないかなるデバイスによっても行うことができる。別の選択肢として、経口／経消化管、経鼻、気管内、肺内、腔内、又は直腸内経路など、粘膜経路によって投与することもできる。局所投与は、経皮的手法で行うこともできる（例：パッチなど）。本発明に関連しては、筋肉内及び皮下投与が好ましい経路である。投与は、1回の用量で行ってもよく、又は1日乃至1年といった範囲の所定の間隔を置いて1回若しくは数回投与を繰り返す用量で行ってもよい。投与間隔は、1週間乃至1ヶ月程度が望ましい。

20

【0069】

適切な投与量は、種々のパラメータ、特に、投与方法、使用する組成物、宿主生物の年齢、健康状態、及び体重、症状の性質及び程度、併用中の治療法の種類、治療の頻度、並びに／又は予防若しくは治療の必要性に応じて適応させることができる。適切な用量を決定するのに必要なさらに精密な計算は、関連する状況を考慮して、医師が日常的に行う。一般的な指針としては、ワクシニア含有組成物の適切な用量は、約 10^4 乃至 10^9 p f u（ブラーク形成単位）の範囲であり、約 10^5 乃至 10^8 p f uが望ましく、一方、アデノウイルス含有組成物の場合は、約 10^5 乃至 10^{13} i u（感染単位）の範囲であり、約 10^7 乃至 10^{11} i uが望ましい。ベクタープラスマミド主体の組成物は、 $10\text{ }\mu\text{g}$ 及び 20 mg の間の用量で投与することができ、有利には、 $100\text{ }\mu\text{g}$ 及び 2 mg の間である。タンパク質組成物は、 10 ng 及び 20 mg の間の用量で投与することができ、特に好ましいのは、体重 1 kg あたり約 $0.1\text{ }\mu\text{g}$ 乃至 2 mg の用量である。

30

【0070】

好ましい態様では、本発明で用いる組成物は、上述のMVAベクターを含んでなり、 5×10^5 p f u乃至 5×10^7 p f uの用量で、1週間の間隔で3回、皮下経路で投与される。

40

【0071】

所望する場合、本発明は、1又は2種類以上の治療モダリティ（例：放射線、化学療法、及び／又は外科手術）と組み合わせて使用することができる。複合的な治療手法によって、より幅広い治療介入が患者に対して施される。一つの態様では、本発明の方法に先立って、又は好ましくはそれに続いて、HPVと関連する病変部位の外科切除を行うことができる（例：円錐切除）。別の態様では、本発明の方法に先立って、又はそれに続いて、

50

放射線治療（例：ガンマ線）を行うことができる。当業者であれば、使用することができる適切な放射線治療のプロトコル及びパラメータを容易に構築することができる（例えば、Perez and Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co. 参照；当業者であれば容易に明らかであろう適切な適応及び変更を行う）。さらに別の態様では、本発明の方法又は使用は、HPV感染やHPVに関連する病理状態の治療又は予防に従来から用いられている1若しくは2種類以上の薬物を用いた化学療法と組み合わされる。

【0072】

組成物は、1若しくは2種類以上の初期HPV 16ポリペプチド、望ましくは、本技術分野で報告されているように、非発癌性に及び膜提示されるように修飾されが好ましいE6及び/又はE7 HPV 16ポリペプチド(WO99/03885参照)などの、その他のHPVポリペプチドと組み合わせて使用することもできる。HPV 16及びHPV 18のE6並びに/若しくはE7ポリペプチド、又はHPV 16及びHPV 18のE6並びに/若しくはE7ポリペプチドをコードする核酸を含んでなるこのような組成物は、HPV 39、HPV 45、HPV 51、HPV 56、HPV 59、HPV 68、HPV 70、及びHPV 85のいずれかに加えて、HPV 31、HPV 33、HPV 35、HPV 52、及びHPV 58のいずれか、又はこれらの組み合わせ（例：HPV 31とHPV 45）などの、HPV 16及びHPV 18以外の少なくとも1種類のパピローマウイルスに起因する感染又は病理状態を治療するのに特に有用であり得る。

