

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6146879号
(P6146879)

(45) 発行日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(24) 登録日 平成29年5月26日(2017.5.26)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12 Z N A
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P	31/20
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C O 7 K	14/025 (2006.01)	C O 7 K	14/025

請求項の数 7 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2015-72615 (P2015-72615)	(73) 特許権者	509329730
(22) 出願日	平成27年3月31日(2015.3.31)		アカデミシュ ジーケンハウス ライデン
(62) 分割の表示	特願2010-510240 (P2010-510240) の分割		ハー. オー. デー. エン. ルムク
原出願日	平成20年5月27日(2008.5.27)		オランダ国 エンエル - 2333 ゼ
(65) 公開番号	特開2015-147786 (P2015-147786A)		ットアー ライデン、アルビヌスドレーフ
(43) 公開日	平成27年8月20日(2015.8.20)	(74) 代理人	100107456
審査請求日	平成27年4月16日(2015.4.16)		弁理士 池田 成人
(31) 優先権主張番号	07109281.1	(74) 代理人	100162352
(32) 優先日	平成19年5月31日(2007.5.31)		弁理士 酒巻 順一郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100123995
(31) 優先権主張番号	07109287.8		弁理士 野田 雅一
(32) 優先日	平成19年5月31日(2007.5.31)	(74) 代理人	100148596
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 山口 和弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンで使用するための、子宮頸部悪性腫瘍に浸潤するT細胞によって標的とされるHPVエピトープ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

HPV関連疾患の予防及び/又は治療用薬物の製造のためのペプチドの使用であって、
前記HPV関連疾患が、子宮頸部上皮内新生物(CIN)、外陰上皮内新生物(VIN)、
膣上皮内新生物(VAIN)、肛門上皮内新生物(AIN)、陰茎上皮内新生物(PIIN)、子宮頸癌、
外陰癌、膣癌、肛門癌、陰茎癌及び頭頸部の癌からなる群から選択され、

前記薬物が、少なくとも2つの異なるペプチドを含み、

前記少なくとも2つのペプチドが、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるHPV
16 E6タンパク質の1~32番目のアミノ酸残基からなるペプチド及び配列番号1に
示されるアミノ酸配列からなるHPV16 E6タンパク質の19~50番目のアミノ酸
残基からなるペプチドである、使用。

【請求項2】

薬物が、少なくとも1つのアジュバントをさらに含む、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

アジュバントが、Toll様受容体を介して作用する、請求項2に記載の使用。

【請求項4】

薬物が、静脈内、皮下、筋肉内粘膜、真皮内及び/又は皮内投与用である、請求項1~3のいずれか一項に記載の使用。

【請求項5】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる H P V 1 6 E 6 タンパク質の 1 ~ 3 2 番目のアミノ酸残基からなるペプチド及び配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる H P V 1 6 E 6 タンパク質の 1 9 ~ 5 0 番目のアミノ酸残基からなるペプチド並びに薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 6】

少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記アジュバントが T o l l 様受容体を介して作用する、請求項 6 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、医学及び免疫学の分野に関する。本発明は特に、H P V 関連疾患の予防、治療及び/又は診断において使用できる新規な H P V エピトープに関する。

【背景技術】

【0002】

子宮頸癌は世界で 2 番目に多い癌である (Bosch et al. 2003)。高リスク型ヒトパピローマウイルス (H P V, human papilloma virus) の 1 6 型及び 1 8 型は、全患者のおよそ 3 分の 2 において子宮頸癌の原因となっている (Bosch et al. 1995, Munoz et al. 2003)。H P V ゲノムは、悪性細胞の表現型の発現及び維持に必要であるため高悪性度子宮頸部病変及び癌において構成的に発現される 2 種のオンコプロテイン、E 6 及び E 7 をコードする (zur Hausen, 1996)。

20

【0003】

これらのオンコプロテインの腫瘍特異的発現に加えて、子宮頸癌患者のほぼ半分の末梢血において検出される低レベルの血中 E 6 及び E 7 特異的 T 細胞の存在 (de Jong et al. 2004, van der Burg et al. 2001, Welters et al. 2003, Welters et al. 2006, Rensing et al. 1996, Bontkes et al. 2000, Luxton et al. 1996) は、これらのオンコプロテインが腫瘍拒絶抗原としての役割を果たし得ることを示唆した。しかしながら、血中 H P V 特異的 T 細胞の存在は、これらのオンコプロテインが抗腫瘍反応に寄与することを意味しない。疾患を管理するためには、これらの T 細胞は少なくとも腫瘍部位にホーミングできなくてはならない。実際、子宮頸癌の一部はリンパ球に浸潤される (Bethwaite et al. 1996, Chao et al. 1999, Piersma et al. 2007) が、おそらく腫瘍組織から T 細胞培養を確立するのが比較的困難であるため、これらの子宮頸部腫瘍に浸潤する T 細胞の特異性及びタイプに関する詳細な知識は今もなお不足している。それにもかかわらず、少数の初期の先駆者は、腫瘍から H P V 特異的腫瘍浸潤性リンパ球 (T I L, tumor infiltrating lymphocyte) を単離することができ、H P V 1 6 の 2 種の単一の C D 8 ⁺ T 細胞エピトープ (Evans et al. 1997, Oerke et al. 2005) 並びに頻度の低い高リスク H P V 5 9 及び H P V 3 3 亜型 (Hohn et al. 1999, Hohn et al. 2000) に特異的な 2 種の C D 4 T 細胞エピトープの同定につながった。しかしながら、子宮頸癌における H P V 特異的適応免疫応答の寄与及び役割を理解するために、子宮頸部組織浸潤性リンパ球に関する大規模研究が緊急に必要である。加えて、このことにより、免疫介入戦略を成功させる合理的な設計が可能となるだろう。

30

40

【0004】

最近の研究は、2 種のサイトカイン、I L - 7 及び I L - 1 5 が C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ エフェクターメモリー T 細胞の増殖及び生存において重要な役割をもつことを示した。I L - 7 はエフェクター T 細胞に生存シグナルを提供する (Li et al. 2003)。I L - 1 5 は T 細胞分裂の開始において不可欠な増殖因子であり、T I L 培養を増殖させるために一般に使用する I L - 2 とは対照的に、T 細胞増殖の継続を制限しない (Li et al. 2001)。さらに、I L - 1 5 は抗原 - 非依存性の C D 8 (⁺) メモリー T 細胞アクチベーターとしても働くことができる (Liu et al. 2002)。総合すると、I L - 7 及び I L - 1 5 は非常に高い効率でエフェクターメモリー T 細胞を増殖させることができるが、これらのサ

50

イトカインの刺激に対してセントラルメモリーT細胞は反応性が低く、ナイーブT細胞は反応しない (Geginat et al. 2001、McKinlay et al. 2007、Bacchetta et al 2002)。

【0005】

以前の研究の多くは、末梢血単核細胞 (P B M C , peripheral blood mononuclear cell) 由来のT細胞による、HPV16 E6及び/又はE7タンパク質中の配列からなる合成ペプチドのMHCクラスII拘束性認識を報告している。

【0006】

国際公開第02/070006号パンフレットは、HPV16 E6タンパク質のアミノ酸127~142からなるペプチドに対するDR1拘束性応答、HPV16 E7タンパク質のアミノ酸35~50からなるペプチドに対するDQ2拘束性応答、HPV16 E7タンパク質のアミノ酸43~77からなるペプチドに対するDR3拘束性応答、及びHPV16 E7タンパク質のアミノ酸50~62からなるペプチドに対するDR15拘束性応答を開示する。

10

【0007】

Strangらは、無症候性個体由来のP B M Cにおける、HPV16 E6タンパク質のアミノ酸42~57からなる合成ペプチドに対するDR7拘束性応答を開示する。

【0008】

Altmannらは、無症候性個体由来のP B M CにおけるHPV16 E7タンパク質のアミノ酸5~18からなる合成ペプチドに対するDR1/DR11タイプの応答、無症候性個体由来のP B M CにおけるHPV16 E7タンパク質のアミノ酸17~34からなる合成ペプチドに対するDR4/DR13タイプの応答、及び無症候性個体由来のP B M CにおけるHPV16 E7タンパク質のアミノ酸69~82からなる合成ペプチドに対するDR4/DR13タイプの応答を開示する。

20

【0009】

国際公開第02/090382号パンフレットは、HPV16 E6及びE7タンパク質の一連の重複するペプチドについて、白人人口において最も多く見られるHLA-DR分子に対する結合親和性を開示する。国際公開第02/090382号パンフレットはさらに、ポーエン様丘疹症患者由来のCD8枯渇P B M Cにおける多くのHPV16 E6及びE7ペプチドに対する応答を報告する。

【先行技術文献】

30

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第02/070006号パンフレット

【特許文献2】国際公開第02/090382号パンフレット

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Bosch, F. X. and de Sanjose, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr: 3-13, 2003

【非特許文献2】Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst, 87: 796-802, 1995

40

【非特許文献3】Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, 348: 518-527, 2003

【非特許文献4】zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta, 9: F55-78, 1996

50

【非特許文献 5】de Jong, A., van Poelgeest, M. I., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*, 64: 5449-5455, 2004

【非特許文献 6】van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., and Offringa, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer*, 91: 612-618, 2001

10

【非特許文献 7】Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res*, 63: 636-641, 2003

【非特許文献 8】Welters, M. J., van der Logt, P., van den Eeden, S. J., Kwappenberg, K. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G. G., Melief, C. J., van der Burg, S. H., and Offringa, R. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. *Int J Cancer*, 118: 950-956, 2006

20

【非特許文献 9】Rensing, M. E., van Driel, W. J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M. P., Hartman, M., Anholts, J. D., Schreuder, G. M., ter Harmse, W. B., Fleuren, G. J., Trimbos, B. J., Kast, W. M., and Melief, C. J. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A *0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res*, 56: 582-588, 1996

【非特許文献 1 0】Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., van den Muysenberg, A. J., Verheijen, R. H., Stukart, M. J., Meijer, C. J., Scheper, R. J., Stacey, S. N., Duggan-Keen, M. F., Stern, P. L., Man, S., Borysiewicz, L. K., and Walboomers, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 88: 92-98, 2000

30

【非特許文献 1 1】Luxton, J. C., Rowe, A. J., Cridland, J. C., Coletart, T., Wilson, P., and Shepherd, P. S. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J Gen Virol*, 77 (Pt 7): 1585-1593, 1996

【非特許文献 1 2】Bethwaite, P. B., Holloway, L. J., Thornton, A., and Delahunt, B. Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology*, 28: 321-327, 1996

40

【非特許文献 1 3】Chao, H. T., Wang, P. H., Tseng, J. Y., Lai, C. R., Chiang, S. C., and Yuan, C. C. Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur J Gynaecol Oncol*, 20: 136-140, 1999

【非特許文献 1 4】Piersma, S. J., Jordanova, E. S., van Poelgeest, M. I., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Kenter, G. G., Fleuren, G. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer*

50

Res, 67: 354-361, 2007

【非特許文献 1 5】Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S., and Borysiewicz, L. K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*, 57: 2943-2950, 1997

【非特許文献 1 6】Oerke, S., Hohn, H., Zehbe, I., Pilch, H., Schicketanz, K. H., Hitzler, W. E., Neukirch, C., Freitag, K., and Maeurer, M. J. Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer*, 114: 766-778, 2005

【非特許文献 1 7】Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Hilmes, C., Kaufmann, A., Seliger, B., and Maeurer, M. J. CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol*, 163: 5715-5722, 1999

【非特許文献 1 8】Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Freitag, K., Necker, A., and Maeurer, M. J. Human papillomavirus type 33 E7 peptides presented by HLA-DR*0402 to tumor-infiltrating T cells in cervical cancer. *J Virol*, 74: 6632-6636, 2000

【非特許文献 1 9】Li, J., Huston, G., and Swain, S. L. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med*, 198: 1807-1815, 2003

【非特許文献 2 0】Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med*, 7: 114-118, 2001

【非特許文献 2 1】Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y., Henkart, P. A., and Weng, N. P. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 6192-6197, 2002

【非特許文献 2 2】Geginat, J., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 194: 1711-1719, 2001

【非特許文献 2 3】McKinlay, A., Radford, K., Kato, M., Field, K., Gardiner, D., Khalil, D., Burnell, F., Hart, D., and Vuckovic, S. Blood monocytes, myeloid dendritic cells and the cytokines interleukin (IL)-7 and IL-15 maintain human CD4+ T memory cells with mixed helper/regulatory function. *Immunology*, 120: 392-403, 2007

【非特許文献 2 4】Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M. G. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol*, 32: 2237-2245, 2002

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

しかしながら、HPV関連悪性腫瘍における、好ましくはHPV16、18、31、33及び45などのより多く見られる高リスク亜型に関して腫瘍浸潤性リンパ球の存在、タイプ及び特異性についての知識が依然として必要である。本発明の目的は、腫瘍浸潤性リンパ球の標的であり、HPV関連疾患の予防、治療及び/又は診断において使用できる新規なHPVエピトープを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、子宮頸部悪性腫瘍患者70名の大規模集団における子宮頸部浸潤性T細胞の存在及びHPV16又は、HPV18特異性に関する本発明者らの分析に基づいて同定した新規なT細胞エピトープを提供する。本発明者らは、これらの浸潤性リンパ球がHPV

10

20

30

40

50

特異的T細胞を含むことを発見した。より詳細な分析において、本発明者らは、17個の新規なCD4⁺及びCD8⁺T細胞エピトープ、並びにこれらのHLA拘束エレメントを同定したが、HPV特異的免疫応答がE6及びE7オンコプロテインの全ての部分に対して誘導されることも明らかにした。意外なことに、CD4⁺T細胞エピトープの大多数は、HLA-DQ及びHLA-DP分子が微量に発現されるという状況において提示された。同定されたT細胞エピトープは、HPV16及びHPV18陽性腫瘍に対する免疫応答において生理的標的を構成するので、HPV関連疾患患者においてHPV関連疾患の予防及び免疫療法を最適化するために有益な標的である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、以下の[1]～[28]に関する。

[1] HPV関連疾患の予防及び/又は治療用薬物の製造のためのペプチドの使用であって、

前記ペプチドが、100、98、96、94、92アミノ酸以下の長さを有し、HPV E6及びE7タンパク質のうち少なくとも1つのアミノ酸配列由来の少なくとも19個の連続したアミノ酸を含み、前記連続したアミノ酸配列が、HLA-DQ及びHLA-DP分子のうち少なくとも1つによって提示されるエピトープを含み、前記エピトープが、HLA-DQ2に関連して提示されず、且つHPV16 E7タンパク質のアミノ酸35～50からなるエピトープではない、使用。

[2] 連続したアミノ酸配列が、子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞、又は流入領域リンパ節由来のT細胞によって認識されるエピトープを含む、上記[1]に記載の使用。

[3] エピトープがHPV E6タンパク質のエピトープである、上記[1]又は[2]に記載の使用。

[4] エピトープがHPV血清型16、18、31、33又は45、好ましくは16、18、31又は33、より好ましくは16又は18のエピトープである、上記[1]～[3]のいずれかに記載の使用。

[5] エピトープが、配列番号6、5、7、9、10、11、12、13、16、18、19、20及び21からなる群から選択される、上記[1]～[4]のいずれかに記載の使用。

[6] 連続したアミノ酸配列の長さが、19～45アミノ酸、好ましくは22～35アミノ酸、より好ましくは33～35アミノ酸である、上記[1]～[5]のいずれかに記載の使用。

[7] HPV関連疾患の予防及び/又は治療用薬物の製造のためのペプチドの使用であって、前記ペプチドが、100アミノ酸以下の長さを有し、HPV E6及びE7タンパク質のうち少なくとも1つのアミノ酸配列由来の少なくとも19個の連続したアミノ酸を含み、前記連続したアミノ酸配列が、子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞、又は流入領域リンパ節由来のT細胞によって認識されるエピトープを含む、使用。

[8] エピトープが、配列番号5～26からなる群から選択される、上記[7]に記載の使用。

[9] エピトープが、配列番号7、14、22～26からなる群から選択されるHLAクラスI CTLエピトープである、上記[8]に記載の使用。

[10] 連続したアミノ酸配列が、HLA-B分子によって提示されるエピトープを含む、上記[7]に記載の使用。

[11] HLA-B分子が、HLA-B7、HLA-B14、HLA-B27又はHLA-B57分子である、上記[10]に記載の使用。

[12] エピトープが、配列番号7、22、24、25及び26からなる群から選択される、上記[11]に記載の使用。

[13] 連続したアミノ酸配列が、HLA-A分子によって提示されるエピトープを含む、上記[9]に記載の使用。

[14] HLA-A分子が、HLA-A2、又はHLA*0201分子である、上記[1

10

20

30

40

50

3]に記載の使用。

[1 5] エピトープが、配列番号 2 3 及び 2 6 からなる群から選択される、上記 [1 4] に記載の使用。

[1 6] 薬物が、上記 [1] ~ [8] のいずれかに定義される少なくとも 2 つの異なるペプチドを含む、上記 [1] ~ [1 5] のいずれかに記載の使用。

[1 7] 薬物が、少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む、上記 [1] ~ [1 6] のいずれかに記載の使用。

[1 8] アジュバントが、T o l l 様受容体を介して作用する、上記 [1 7] に記載の使用。

[1 9] 薬物が、静脈内、皮下、筋肉内粘膜、真皮内及び/又は皮内投与用である、上記 [1] ~ [1 8] のいずれかに記載の使用。

[2 0] 有効量の上記 [1] ~ [1 9] のいずれかに定義される薬物を、それを必要とする対象に投与することを含む、HPV 関連疾患の予防及び/又は治療のための方法。

[2 1] 上記 [1] ~ [1 5] のいずれかに定義されるペプチド。

[2 2] 薬物として使用するための、上記 [2 1] に記載のペプチド。

[2 3] 上記 [1] ~ [1 5] のいずれかに定義されるペプチド及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

[2 4] 好ましくはT o l l 様受容体を介して作用する少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む、上記 [2 3] に記載の組成物。

[2 5] 上記 [1] ~ [1 5] のいずれかに定義される少なくとも 1 つのペプチドをコードする核酸分子。

[2 6] 配列番号 5 ~ 2 6 からなる群から選択されるエピトープを認識するT 細胞受容体をコードする核酸分子。

[2 7] 上記 [2 6] に記載の核酸分子を含む単離T 細胞。

[2 8] 配列番号 5 ~ 2 6 からなる群から選択されるエピトープを認識するT 細胞受容体を含む単離T 細胞。

一態様において、本発明はしたがって、HPV 由来合成ペプチドに加え、新たに同定されたHPV のCD4⁺Th及びCD8⁺CTL細胞エピトープのアミノ酸配列に関し、これらを含む免疫原性組成物もまた本発明の一部である。このようなペプチドは、広範なHPV 関連悪性腫瘍を含むHPV 関連疾患患者において投与時に、大いに改善、増強、及び延長されたCD8⁺CTLエフェクター及び記憶応答をもたらす。このようなペプチドはまた、このCD4⁺Th応答の結果として、エフェクター細胞がより浸潤しやすい、大いに改善された炎症誘発性微小環境を誘導することもできる。

【 0 0 1 5 】

本発明のペプチドは好ましくはワクチン単独として又は免疫原性組成物と組み合わせて若しくはかかる免疫原性組成物の一部として使用されるので、前記ペプチドはワクチンペプチドと呼び、組成物はワクチン組成物と呼ぶことが好ましい。

【 0 0 1 6 】

インビトロで効率良く合成できるので、医療用には比較的短いペプチドの使用が非常に好ましく、約100アミノ酸よりも大きいネイティブなタンパク質は不可能であるか、又は不経済である。ペプチドの化学合成は日常的な操作であり、種々の適した方法が当業者知られている。ペプチドの化学合成はまた、標準化が困難であり徹底的な精製及び品質管理手法を要するという無傷のタンパク質の組換え体生産に関連する問題も克服する。HLAクラスI及びクラスIIエピトープの長さを超える長さの(例えば、本明細書において下記に示す長さを有している)ペプチドは、国際公開第02/070006号パンフレットにおいて説明されたように、プロフェッショナル抗原提示細胞、特にDCに取り込まれるのに十分な大きさであり、含有されるHLAクラスI及びクラスIIエピトープの細胞表面提示が起こる前にDCにおいてプロセッシングされるため、ワクチン成分として使用するのに特に有利である。したがって、非抗原提示細胞上の最小HLAクラスIエピトープの組織的提示によるT細胞寛容の不都合な誘導(Toes et al., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.

