

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-550480

(P2023-550480A)

(43)公表日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/37 (2006.01)	C 1 2 N	15/37	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/025 (2006.01)	C 0 7 K	14/025		4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全86頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-530809(P2023-530809)				
(86)(22)出願日	令和3年11月23日(2021.11.23)				
(85)翻訳文提出日	令和5年7月21日(2023.7.21)				
(86)国際出願番号	PCT/US2021/060605				
(87)国際公開番号	WO2022/115470				
(87)国際公開日	令和4年6月2日(2022.6.2)				
(31)優先権主張番号	63/118,222				
(32)優先日	令和2年11月25日(2020.11.25)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	508087044 プレシゲン、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド州 208 76, ジャーマンタウン, セネカ メド ウズ パークウェイ 20358				
(74)代理人	110000659 弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所				
(72)発明者	ボロー, ダグラス, イー. アメリカ合衆国 メリーランド州 208 76, ジャーマンタウン, セネカ メド ウズ パークウェイ 20358				
(72)発明者	エティレディ, ダモダー, アール. アメリカ合衆国 メリーランド州 208 76, ジャーマンタウン, セネカ メド ウズ パークウェイ 20358 最終頁に続く				

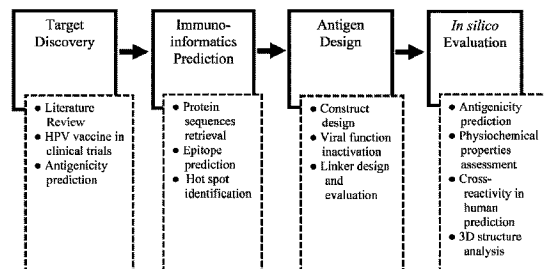
(54)【発明の名称】 ヒト乳頭腫ウイルスワクチンおよびHPV関連疾患のための同ワクチンの使用

(57)【要約】

本明細書に提供されるのは、HPV6およびHPV11 関連病態の標的となるHPV分子ワクチンなどの、HPV 関連障害および病理の使用ならびに治療のための多抗原性ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 分子ワクチン構築物である。

【選択図】 図1

FIG. 1: HPV6/11 Antigen Design Workflow



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト乳頭腫ウイルス 6 (HPV 6) 由来の少なくとも 1 つのエピトープおよびヒト乳頭腫ウイルス 11 (HPV 11) 由来の少なくとも 1 つのエピトープを含む非天然ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記非天然ポリペプチドが、ヒト乳頭腫ウイルス 16 (HPV 16) 由来の少なくとも 1 つのエピトープを含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記非天然ポリペプチドが、

HPV 6 E2 タンパク質、

HPV 6 E4 タンパク質、

HPV 6 E6 タンパク質、

HPV 6 E7 タンパク質、

HPV 11 E6 タンパク質、および／または

HPV 11 E7 タンパク質、

のいずれか 4 つに由来する HPV エピトープを含み、前記ポリペプチドは少なくとも 1 つの HPV 6 エピトープおよび少なくとも 1 つの HPV 11 エピトープを含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記非天然ポリペプチドが、HPV 16 タンパク質に由来する少なくとも 1 つのエピトープをさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記非天然ポリペプチドが、

a) HPV 6 E2 タンパク質、HPV 6 E4 タンパク質、HPV 6 E6 タンパク質、HPV 6 E7 タンパク質、HPV 11 E6 タンパク質、および HPV 11 E7 タンパク質、または、

b) HPV 6 E2 タンパク質、HPV 6 E4 タンパク質、HPV 6 E6 タンパク質、HPV 6 E7 タンパク質、HPV 11 E6 タンパク質、HPV 11 E7 タンパク質、HPV 16 E6 タンパク質、および HPV 16 E7 タンパク質

に由来する HPV エピトープを含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

1 つ以上のポリペプチドリンカーをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド配列をさらに含み、ここで、前記 1 つ以上のリンカーが、

a) 配列番号 34、

b) 配列番号 40、

c) 配列番号 42、

d) 配列番号 45、

e) 配列番号 48、

f) 配列番号 50、

g) 配列番号 52、および／または、

h) 配列番号 57

のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記非天然ポリペプチドが、

a) HPV 6 E2 タンパク質、HPV 6 E4 タンパク質、HPV 6 E6 タンパク質、HPV 6 E7 タンパク質、HPV 11 E6 タンパク質、および HPV 11 E7 タンパク質に由来するエピトープを含み、ここで前記ポリペプチドがさらに配列番号 45、配列番号 42、または配列番号 40 の少なくとも 1 つのリンカー配列を含むか、

b) HPV 6 E 2 タンパク質、HPV 6 E 4 タンパク質、HPV 6 E 6 タンパク質、HPV 6 E 7 タンパク質、HPV 1 1 E 6 タンパク質、および HPV 1 1 E 7 タンパク質に由来するエピトープを含み、ここで前記ポリペプチドがさらに配列番号 3 4 の少なくとも 1 つのリンカー配列を含むか、

c) HPV 6 E 2 タンパク質、HPV 6 E 4 タンパク質、HPV 6 E 6 タンパク質、HPV 1 1 E 6 タンパク質、HPV 1 1 E 7 タンパク質、HPV 1 6 E 6 タンパク質、HPV 1 6 E 7 タンパク質に由来するエピトープを含み、ここで前記ポリペプチドがさらに配列番号 5 2、配列番号 4 8、または配列番号 5 0 の少なくとも 1 つのリンカー配列を含むか、あるいは、

d) HPV 6 E 2 タンパク質、HPV 6 E 4 タンパク質、HPV 6 E 6 タンパク質、HPV 1 1 E 6 タンパク質、HPV 1 1 E 7 タンパク質、HPV 1 6 E 6 タンパク質、および HPV 1 6 E 7 タンパク質に由来するエピトープを含み、ここで前記ポリペプチドがさらに配列番号 5 7 の少なくとも 1 つのリンカー配列を含む、ポリヌクレオチド。