10

20

30

30

【0073】

別の態様では、1若しくは2種類以上のプライミング組成物（初回組成物）(priming composition)、及び1若しくは2種類以上のブースティング組成物（追加組成物）(boosting composition)の逐次投与を含んでなるプライム・ブースト治療モダリティ(prime boost therapeutic modality)に従って、本発明が用いられる。通常、プライミング組成物及びブースティング組成物は、少なくとも一つの共通する免疫原性ドメインを含んでなるかコードする異なる媒体を使用する。プライミング組成物をまず宿主生物へ投与し、続いて、1日乃至12ヶ月の範囲のある期間の後に、ブースティング組成物を投与する。さらに、プライミング組成物及びブースティング組成物は、同一の部位に投与してもよく、又は、同じ投与経路若しくは異なる投与経路により、別々の部位に投与してもよい。例えば、HPV 18初期ポリペプチドを主体とするプライミング組成物を粘膜経路で投与することができ、一方、核酸ベクターを主体とするブースティング組成物を、好ましくは、例えばMVAベクターの皮下注射、DNAプラスミド及びアデノウイルスベクターの筋肉内注射などの注射によって投与する。

【0074】

本発明はさらに、HPV 18以外の少なくとも1種類のヒトパピローマウイルスに対する免疫反応を誘発又は刺激するための、1若しくは2種類以上のHPV 18初期ポリペプチド又はHPV 18初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物の使用に関する。本発明はさらに、HPV 18以外の少なくとも1種類のヒトパピローマウイルスに対する免疫反応を哺乳類中で誘発又は刺激するための方法に関し、その方法は、1若しくは2種類以上のHPV 18初期ポリペプチド又はHPV 18初期ポリペプチドをコードする核酸を含んでなる組成物を哺乳類に投与することを含んでなる。免疫反応は、HPV初期ポリペプチドに対する細胞免疫反応であることが好ましく、CD4+、CD8+、又はCD4+とCD8+の両方が媒介する免疫反応が好ましい。

40

【0075】

動物若しくはヒトである生物への投与によって抗HPV免疫反応を誘発又は刺激する能力は、本技術分野において標準的な種々のアッセイを用いて、インビトロ若しくはインビボで評価することができる。免疫反応の発生及び刺激を評価するのに使用可能な技術に関

50

する一般的な説明に関しては、例えば、Colligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J. Wiley & Sons Inc., National Institute of Health) を参照のこと。細胞免疫の測定は、CD4+ 及び CD8+ T 細胞から誘導されるものを含む活性化されたエフェクター細胞によって分泌されるサイトカインプロファイルの測定（例：エリスポットによる IL-10 又は IFNg 産生細胞の定量）、免疫エフェクター細胞の活性化状態の測定（例：古典的な [³H]チミジン取り込み試験による T 細胞増殖のアッセイ）、感作された対象中の抗原特異的 T リンパ球のアッセイ（例：細胞毒性アッセイにおけるペプチド特異的な溶解）、例えば ⁵¹Cr 放出アッセイによって測定されるリンパ球が媒介する抗腫瘍細胞溶解作用、によって行うことができる。体液性反応を刺激する能力は、抗体結合及び／若しくは結合の競争によって（例えば、Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press を参照）、又はインビトロでの腫瘍特異的抗体の媒介による細胞増殖の阻害の発生（Gazit et al., 1992, Cancer Immunol. Immunother. 35, 135-144）によって測定することができる。本発明の方法は、適切な腫瘍誘発剤（例：HPV 18 E6 及び E7 を発現する T C 1 細胞）を接種した動物モデルでの、抗 HPV 免疫反応の誘発又は刺激を反映する抗腫瘍活性を測定することによって、さらに実証することもできる。

10

【0076】

本発明を実例を挙げる形で説明してきたが、使用した用語は、限定のためではなく説明のための言葉の性質を有するものであることを意図していることは理解されるべきである。上述の教示内容に照らして、本発明の多くの変更、及び変形が可能であることは明らかである。従って、添付の請求項の範囲内において、本発明が、本明細書で具体的に述べるものとは異なる方法で実施することが可能であることは理解されるべきである。

20

【0077】

上記で引用したすべての特許、刊行物、及びデータベース入力事項の開示内容は、それらの特許、刊行物、又は入力事項の各々が参考することで組み入れられると特に個々に示されているのと同様に、その全てが参考することで本明細書に特に組み入れられる。