10

20

30

40

50

U.S.A 93:7855及びToes et al., 1996, J. Immunol. 156:3911に示されるように)は、本明細書において示される長さを有する本発明のペプチドの適用によって予防される(Zwaveling et al., 2002, J. Immunol. 169:350において示されるように)。CTL及び/又はTh細胞のT細胞受容体に提示されることになるエピトープを含むペプチドは、HLAクラスI及びHLAクラスIIエピトープの両方を含有するのに十分な長さを有することが好ましい。

【0017】

本発明の第1の態様において、HPV E6及びE7タンパク質のうちの少なくとも1つの完全長アミノ酸配列から選択される連続したアミノ酸配列を含むペプチドが提供される。好ましくは、HPV E6及びE7タンパク質の完全長アミノ酸配列から選択される連続したアミノ酸配列は、血清型16、18、31、33又は45などの高リスク型HPV血清型由来、より好ましくはHPV E6及びE7血清型16、18、31又は33のアミノ酸配列由来、最も好ましくは血清型16又は18由来であり、その中で16が最も好ましい。HPV血清型16 E6及びE7タンパク質のアミノ酸配列を配列番号1及び2にそれぞれ示す。HPV血清型18 E6及びE7タンパク質のアミノ酸配列を配列番号3及び4にそれぞれ示す。

【0018】

ペプチドは、少なくとも1つのHLAクラスII Th細胞エピトープ及び/又は少なくとも1つのHLAクラスI細胞傷害性T細胞エピトープ、好ましくは本明細書において下記でより詳細に定義されるエピトープを含むことが好ましい。ペプチドは、100アミノ酸以下の長さを有し、上記で定義したHPVタンパク質のうちの1つのアミノ酸配列から選択される少なくとも19個の連続するアミノ酸を含むことが好ましく、このペプチドは好ましくは、HLAクラスIIエピトープ及びHLAクラスIエピトープのうちの1つ、より好ましくは少なくとも1つのHLAクラスIIエピトープ及び少なくとも1つのHLAクラスIエピトープの両方、並びに最も好ましくは(必ずしも必要ではないが)両方が上記で定義されたHPVタンパク質のうちの1つのアミノ酸配列由来のものを含む。ペプチドにおいて、少なくとも1つのHLAクラスIIエピトープ及び少なくとも1つのHLAクラスIエピトープが、上記で定義したHPVタンパク質のうちの1つのアミノ酸配列由来の連続するアミノ配列内に存在することがより好ましい。明確にするためにいえば、本発明のペプチドは、HLAクラスIに提示されるエピトープ及び/又はHLAクラスIIに提示されるエピトープを含むことが好ましい。これらのエピトープはそれぞれ、本明細書において記載されるようにプロセッシングされた後、提示可能であり、細胞上に存在する対応する特異的HLA分子に結合するはずである。そのため本発明の文脈において、HLAハプロタイプ特異的エピトープはまた、そのHLAハプロタイプに結合し、提示及び/又は拘束されるエピトープと称することもできる。

【0019】

本発明の文脈において、「ペプチドが100アミノ酸以下の長さを有する」とは、HPVタンパク質に由来しており、本明細書に記載のペプチド中に存在する連続的なアミノ酸数が、100、98、96、94、92、又は90以下であることを意味することが好ましい。したがって、本明細書に定義されているペプチドは本質的に、完全長HPVタンパク質とは異なる。このようなペプチドは、HPVタンパク質に由来するアミノ酸以外のさらなるアミノ酸を含んでもよく、又は完全にHPVタンパク質に由来するアミノ酸配列でできていても、若しくは同アミノ酸配列からなってもよい。ペプチドに含まれる上記で定義したHPVタンパク質のうちの1つ由来の連続したアミノ酸配列の長さは、好ましくは少なくとも19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44又は45アミノ酸及び/又は好ましくは100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、60、50、45、40、35、33又は30以下であり、ペプチドに含まれる上記で定義したHPVタンパク質のうちの1つ由来の連続したアミノ酸配列の長さは

10

20

30

40

50

、より好ましくは19～45、さらにより好ましくは22～40アミノ酸、さらにより好ましくは30～35、最も好ましくは33～35アミノ酸である。別の好ましい実施形態において、本発明のペプチドは、本明細書において定義したHPVタンパク質由来の連続したアミノ酸配列のいずれかからなり、それによって、ネイティブなHPVタンパク質配列においてこのアミノ酸配列と隣接していないHPVタンパク質由来の連続したアミノ酸配列のいずれの末端にもアミノ酸は付加されていないことが理解される。本発明のペプチドは、容易に合成することができ、プロフェッショナル抗原提示細胞によって取り込まれプロテアソームによってプロセシングされるのに十分な大きさであり、少なくとも1つのHLAクラスI及び/又は少なくとも1つのHLAクラスIIエピトープを含有するために十分な物理容量及び長さを有する。必要に応じ、ペプチドはN又はC末端伸長を含んでい

10

【0020】

本発明の好ましいペプチドは、100、98、96、94、92アミノ酸以下の長さを有し、HPV E6及びE7タンパク質のうち少なくとも1つのアミノ酸配列由来の少なくとも19個の連続したアミノ酸を含み、この連続したアミノ酸配列は、子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞、又は子宮頸部腫瘍性病変から流入している骨盤領域のリンパ節に存在する若しくはそこから単離されたT細胞、好ましくは転移性腫瘍細胞を含む流入領域リンパ節に存在する若しくはそこから単離されたT細胞によって認識されるエピトープを含む。本発明によるペプチドは、T細胞応答を誘導するために使用されることが好ましい

20

【0021】

本発明のさらに好ましいペプチドにおいて、連続したアミノ酸配列は、HPV E6タンパク質のアミノ酸11～32、HPV E6タンパク質のアミノ酸37～68、HPV E6タンパク質のアミノ酸52～61、HPV 6タンパク質のアミノ酸51～72、HPV E6タンパク質のアミノ酸55～86、HPV E6タンパク質のアミノ酸61～82、HPV E6タンパク質のアミノ酸71～92、HPV E6タンパク質のアミノ酸73～105、HPV E6タンパク質のアミノ酸91～112、HPV E6タンパク質のアミノ酸101～122、HPV E6タンパク質のアミノ酸121～142、HPV E6タンパク質のアミノ酸129～138、HPV E7タンパク質のアミノ酸1

30

【0022】

本発明の好ましいペプチドは、少なくともHPV特異的クラスII CD4⁺ Th細胞エピトープを含む。本発明によるペプチド中に含まれるクラスII CD4⁺ Th細胞エピトープは、HPV関連疾患ヒト患者及び/又は健常対照においてCD4⁺ Th細胞を誘導又は活性化できることが好ましい。活性化はエクスピボ又はインピボで、より好ましくは感染細胞及び/又は腫瘍細胞が上記で定義したHPVタンパク質を発現するHPV関連悪性腫瘍等のHPV関連疾患ヒト患者において、評価されることが好ましい。HLAクラスIIエピトープは、CD4⁺ Th記憶及び/又はCD4⁺ Thエフェクター応答を活性化すること、すなわちCD45RO陽性CD4⁺ Th細胞の活性化が可能であることが最も好ましい。このことは、DCのCD40誘発による「殺細胞許可(license to kill)」シグナル(Lanzavecchia, 1998)によって、より強力なCD8⁺ エフェクター及び記憶CTL応答をもたらすことになる。別の状況において、活性化されたCD4⁺ Th細胞は、免疫系の

40

50

H L A非拘束性キラー細胞を活性化することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれる好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、HPV E 6タンパク質のアミノ酸11～32、HPV E 6タンパク質のアミノ酸37～68、HPV E 6タンパク質のアミノ酸52～61、HPV E 6タンパク質のアミノ酸51～72、HPV E 6タンパク質のアミノ酸55～86、HPV E 6タンパク質のアミノ酸61～82、HPV E 6タンパク質のアミノ酸71～92、HPV E 6タンパク質のアミノ酸73～105、HPV E 6タンパク質のアミノ酸91～112、HPV E 6タンパク質のアミノ酸101～122、HPV E 6タンパク質のアミノ酸121～142、HPV E 6タンパク質のアミノ酸129～138、HPV E 7タンパク質のアミノ酸1～32、HPV E 7タンパク質のアミノ酸21～42、HPV E 7タンパク質のアミノ酸51～72及びHPV E 7タンパク質のアミノ酸76～86からなる群から選択される。本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれるより好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、配列番号5～21からなる群から選択される。

10

【 0 0 2 4 】

本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれる別の好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、DR 4、DR 7、DR 12、DR 15、DP 1、DP 0201、DP 4、DP 14、DP 1401、DP 17、DQ 5、DQ 6、DP 1901、DQ * 0301、DQ * 0302、DQ * 0308、DQ * 0501からなる群から選択されるハプロタイプによって拘束されるエピトープである。本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれるさらに好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、DP又はDQハプロタイプによって拘束されるエピトープであり、そのうちDP 1、DP 0201、DP 4、DP 14、DP 1401、DP 17、DQ 5、DQ 6、DP 1901、DQ * 0301、DQ * 0302、DQ * 0308及びDQ * 0501がより好ましい。1つの以前開示されたH L A - D Q拘束性エピトープ（国際公開第02/070006号パンフレット）は、HPV 16 E 7タンパク質のアミノ酸35～50からなる。しかしながらこのエピトープは、末梢T細胞によって認識され、子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞、又は子宮頸部腫瘍性病変から流入している骨盤領域のリンパ節に存在する若しくはそこから単離されたT細胞によって認識されないエピトープである。そのため本発明のペプチド中の連続した配列は、HPV 16 E 7タンパク質のアミノ酸35～50からなるエピトープを含まないことが好ましい。したがって、本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれる好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、DP又はDQハプロタイプによって拘束され、DRハプロタイプによって拘束されないエピトープである。H L A - DR分子の発現は、腫瘍細胞上でアップレギュレートされることが知られている。この状況における提示は、ノンプロフェッショナル抗原提示細胞（A P C , Antigen Presenting Cell）上の抗原提示のように、寛容を誘導する場合がある。H L A - DP又はDQ分子の発現は非常に低い、それにもかかわらずH L A - DQ及びH L A - DPエピトープは、例えばDCなどのプロフェッショナルA P C上に提示される場合、効果的な免疫応答をもたらすことができる。

20

30

40

【 0 0 2 5 】

本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれるさらに別の好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、DP又はDQハプロタイプによって拘束される、HPV E 6又はE 7タンパク質、より好ましくはHPV血清型16、18、31、33又は45のE 6又はE 7タンパク質、最も好ましくはHPV血清型16又は18のE 6又はE 7タンパク質のエピトープであり、そのうち16が最も好ましい。

【 0 0 2 6 】

本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれるなおさらに好ましいクラスII C D 4 + T h細胞エピトープは、HPV E 6タンパク質のアミノ酸11～32、HPV E 6タンパク質のアミノ酸37～68、HPV E 6タンパク質のアミノ酸52～61

50

、HPV6タンパク質のアミノ酸51～72、HPV E6タンパク質のアミノ酸61～82、HPV E6タンパク質のアミノ酸71～92、HPV E6タンパク質のアミノ酸73～105、HPV E6タンパク質のアミノ酸91～112、HPV E6タンパク質のアミノ酸101～122、HPV E6タンパク質のアミノ酸121～142、HPV E7タンパク質のアミノ酸1～32及びHPV E7タンパク質のアミノ酸51～72からなる群から選択されるエピトープである。本発明によるペプチド中(の連続した配列中)に含まれるより好ましいクラスII CD4⁺ Th細胞エピトープは、配列番号5、6、7、9、10、11、12、13、16、18、19、20及び21からなる群から選択される。

【0027】

別の好ましい実施形態において、本発明のペプチドは、少なくともHPV特異的クラスII CD8⁺ CTL細胞エピトープを含む。加えて、前記HLAクラスIエピトープはCD8⁺ CTL応答を活性化できることが好ましい。CTL活性化能は、エクスピボ及び/又はインピボで、ヒト健常対照個体において、又はさらにより好ましくは感染及び/若しくは腫瘍細胞が上記で定義したHPVタンパク質を発現するHPV関連悪性腫瘍などのHPV関連疾患ヒト患者において、実証されていることが最も好ましい。1つのペプチド内にHLAクラスI及びクラスIIエピトープ両方が存在することは、効果的なCTL細胞応答の開始及び維持に相乗効果があるため、特に有利であることが認められている(Zwaveling et al., 2002に示される)。

【0028】

CTL及び/又はTh細胞のT細胞受容体に提示されることになるエピトープを含むペプチドは、多くの必要条件を満たすことが好ましい。ペプチドは、HLAクラスI及びHLAクラスIIエピトープの両方を含有するのに十分な長さを有することが好ましい。さらにペプチドは、HLAクラスI結合部分内にアンカー残基を含み、それぞれクラスI分子に結合可能となることが好ましい。ペプチドと提示MHC分子間の相互作用の安定性は、顕著で効果的な免疫応答を引き起こすために十分であることが好ましい。したがって本発明の文脈において、ペプチドと提示MHC分子間の相互作用の安定性は、ペプチドが高親和性結合への中間体を有し、それによって約5 µM以下のIC₅₀が高親和性結合とみなされ、約5 µM超約15 µM以下のIC₅₀が中親和性結合とみなされ、約15 µM超100 µM以下のIC₅₀が低親和性結合と判断され、約100 µM超のIC₅₀が結合なしとみなされ、それによってペプチドのMHC分子への結合親和性がvan den Burg et al., 1995及びKessler et al., 2003に記載の通り決定されるようなものであることが好ましい。

【0029】

エピトープのC末端を生じる特異的プロテアソーム切断部位は、大きい方のペプチドから遊離してHLAクラスI分子上に提示されるように、エピトープアミノ酸配列のちょうど後ろに存在することが好ましい。HLAクラスII提示エピトープの長さの必要条件はそれほど厳しくなく、したがってクラスII結合ペプチドの厳密な酵素的生成が絶対必要というわけではない。こうした必要条件は、完全長HPVタンパク質配列、特にHPV E6及びE7タンパク質においてペプチドを局在化及び設計するために本発明において使用され、かかるペプチドは、好ましいCTL及びTh細胞エピトープ及び/又はこれらの組合せを含み、したがってワクチン接種の目的に非常に適するペプチドである。

【0030】

さらに、インピトロ及びエクスピボでのT細胞実験は、本発明によるペプチドが実質的なCD4⁺ Th及びCD8⁺ CTL応答を誘導する能力を確認するために使用されることが好ましい。そのため本発明のペプチドは、最も強力で最も広く適用できるHPV E6及びE7腫瘍抗原由来のHLAクラスI及び/又はクラスII提示T細胞エピトープを含む化学的に合成可能な比較的短いペプチドの選択において著しい改善をもたらす。ペプチドはプロテアソーム切断に関して個々に最適化され、好ましくはHLAクラスI及びクラスIIエピトープのうちの少なくとも1つ、より好ましくはHLAクラスI及びクラスIIエピ

10

20

30

40

50

トープ両方を含有する。本発明のペプチド内に含有されるCTLエピトープC末端の20Sプロテアソームによる遊離は、CD8⁺CTL刺激能を有するHLAクラスI結合断片をもたらす。

【0031】

本発明のHPVペプチドにおけるHLAクラスIエピトープは、治療を受けるヒト対象集団において優勢なHLA対立遺伝子上に提示できることが好ましい。本発明のHPV由来ペプチドにおいて好ましいHLAクラスIエピトープは、HLA-A2、HLA-B7、HLA-B14、HLA-B27、HLA-B57、及びHLA*0201に結合できるエピトープである。最も好ましいHLAクラスI CTLエピトープは、HLA-B結合HPVエピトープであり、そのうちHLA-B7、HLA-B14、HLA-B27、HLA-B57が最も好ましい。HLAクラスIエピトープは、高いペプチド結合能（約5 μ Mペプチド未満のIC₅₀）又は少なくとも中親和性（5 μ M超、約15 μ Mペプチド未満のIC₅₀）を有することが好ましい。本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれる好ましいクラスI CTLエピトープは、上記のクラスIハプロタイプによって拘束される、HPV E6又はE7タンパク質、より好ましくはHPV血清型16、18、31、33又は45のE6又はE7タンパク質、最も好ましくはHPV血清型16又は18のE6又はE7タンパク質のエピトープであり、そのうち16が最も好ましい。

10

【0032】

本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれる好ましいクラスI CTLエピトープは、HPV E6タンパク質のアミノ酸13~22、HPV E6タンパク質のアミノ酸29~38、HPV E6タンパク質のアミノ酸52~61、HPV E6タンパク質のアミノ酸129~138、HPV E6タンパク質のアミノ酸137~146、HPV E6タンパク質のアミノ酸149~158及びHPV E7タンパク質のアミノ酸11~19からなる群から選択される。本発明によるペプチド中（の連続した配列中）に含まれるより好ましいクラスII CD4⁺Th細胞エピトープは、配列番号7、14、22~26からなる群から選択される。

20

【0033】

本発明によるペプチド中に含まれる好ましいエピトープは、HLA-B分子によって提示されるエピトープである。HLA-B分子は、HLA-B7、HLA-B14、HLA-B27又はHLA-B57分子であることが好ましい。そのようなエピトープは、配列番号7、22、24、25及び26からなる群から選択される。

30

【0034】

本発明によるペプチド中に含まれる別の好ましいエピトープは、HLA-A分子によって提示されるエピトープである。HLA-A分子は、HLA-A2、又はHLA*0201分子であることが好ましい。そのようなエピトープは、配列番号23及び26からなる群から選択される。

【0035】

より好ましい実施形態によると、本発明のペプチドは、100、98、96、94、94、92アミノ酸以下の長さを有し、HPV E6タンパク質のアミノ酸1~32、HPV E6タンパク質のアミノ酸19~50、HPV E6タンパク質のアミノ酸41~65、HPV E6タンパク質のアミノ酸55~80、HPV E6タンパク質のアミノ酸71~95、HPV E6タンパク質のアミノ酸85~109、HPV E6タンパク質のアミノ酸91~122、HPV E6タンパク質E6のアミノ酸109~140、HPV E6タンパク質のアミノ酸127~158、HPV E7タンパク質のアミノ酸1~35、HPV E7タンパク質のアミノ酸22~56、HPV E7タンパク質のアミノ酸43~77、及びHPV E7タンパク質のアミノ酸64~98からなる群から選択されるHPVタンパク質由来の連続したアミノ酸配列を含む。本発明のペプチドは、HPV E6タンパク質のアミノ酸1~32、HPV E6タンパク質のアミノ酸19~50、HPV E6タンパク質のアミノ酸41~65、HPV E6タンパク質のアミノ酸55

40

50

～ 80、HPV E6タンパク質のアミノ酸71～95、HPV E6タンパク質のアミノ酸85～109、HPV E6タンパク質のアミノ酸91～122、HPV E6タンパク質E6のアミノ酸109～140、HPV E6タンパク質のアミノ酸127～158、HPV E7タンパク質のアミノ酸1～35、HPV E7タンパク質のアミノ酸22～56、HPV E7タンパク質のアミノ酸43～77及びHPV E7タンパク質のアミノ酸64～98からなる群から選択されるHPVタンパク質由来の連続したアミノ酸配列からなることがより好ましい。HPV E6又はE7タンパク質由来の連続したアミノ酸配列は、好ましくはHPV血清型16、18、31、33又は45、最も好ましくはHPV血清型16又は18のものであり、そのうち16が最も好ましい。

【0036】

このエピトープが前記ペプチドに存在していれば、本明細書において定義したペプチドが、前記ペプチドにおけるエピトープ（例えば本発明において、HLA-DQ及びHLA-DP分子のうち少なくとも1つによって提示されるエピトープ、及び/又は子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞若しくは流入領域リンパ節由来のT細胞によって認識されると同定されるエピトープ）の存在に関係する所望の有利な性質を有するであろうことが当業者にはすぐに明らかである。本発明によるペプチドは、T細胞応答を誘導するために使用されることが好ましい。

【0037】

当業者であれば、本適用が本明細書において同定される所望のエピトープを含むか、又はかかるエピトープからなるように設計可能な各ペプチドを、本明細書で同定していなくても、本発明は本明細書において同定されるエピトープを含む、又はかかるエピトープからなる本明細書に定義されている任意のペプチドを包含することを理解するであろう。好ましい実施形態において、ペプチドはHPVタンパク質とは異なる。別の好ましい実施形態において、ペプチドはHPV16 E7のアミノ酸35～50を含まない、又は同アミノ酸からなるものではない。

【0038】

例えば、1つの好ましいエピトープは、配列番号5（HPV16 E6のアミノ酸11～32）である。この段落は、本明細書において同定される各エピトープの説明であり、同エピトープに適用することができる。配列番号5を含む任意のペプチドは、本発明によって包含され、本発明に従って使用することができる。この好ましい実施形態において、ペプチドはHPVタンパク質とは異なる。本発明のペプチドの好ましいアミノ酸長は、本明細書において既に定義されている。本発明のペプチドを設計する場合、ペプチドは、本明細書において同定される所定のエピトープのN末端部位から始まってもよく又は本明細書において同定される所定のエピトープのC末端部位で終わってもよい。代替として、所定のエピトープ（例えば配列番号5）は、本発明のペプチド内に含まれてもよい。例として配列番号5を使用すると、本発明者らが45アミノ酸の長さを有するペプチドを設計する場合、このようなペプチドはHPV16 E6の11～56、1～45、2～46、3～47、4～48、5～49、5～50からなってもよく、又はこれらを含んでもよい。本発明のペプチドはさらに、本明細書において定義される又は当業者に既知の任意の別のHPVエピトープを含んでもよい。

【0039】

この好ましい実施形態（エピトープとして配列番号5）において、ペプチドは、米国特許第2005/0142541号明細書に開示されているHPV16 E6のアミノ酸9～33を含まないか、又は同アミノ酸からなるものではない。この好ましい実施形態において、ペプチドは、欧州特許第451550号明細書に開示されているHPV16 E6のアミノ酸1～37を含まないか、又は同アミノ酸からなるものではない。この好ましい実施形態において、ペプチドは、米国特許第5629161号明細書に開示されているHPV16 E6のアミノ酸8～37を含まないか、又は同アミノ酸からなるものではない。好ましい実施形態において、配列番号5を含むペプチドは、10～32、1～32、1～45、11～56、2～46、3～47、4～48、5～49、5～50（数字はHP

10

20

30

40

50

V 1 6 E 6 の開始及び末端アミノ酸を示す) からなるか、又は同アミノ酸を含む。

【 0 0 4 0 】

別の好ましい実施形態(エピトープとして配列番号 8、HPV 1 6 E 6 のアミノ酸 5 5 ~ 8 6)において、ペプチドは、ユニプロット(uniprot)に開示されている、次の受託番号 Q 9 1 9 B 2 (1 ~ 9 9、数字は HPV 1 6 E 6 の開始及び末端アミノ酸を示す)又は Q 8 0 8 8 2 (1 ~ 8 4)を有する HPV 1 6 E 6 の断片を含まないか、又は同断片からなるものではない。本実施形態でもまた、配列番号 8 を含むペプチドは、このエピトープの N 末端部位から始まってもよく、又はこのエピトープの C 末端部位で終わってもよく、又はこのエピトープはペプチド内に存在してもよい。例えば、本発明者らが 4 5 アミノ酸の長さを有するペプチドを設計すると、このようなペプチドは 5 5 ~ 1 0 0、4 1 ~ 8 6、4 5 ~ 9 0 からなっても又はこれらを含んでもよい。好ましい実施形態において、配列番号 8 を含むペプチドは、5 5 ~ 1 0 0、4 1 ~ 8 6、4 5 ~ 9 0 からなり又はこれらを含む(数字は HPV 1 6 E 6 タンパク質アミノ酸配列における開始及び末端アミノ酸を示す)。

10

【 0 0 4 1 】

本発明の HPV 由来ペプチドは、1 又は複数のアミノ酸の欠失又は置換によって、追加のアミノ酸又は官能基を用いた N 及び/又は C 末端伸長によって改変することができ、これによりバイオアベイラビリティ、T 細胞標的化を改善でき、又はアジュバント若しくは(共)刺激機能を提供する免疫調節物質を含む若しくは放出することができる。N 及び/又は C 末端の任意選択の追加のアミノ酸は、HPV タンパク質のネイティブなアミノ酸配列中の対応する位置に存在しないことが好ましく、HPV E 6 又は E 7 アミノ酸配列(例えば、配列番号 1 ~ 4)のいずれの由来でもないことがより好ましい。当業者であれば、種々の HPV 血清型の HPV アミノ酸配列が本発明に明白に含まれることをよく理解するであろう。

20

【 0 0 4 2 】

本発明の HPV 由来ペプチドは、化学合成及びその後の精製によって得ることができる(例えば、実施例 1 参照)。本発明の HPV 由来ペプチドは、3 5、2 0、1 0、5 又は 0 % 以下の DMSO を含む生理学的に許容される水溶液(例えば、PBS)に可溶であることが好ましい。このような溶液において、ペプチドは、少なくとも 1 m l 当たりペプチド 0 . 5、1、2、4、又は 8 m g の濃度で可溶であることが好ましい。複数の異なる本発明の HPV 由来ペプチドの混合物が、少なくともこのような溶液 1 m l 当たりペプチド 0 . 5、1、2、4、又は 8 m g の濃度で可溶であることがより好ましい。

30

【 0 0 4 3 】

本発明によるペプチドの好ましい使用は、薬物としての使用であり、それによりペプチドがワクチン又はその活性成分として使用されることがより好ましい。各ペプチドは、単独で又は好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 2、1 3、1 5 及び 2 0 までの異なる本発明のペプチドの組合せで、癌の治療及び/又は予防において、薬物、好ましくは HPV 関連疾患の治療又は予防用ワクチンの製造のために使用することができる。本発明によるこのような薬物及び/又は抗腫瘍ワクチンは、以下の非網羅的なリスト、子宮頸部(CIN, cervix)、外陰部(VIN, vulva)、膣(VaIN, vagina)、肛門(AIN, anus)、及び陰茎(PIN, penis)の頸部上皮内腫瘍形成、並びに子宮頸部、外陰部、膣、肛門、陰茎及び頭頸部の癌、に罹患しているか、又は発症するリスクのある患者を治療するために使用することができる。

40

【 0 0 4 4 】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 2、1 3、1 5 及び 2 0 までの異なる上記で定義された本発明のペプチドを含み、1 又は複数の薬学的に許容される賦形剤、特にアジュバント及び免疫調節剤を含んでもよい、ヒト対象の治療及び/又はワクチン接種に有用であり得る組成物にさらに関する。組成物は、医薬組成物及び/又は薬物としての使用するためのものであることが好ましい。医薬組成物は、好ましくはワクチン接種を目的とする。医薬組成物は、癌の治療及び/又は

50

予防のために、薬物、好ましくはHPV関連疾患の治療又は予防用ワクチンの製造のために使用することが好ましい。HPV関連疾患の非網羅的なリストは、本明細書において既に示している。

【0045】

したがって、一態様において本発明は、HPV関連疾患の予防及び/又は治療用薬物の製造のためのペプチドの使用であって、ペプチドが、100、98、96、94、92アミノ酸以下の長さを有し、HPV E6及びE7タンパク質のうち少なくとも1つのアミノ酸配列由来の少なくとも19個の連続したアミノ酸を含み、連続したアミノ酸配列が、HLA-DQ及びHLA-DP分子のうち少なくとも1つによって提示されるエピトープを含む、使用に関する。エピトープは、HLA-DQ2に関連して提示されず、且つ、HPV16 E7タンパク質のアミノ酸35~50からなるエピトープではないことが好ましい。代替として又は別の好ましい実施形態における先の好ましい実施形態と組み合わせ、連続したアミノ酸配列は、子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞によって、又は流入領域リンパ節由来のT細胞によって認識されるエピトープを含む。ペプチド、連続したアミノ酸配列及びエピトープは、本明細書において上記で定義された通りであることが好ましい。

10

【0046】

別の態様において、本発明は、HPV関連疾患の予防及び/又は治療用薬物の製造のためのペプチドの使用であって、ペプチドが、100、98、96、94、92アミノ酸以下の長さを有し、HPV E6及びE7タンパク質のうち少なくとも1つのアミノ酸配列由来の少なくとも19個の連続したアミノ酸を含み、連続したアミノ酸配列が、子宮頸部腫瘍性病変に浸潤するT細胞によって、又は流入領域リンパ節由来のT細胞によって認識されるエピトープを含む、使用に関する。ペプチド、連続したアミノ酸配列及びエピトープは、本明細書において上記で定義された通りであることが好ましい。

20

【0047】

薬物の処方、投与方法及び薬学的に許容される賦形剤の使用は、当技術分野において既知及び通例であり、例えばRemington; The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphiaに記載されている。本発明の医薬組成物及び薬物は、静脈内若しくは皮下、又は筋肉内投与に適するように処方されることが好ましいが、粘膜投与又は例えば、注射による真皮内(intradermal)及び/若しくは皮内(intracutaneous)投与などの別の投与経路が想定可能である。本明細書において、真皮内投与が好ましい。真皮内投与に特に関連する利点及び/又は好ましい実施形態は、「真皮内投与」と題する独立した章において追って定義する。

30

【0048】

本発明の少なくとも1つのペプチド及び/又は少なくとも1つの組成物の投与を、単一の投与として実施できることが本発明によりさらに包含される。代替として、少なくとも1つのペプチド及び/又は少なくとも1つの組成物の投与を必要に応じて繰り返してもよく、及び/又は本発明の異なるペプチド及び/又は組成物を順次に投与してもよい。

【0049】

本発明による医薬組成物(薬物とも称する)は、少なくとも1つの免疫応答刺激化合物又はアジュバントを含むことが好ましい。有利には、本発明による医薬組成物は、1又は複数の合成アジュバントをさらに含んでもよい。こうしたアジュバントは、本発明による医薬組成物に混合してもよく、又は治療を受ける哺乳動物又はヒトに別々に投与してもよい。特に好ましいのは、Toll様受容体を介して且つ/又はレチノイン酸誘導性遺伝子1(RIG-1, Retinoic acid-Inducible Gene-1)タンパク質を介して且つ/又はエンドセリン受容体を介して作用すると知られているアジュバントである。先天性免疫系を活性化できる免疫修飾化合物は、TLR1~10を含むToll様受容体(TLR, Toll like receptor)を介して特によく活性化することができる。TLR受容体並びにその修飾体及び誘導体を活性化できる化合物は、当技術分野において十分に立証されている。TLR1は細菌のリポタンパク質及びそのアセチル化体によって活性化でき、加えてTLR2

40

50

はグラム陽性細菌の糖脂質、LPS、LPA、LTA、線毛、外膜タンパク質、細菌由来又は宿主由来ヒートショックタンパク質、及びマイコバクテリアの(Mycobacterial)リポアラビノマンナンによって活性化できる。TLR3は、特にウイルス起源のdsRNAによって、又はポリ(I:C)化合物によって活性化できる。TLR4は、グラム陰性LPS、LTA、宿主由来又は細菌起源のヒートショックタンパク質、ウイルスコート又はエンベロープタンパク質、タキソール又はその誘導体、オリゴ糖を含有するヒアルロン酸及びフィブロネクチンによって活性化できる。TLR5は、細菌の鞭毛又はフラジェリンによって活性化できる。TLR6は、マイコバクテリアのリポタンパク質、及びB群連鎖球菌(Streptococcus)易熱性可溶性因子(GBS-F, group B streptococcus heat labile soluble factor)又は連鎖球菌モジュリンによって活性化できる。TLR7は、イミダゾキノリンによって活性化できる。TLR9は、非メチル化CpG DNA又はクロマチン-IgG複合体によって活性化できる。特にTLR3、TLR7及びTLR9は、ウイルス感染に対する先天性免疫応答を媒介するのに重要な役割を果たし、これらの受容体を活性化できる化合物は、本発明による治療方法において及び組成物又は薬物において使用するために特に好ましい。特に好ましいアジュバントは、dsRNAを含む合成的に生成された化合物、ポリ(I:C)、TLR3及びTLR9受容体を誘発する非メチル化CpG DNA、IC31、TLR9アゴニスト、IMSAVAC、TLR4アゴニスト、Montanide ISA-51、MontanideISA720(フランスのSeppic社 7により製造されたアジュバント)を含むがこれらに限定されない。RIG-1タンパク質は、TLR3と同様にds-RNAによって活性化されることが知られている(Immunity, (2005), 1:19-28) 10

。別の好ましい実施形態において、合成アジュバント化合物は、本発明のペプチドに物理的に結合している。アジュバント及び共刺激化合物又は官能基の、ペプチドを含むHLAクラスI及びクラスIIエピトープとの物理的結合は、抗原提示細胞、特に抗原を取り込み、代謝し提示する樹状細胞の同時刺激によって免疫応答の強化をもたらす。別の好ましい免疫修飾化合物は、BQ-788などのエンドセリン受容体の阻害剤である(Buckanovich RJ et al. Nature Medicine (2008), 14:28-36, Ishikawa K, PNAS (1994) 91:4892) 20

。BQ-788は、N-cis-2,6-ジメチルペリジノカルボニル-L-メチルロイシル-D-1-メトキシカルボニルトリプトファン-D-ノルロイシンである。しかしながら、任意のBQ-788誘導体又は修飾BQ-788化合物もまた本発明の範囲内に包含される。 30

【0050】

さらに、本発明のペプチド及び組成物と組み合わせた、国際公開第99/61065号パンフレット及び国際公開第03/084999号パンフレットに記載の抗原提示細胞(共)刺激分子の使用が好ましい。特に、4-1-BB及び/又はCD40リガンド、アゴニスト抗体、OX40リガンド又はその機能的断片及び誘導体、加えて同様のアゴニスト活性を有する合成化合物の使用が、対象の最適な免疫応答の開始をさらに刺激するために、治療を受ける対象に別々に、又は本発明のペプチドと併用して投与されることが好ましい。

【0051】

加えて、好ましい実施形態は、TLRリガンド及び/又は抗CD40/抗4-1BB抗体などのさらなる免疫刺激剤の存在下又は非存在下での、鉱油(例えば、Montanide ISA 51)又はPLGAなどの徐放性媒体における、ペプチドの送達を含む。代替として、本発明のペプチドは、免疫刺激剤(アジュバント)の存在下又は非存在下で真皮内へ、例えば注射によって送達してもよい。真皮内送達には、本発明のペプチドは、ペプチド及び1又は複数の免疫学的に不活性で薬学的に許容される担体、例えば、生理学的イオン強度及び/又は浸透圧の緩衝水溶液(例えば、PBSなど)からなる組成物において投与されることが好ましい。 40

【0052】

真皮内投与

好ましい実施形態において、全て本明細書で定義されている本発明において使用される 50

ペプチド又はペプチドを含む組成物又は薬物は、真皮内投与又は適用に適するように処方される。真皮内とは、当業者に既知である。本発明の文脈において、真皮内は皮内と同義であり、皮下とは異なる。物質の最も表面的な適用は、上皮（皮膚上）であり、次いで真皮内適用（皮膚内又は皮膚中へ）、次いで皮下適用（皮膚のすぐ下の組織内）、次いで筋肉内適用（筋肉本体中へ）となる。真皮内適用は通常、注射により投与される。物質の真皮内注射は通常、物質に対して起こり得る反応、アレルギー及び/又は細胞性免疫を試験するために行われる。皮下適用もまた通常、注射により投与され、例えば、皮膚の下の組織内に針を注射する。

【0053】

別のさらに好ましい実施形態において、本発明において使用される薬物は、Montanide ISA-51などのいかなるアジュバントも含まず、これは薬物の処方がより単純であることを意味し、例えば、使用される薬物中に油-水型エマルジョンが存在しないことが好ましい。したがって、本発明において使用される薬物は、Montanide ISA-51などアジュバントを含まない、及び/又は水中油型エマルジョンを含まない。したがって、好ましい実施形態において、本発明において使用される薬物は、例えば、本明細書において先に定義した1又は複数のペプチドを含む又はからなるリン酸緩衝生理食塩水（PBS, Phosphate Buffer Saline）などの生理学的イオン強度及び/又は浸透圧の緩衝水溶液である。当業者であれば、そのような溶液の調製方法を知っている。

10

【0054】

本発明において使用される薬物は、本明細書において先に定義されたペプチド少量の真皮内投与によって、さらに免疫原性効果を達成できるという別の利点を有する。使用する各ペプチドの量は、好ましくは1~1000 µg、より好ましくは5~500 µg、さらにより好ましくは10~100 µgの範囲である。

20

【0055】

別の好ましい実施形態において、薬物は、本明細書において先に定義されたペプチド及び少なくとも1つのアジュバントを含み、前記アジュバントは水中油エマルジョンに処方されず、且つ/又は本明細書において先に定義された水中油エマルジョンタイプのものではない。このタイプの薬物は、単回投与として投与することができる。代替として、本明細書において先に定義されたペプチド及び/又はアジュバントの投与を、必要に応じて繰り返してもよく、且つ/又は異なるペプチド及び/又は異なるアジュバントを順次に投与してもよい。本発明のペプチドは真皮内投与されるが、本明細書において定義されたアジュバントは順次に投与されることが、本発明によりさらに包含される。アジュバントは真皮内投与されてもよい。しかしながら、任意の別の投与方法をアジュバントに使用してもよい。