【0078】

以下の例によって本発明を例証する。

30

【実施例】

【0079】

実施例 1 : HPV 18 E6 及び E7 ポリペプチドを発現するウイルスの構築

以下に述べる構築は、Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY)、に詳細が述べられている一般的な遺伝子操作及び分子クローニング技術、又は、市販のキットを用いる場合は製造元の推奨事項に従って実施する。PCR 増幅技術は当業者に公知である (PCR protocols A guide to methods and applications, 1990, published by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press)。遺伝子組換えワクシニアウイルスの構築は、本技術分野における従来の技術に従って実施し、上記で引用した文献、並びにMackett et al. (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419)、及びMackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864) に記載されている。大腸菌の選択遺伝子 gpt (キサンチンギアニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ) (Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) を用いて、遺伝子組換えワクシニアウイルスの選択を促進する。

40

【0080】

HPV 18 E6 及び E7 ポリペプチドの膜にアンカーされた非発癌性変異体 (E6

50

* TMF 及び E 7 * TMR) を発現する遺伝子組換えMVAウイルスは、WO99/03885 及び US6,884,786 (HPV 16 E6 及び E7 ポリペプチドの膜にアンカーされた非発癌性変異体を発現するMVTG8042について記載) に記載のようにして構築することができる。好ましくは、HPV 18 遺伝子配列は、両方が p7.5K プロモーターの支配下に置かれ、MVAゲノムのexcision III 領域中へ挿入される。構築物が免疫賦活遺伝子を含む場合、H5R プロモーターによってもたらされるIL 2 遺伝子が好ましい。得られた構築物は、MVA HPV 18 と称する。

【0081】

MVA HPV 18 ウィルス粒子は、従来の技術に従い、CEF 細胞中で作製することができる。ウイルスストックは、注射投与の日まで -80° で保存する。このウイルス懸濁液を急速解凍し、投与前に、例えば、pH8 の Tris HC1 を 10 mM 、ショ糖を 5% (w/v) 、及び NaCl を 50 mM 含む適切なバッファーで希釈して、体積 100 μl 中のウイルス用量を 5×10^7 pfu とする。

10

【0082】

実施例 2 : HPV 18 E6 及び E7 ポリペプチドによってもたらされる交差反応性

交差反応性は、以下に示すように、MVTG HPV 18 で免疫されたマウスから採取した脾細胞での IFNg エリススポット (ELISPOT) アッセイによって評価することができる。

【0083】

異なる HPV 遺伝子型からの E6 及び E7 アミノ酸配列は、HUSAR マルチプルアライメントプログラム (CLUSTAL) (https://genius.embnet.dk/fz_heidelberg.de/menu/cgi/bin/w2h/w2h_start) を用いて整列する。

20

【0084】

T 細胞に認識されることが予想されるペプチド (H2^b 制限 (H2^b restricted)) は、インターネット上で公開されている、ペプチドの結合性に関するプログラム BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) を用いて識別することができる。E7 特異的 CTL によって認識されると本技術分野で報告されている参照ペプチドから得られた結合スコアと同じ若しくはそれを超えるスコアを示すペプチドは、さらに分析される。HPV 18 E6 及び E7 ポリペプチドのアミノ酸配列と比べて 1 又は 2 個のアミノ酸の違いを示すペプチドを選択して、この交差反応性分析にかける。選択されたペプチドは、従来の合成技術によって合成することができ、HPV 18 E6 及び E7 ポリペプチドで免疫されたマウスから採取した脾細胞とのその交差反応能力を、以下のようにして測定することができる。

30

【0085】

健康なメスの SPF マウス C57BL/6 を市販業者より入手し、管理条件下で飼育する (一時間あたり少なくとも 11 回の換気を行い、温度が 18 乃至 22° 、相対湿度が 40 乃至 70% の範囲になるよう空調された専用個室を使用。12 時間点灯、12 時間消灯の周期となるように照明を自動制御する。飼料及び水は実験期間を通して自由に与える)。