30

【0056】

ワクチン注射は疾患の部位で又は可能な限り近くで実現され、罹患流入領域リンパ節の局所的活性化をもたらす、免疫系のより強い局所的活性化をもたらすので、ペプチドの真皮内投与は非常に魅力的である。特にVIN、VAIN、AIN、PIN、陰茎癌、外陰癌、肛門癌、頭頸部癌に関してはそうである。

【0057】

好ましい実施形態において、真皮内投与は病変又は疾患の部位で直接実施される。本明細書において、病変部位で、とは病変部位から5、2、1、0.5、0.2又は0.1 cm未満の範囲内であると理解される。

40

【0058】

本明細書において先に定義された薬物を真皮内投与すると、Th2応答だけでなくTh1応答もまた誘発される。遺伝子銃を介した皮膚抗原初回刺激が選択的Th2免疫応答を引き起こすことが既に分かっているので、これは驚くべきことである（Alvarez D. et al, 2005）。さらに、観察された免疫応答は、（Alvarez D. et al, 2005）に基づいて予想できたように皮膚に制限されるだけではない。本発明者らは、IFNを分泌する特異的T細胞が、曝露後の末梢血において検出されるように、2次リンパ系を循環することを示

50

す。

【0059】

本発明の薬物の別の非常に重要な利点は、比較的少量のペプチドを、1回だけの注射で、単純な処方で、Montanide ISA-51などの望ましくない副作用をもたらすことが知られているいかなるアジュバントも用いずに使用できることである。いかなる理論にも拘束されるわけではないが、本発明者らは、本発明において使用されるHPV真皮内ペプチド(1又は複数)は、上皮に存在する表皮ランゲルハンス細胞(LC, Langerhans cell)を特異的に直接標的の候補と考える。ランゲルハンス細胞は、一次免疫応答を開始する顕著な能力を示すDCの特定のサブタイプである(Romani N. et al 1992)。こうしたLCは、本発明において使用される薬物によって回復する天然のアジュバントとみなすことができる。

10

【0060】

別の好ましい実施形態において、本発明は、HPV関連疾患の治療又は予防用薬物の製造のためのHPV-E2、-E6及び/又は-E7タンパク質由来のペプチドの使用であって、薬物が先に定義された真皮内投与用であり、加えてHPV関連疾患の治療又は予防用薬物の製造のためにHPV-E2、-E6及び/又は-E7タンパク質由来のペプチドがさらに使用され、薬物が皮下投与用である、使用に関する。

【0061】

真皮内投与用薬物は、本明細書において既に定義されている。皮下投与用で使用されるペプチドは、真皮内投与用で使用されるものと同じであり、本明細書において既に定義されている。当業者であれば、皮下投与に適する薬物の処方方法を知っている。皮下投与に適する薬物は、アジュバントと組み合わせて、本明細書において既に定義されたペプチドを含むことが好ましい。好ましいアジュバントは、本明細書において既に記載されている。別の好ましいアジュバントは、Freundの不完全アジュバント(IFA, incomplete Freund's adjuvant)、Montanide ISA-51又はMontanide ISA 720(フランスのSeppic社製)などの水中油エマルジョンのものである。さらに好ましい実施形態において、皮下投与に適する薬物は、どちらも本明細書において先に定義された1又は複数のペプチド、アジュバント、及び全て本明細書において先に定義された不活性な薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を含む。薬物の処方、及び薬学的に許容される賦形剤の使用は、当技術分野において既知及び通例であり、例えばRemington; The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphiaに記載されている。本発明において使用される第2の薬物は、皮下投与に適するように処方される。

20

30

【0062】

好ましい本実施形態において、真皮内投与用に適する薬物は、皮下投与に適する薬物と同時に投与することができる。代替として、両薬物を順次真皮内、続いて皮下投与することもでき、又は逆もまた同様である(まず皮下投与その後続いて真皮内投与)。好ましい本実施形態において、真皮内投与のために記載された先の好ましい実施形態のように、本明細書において先に定義されたペプチド及び/又はアジュバントの真皮内及び/又は皮下投与を、必要に応じて繰り返してもよく、且つ/又は異なるペプチド及び/又は異なるアジュバントの投与を順次に真皮内及び/又は皮下投与してもよい。本発明のペプチドを真皮内及び/又は皮下投与し、その一方で本明細書において定義されたアジュバントを順次に投与することが、本発明によりさらに包含される。アジュバントは、真皮内及び/又は皮下投与することができる。しかしながら、任意の別の投与方法をアジュバントに使用することができる。

40

【0063】

本発明者らは、本発明による薬物の真皮内及び皮下投与の組合せが有利であると推測する。表皮のDCは明らかに真皮及び皮下組織のDCと異なる。皮内(真皮内)免疫化は、抗原プロセッシング、及び樹状ネットワークを通してケラチン生成細胞と密接に接触する表皮DC(Langerin陽性ランゲルハンス細胞)の活性化を引き起こすであろう。これはまた、ランゲルハンス細胞及びケラチン生成細胞間の相互作用において炎症経路を最適に活性

50

化し、その後続いて抗原を負荷し活性化したランゲルハンス細胞を皮膚流入領域リンパ節へ輸送する。

【 0 0 6 4 】

皮下投与は、別のDCサブセットを活性化し、これもまた抗原を負荷され、皮膚流入領域リンパ節まで独立して移動するであろう。おそらく、真皮内及び皮下の両方に投与できる薬物の使用は、異なるDCサブセットによるこうした流入節におけるT細胞の相乗的刺激をもたらすことができる。

【 0 0 6 5 】

別の態様において、本発明は、本明細書において上記で定義されたペプチド及び/又はエピトープをコードする核酸に関する。前記核酸は、野生型完全長HPV E6又はE7タンパク質はコードしないが、本発明のペプチド及び/又はエピトープ自体、又は野生型HPV E6若しくはE7タンパク質と隣接していないアミノ酸配列に隣接する本発明のペプチド及び/又はエピトープをコードすることが好ましい。そのような隣接するアミノ酸は、野生型HPV E6又はE7タンパク質以外のタンパク質由来であってもよく、及び/又はそのアミノ酸が隣接するペプチド/エピトープと隣接していない野生型HPV E6又はE7タンパク質内の別の場所由来であってもよい。好ましい実施形態において、前記核酸は、数珠状に配置した2つ以上の本発明のペプチド及び/又はエピトープをコードし、それによって本発明のペプチド及び/又はエピトープ(数珠)は直接的に結合するか、並びに/又は野生型HPV E6又はE7タンパク質以外のタンパク質由来であるか、及び/若しくはそのタンパク質が隣接するペプチド/エピトープと隣接していない野生型HPV E6又はE7タンパク質内の別の場所由来であるリンカー配列を介して結合する。ペプチド/エピトープに隣接又は結合しているアミノ酸配列は、タンパク質分解切断部位を含んでもよい。そのような核酸は、本発明のペプチド/エピトープを種々の方法で送達するために適用できる。そのような核酸は、例えば、そこからそのような核酸を精製できる、適した宿主細胞(例えば、大腸菌(E. coli))における組換えタンパク質の生産に使用できる。代替として、核酸は発現調節配列(プロモーターなど)に作動可能に結合させても、ヒト細胞用の発現構築体に組み込んでもよい。そのような(自己)細胞は、エクスピボでトランスフェクト又は形質導入してそれを必要とする対象に(再)投与してもよい。代替として、発現構築体は適した遺伝子治療ベクターに組み込んでもよい。ウイルスベクター(欠損型ウイルスに基づく)は、非ウイルス性の作用物質と比較してより効率的な遺伝子導入の作用物質である。適したウイルス発現構築体は、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV, adeno-associated virus)、レトロウイルス又は改変ワクシニアAnkara(MVA, modified vaccinia Ankara)に基づくベクターを含む。

【 0 0 6 6 】

別の実施形態において、本発明は、HPV特異的T細胞受容体(TCR, T cell receptor)分子を、本明細書に記載される本発明のHPVエピトープと相互作用できるT細胞から単離する手段を提供する。本発明によるTCRは、好ましくは生細胞においてインピトロ又はインピボでHLA分子に関連し且つ/又は提示される場合、ペプチドを含むHPVエピトープと相互作用できることが好ましい。T細胞受容体及び特に本発明によるTCRをコードする核酸は、例えば、そのようなTCRを、そうでなければ本明細書に記載される本発明のHPVエピトープに対するT細胞免疫を引き起こすことのできない患者のT細胞に導入するために適用できる。このTCRクローニング法によって、T細胞クローンをを用いた治療を受けるレシピエントと本質的に同遺伝子型であり、すなわち、TCR発現T細胞クローンがHPV関連疾患に罹患している患者の自己由来であるT細胞クローンを提供できる。したがって本方法は、それを必要とする対象においてHPVエピトープを発現する腫瘍及び/又はHPV感染細胞に対して作製でき、特異的に標的とすることができる、本発明によるHPVエピトープを認識できるT細胞クローンを提供する。好ましい実施形態において、対象のT細胞は、本明細書に記載の本発明のHPVエピトープを認識するTCRを用いて単離及び形質導入される。選択及び増殖に次いで、当業者に既知であるが、HPV誘導性腫瘍細胞又はHPV感染細胞を認識可能な、その時TCRを発現してい

10

20

30

40

50

これらの自己T細胞を、これらのT細胞が腫瘍及びHPV感染細胞を特異的に標的とする場合、患者に再導入することができる。したがって本発明は、好ましくはHLA分子に関連して、本明細書において定義されたHPVエピトープと相互作用できるT細胞受容体をコード及び発現するTリンパ球を提供する。前記Tリンパ球は組換え又は自然により選択されたTリンパ球であってよい。本発明のTリンパ球はまた、本発明の方法用に、及び本発明の医薬組成物において使用してもよい。したがって、本明細書は、免疫応答の誘発を促す条件下で未分化のリンパ球を本発明のHPVエピトープ（又はこのエピトープを含むペプチド）と接触させるステップであって、本発明によるペプチドを使用してインビトロ又はインビボで、例えば移植を受ける患者において行ってもよいステップを含む、本発明の細胞傷害性Tリンパ球を産生するための少なくとも2つの方法を提供する。代替として、10
 以前の方法により得られた細胞から得られる、又はエピトープに対する免疫応答を示す対象から得られる、本発明のHPVエピトープとの相互作用に特異的なTCRをコードする遺伝子を、宿主細胞及び/又は宿主リンパ球、好ましくは自己リンパ球にクローニングすることによって、インビトロで実施してもよく、細胞傷害性Tリンパ球（CTL, cytotoxic T lymphocyte）に分化してもよい。本実施形態の方法の詳細は、例えば、De Witte et al. 2006及びSchumacher et al. 2002に記載されている。

【0067】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のペプチド及び/又はエピトープをコードする核酸、本発明のエピトープを認識するT細胞受容体、このようなT細胞受容体をコードする核酸、このような核酸を発現するT細胞（クローン）の薬物としての使用に関連する。薬物は、HPV関連疾患の治療及び/又は予防において使用されることが好ましい。本発明によるこのような薬物は、以下の非網羅的なリスト、子宮頸部（CIN）、外陰部（VIN）、膣（VaIN）、肛門（AIN）、及び陰茎（PIN）の頸部上皮内腫瘍形成、並びに子宮頸部、外陰部、膣、肛門、陰茎及び頭頸部の癌、に罹患している又は発症するリスクのある患者を治療するために使用してもよい。20

【0068】

本文書において及びその特許請求の範囲において、「含むこと（to comprise）」という動詞及びその活用は、その単語に続く項目が含まれるが、特に記載されていない項目も除外されないことを意味する非限定的な意味において使用される。加えて、「なること（to consist）」という動詞は、本明細書において定義されているペプチド又は組成物が具体的に特定されたもの以外のさらなる構成要素（1又は複数）を含んでもよいことを意味する「から本質的になること」によって置き換えることができ、前記さらなる構成要素（1又は複数）は本発明の特有の特徴を変化させない。加えて、単数表記による要素の言及は、文脈上明らかに1つ及び1つだけの要素があると解すべき場合を除き、2つ以上の要素が存在する可能性を除外しない。したがって、単数は通常「少なくとも1つの」を意味する。30

【0069】

本明細書において引用された全ての参考特許及び参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。以下の実施例は例示のみを目的として示され、決して本発明の範囲を限定するものではない。40

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1A】4名の異なる患者の頸部組織から単離した初期T細胞培養の増殖を示す図である。3日間の増殖アッセイにおいて、HPV16又は18、E6又はE7ペプチドプール及び組換えタンパク質を用いて刺激すると、全てのT細胞培養物が自然にプロセッシングされた抗原を認識した。C265はHPV16 E6ペプチドプール1~92を、C334はHPV16 E6ペプチドプール71~158を、C284はHPV16 E7ペプチドプール1~98を、及びC228はHPV18 E7ペプチドプール1~106を認識した。

【図1B】単一ペプチドを使用したバルク培養の特異性の精細マッピングを、増殖及びI 50

IFN 産生によって測定した図である。C 2 6 5 はペプチド HPV 1 6 E 6 3 7 ~ 6 8 を、C 3 3 4 はペプチド HPV 1 6 E 6 1 3 7 ~ 1 5 8 を、C 2 8 4 はペプチド HPV 1 6 E 7 7 1 ~ 9 2 を及び C 2 2 8 はペプチド HPV 1 8 E 7 2 1 ~ 4 2 を用いた刺激に応答した。

【図 2】細胞内サイトカイン IFN 染色により測定した、HPV 抗原に応答する T 細胞のタイプの分析を示す図である。陽性ペプチド及びタンパク質として、C 2 6 5 に関してペプチド HPV 1 6 E 6 4 1 ~ 6 2 及び HPV 1 6 E 6 タンパク質を、C 3 3 4 に関して HPV 1 6 E 6 タンパク質及びペプチド 1 3 7 ~ 1 5 8 を、C 2 8 4 に関して HPV 1 6 E 7 タンパク質及びペプチド 7 1 ~ 9 2 を、並びに C 2 2 8 に関して HPV 1 8 E 7 タンパク質及びペプチド 2 1 ~ 4 2 を使用した。HPV の相当物のペプチド及びタンパク質を、陰性対照として使用した。C 2 6 5 の T I L 培養が、ともに HPV 1 6 E 6 4 1 ~ 6 2 ペプチドに応答した CD 4 ⁺ 及び CD 8 ⁺ T 細胞応答を示した。

10

【図 3 A】3 日間の増殖アッセイにおける、HLA クラス II 抗体による CD 4 拘束性応答の遮断を示す図である。C 2 6 5 由来 T 細胞はペプチド負荷自己 B - L C L により刺激され、C 2 8 4 由来 T 細胞は H L A - D R 1 2 にのみ適合したペプチド負荷単球により刺激され、C 2 2 8 由来 T 細胞は H L A が D Q * 0 3 0 2 に適合したペプチド負荷単球により刺激された。

【図 3 B】T I L 培養の精細マッピング及び H L A 拘束性を示す図である。患者 C 2 6 5 の CD 4 ⁺ T 細胞を、認識される長い方のペプチドのアミノ酸配列をカバーする、1 0 m e r のペプチドでパルス標識した自己 B - L C L により刺激し、E L I S P O T アッセイにより試験した。これらの CD 4 ⁺ T 細胞の拘束性を決定するために、H L A - D P 2 のみに適合した単球によりこれらを刺激した。同様に、C 3 3 4 の CD 8 T 細胞に認識される最小のペプチド - エピトープを、E L I S P O T アッセイにおいて、指定の 1 0 m e r のペプチドと一緒にこれらの T 細胞をインキュベートすることによって決定した。C 3 3 4 CD 8 ⁺ T 細胞応答の H L A 拘束性は、患者の H L A クラス I 分子と部分的に適合した健常個体から単離した P B M C をパルス標識されたペプチドを使用して決定した。

20

【図 4 A】C 4 2 7 の腫瘍流入領域リンパ節に存在する T 細胞反応性の分析を示す図である。3 日間の増殖アッセイにおいて測定された、自己 B - L C L をパルス標識された HPV 1 6 E 6 ペプチドにより刺激して 3 週間後の T 細胞培養の反応性。

【図 4 B】C 4 2 7 の腫瘍流入領域リンパ節に存在する T 細胞反応性の分析を示す図である。上パネル：単一の 2 2 m e r のペプチドでパルス標識された自己 B - L C L により刺激したときの T 細胞培養の認識パターン。下パネル：初期 L N M C 培養由来の T 細胞クローンに認識された最小エピトープのグラフ。CD 4 T 細胞クローン C 4 2 7 . 4 7 を 3 日間の増殖アッセイにおいて刺激及び試験した（左パネル）。CD 8 T 細胞クローン C 4 2 7 . 7 8 を IFN E L I S P O T アッセイにおいて試験した（右パネル）。

30

【図 4 C】C 4 2 7 の腫瘍流入領域リンパ節に存在する T 細胞反応性の分析を示す図である。細胞内サイトカイン染色により、応答する T 細胞のタイプを決定した。HPV 1 6 E 6 ペプチド 1 1 ~ 3 2 （上パネル）及びペプチド 1 3 7 ~ 1 5 8 （下パネル）を、陽性ペプチドとして使用した。HPV 1 8 E 7 ペプチド及びタンパク質を、陰性対照として使用した。

40

【図 4 D】C 4 2 7 の腫瘍流入領域リンパ節に存在する T 細胞反応性の分析を示す図である。クラス II に部分的に適合する B - L C L （C 4 2 7 . 4 7、上パネル）の及び H L A クラス I に部分的に適合する B - L C L （C 4 2 7 . 7 8、下パネル）の H L A クラス II 遮断抗体を使用して、拘束エレメントを分析し、CD 4 ⁺ T 細胞応答が H L A - D P 1 4 により、及び CD 8 ⁺ T 細胞が H L A - B 1 4 により拘束されることを示した。

【図 5】1 9 名の健常なドナー（H D , healthy donor）群において陽性皮膚反応を誘導した数、出現日、及び注射した抗原の概要を示す図である。皮膚反応は、直径 2 m m を超える丘疹が注射 2 日後以降に生じた場合に陽性とみなした。図に示すレイアウトは、8 つのペプチドプールに関して使用しており、使用したペプチドプールのタンパク質中の最初及び最後のアミノ酸を示す。太枠で印刷されているレイアウトは、この時間枠内の少なく

50

とも1つの陽性反応を示し、黒塗りの四角は、示されるペプチドプールに対して新たに発生した陽性皮膚反応を表す。

【図6】健常なドナーの事前曝露血液試料におけるIFN E L I s p o tによるHPV 16特異的T細胞の検出は、認識されたペプチドプール ($p = 0.0003$ 、両側のフィッシャーの正確確立検定) に対する初期 (13日未満) 陽性皮膚反応の出現と顕著に相関していることを示す図である。特異的応答を、実験ウェル中の平均スポット数から平均スポット数に培地対照の $2 \times SD$ を加算したものを引くことによって計算した。100.000 P B M C 当たりの特異的スポット数を示す。応答は、ペプチドプール特異的T細胞の頻度が100.000 P B M C において5以上である場合に陽性とみなした。

【図7】陽性皮膚反応の出現と健常なドナーの曝露後血液試料における血中HPV 16特異的T細胞の同時検出 (IFN E L I s p o t) ($p < 0.0001$ 、両側のフィッシャーの正確確立検定) との関連性を示す図である。合計88個の皮膚試験のうち、39個が陽性であった。これらの39個の反応のうち25個が、E L I s p o t における陽性反応と関連していた (100.000 P B M C におけるT細胞の頻度が5以上)。皮膚反応を示さなかった49個の皮膚試験部位のうち、10個が陽性E L I s p o t と関連していた。

【図8】図8Aは、陽性皮膚反応を示す健常なドナーの曝露後血液試料におけるIFN E L I s p o t により検出されたHPV 16特異的T細胞応答を示す図である。100.000 P B M C 当たりの平均スポット数を示す。記憶応答ミックス (M R M , Memory response mix) を、陽性対照として使用した。黒塗りのバーは、パンチ生検を採取し培養に

入れた陽性皮膚反応部位を示す。図8Bは、パンチ生検外に浸潤したTリンパ球を、14~28日間のサイトカインによる増殖後、ペプチド ($10 \mu g / ml$) (皮膚試験において注射した場合) 又はタンパク質 ($20 \mu g / ml$) をパルス標識した単球による刺激に対して、増殖する能力を試験した結果を示す図である。フィットヘマグルチニン (P H A , Phytohemagglutinine) が陽性対照の役割を果たした。[3H]チミジン取り込みによって増殖を測定し、増殖応答を、刺激指数 (S I , stimulation index) が3以上と定義した。健常なドナー17 (H D 17) は、非特異的T細胞からなる陽性皮膚反応部位の一例である。図8Cは、Bの増殖応答の上清を、サイトメトリックビーズアレイにより、IFN、インターロイキン4 (I L 4)、I L 5 及び腫瘍壊死因子、I L 2、I L 10 (図示せず) の存在について分析した結果を示す図である。カットオフ値は、異なるサイトカイン (IFN $100 pg / ml$ 、残りのサイトカインについては $20 pg / ml$) の標準曲線に基づいたものである。抗原特異的サイトカイン産生は、サイトカイン濃度がカットオフレベルより高く、培地対照濃度の2倍より大きいと定義した。健常なドナー15 (H D 15) は、I L 5 の高いバックグラウンドレベルを示すが、抗原刺激後2xを超えるまで増加する。

【図9】健常なドナー15 (H D 15) のプール4 (E 6₄₁₋₆₅、E 6₅₅₋₈₀、E 6₇₁₋₉₅) の皮膚生検のT細胞培養物が、HPV 16特異的CD4+及びCD8+T細胞の両方からなることを示す図である。培養の特異性は、注射皮膚試験に対応するタンパク質 ($20 \mu g / ml$) 及びペプチド ($10 \mu g / ml$) に対する細胞内サイトカイン染色 (I C S , intracellular cytokine staining) において試験した。注目すべきことに、4個のうち3個の生検においてCD8+HPV 16特異的T細胞が検出された。

【0071】

[実施例]

【実施例1】

【0072】

新規なHPVエピトープの同定及び特徴付け

1. 方法

1.1 対象

the Leiden University Medical Centre and Leyenburg Hospital the Hagueの婦人科において組織学的に証明された子宮頸部腫瘍を示す女性を、インフォームドコンセントを

10

20

30

40

50

与えた後にHPV16陽性子宮頸部病変に対する細胞性免疫を調べるCIRCLE試験に登録した。試験設計は両方の病院の医療倫理委員会(Medical Ethical Committees)によって承認された。外科的切除組織試料から単離したDNAにHPV16及びHPV18特異的プライマーを使用して、HPV状態に関して対象を試験した(Claas et al. 1989)。HLA拘束分析用の末梢血単核細胞(PBMC)を、インフォームドコンセント後にHLAタイプの匿名の健常な血液ドナーから得た。

【0073】

1.2 抗原

HPV16及びHPV18のE6及びE7タンパク質の両方にまたがる一組の重複するペプチドを、T細胞刺激アッセイに使用した。HPV16及びHPV18のE6及びE7は22merの重複する12残基からなっていた。初期に記載されたのと同様にペプチドを合成し溶解させた(van der Burg et al. 2001, Welters et al. 2006)。組換え体HPV E6及びE7タンパク質は、初期に記載されたのと同様に組換え体大腸菌において生成した(van der Burg et al. 2001)。さらに、HPV16 E6とE7の両方の一組の重複する10mer(重複する9アミノ酸)を生成して、HPV16特異的T細胞によって認識される最小ペプチドエピトープの位置を正確に示した。

【0074】

1.3 抗原提示細胞

患者のエプスタインバールウイルス形質転換B細胞系(B-LCL)を、10%のFCSを含有するIMDM中に維持した。単球は初期に記載されたのと同様に末梢血リンパ球から作製した(de Jong et al. 2002)。

【0075】

1.4 T細胞の単離及び培養

子宮頸部腫瘍生検を広汎子宮全摘術後に得て、子宮頸部腫瘍組織は生検後にCINIII患者から得た。新たな頸部組織を約1mm³の切片に刻み、10%のヒトAB血清(Sigma社製、St.Louis MO、USA)、10%のT細胞増殖因子(TCGF, T cell growth Factor, Zeptomatrix社製、Buffalo NY、USA)及び5ng/mlのIL-15(Peprotech社製、Rocky Hill NJ、USA)を補充したIMDM(BioWhittaker社製、Verviers、ベルギー)中で培養した。第1日中、5ng/mlのIL-7(Peprotech社製)を培養物に加えてT細胞増殖を確実にした。2~3週間後、T細胞(TIL、CIL)培養物の特異性を試験し、照射した自己B-LCLと5µg/mlの同種ペプチドの混合物を使用して陽性培養物を増殖した。

【0076】

リンパ節は骨盤領域に由来しており、転移性癌を示す腫瘍細胞を含有していた。リンパ節は切片に切断し、コラゲナーゼ(200IU/ml、Sigma社製)及びDNase(50µg/ml、Sigma社製)の存在下において37℃で1時間インキュベートし、その後リンパ節単核細胞を細胞濾過器(BD社製、Erebodengem、ベルギー)に通して、単細胞懸濁液を得た。別のLMNC培養物はHPV16又は18のE6又はE7ペプチドプールで刺激し、2~3週間培養した。

【0077】

T細胞クローンはEvans et al. (Evans et al. 2001) 出典のプロトコルに従った限界希釈法を使用して単離し、IL-2を10%のTCGF及び5ng/mlのIL-15に交換し、且つT細胞受容体誘発用に0.5µg/mlのフィトヘマグルチン(PHA, Murex Diagnostics社製、Dartford、UK)を加えた。限界希釈の後、T細胞クローンをそれらの特異性に関して試験し、10%のウシ胎児血清(FCS, Fetal Calf Serum、PAA Laboratories社製、Pasching、オーストリア)、10%のTCGF及び5ng/mlのIL-15を含有するIMDM中に維持した。培地、3個の異なるドナー由来の照射したPBMC、B-LCL及び0.5µg/mlのPHAの混合物を使用してT細胞クローンを増殖した。

【0078】

1.5 T細胞特異性の分析

T細胞培養物（1ウェル当たり25,000～50,000個の細胞）を、3日間の増殖アッセイ中三連でHPV16及び18のE6及びE7ペプチド（5µg/ml）及びタンパク質（10µg/ml）の認識に関して、パルス標識した自己単球又は照射した自己EBVで試験した。48時間後、上清を採取し、サイトカイン分析用に-20℃で保存した。培養の最後の16時間中に、1ウェル当たり0.5µCiの³Hチミジンを加えて増殖を測定した（van der Burg et al. 2001）。抗原特異的IFN産生は初期に記載されたのと同様にELISAによって測定した（van der Burg et al. 1999）。

【0079】

MHCクラスII遮断実験は、HLA-DR（B8.11.2）、HLA-DQ（SPV.L3）及びHLA-DP（B7/21）に対するマウスモノクローナル抗体を使用して前に報告されたように実施した（van der Burg et al. 1999）。ペプチドパルス標識APCは、T細胞を加える前に2時間抗MHCクラスII抗体と共にインキュベートした。

【0080】

細胞内サイトカイン染色によって測定したIFN産生T細胞の計数は初期に記載されたのと同様に実施した（de Jong et al. 2005）。簡単に言うと、APCに同種ペプチド又は組換え体タンパク質を充填し、T細胞培養物と共にインキュベートした。インキュベーションの1時間後、10µg/mlのBrefeldinA（Sigma社製）を加え、一晩インキュベートした。その後細胞を4%パラホルムアルデヒド（Sigma社製）で固定し、0.1%サポニンで透過処理した。試料は後にCD4-APC、CD8-PerCP及びIFN-PEで染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0081】

CD8T細胞によって認識される最小ペプチドは、IFN-ELISPOTによって分析した（van der Burg et al. 2001、Welters et al. 2006、de Jong et al. 2002）。CD8T細胞系は、IFN捕捉抗体（Mabtech社製、Nacha、スウェーデン）でコーティングしたMultiscreen96ウェルプレート（Millipore社製、Etten-Leur、オランダ）に、2×10⁴の密度で三連のウェルに接種した。マイクロ培養物は5µg/mlの10merペプチドで刺激し、一晩インキュベートした。CD8T細胞のHLA拘束の分析は、同数のT細胞と同時培養した5µg/mlの10merペプチドパルス標識PBMC又はB-LCLを使用して実施した。IFN特異的スポットは製造者（Mabtech社製）の説明書に従い染色した。スポットの数は完全自動化コンピュータ支援ビデオ画像システム（BIOSYS）で分析した。

【0082】

2. 結果

2.1 HPV特異的T細胞は子宮頸部腫瘍浸潤性リンパ球中に存在する

本試験において、本発明者らは、HPV特異的T細胞がそれらの同種抗原と遭遇しそれらのエフェクター機能を発揮すべき部位である、子宮頸部腫瘍性病変中での、HPV16及びHPV18特異的T細胞の存在、タイプ及び特異性を分析した。全体で74名の患者を分析した。頸部組織は、子宮頸癌を有する61名の患者から、及びCINIIIを有する9名の追加的的患者から得た。組織の刻んだ切片は、IL-15及びTCGFを含有するサイトカインの混合物の存在下で2～3週間培養した。腫瘍特異的T細胞の増殖の考えられる偏りを妨げるために、外来性HPV抗原をこれらの培養物に与えることはなかった。培養の第14～21日以内に、サイトカイン増殖T細胞を採取し、FACSによって分析した。これらの培養物中に存在するCD3⁺T細胞の平均率は、第2週の41%から第3週の68%まで増大した。一般に、第2週又は第3週（それぞれ38%±21%；48%±24%）のCD3⁺CD4⁺T細胞（34%±22%）とCD3⁺CD8⁺T細胞（52%±22%）の割合によって示されたように、この培養法は1タイプのT細胞の選択的増殖に好ましくなかった。個々の培養物は、CD4⁺又はCD8⁺T細胞のいずれかのさらに顕著な増殖を示す場合もあった（図示せず）。HPV特異的T細胞の存在を分析するために、HPV16及びHPV18のE6及びE7タンパク質にまたがる重複するペプチド

10

20

30

40

50

の異なるプール、及びそれぞれの組換え体タンパク質でパルス標識した自己単球で培養物を刺激した。51名のHPV16又はHPV18陽性患者の19名中で、本発明者らは増殖によりHPV特異的T細胞を検出することができた(表1、図1a)。これらの培養物はペプチド及びタンパク質負荷単球の両方に応答し、T細胞が自然にプロセッシングされた抗原を認識したことを示した。8個の培養物においてE6特異的T細胞を検出し、10個の培養物においてT細胞はE7に応答し、1個のT細胞培養物においてE6とE7の両方に対する応答を検出した。重要なことに、HPV16及び18陰性頸部組織(n=19)中ではHPV16又は18特異的T細胞応答は検出せず、これにより観察したHPV16及び18特異的応答はインビトロで誘導されなかったことが示された(表1)。

【表1】

表1 浸潤性リンパ球において検出されたHPV16及び18特異的応答

HPV状態	起源	患者	年齢	細胞型	病期	反応性	SI*	認識された ペプチド数	T細胞 タイプ	
HPV16										
	TIL									
		176	45	扁平上皮	FIGO 1B	E6	80	2	CD4/CD8	
		178	40	扁平上皮	FIGO 1B	E7	11	1	CD4	
		185	56	扁平上皮	FIGO 3B	E7	6	1	CD8	
		192	37	扁平上皮	FIGO 1B					
		194	67	腺	FIGO 2A	E7	5			10
		226	56	扁平上皮	FIGO 1B	E6	3	1	CD4	
		229	42	扁平上皮	FIGO 1B					
		230	45	扁平上皮	FIGO 1A					
		246	31	扁平上皮	FIGO 1B					
		265	44	扁平上皮	FIGO 1B	E6	104	2	CD4/CD8	
		267	49	扁平上皮	FIGO 1B	E6	109	2	CD4	
		271	40	扁平上皮	FIGO 1B					
		281	35	扁平上皮	FIGO 1B					
		283	51	扁平上皮	FIGO 1B					
		308	39	扁平上皮	FIGO 1B					
		312	30	腺	FIGO 1B					
		331	65	扁平上皮	FIGO 1B	E6	3	2	CD4/CD8	20
		332	32	扁平上皮	FIGO 1B					
		334	41	扁平上皮	FIGO 1B	E6	5	1	CD8	
		338	34	扁平上皮	FIGO 1B					
		340	29	扁平上皮	FIGO 1B					
		343	51	不明	FIGO 1B					
		344	43	扁平上皮	FIGO 2A					
		363	45	扁平上皮	FIGO 1B					
		369	33	腺	FIGO 1A					
		371	31	扁平上皮	FIGO 1B					
		372	72	扁平上皮	FIGO 1B					
		390	33	腺	FIGO 1B	E6/E7	4			30
		398	48	扁平上皮	FIGO 1B					
		405	41	扁平上皮	FIGO 2B					
		418	34	扁平上皮	FIGO 1B					
		415	46	扁平上皮	FIGO 1B					
		424	35	扁平上皮	FIGO 1B					
		441	51	扁平上皮	FIGO 1B					
		446	29	扁平上皮	FIGO 1B	E6	4	4	CD4/CD8	
	CIL									
		279	60	不明	CIN3					
		284	36	扁平上皮	CIN2	E7	13	1	CD4	
		285	27	扁平上皮	CIN3					
		310	46	扁平上皮	CIN3					
		314	34	扁平上皮	CIN3	E7	11			40
		355	47	扁平上皮	CIN3					
		356	26	扁平上皮	CIN3	E7	3.5	1	CD4	
	LN									
		148	46	扁平上皮	FIGO 1B	E6/E7	9/3		CD4	
		267	49	扁平上皮	FIGO 1B	E6	4		CD4	
		271	40	扁平上皮	FIGO 1B	E6/E7	1.5/2		CD4	

HPV18		427	28	扁平上皮	FIGO 1B	E6	9		CD4/CD8	
	TIL									
		187	43	扁平上皮	FIGO 1B	E6	2	1	CD4	
		196	48	腺扁平上皮	FIGO 2A					
		209	55	扁平上皮	FIGO 1B					
		214	42	腺	FIGO 1B	E7	15	1	CD4	
		228	37	扁平上皮	FIGO 2A	E7	18	1	CD4	
		251	39	腺扁平上皮	FIGO 2A	E7	3			
		261	38	扁平上皮	FIGO 1B					
		335	33	腺	FIGO 1B					
	378	40	腺	FIGO 1B	E7	8	1	CD4	10	
	LN									
		151	43	扁平上皮	FIGO 1B	E6/E7	2/3		CD4	
HPV16-18-	TIL									
		181	40	扁平上皮	FIGO 1B					
		182	80	扁平上皮	FIGO 2B					
		215	31	扁平上皮	FIGO 1B					
		245	41	扁平上皮	FIGO 1B					
		248	46	扁平上皮	FIGO 2A					
		264	35	腺	FIGO 1B					
		280	31	扁平上皮	FIGO 1B					
		287	61	癌肉腫	FIGO 2B					20
		289	45	腺	FIGO 1B					
		292	32	扁平上皮	FIGO 1B					
		324	51	扁平上皮	FIGO 1B					
		353	35	腺	FIGO 1A					
		373	55	扁平上皮	FIGO 1B					
		377	85	扁平上皮	FIGO 1B					
		381	80	腺	FIGO 1B					
		384	75	扁平上皮	FIGO 1B					
		414	64	扁平上皮	FIGO 2A					
		CIL								
			348	35	扁平上皮	CIN3				
		354	39	扁平上皮	CIN3				30	
	LN									
		426	40	扁平上皮	FIGO 1B					

*SI=応答T細胞の刺激指数

【 0 0 8 3 】

2.2 HPV特異的CD4とCD8 T細胞の両方が腫瘍組織に浸潤する

HPV特異的反応性の評価後、19の応答T細胞系を同種ペプチド、サイトカイン混合物及びフィーダー細胞での刺激によって増殖した。これらのHPV特異的培養物の15個は、さらなる分析用に十分増殖することができた。HPV特異的T細胞の優れた特異性を、単一のペプチドを使用して短期の刺激アッセイにおいて決定した。5個の培養物が2個以上の異なるペプチドを認識し、一方他の10個の培養物は単一のペプチドを認識した(図1b、表1)。抗原刺激に応答したT細胞のタイプを評価するために、T細胞培養物をそれらの同種ペプチド及びタンパク質抗原で刺激し、且つ応答は細胞内IFN染色によって分析した(図2)。大部分のTIL培養物は、HPV特異的CD4+浸潤性Tリンパ球を含有しており(n=13名の患者、13の異なるペプチドを認識した)、一方HPV特異的CD8+T細胞浸潤性リンパ球は6個の培養物中に見られた。HPV特異的T細胞系の9個ではCD4+T細胞応答のみを検出し、4個のT細胞系ではCD4+T細胞とCD8+T細胞の両方が反応し、且つ2個のT細胞系ではCD8 T細胞の応答のみを検出した(表1、図2)。

【 0 0 8 4 】

2.3 腫瘍浸潤性リンパ球のHLA拘束

40

50

CD8⁺T細胞及びCD4⁺T細胞に対するHPVペプチドの提示と関連するHLAクラスI及びII遺伝子座を、遮断抗体及び健常ドナーから単離した部分的HLA適合APCを使用して試験した。広く様々なHLAクラスII分子は、HPV16及びHPV18の抗原E6及びE7の提示と関連することが分かった(表2)。HLA-DR、HLA-DQ及びHLA-DPに対する遮断抗体の使用によって、検出した応答のうち3つはHLA-DRによって拘束され、3つはHLA-DQによって拘束され、3つはHLA-DPによって拘束されたことが明らかになった(図3a、表2)。HPV抗原の提示と関連する正確なHLA拘束エレメントを決定するために、ただ1つのHLA対立遺伝子に適合する健常ドナー由来のAPCを使用した(図3)。6例において本発明者らは、拘束エレメントを正確に決定することができなかった。