40

【0086】

市販業者から入手し、上記で示した条件下で飼育した生後 7 週間の特定病原体除去 (SPF) マウスのメス C57BL/6 を、 5×10^7 pfu の MVTGN33 又は MVTG HPV 18 により、第 0 日、第 7 日、及び第 14 日の 3 回、皮下投与で免疫することができる。皮下注射は、各回ごとに、動物の右側腹部の異なる場所に行なうことが好ましい。最後の免疫化後、第 24 日に脾臓を採取することができる。新鮮な脾臓細胞を、本技術分野における従来の技術を用いて調製することができる。

【0087】

96 ウェルのニトロセルロースプレートは、炭酸ナトリウムバッファー中の 3 μg / ml のモノクローナルラット抗マウス IFNg 抗体 (クローン R4 6A2 ; Phami

50

n g e n、C a t N u m b e r 5 5 1 2 1 6、1 0 0 μ l / ウェル)でコーティングすることができる。プレートは、4で一晩、又は37で1時間インキュベートすることができる。プレートは、10% F C S 含有D M E Mで3回洗浄し、各ウェルあたり100 μ lの10% F C S 含有D M E Mにより、37で2時間浸漬することができる。脾細胞は、 10^6 細胞 / 100 μ lの濃度で播種することができる。I L 2は、6 U / 50 μ l / ウェルの濃度でウェルへ添加することができる(R & D S y s t e m s ; 10 ng / ml)。ポジティブコントロールとしては、一般的にコンカナバリンAが用いられる(5 μ g / ml)。

【0088】

Tエピトープを有することが予想されたペプチドは合成することができ、D M S O 中100 mg / mlの濃度で得られ、4で保存する。ポジティブコントロールとしては、H P V 18 参照ペプチドを用い、無関係のペプチドをネガティブコントロールとして用いる。5 μ g / mlの濃度で各ウェルにペプチドを添加し、5% C O₂ 下、37で48時間インキュベートすることができる。

【0089】

1 X P B S で1回、0.05% P B S Tween で5回の洗浄後、0.3 μ g / 100 μ l / ウェルの濃度でビオチン化抗マウスI F N g (クローンX M G 1.2、P h a r m i n g e n) を添加し、ゆっくり攪拌しながら室温で2時間インキュベートすることができる。プレートは、0.05% P B S Tween で5回の洗浄することができる。0.05% P B S Tween 1% F C S 中の1/5000に希釈したE x t r a v i d i n A K P (S i g m a、S t . L o u i s、ミズーリ州)をウェルに添加することもできる(100 μ l / ウェル)。プレートは、室温で45分間インキュベートし、その後、0.05% P B S Tween で5回洗浄することができる。I F N g 分泌は、バイオラッドキット(B i o r a d K i t)により確認することができる。各ウェルに100 μ lの基質(N B T + B C I P)を添加し、プレートを室温で0.5時間静置することができる。プレートは水で洗浄し、室温で一晩乾燥させることができる。スポットのカウントは、エリスピットリーダー、B i o r e a d e r 4 0 0 0 P r o X (B I O S Y S G M B H ; S e r l a b o、フランス)を用いて行うことができる。

【0090】

H P V 18 参照ペプチドの存在下で、免疫化脾細胞の培養物はI F N g の産生を刺激し、一方、交差反応を行わないペプチド(無関係のペプチドなど)を脾細胞培養物中へ添加しても有意の影響は見られない(I F N g 産生のレベルが基準以下)。交差反応性が表れるのは、非H P V 18 ペプチドが免疫化マウスのC T Lによって認識された時であり、このことは、H P V 18 E 6 及び/若しくはE 7 ポリペプチド、又はこれらを発現するベクター(例:M V A T G H P V 18)によるワクチン接種が、その他のH P V 遺伝子型による感染の治療にも効果を示す可能性があることを示唆している。

【配列表】

2009534331000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2007/003367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/025		
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) 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, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/037175 A (ZYCOS INC [US]; BEACH KATHLEEN [US]; HEDLEY MARY LYNNE [US]; URBAN ROB) 6 May 2004 (2004-05-06) the whole document	1-8, 13-18, 20-25 9-12,19
X	WO 02/077012 A (US GOVERNMENT [US]; KHLEIF SAMIR N [US]; BERZOFSKY JAY A [US]) 3 October 2002 (2002-10-03) claims 1-18	1-5, 15-18, 20-25 9-12,19
Y	US 6 884 786 B1 (KIENY MARIE-PAULE [FR] ET AL) 26 April 2005 (2005-04-26) The whole document and in particular SEQ ID NO.1	9-12,19
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the international search report	
18 December 2007	28/01/2008	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Wimmer, Georg	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2007/003367