【表2】

表2 子宮頸癌患者に認識されるT細胞エピトープ

T細胞タイプ	認識されるエピトープ	拘束性	起源	患者	SEQ ID
CD4	HPV16E6.11-32	DP17	LN	C148	5
	HPV16E6.11-32	DP1401	LN	C271, C427	5
	HPV16E6.37-68	DP0201	TIL	C226	6
	HPV16E6.52-61	DP0201	TIL	C265	7
	HPV16E6.55-86	不明	LN,TIL	C267	8
	HPV16E6.61-82	DP1又はDP14	LN	C427	9
	HPV16E6.73-105	DP4	LN	C148	10
	HPV16E6 73-105	不明	LN,TIL	C267	10
	HPV16E6.91-112	DR15又はDQ5	TIL	C331	11
	HPV16E6.91-112	不明	LN	C267	11
	HPV16E6.101-122	DQ6	LN,TIL	C427, C446	12
	HPV16E6.121-142	DP0201又はDQ5	TIL	C265	13
	HPV16E6.121-142	不明	TIL	C187	13
	HPV16E6.129-138	DR7	TIL	C176	14
	HPV16E7.21-42	DR4	TIL	C178	15
	HPV16E7.51-72	DP1901	CIL	C356	16
	HPV16E7.76-86	DR12	CIL	C284	17
	HPV18E6.51-72	DQ*0301	LN	C151	18
	HPV18E6.71-92	DQ*0501	LN	C151	19
	HPV18E7.1-32	DQ*0302, DQ*0308	TIL	C214	20
HPV18E7.1-32	不明	TIL	C378	20	
HPV18E7.21-42	DQ*0302	TIL	C228	21	
CD8	HPV16E6.13-22	HLA-B7	TIL	C446	22
	HPV16E6.29-38	HLA-A2	LN	C427	23
	HPV16E6.52-61	HLA-B57	TIL	C331	7
	HPV16E6.52-61	不明	TIL	C265	7
	HPV16E6.129-138	不明	TIL	C265	14
	HPV16E6.137-146	HLA-B27	TIL	C176, C334	24
	HPV16E6.149-158	HLA-B14	LN	C427	25
HPV16E7.11-19	HLA*0201	TIL	C185	26	

【0085】

患者C265の場合、HPV特異的CD4⁺とCD8⁺T細胞の両方が同じペプチドに応答した(図2)。これら2つのT細胞応答を区別するために、限界希釈法によってT細胞クローンを樹立した。残念ながら、CD4⁺T細胞クローンのみを得て、したがって、HLAクラスII拘束エレメントのみを樹立することができた。したがって、他の5個の異

なるHPV特異的CD8T細胞培養物中の最小ペプチド及び拘束を決定することのみが可能であった(表2)。一例として、図3は最小ペプチド-エピトープの決定及び患者C334から得たTIL培養物のCD8T細胞応答の拘束(図3c)を示す。この応答はHLA-B27によって拘束されたが、それは、このCD8T細胞培養物は、HLA-B27適合ペプチド負荷APCを用いた刺激にのみ応答し、他のドナー由来の他の部分的HLAクラスI適合APCを用いた刺激には応答しなかったからである(図3c)。1名の患者(C265)は2つの異なるエピトープに対するCD8⁺T細胞応答を示し、2名の患者(C176及びC334)は同じHLA-B27CTLエピトープに反応した(表2)。

【0086】

2.4 腫瘍流入領域リンパ節中のHPV特異的T細胞

腫瘍流入領域リンパ節はHPV特異的T細胞が初回抗原刺激及び活性化される部位であり、したがって、HPV特異的T細胞応答も、6名の異なる子宮頸癌患者由来の腫瘍流入領域リンパ節において試験した。リンパ節単核細胞(LNMC, lymph node mononuclear cell)の単細胞懸濁液は、そのリンパ節の転移を示す子宮頸癌患者から単離した。本発明者らは、新たに単離したLNMCにおけるHPV特異的エクスピボ応答を直接検出することはできなかった(データ示さず)。したがって、LNMCはHPV16又は18のE6及びE7ペプチドプールを用いた1ラウンドのインビトロ刺激によって最初に増殖した。4例においてLNMCはHPV16に反応し、1名の患者では、HPV18反応は増殖及びIFN産生によって検出した(表1、図4A)。TIL培養物と同様に、HPV16陽性腫瘍を有する患者はHPV16にのみ反応し、一方HPV18陽性子宮頸癌と診断された患者はHPV18に対してのみ反応した。LNMCをインビトロでHPV16及びHPV18ペプチドを用いて刺激したという事実にもかかわらず(表1)、HPV16/18陰性患者由来のLNMCにおいてHPV16又はHPV18のいずれに対する反応も検出しなかった。これらのLNMC培養物から単離したT細胞クローンは、それらの優れた特異性及びHLA拘束エレメントに関して特徴付けした。CD4⁺T細胞の反応性は10個の異なるペプチドに見られ、そのうちの7個はTIL培養物中では検出しなかった。これらのエピトープの3個はHLA-DQによって拘束され、且つ他の4個はHLA-DPによって拘束された。さらに、1個のHLA-A*0201拘束及び1個のHLA-B14拘束CD8⁺T細胞エピトープを同定した(表2)。図4はLNMC培養物の分析の一例を示す。1ラウンドの刺激後、LNMC培養物はHPV16 E6ペプチド又は組換え体タンパク質のプールを負荷したAPCに特異的に反応した(図4A)。単一のペプチドに対する反応性の分析は広範囲のレパートリーのペプチドの認識を示し(図4B)、この培養物から単離したCD4⁺及びCD8⁺T細胞クローンは、組換え体タンパク質から自然にプロセッシングされたときそれらの同種抗原を認識した(図4C)。HLAクラスII遮断抗体及び部分的適合ドナー由来のAPCを使用して拘束をさらに決定した(図4D)。

【0087】

総合すると、TILと腫瘍流入領域リンパ節細胞の両方の分析により、54名の異なるHPV16又はHPV18陽性患者の23名において、合計25個の異なるE6又はE7由来ペプチドに対する特異的T細胞応答を検出することができることが明らかになった。特に、13個のCD4⁺T細胞ペプチド-エピトープはHLA-DQ又はHLA-DPによって拘束され、3個はHLA-DRによって拘束され、且つ6例において、本発明者らはHLA-DQ/DPとHLA-DRを区別することができなかった(表2)。発見したCD8⁺T細胞応答のうち、2個はHLA-Aによって拘束され、4個はHLA-Bによって拘束され、且つ2個は決定不能であった(表2)。

【0088】

3. 考察

HPV16コードオンコプロテインE6及びE7は、動物モデル中で腫瘍拒絶抗原として機能することができ(Zwaveling et al. 2002, Peng et al. 2005)、それらは子宮頸癌における腫瘍浸潤性リンパ球の標的抗原として機能することもできることが示唆される

10

20

30

40

50

が、これは患者の大規模集団では決して系統的に分析されていない。本発明者らは、子宮頸癌と最も顕著に関連するHPV型であるHPV16及びHPV18に対して、反応性がある多数のTIL及びCIN浸潤性リンパ球(CIL, CIL-infiltrating lymphocyte)培養物を樹立することができた(Bosch et al. 1995、Munoz et al 2003)。使用したサイトカイン混合物は、いずれかのタイプのT細胞の増殖に関する明らかな優先傾向なしでCD4T細胞とCD8T細胞の両方の増殖を確実にした。本発明者らの試験の経過中、HPV16又はHPV18以外のHPV型に陽性の腫瘍と診断された患者から19のTIL培養物を樹立した。これらの培養物はいずれも、HPV16又はHPV18のE6及びE7抗原を用いた刺激に反応しなかった。特に、HPV16陽性患者由来のTIL及びCILはHPV18のE6及びE7に反応せず、逆も然りであった(表1)。したがって、HPV16又はHPV18陽性患者のTIL及びCILにおいて観察したHPV特異的T細胞応答は、インビトロで誘導されたT細胞応答の結果ではなく、インビボでの抗腫瘍反応を反映するものである。近年本発明者らは、卵巣癌を有する患者の小コホート由来のTIL培養物の増殖においても、このプロトコルは成功したことを示した(Lambeck et al. 2007)。

【0089】

同様の数のTIL培養物がE6及びE7に反応した(表1)。同種ペプチド-エピトープ及びHPV特異的免疫応答のHLA拘束エレメントの同定は、HPV特異的免疫は特定の免疫優勢領域に制限されず、E6及びE7オンコプロテインの全ドメインに向けられたものであったことを明らかにし(表2)、HPV E6特異的T細胞とE7特異的T細胞の両方が抗腫瘍反応に貢献し得ることが示唆された。特筆すべきことに、本発明者らの分析は、大部分のHPV特異的CD4⁺T細胞応答は、HLA-DRによってではなくHLA-DQ又はDPによって拘束されたこと(13/16)を明らかにした(表2)。これは予想外であったが、それは、HLA-DRは、APCの細胞表面(Schwartz et al. 1988)及びデノボHLAクラスII発現がある子宮頸癌細胞(Hilders et al. 1994)上に、最も豊富に存在するHLAクラスII分子であるからである。さらに、他の腫瘍抗原では、同定するCD4⁺T細胞エピトープの大部分は、HLA-DRの状況で提示される(80/93; <http://www.cancerimmunity.org>のデータベースを参照)。しかしながら、子宮頸癌では、HLA-DQ及びHLA-DP拘束T細胞のより顕著な役割が存在するようであり、HPVに対する機能的T細胞応答を同定するためのコンピュータアルゴリズムを組み込んだ戦略は、HLA-DRのみに焦点を当てるべきではないと論じられている(Warrino et al. 2004、Facchinetti et al. 2005)。

【0090】

7名の患者において、CD8⁺T細胞応答を検出した。3個の新規のHLA-B7、HLA-B14及びHLA-B27拘束CD8T細胞エピトープの同定に加えて、本発明者らはHPV16 E7.11-20エピトープを認識するHLA-A*0201拘束腫瘍浸潤性CD8⁺T細胞(Evans et al. 1997、Oerke et al. 2005)の存在を確認したが、ただしペプチド配列11~19に対するさらに強い反応性を観察した。さらに、HLA-B57拘束エピトープHPV16 E6.52-61に反応性があるCD8⁺T細胞を検出した。健常対象の末梢血中のHLA-B57拘束HPV16 E6.52-61特異的CD8⁺T細胞の検出に基づいて、このCTLエピトープはHPV16感染を除去する際に重要な役割を果たす可能性があることが示唆されている(Nakagawa et al 2004、Nakagawa et al 2007)。しかしながら、癌患者中のこのエピトープに反応するCTLの検出はこの可能性を低下させる。

【0091】

本発明者らの試験は、54名の異なるHPV16又はHPV18陽性患者の少なくとも23名において、E6及び/又はE7に対する特異的T細胞応答を検出することができることを示す(表1)。これは、既存の免疫応答を有する患者中の有効な抗腫瘍反応を回復するための、これらの抗原に対するT細胞応答の誘導を目的とするワクチン接種戦略を容易にする。重要なことに、この試験中にT細胞によって認識されるT細胞エピトープは、

10

20

30

40

50

HPV 16 及び HPV 18 陽性腫瘍に対する免疫応答における生理的標的を構成する。このようにそれらは、疾患の異なる段階での HPV 特異的 T 細胞サブセットの重要性及び機能の総合分析、並びに免疫療法のモニタリングに有益であり得る。子宮頸癌患者中に頻繁に存在する HPV 特異的 T 細胞は、養子 T 細胞移入療法中で使用することができる腫瘍特異的 T 細胞の貴重な源を構成する可能性もある。

【実施例 2】

【0092】

ペプチドの真皮内投与

材料及び方法

試験設計

上腕中の臨床用 HPV 16 ペプチドのプールの真皮内注射によって測定した HPV 16 E 2、E 6、及び E 7 特異的 T 細胞応答を分析するための横断的 (cross-sectional) パイロット試験を、頸部の HPV 関連障害を有する患者及び健常個体において実施した。遅延型過敏反応は記憶 T 細胞応答を示すので、分析時に HPV 16 陽性に関する要件は存在しなかった。

【0093】

対象

インフォームドコンセントを与えた後に、一群の 19 名の健常個体 (HD, healthy individual) がこの試験に参加した。この群の健常個体は 31 歳の平均年齢 (範囲、20 ~ 51 歳) を示し、80% の女性及び 20% の男性で構成されていた。末梢血単核細胞 (PBMC) は、皮膚試験の投与の直前に全ての対象から得た。健常個体における皮膚試験の陽性の後期出現により、19 名の健常ボランティアの 11 名から第 2 の血液試料を単離した。試験設計は the Leiden University Medical Centre の医療倫理委員会 (Medical Ethical Committees) によって承認された。

【0094】

DTH 皮膚試験

遅延型過敏反応 (DTH, Delayed Type Hypersensitivity) に基づく皮膚試験を、HPV 特異的細胞性免疫応答のインビボ測定用の高感度及び簡潔な方法として使用することができる (Hopfl, 2000, Hopfl, 1991)。皮膚試験用調製物は、HPV 16 E 6 及び E 7 タンパク質全体及び HPV 16 E 2 タンパク質の大部分の免疫原性領域にまたがる長鎖の臨床用合成ペプチドの 8 プールからなっていた (de Jong, 2004)。これらの臨床用ペプチドは、LUMC の部門間 GMP 施設において生成された。皮膚試験のそれぞれのプールは、ペプチドによって含まれるタンパク質中の領域の最初と最後のアミノ酸によって示される、2 又は 3 の合成ペプチドからなっていた。プール 1: E 2₃₁₋₆₀、E 2₄₆₋₇₅、プール 2: E 2₃₀₁₋₃₃₀、E 2₃₁₆₋₃₄₅、プール 3: E 6₁₋₃₁、E 6₁₉₋₅₀、プール 4: E 6₄₁₋₆₅、E 6₅₅₋₈₀、E 6₇₁₋₉₅、プール 5: E 6₈₅₋₁₀₉、E 6₉₁₋₁₂₂、プール 6: E 6₁₀₉₋₁₄₀、E 6₁₂₇₋₁₅₈、プール 7: E 7₁₋₃₅、E 7₂₂₋₅₆、プール 8: E 7₄₃₋₇₇、E 7₆₄₋₉₈。プール 3 は配列番号 5、22 及び 23 を含む。プール 4 は配列番号 7 ~ 9 を含む。プール 5 は配列番号 11 及び 12 を含む。プール 6 は配列番号 13、14、24 及び 25 を含む。プール 7 は配列番号 15 及び 26 を含む。プール 8 は配列番号 16 及び 17 を含む。ペプチドプール 1 つ当たり、16% DMSO を含む 20 mM の等張リン酸緩衝液 (10 µg / ペプチド) に溶かした 0.2 mg / ml ペプチドの 0.05 ml を皮内注射した。ペプチド及び陰性対照 (溶媒のみ) のプールを、上腕の個々の皮膚試験部位に別々に注射した。皮膚試験部位は少なくとも 3 回、ペプチド (Hopfl) の注射後 72 時間及び 7 日、及び第 1 健常対象の 1 名における非常に後期の皮膚反応の最初の報告後 3 週間で調べた。注射後 2 日以内に直径 2 ミリメートルを超える丘疹が生じたとき、反応は陽性であると考えた。陽性皮膚反応部位から、パンチ生検 (4 mm) を得て、小片に切断し、10% のヒト AB 血清、10% の TCGF 及び 5 ng / ml の IL7 及び IL15 を含有する IMDM 中で培養して、皮膚組織からのリンパ球の移出を可能にした。培養の 2 ~

10

20

30

40

50

4週間後、増殖したT細胞を採取し、それらのHPV特異的反応性に関して試験した。

【0095】

インビトロ免疫アッセイ用の抗原

皮膚試験中で使用したペプチドと同様の一組のペプチドを、T細胞刺激アッセイ及びIFN-ELISPOTアッセイに使用した。4個のHPV16 E2ペプチドは30merペプチドの重複する15残基からなっており、HPV16 E6は32mer、HPV16 E7は35mer、いずれも重複する14残基からなっていた。以前に記載されたのと同様に(van der Burg, 1999)ペプチドを合成及び溶解した。特に、IFN-ELISPOTアッセイでは、ペプチドプール4及び5は皮膚試験中で使用したペプチドプールと若干異なっており、プール4はペプチドE6₃₇₋₆₈、E6₅₅₋₈₆、E6₇₃₋₁₀₄を含有し、且つプール5はペプチドE6₇₃₋₁₀₄、E6₉₁₋₁₂₂を含んでいた。

10

【0096】

破傷風トキソイド(0,75リムス・フロクレンティウス種/ml、National Institute of Public Health and Environment、Bilthoven、オランダ)、超音波処理済みヒト型結核菌(5µg/ml、Dr.P.Klatser、Royal Tropical Institute、Amsterdam、オランダによって気前よく寄付された)、及びカンジダ・アルピカンス種(0.15mg/ml、HAL Allergenen Lab.、Haarlem、オランダ)の混合物からなる記憶応答ミックス(MRM50x)を陽性対照として使用した。以前に記載されたように(van der Burg, 2001)、組換え体HPV16 E2、E6及びE7タンパク質を組換え体大腸菌において生成した。

20

【0097】

IFN-ELISPOTによる抗原特異的Th細胞の分析

以前に記載されたように(van der Burg, 2001)ELISPOTによってHPV16特異的Th細胞の存在を分析した。簡単に言えば、新たなPBMCを、示したHPV16 E2、E6及びE7ペプチドプールの有無の下で、10%ヒトAB血清を補充した1mlのIMDM(Bio Whittaker社製、Verviers、ベルギー)中、24ウェルプレート(Costar社製、Cambridge、MA)の1ウェル当たり 2×10^6 個細胞の密度で接種した。ペプチドは5µg/ml/ペプチドの濃度で使用した。37°Cでのインキュベーションの4日後、PBMCを採取し、洗浄し、IFN-γ捕捉抗体(Mabtech社製、Nachta、スウェーデン)でコーティングしたMultiscreen96ウェルプレート(Millipore社製、Etten-Leur、オランダ)中、10%FCSを補充した100µlのIMDM中、1ウェル当たり 10^5 個細胞の密度で四連のウェルに接種した。ELISPOTのさらなる抗体のインキュベーション及び発色は、製造者の説明書(Mabtech社製)に従い実施した。完全自動化コンピュータ支援ビデオ画像システム(Bio Sys)を用いてスポットを計数した。実験ウェル中の平均スポット数から平均スポット数に培地対照の $2 \times SD$ を加算したものを引くことによって、特異的スポットを計算した(van der Burg, 2001)。

30

【0098】

T細胞増殖アッセイ

皮膚生検のT細胞培養物を、3日間の増殖アッセイ中の特異的ペプチド及びタンパク質の認識に関して試験した(van der Burg, 2001)。簡単に言うと、37°Cでのエキスビオ15培地(Cambrex社製)中での2時間中の平底96ウェルプレートへの付着によって、PBMCから自己単球を単離した。単球はAPCとして使用し、10µg/mlのペプチド及び20µg/mlのタンパク質を一晩負荷した。皮膚試験用浸潤性リンパ球を、10%AB血清を補充したIMDM中、1ウェル当たり $2 \sim 5 \times 10^4$ 個細胞の密度で接種した。単独培地は陰性対照として採取し、フィットヘマグルチン(0.5µg/ml)は陽性対照として働いた。増殖は $[^3H]$ チミジン(5µCi/mmole)の取り込みによって測定した。増殖応答は刺激指数(SI)が3以上であったとき特異的であると定義した。増殖アッセイの上清を、抗原特異的サイトカイン産生の分析用にインキュベーション後48時間で採取した。