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YOUDE SARAH J ET AL: "Cross-typic specificity and immunotherapeutic potential of a human HPV16 E7-specific CTL line" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 114, no. 4, April 2005 (2005-04), pages 606-612, XP002462842 ISSN: 0020-7136 the whole document	9-12,19
Y	WO 96/19496 A (CSL LTD [AU]; UNIV QUEENSLAND [AU]; EDWARDS STIRLING JOHN [AU]; COX JO) 27 June 1996 (1996-06-27) the whole document	9-12,19
Y	KRCHNAK V ET AL: "IDENTIFICATION OF SEROREACTIVE EPITOPE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 E7 PROTEIN BY SYNTHETIC PEPTIDES" ACTA VIROLOGICA, ACADEMIA PRAGUE, PRAGUE, CS, vol. 37, no. 5, October 1993 (1993-10), pages 395-402, XP009050452 ISSN: 0001-723X the whole document	9-12,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2007/003367
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

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(e).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11 (entirely); 1-7, 9, 10, 13-25 (all partially)

Use of a composition comprising one or more early polypeptides of HPV-18 (or a nucleic acid encoding the same) for the manufacture of a medicament for preventing or treating an infection or a pathological condition caused by at least one papillomavirus other than HPV-18,

wherein the polypeptide is an HPV-18 E6 polypeptide modified by incorporation of a membrane-anchoring sequence and a secretory sequence.

2. claims: 12 (entirely); 1-6, 8-10, 13-25 (all partially)

Use of a composition comprising one or more early polypeptides of HPV-18 (or a nucleic acid encoding the same) for the manufacture of a medicament for preventing or treating an infection or a pathological condition caused by at least one papillomavirus other than HPV-18,

wherein the polypeptide is an HPV-18 E7 polypeptide modified by incorporation of a membrane-anchoring sequence and a secretory sequence.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/003367

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2004037175	A	06-05-2004	AU CA EP JP	2003284239 A1 2502696 A1 1556513 A2 2006503914 T		13-05-2004 06-05-2004 27-07-2005 02-02-2006
WO 02077012	A	03-10-2002	CA EP US US	2441947 A1 1425039 A2 2004106551 A1 2007166319 A1		03-10-2002 09-06-2004 03-06-2004 19-07-2007
US 6884786	B1	26-04-2005	AT AU AU CA DE DE EP ES FR WO JP PT	277947 T 749054 B2 8812798 A 2296797 A1 69826661 D1 69826661 T2 0989999 A1 2229528 T3 2766091 A1 9903885 A1 2001510201 T 989999 T		15-10-2004 20-06-2002 10-02-1999 28-01-1999 04-11-2004 06-10-2005 05-04-2000 16-04-2005 22-01-1999 28-01-1999 31-07-2001 31-01-2005
WO 9619496	A	27-06-1996	AT CA DE EP JP NZ US US US ZA	326479 T 2207741 A1 69534995 T2 0796273 A1 10510989 T 297946 A 6303128 B1 6306397 B1 6004557 A 9510832 A		15-06-2006 27-06-1996 11-01-2007 24-09-1997 27-10-1998 28-01-2000 16-10-2001 23-10-2001 21-12-1999 04-07-1996

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 14/025 (2006.01)	C 0 7 K 14/025	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ロナルド、ルーカ

フランス国イルキルシュ グラフェンスタデン、ルート、ブルケル、107

(72) 発明者 ステファヌ、ポール

フランス国サン、ジュス、サン、ランペール、リュ、フランソワ、ラブレー、150

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA07 CA20 DA02 EA02 FA02 GA11

4C084 AA02 AA03 AA13 BA22 BA44 CA01 MA66 NA14 ZB092 ZB262
ZB332

4C087 AA01 AA03 BC83 CA12 MA66 NA14 ZB09 ZB26 ZB33
4H045 BA09 CA01 DA86 EA31 FA74