40

50

【 0 0 9 9 】

HPV 16 特異的増殖応答と関連するサイトカインの分析

6 個の異なる Th 1 及び Th 2 サイトカイン、IFN γ 、腫瘍壊死因子、インターロイキン 2 (IL 2)、IL 4、IL 5 及び IL 10 の同時検出を、製造者の説明書に従いサイトメトリックビーズアレイ (Becton Dickinson社製) を使用して実施した。カットオフ値は、異なるサイトカインの標準曲線 (100 pg/ml の IFN γ 、残りのサイトカインに関して 20 pg/ml) に基づいた。抗原特異的サイトカイン産生は、カットオフレベルを超え培地対照濃度の 2 倍より大きいサイトカイン濃度として定義した (de Jong, 2004)。

【 0 1 0 0 】

細胞内サイトカイン染色 (ICS)

陽性皮膚反応部位由来の T 細胞培養物の特異性及び特徴を、前に報告されたように (de Jong, 2005) ICS によって試験した。簡単に言えば、皮膚試験用浸潤性リンパ球を採取し、洗浄し、10% AB 血清を含む IMDM 中に懸濁し、且つ $2 \sim 5 \times 10^4$ 個細胞を、エクスピボ培地において 50 μ l のペプチド (10 μ g/ml) 又はタンパク質 (20 μ g/ml) で一晩パルス標識した自己単球に加えた。単独培地は陰性対照として採取し、フィットヘマグルチン (0.5 μ g/ml) は陽性対照として働いた。試料は FITC 標識マウス抗ヒト IFN γ (0.5 μ g/ml、BD PharMingen社製)、PE 標識マウス抗ヒト IL 5 (0.2 mg/ml、BD PharMingen社製)、APC 標識抗 CD 4 (BD Bioscience社製) 及び PerCP 標識抗 CD 8 (BD Bioscience社製) で同時に染色した。4 でのインキュベーション後、細胞を洗浄し、1% パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリー (FACSscan、BD Bioscience社製) によって分析した。

【 0 1 0 1 】

統計分析

フィッシャーの正確確立検定 (両側) を使用して、PBMC における IFN γ 産生 HPV 特異的 T 細胞の検出、皮膚試験反応の存在、又は皮膚生検中の HPV 特異的 T 細胞の存在の間の関係、並びにこれらの群内の皮膚反応の大きさ又は数に関する患者と健常対照の間の違いを分析した。統計分析は Graphpad Instat ソフトウェア (バージョン 3.0) 及び Graphpad Prism4 を使用して実施した。

【 0 1 0 2 】

結果

HPV 16 E 2、E 6 - 及び E 7 ペプチドを用いた皮内注射に対する皮膚反応

本発明者らは、HPV 16 E 2、E 6 及び E 7 ペプチドを用いた皮内注射後の健常対照中の皮膚反応を試験した。陽性皮膚反応は直径 2 ~ 20 ミリメートルの扁平状赤色丘疹として現れ、注射後 2 ~ 25 日以内に生じた。陽性皮膚反応は、皮膚試験中の 152 名の健常ボランティアの 46 名において検出した。全体として、皮膚試験中のそれぞれのペプチドプールは陽性皮膚反応をもたらすことができた。最も頻繁に、E 2₃₁₋₇₅ (対象 19 名中 10 名)、E 6₃₇₋₁₀₄ (9/16) 及び E 7₄₃₋₉₈ (7/19) に対する反応を対照群中で観察した。この反応パターンは、本発明者らが PBMC において以前に観察した反応パターンと似ている (de Jong, 2002、Welters, 2003) (図 5)。これらの皮膚反応は、これらの個体の PBMC において検出したのと同様に、ペプチド特異的 T 細胞応答の存在に対応した (データ示さず)。

【 0 1 0 3 】

健常ドナー中の皮膚反応は末梢血中の HPV 16 特異的 T 細胞の高頻度と関連する。

皮膚試験の結果と血中 HPV 16 特異的 1 型 T 細胞の存在を比較するために、IFN γ ELISpot アッセイを、真皮内ペプチド曝露を行う前に回収した PBMC を用いて実施した。19 名の健常ボランティアのうち 5 名において、本発明者らは IFN γ - ELISpot によって HPV 16 特異的免疫応答を検出することができた。健常個体の事前曝露血液試料中の、100.000 個の PBMC 当たり 5 個以上の血中 HPV 16 特異的 T 細胞の検出は、同じペプチド配列に対する初期 (13 日以内) の陽性皮膚反応と関係があ

10

20

30

40

50

った ($p = 0.0003$ 、両側のフィッシャーの正確確立検定；図6)。後期の陽性皮膚反応(第14~25日)を誘導したペプチドとの事前曝露血液試料の健常ドナー中で、HPV16特異的血液中T細胞は検出しなかった。これは、血中抗原特異的細胞の頻度は、皮膚反応の遅延時間の出現を決定することを示唆する。

【0104】

後期の皮膚反応が現れたときのHPV特異的T細胞の頻度を評価するために、11名の健常ボランティアから追加的血液試料を回収した。これらの個体において、88の皮膚試験のうちの39が陽性であった。39の陽性皮膚反応のうちの25及び49の陰性皮膚反応のうちの10において、100.000個のPBMC当たり5個以上のHPV16特異的T細胞を検出した。この時点で、曝露後の血液試料中の血中HPV特異的IFN産生T細胞の検出と皮膚反応の存在の間の、有意な相関関係を見出した ($p < 0.0001$ 、フィッシャーの正確確立検定；図7)。これは、健常ボランティアの血液中のHPV16特異的T細胞の頻度は、HPV16ペプチドを用いた真皮内曝露後に有意に高くなることを示し、ペプチド抗原の皮内注射は、健常ボランティアの血液中のHPV16特異的T細胞の数を増大することを示す。

【0105】

陽性皮膚反応部位の生検はTh1/Th2-CD4+とCD8+HPV16特異的T細胞の両方からなる。

健常ボランティアの陽性皮膚反応の約25%は、血中のHPV16特異的IFN産生T細胞の検出と関係がなく、他の、非IFN産生タイプのT細胞が、HPV16ペプチドの真皮内注射後に皮膚に浸潤する可能性があることが示唆された。

【0106】

陽性皮膚反応部位中の細胞を特徴付けするために、パンチ生検を採取した。合計8個の生検を7名の健常個体の異なる陽性皮膚反応部位から得て、サイトカインのカクテルと共に培養し、抗原刺激なしのインビトロでのT細胞の増殖を可能にした。8例のうちの7例において、T細胞は組織外に浸潤し、3~4週間以内に増殖した。増殖したT細胞は、短期の増殖アッセイ中のそれらの特異性に関して試験した。図8は、ペプチドのプールでパルス標識し、さらに皮膚試験中にこの部位に注射した自己単球(HD2、HD10、HD15)、及びHPV16E6タンパク質(図8AB)でパルス標識した単球を用いた刺激によって特異的に増殖したT細胞培養物の例を示す。これは、これらのT細胞が、抗原が自然にプロセッシング及び提示された後に、それらの同種HLA-ペプチド複合体を認識することができたことを示す。これらの増殖T細胞培養物の上清の分析は、HPV16特異的T細胞がIFN、IL-4及びIL-5を産生した混合型Th1/Th2サイトカインプロファイルを明らかにした(図8C)。

【0107】

生検培養物(8個中4個)においてHPV特異的T細胞を検出したそれぞれの場合、これはELISPOTによる曝露後の血液試料中の血中HPV16特異的IFN産生T細胞の検出と一致した(図8A及びBを比較)。他の4個の陽性皮膚反応生検の3個(HD2、HD17、HD18)において、T細胞はHPV16ペプチドに应答せず(図8；HD17)、一例では、T細胞は組織外に全く浸潤しなかった(HD13)。これらの4例において、本発明者らは、曝露後の血液試料中の血中HPV16特異的IFN産生T細胞を検出することができなかった。

【0108】

CD4及びCD8細胞表面マーカーによる生検-T細胞の同時染色は、HPV16特異的CD4+だけでなくHPV16特異的CD8+T細胞も、HPV16ペプチドでの真皮内曝露によって皮膚部位に浸潤したことを示した(図9)。全体として、HPV16特異的T細胞によって浸潤した4個の生検の3個において、本発明者らは、HPV16特異的CD8+T細胞を検出することができた。HD2の生検(プール6)から単離したCD8+T細胞は、注射皮膚試験の両方の重複するペプチド：HPV16E6₁₀₉₋₁₄₀とE6₁₂₇₋₁₅₈に应答したが(データ示さず)、一方両対象HD15及びHD16

10

20

30

40

50

のCD8⁺T細胞は、HPV16 E6₃₇₋₆₈に応答した(HD15に関する実施例、図5を参照)。

【0109】

総合すると、HPV16ペプチドを用いた真皮内曝露によって皮膚に移動する免疫細胞の集団は、HPV16特異的CD4⁺Th1⁻、Th2⁻及びCD8⁺細胞障害性T細胞を含む。この浸潤は、血液中の血中HPV16特異的IFN γ 産生T細胞の出現と平行する。

【0110】

考察

皮膚試験は、インビボでの細胞仲介免疫の測定用の簡潔なアッセイとして一般的に使用する。本発明者らは、インビボでの初期抗原E2、E6及びE7に対するHPV16特異的細胞性免疫応答を、これらの結果とインビトロアッセイによるT細胞反応性の平行測定の結果を比較することによって測定するための、皮膚試験アッセイの使用を確認した。

【0111】

健常ボランティアの群において、初期皮膚反応は皮内抗原曝露後4~12日で現れた。インビトロでHPV16特異的1型T細胞応答を示すことが知られている(de Jong, 2002, Welters, 2003)、これらの個体において、初期皮膚反応の出現(13日以内)は、20,000個のPBMC当たり少なくとも1個の頻度での、IFN γ 産生HPV16特異的T細胞の検出と有意に関係があった(図6、p<0.001)。IFN γ ELISPOTアッセイ中の陽性反応に関する同じカットオフ基準は、数学的ツールを使用してツベルクリン反応に関するELISPOTの適切なカットオフを定義した、Jeffries et al (Jeffries, 2006)によって推奨される。少数の血中記憶T細胞(図6)によって、古典的なDTH試験と比較して何故皮膚反応が幾らか遅れて出現するかを説明することができる。十分な細胞が生成されて局所炎症、陽性皮膚試験を引き起こす前に、T細胞を追加抗原刺激又は再活性化して分裂を開始させることが必要である。実際、陽性皮膚反応が現れるとき、高頻度のHPV16特異的Th1応答を末梢血中で検出することができる(図7)。

【0112】

歴史的に、Th1細胞はDTH応答を誘導すると仮定されているが、しかしながら幾つかの試験は、Th2細胞も皮膚試験部位に浸潤することを現在示している(Wang, 1999, Woodfolk, 2001)。同様にこの試験は、健常ボランティアの陽性皮膚試験部位は、Th1型とTh2型HPV16特異的T細胞の両方を含有することを示す(図8及び9)。さらに、腎細胞癌又はメラノーマを用いた患者のワクチン接種後の特異的免疫応答をアッセイするために使用した、陽性皮膚試験部位の2つの詳細な試験から明らかとなったように(Bleumer, 2007)、陽性皮膚反応は非特異的T細胞の流入の結果である可能性もある。さらにこの試験は、健常対象由来の幾つかの陽性皮膚試験部位に、注射したHPV16抗原に反応しなかったT細胞が浸潤したことを示した。これまでのところ、特異的陽性皮膚反応の理由は依然として明らかではない。予想外に本発明者らは、健常個体中の大部分の皮膚反応は、抗原の真皮内注射後2~3週間現れることを観察した。これらの後期の陽性皮膚反応は、事前曝露血液中の血中HPV特異的CD4⁺記憶T細胞の検出と相関がなかった一方で(図6)、これらの皮膚試験部位の免疫学的構成は古典的DTH試験のそれと同様であり(Platt, 1983, Poulter, 1982)、HPV16特異的CD4⁺Th1⁻及びTh2⁻細胞並びにHPV16特異的CD8⁺T細胞からなる(図8及び9)。本発明者らは、これらの反応はT細胞初回抗原刺激の結果であり得ると仮定する。2ステップのツベルクリン皮膚試験プロトコルを経験し第2試験ラウンドにおいてのみ陽性であった患者の29%においても、これは記されている(Akcay, 2003)。一般に、ワクチン誘導型T細胞応答は、3週間ではなくワクチン接種後10~14日でピークに達する。しかしながら、このようなプロトコル中では、高用量の抗原及び強力なアジュバントが注射されることに留意しなければならない。したがって、真皮内曝露によって誘導されるT細胞応答はさらにゆっくりと発達し、さらに後期にピークに達すると仮定することが妥当である。健常ボランティアにおける真皮内ペプチド曝露は、HPV16特異的CD4⁺とCD8⁺T細胞

10

20

30

40

50

の両方の誘導をもたらすので、したがって、それは単回、低用量ワクチン接種とみなすべきである。

【 0 1 1 3 】

このパイロット試験の主な目的は、インビボでの1型免疫応答を検出するためのHPV 16特異的皮膚試験の使用を確認することであった。健常ボランティアにおいて、13日以内の陽性皮膚反応は、インビトロでのIFN ELISpotによって検出される血中IFN産生記憶T細胞の存在と実際に相関がある。重要なことに、本発明者らは、皮膚試験及びELISpotによって得られた結果の間の相違も観察した。幾つかの場合、HPV 16特異的血中IFN産生T細胞を、同時皮膚反応なしではあったが曝露後の血液試料中で検出し、逆も然りであり(図7)、これは偽陰性又は偽陽性の結果とみなすことができる。HPVに対する1型免疫の検出の解釈に対するこの影響を完全に理解するために、本発明者らは、インドネシアにおけるHPV陽性患者及び健常ボランティアの大規模集団において現地試験を始めている。

10

【 0 1 1 4 】

(参考文献)

1. Akcay, A., Erdem, Y., Altun, B., Usalan, C., Agca, E., Yasavul, U., Turgan, C., and Caglar, S. The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am.J.Infect.Control*, 31: 371-374, 2003
2. Altmann et al., *Eur J Cancer* 28:326-33, 1992
3. Alvarez D. et al, *J. of Immunology*, 174:1664-1674, 2005
4. Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M. G. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol*, 32: 2237-2245, 2002
5. Bethwaite, P. B., Holloway, L. J., Thornton, A., and Delahunt, B. Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology*, 28: 321-327, 1996
6. Bleumer, I., Tiemessen, D. M., Oosterwijk-Wakka, J. C., Voller, M. C., De Weijer, K., Mulders, P. F., and Oosterwijk, E. Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed dendritic cells. *J.Immunother.*, 30: 116-122, 2007
7. Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., van den Muysenberg, A. J., Verheijen, R. H., Stukart, M. J., Meijer, C. J., Scheper, R. J., Stacey, S. N., Duggan-Keen, M. F., Stern, P. L., Man, S., Borysiewicz, L. K., and Walboomers, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 88: 92-98, 2000
8. Bosch, F. X. and de Sanjose, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 3-13, 2003
9. Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87: 796-802, 1995
10. Chao, H. T., Wang, P. H., Tseng, J. Y., Lai, C. R., Chiang, S. C., and Yuan, C. C. Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur J Gynaecol Oncol*, 20: 136-140, 1999
11. Claas, E. C., Melchers, W. J., van der Linden, H. C., Lindeman, J., and Quint, W. G. Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*,

20

30

40

50

- 135: 703-709, 1989
12. de Jong, A., van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Franken, K. L., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Kenter, G., Vermeij, P., Melief, C. J., and Offringa, R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res*, 62: 472-479, 2002
13. de Jong, A., van der Hulst, J. M., Kenter, G. G., Drijfhout, J. W., Franken, K. L., Vermeij, P., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Rapid enrichment of human papillomavirus (HPV)-specific polyclonal T cell populations for adoptive immunotherapy of cervical cancer. *Int J Cancer*, 114: 274-282, 2005 10
14. de Jong, A., van Poelgeest, M. I., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*, 64: 5449-5455, 2004
15. De Witte et al., *Blood*, Aug 1;108(3):870-7, 2006
16. Evans, M., Borysiewicz, L. K., Evans, A. S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V., and Man, S. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol*, 167: 5420-5428, 2001 20
17. Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S., and Borysiewicz, L. K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*, 57: 2943-2950, 1997
18. Facchinetti, V., Seresini, S., Longhi, R., Garavaglia, C., Casorati, G., and Protti, M. P. CD4+ T cell immunity against the human papillomavirus-18 E6 transforming protein in healthy donors: identification of promiscuous naturally processed epitopes. *Eur J Immunol*, 35: 806-815, 2005
19. Geginat, J., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 194: 1711-1719, 2001 30
20. Hilders, C. G., Houbiers, J. G., Krul, E. J., and Fleuren, G. J. The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 101: 5-12, 1994
21. Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Hilmes, C., Kaufmann, A., Seliger, B., and Maeurer, M. J. CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol*, 163: 5715-5722, 1999
22. Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Freitag, K., Necker, A., and Maeurer, M. J. Human papillomavirus type 33 E7 peptides presented by HLA-DR*0402 to tumor-infiltrating T cells in cervical cancer. *J Virol*, 74: 6632-6636, 2000 40
23. Hopfl, R., Heim, K., Christensen, N., Zumbach, K., Wieland, U., Volgger, B., Widschwendter, A., Haimbuchner, S., Muller-Holzner, E., Pawlita, M., Pfister, H., and Fritsch, P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV 16 oncoprotein E7. *Lancet*, 356: 1985-1986, 2000
24. Hopfl, R., Sandbichler, M., Sepp, N., Heim, K., Muller-Holzner, E., Wartusch, B., Dapunt, O., Jochmus-Kudielka, I., ter Meulen, J., Gissmann, L., and . Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 337: 373-374, 1991
25. Jeffries, D. J., Hill, P. C., Fox, A., Lugos, M., Jackson-Sillah, D. J., Adegbola, R. A., and Brookes, R. H. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for 50

- diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in The Gambia. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.*, 10: 192-198, 2006
26. Kessler et al., *Hum Immunol.* 64:245, 2003
27. Lanzavecchia, *Nature* 393:413, 1998
28. Lambeck, A. J. A., Leffer, N., Hoogeboom, B. N., Sluiter, W. J., MHamming, L. E., Klip, H., ten Hoor, K. A., Esajas, M., van Oven, M., Drijfhout, J. W., Platteel, I., Offringa, R., Hollema, H., Melief, C. J. M., van der Burg, S. H., van der Zee, A. G. J., Daemen, T., and Nijman, H. W. P53-specific T cell responses in patients with malignant and benign ovarian tumors: implications for p53 based immunotherapy. *Int J Cancer*, in press, 2007 10
29. Li, J., Huston, G., and Swain, S. L. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med*, 198: 1807-1815, 2003
30. Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med*, 7: 114-118, 2001
31. Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y., Henkart, P. A., and Weng, N. P. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 6192-6197, 2002
32. Luxton, J. C., Rowe, A. J., Cridland, J. C., Coletart, T., Wilson, P., and Shepherd, P. S. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J Gen Virol*, 77 (Pt 7): 1585-1593, 1996 20
33. McKinlay, A., Radford, K., Kato, M., Field, K., Gardiner, D., Khalil, D., Burnell, F., Hart, D., and Vuckovic, S. Blood monocytes, myeloid dendritic cells and the cytokines interleukin (IL)-7 and IL-15 maintain human CD4+ T memory cells with mixed helper/regulatory function. *Immunology*, 120: 392-403, 2007
34. Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348: 518-527, 2003 30
35. Nakagawa, M., Kim, K. H., Gillam, T. M., and Moscicki, A. B. HLA class I binding promiscuity of the CD8 T-cell epitopes of human papillomavirus type 16 E6 protein. *J Virol*, 81: 1412-1423, 2007
36. Nakagawa, M., Kim, K. H., and Moscicki, A. B. Different methods of identifying new antigenic epitopes of human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11: 889-896, 2004
37. Oerke, S., Hohn, H., Zehbe, I., Pilch, H., Schicketanz, K. H., Hitzler, W. E., Neukirch, C., Freitag, K., and Maeurer, M. J. Naturally processed and HLA-B8-presented HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer*, 114: 766-778, 2005 40
38. Peng, S., Trimble, C., Ji, H., He, L., Tsai, Y. C., Macaes, B., Hung, C. F., and Wu, T. C. Characterization of HPV-16 E6 DNA vaccines employing intracellular targeting and intercellular spreading strategies. *J Biomed Sci*, 12: 689-700, 2005
39. Piersma, S. J., Jordanova, E. S., van Poelgeest, M. I., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Kenter, G. G., Fleuren, G. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res*, 67: 354-3 50

- 61, 2007
40. Platt, J. L., Grant, B. W., Eddy, A. A., and Michael, A. F. Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. *J.Exp.Med.*, 158: 1227-1242, 1983
41. Poulter, L. W., Seymour, G. J., Duke, O., Janossy, G., and Panayi, G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol.*, 74 : 358-369, 1982
42. Remington; *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia
43. Rensing, M. E., van Driel, W. J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M. P., Hartman, M., Anholts, J. D., Schreuder, G. M., ter Harmsel, W. B., Fleuren, G. J., Trimbos, B. J., Kast, W. M., and Melief, C. J. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A *0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res*, 56: 582-588, 1996 10
44. Romani N. et al, *Springer Semin Immunopathol.*, 13:265-279, 1992
45. Schwartz, B. D. Diversity and regulation of expression of human leukocyte antigen class II molecules. *Am J Med*, 85: 6-8, 1988
46. Schumacher et al., *Nat Rev Immunol.* 2(7):512-9, Jul 2002
47. Strang et al., *J Gen Virol.* 71:423-31, 1990 20
48. Toes et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:7855, 1996
49. Toes et al., *J. Immunol.* 156:3911, 1996
50. van den Burg et al., *Hum Immunol.* 44:189-198, 1995
51. van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., Geluk, A., van der Kruk, M., Pontesilli, O., Hovenkamp, E., Franken, K. L., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Ottenhoff, T. H., Melief, C. J., and Offringa, R. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J Immunol*, 162: 152-160, 1999
52. van der Burg, S. H., Piersma, S. J., de Jong, A., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., van den Hende, M., Welters, M. J., Fleuren, G. J., Melief, C. J. M., Kenter, G., and Offringa, R. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. submitted, 2007 30
53. van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., and Offringa, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer*, 91: 612-618, 2001 40
54. Wang, S., Fan, Y., Brunham, R. C., and Yang, X. IFN-gamma knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. *Eur.J.Immunol.*, 29: 3782-3792, 1999
55. Warrino, D. E., Olson, W. C., Knapp, W. T., Scarrow, M. I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R. S., Edwards, R. P., Kast, W. M., and Storkus, W. J. Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res*, 10: 3301-3308, 2004
56. Welters, M. J., van der Logt, P., van den Eeden, S. J., Kwappenberg, K. M., 50

Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G. G., Melief, C. J., van der Burg, S. H., and Offringa, R. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. *Int J Cancer*, 118: 950-956, 2006

57. Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kuppenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res*, 63: 636-641, 2003

58. Woodfolk, J. A. and Platts-Mills, T. A. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. *J. Immunol.*, 167: 5412-5419, 2001

59. zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 9: F55-78, 1996

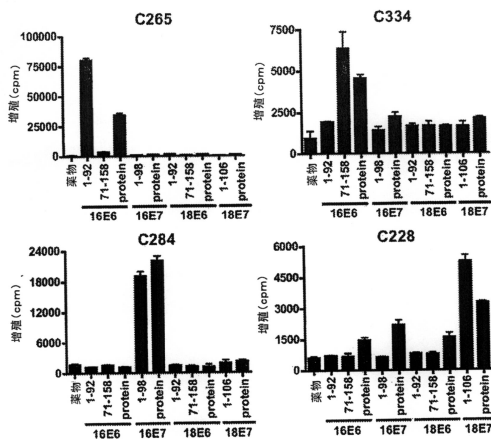
60. Zwaveling, S., Ferreira Mota, S. C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G. B., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol*, 169: 350-358, 2002

10

20

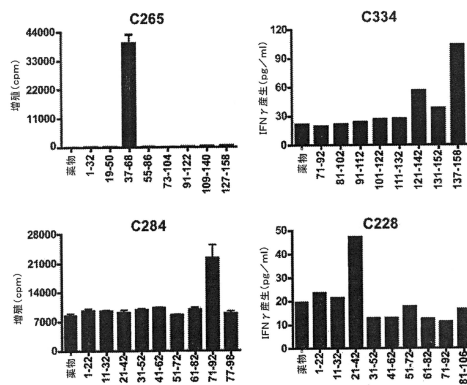
【 図 1 A 】

図1a



【 図 1 B 】

図1b



【 図 2 】

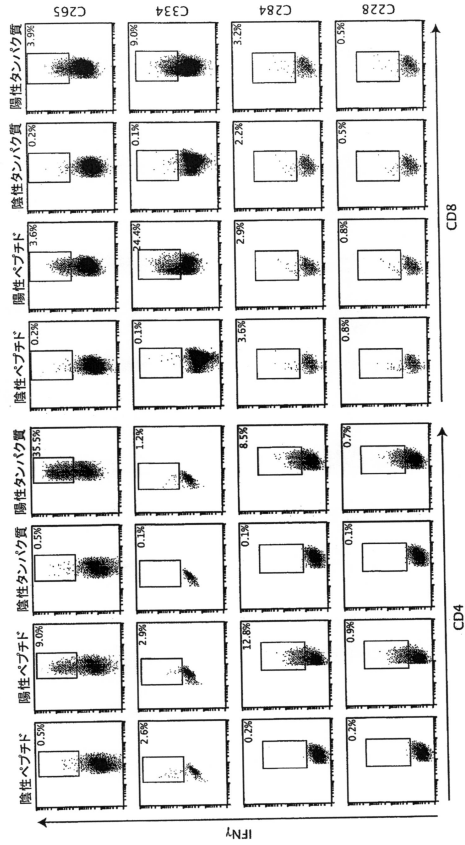


図2

【 図 3 B 】

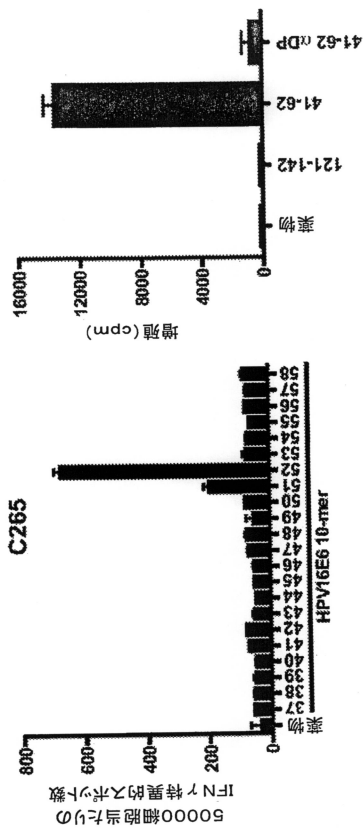
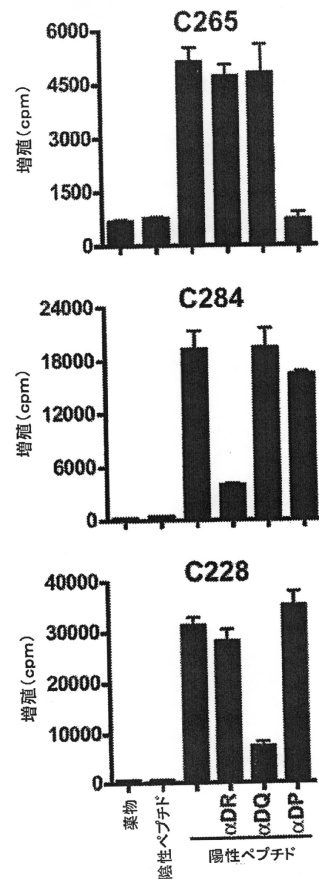


図3b

【 図 3 A 】

e図



【 図 3 C 】

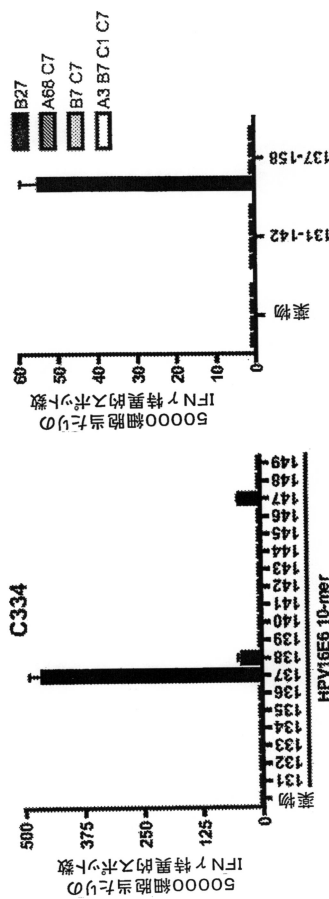
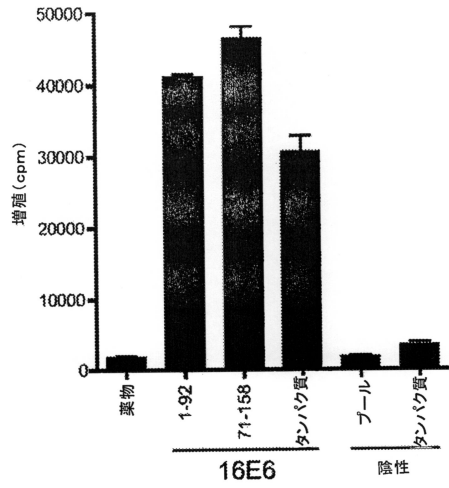


図3c

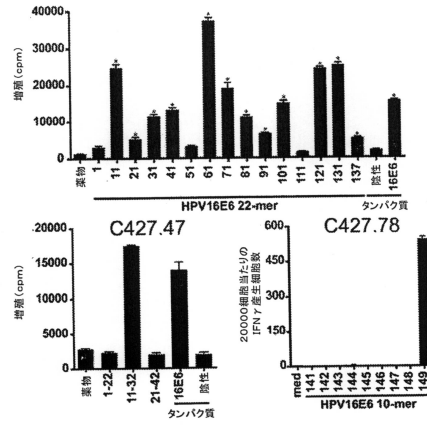
【 図 4 A 】

図4a



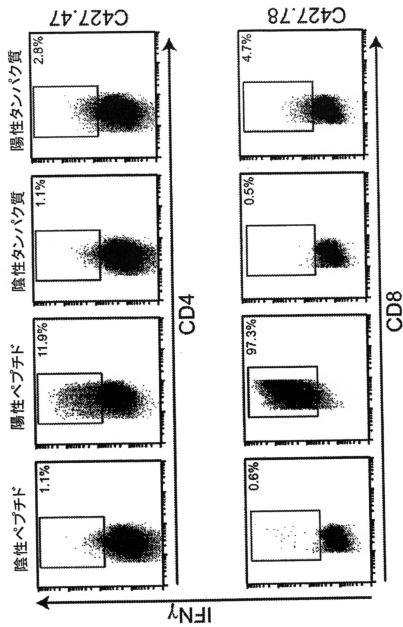
【 図 4 B 】

図4b



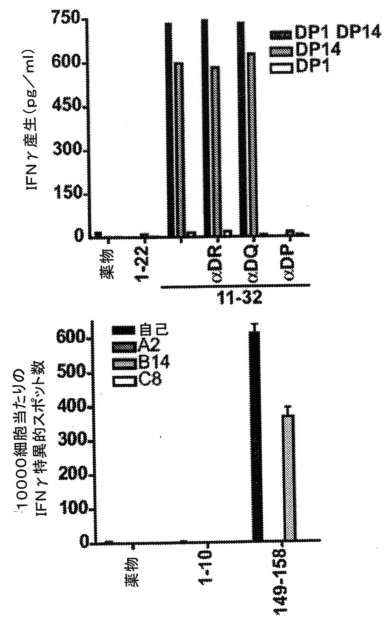
【 図 4 C 】

図4c

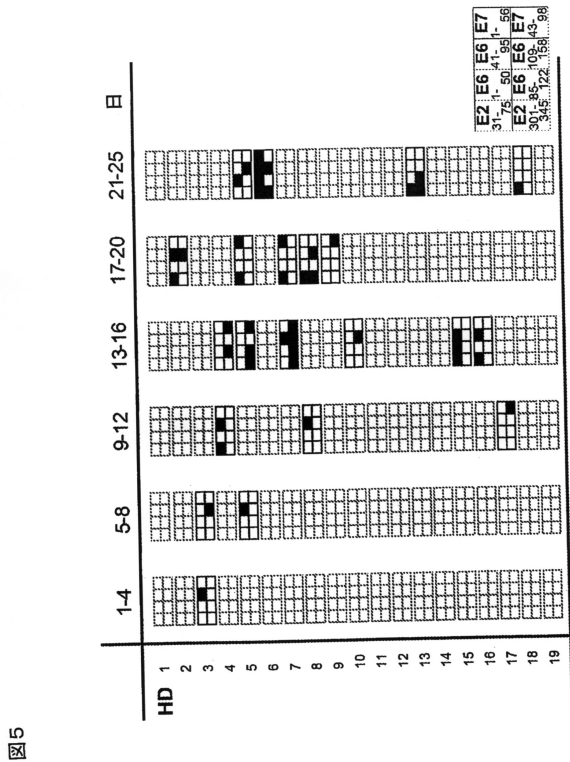


【 図 4 D 】

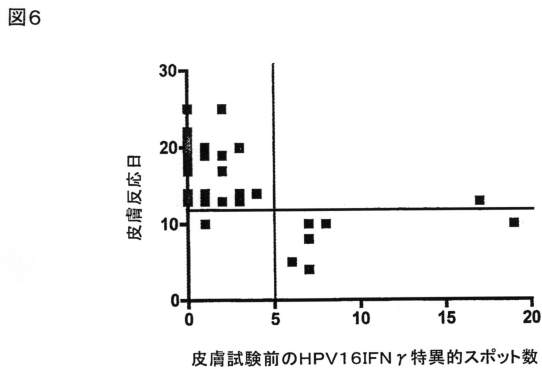
図4d



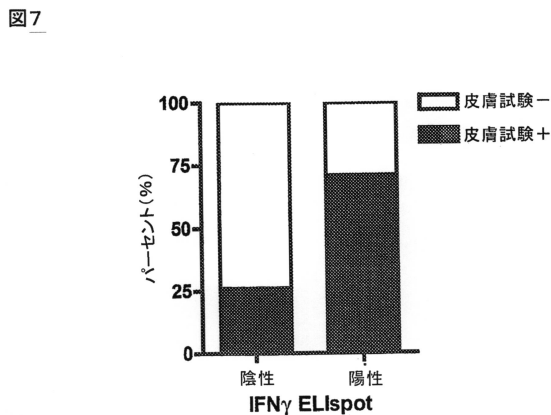
【 図 5 】



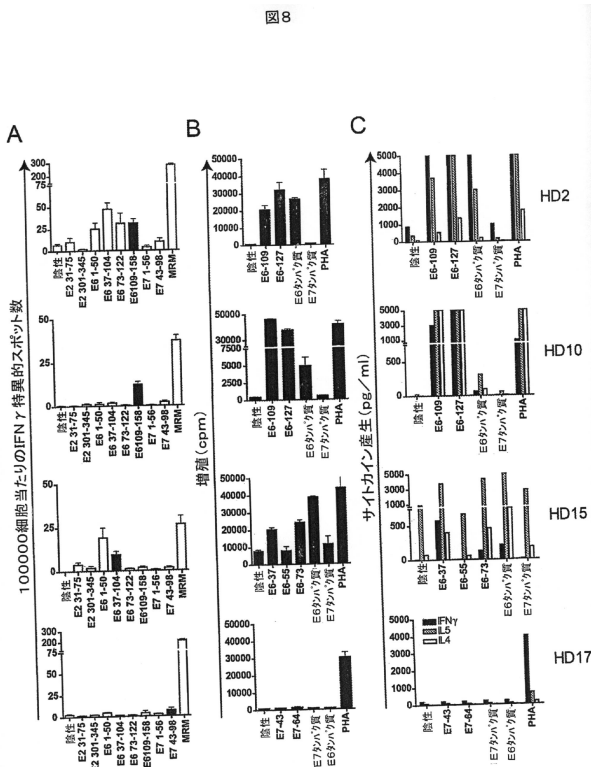
【 図 6 】



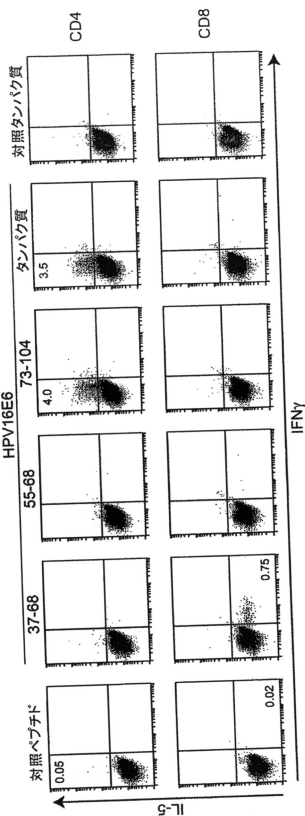
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

0006146879000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/941,070
(32)優先日 平成19年5月31日(2007.5.31)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100126653
弁理士 木元 克輔
(74)代理人 100165526
弁理士 阿部 寛
(72)発明者 ファンデルブルグ ソルド ヘンリカス
オランダ国 ライデン ゼットエイ エヌエル - 2 3 3 3 アルピヌストレーフ 2 ルームディー
- 0 5 - 0 1 7 ポストゾーンケー 1 - ピー
(72)発明者 ケンテル ゲンマ ジー .
オランダ国 アムステルダム イーディー エヌエル - 1 0 1 3 ヘレンマルクト 1 6 エイチ
(72)発明者 メリフ コルネリス ヨハネス マリア
オランダ国 ハールレム ケーシー エヌエル - 2 0 1 2 ウィルヘルミナパルク 3 3

審査官 高橋 樹理

- (56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 3 5 8 1 6 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 4 2 5 4 1 (U S , A 1)
特開平 0 4 - 2 1 7 9 9 8 (J P , A)
特開平 0 6 - 1 6 9 7 8 1 (J P , A)
特表 2 0 0 4 - 5 2 5 1 1 5 (J P , A)
Int. J. Cancer , 2 0 0 1 年 , vol.91 , pp.612-618
Int. J. Cancer , 2 0 0 5 年 , vol.114 , pp.274-282
The Journal of Immunology , 2 0 0 2 年 , vol.169 , pp.350-358

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 6 1 K 3 9 / 1 2
A 6 1 K 3 8 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)