10

【請求項 8】

- a) 配列番号 6 7、
- b) 配列番号 6 9、
- c) 配列番号 7 1、
- d) 配列番号 7 3、または、
- e) 配列番号 7 5

20

に対して、少なくとも 8 0 % 同一、少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一または 1 0 0 % 同一の配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 9】

- a) 配列番号 6 6、
- b) 配列番号 6 8、
- c) 配列番号 7 0、
- d) 配列番号 7 2、または、
- e) 配列番号 7 4

に対して、少なくとも 8 0 % 同一のアミノ酸配列を含む非天然ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチド。

30

【請求項 1 0】

前記アミノ酸配列が、a)、b)、c)、d) または e) のいずれか 1 つと少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 8 % 同一、または 1 0 0 % 同一である、請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載の前記ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

【請求項 1 2】

HPV 6 および HPV 1 1 組成物、ワクチン、または組成物もしくはワクチンで使用するための非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを生成する方法であって、天然の HPV ポリペプチドの誘導体をコードするように HPV ポリヌクレオチド配列を操作することを含み、前記ウイルスポリペプチドの少なくとも 1 つは発癌性生物活性または必須ウイルス複製機能を有しており、1 つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失、挿入、分離、または再編成の組み合わせは、前記組成物、ワクチンを介して発現されるか、または前記ポリヌクレオチドによってコードされ、誘導体ウイルスポリペプチドを生成し、HPV 発癌性生物活性または必須 HPV 複製機能が前記誘導体ウイルスポリペプチドから除去されるが、前記誘導体ウイルスポリペプチドに対する宿主免疫応答性および／または免疫原性活性は、前記対応する天然のウイルスポリペプチドと比較して保持または増強される、方法。

40

【請求項 1 3】

50

前記ポリヌクレオチドまたは誘導体ウイルスポリペプチドが、生体内抗原エпитープ認識のインシリコ予測、生体内アレルゲン認識のインシリコ予測、ヒトプロテオーム交差反応配列相同性解析、アミノ酸配列生理化学的特性解析、３次元（３Ｄ）構造解析、発癌性および／またはウイルス機能の不活性化変異、欠失、置換および／または再編成の特定、のいずれか２つ以上と組み合わせたウイルス抗原を同定することを含むステップを利用して設計される、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドが表５のうちの任意の２つ以上の成分の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

10

【請求項１５】

前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドが表５の成分Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、およびＬ１の配列を含む、請求項１４に記載の非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

【請求項１６】

前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドが表５の成分Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｌ２、Ｌ３およびＬ４の配列を含む、請求項１４に記載の非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

【請求項１７】

前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドが表５の成分Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｊ、Ｋ、Ｌ１、Ｌ２、およびＬ４の配列を含む、請求項１４に記載の非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

20

【請求項１８】

前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドが表５の成分Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｌ２、Ｌ４、Ｌ５、Ｌ６、およびＬ７の配列を含む、請求項１４に記載の非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

【請求項１９】

前記ポリペプチドまたは前記ポリヌクレオチドが表５の成分Ｎ、Ｏ、Ｐ、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、Ｌ５、Ｌ６、Ｌ７、およびＬ８の配列を含む、請求項１４に記載の非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

30

【請求項２０】

請求項１に記載のポリヌクレオチドをコードするベクター。

【請求項２１】

前記ベクターが、プラスミド、ウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、請求項２０に記載のベクター。

【請求項２２】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項２１に記載のベクター。

【請求項２３】

前記アデノウイルスベクターが非ヒト霊長類ウイルスベクターである、請求項２２に記載のベクター。

40

【請求項２４】

薬学的に許容される担体と請求項１に記載のポリヌクレオチドを含む、組成物またはワクチン。

【請求項２５】

ＨＰＶ関連疾患または障害の治療のための、請求項２４に記載の組成物またはワクチンの使用。

【請求項２６】

前記疾患または障害が、ＨＰＶ６、ＨＰＶ１１またはＨＰＶ１６関連疾患または障害である、請求項２５に記載の組成物またはワクチンの使用。

50

【請求項 27】

前記疾患または障害が、再発性呼吸器乳頭腫症（RRP）である、請求項 25 に記載の組成物またはワクチンの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年11月25日に出願された米国仮特許出願第63／118,222号の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表の参照

本出願とともに出願された、電子的に提出された配列表の内容（名称：INX00511US-V1__SEQUENCELIST__ST25；サイズ：71,267 Bytes；作成日：2020年11月24日）は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0003】

本開示は、革新的な多重抗原性HPV分子ワクチンに関するものである。より具体的には、本開示は、HPV6およびHPV11関連病態を標的とするHPV分子ワクチンに関するものである。

【背景技術】

【0004】

世界的に、現在、数千万人がヒト乳頭腫ウイルス（HPV）に感染しており、毎年、数百万人が新たに感染している。現在、予防接種は、推奨される年齢層に接種された場合、HPVによって引き起こされる疾患から保護することができるが、（例えば、HPV株の複数のサブセットおよび／または標的サブセットに対する）カバー範囲と機能性が拡大されており、HPV関連病態に対する機能性を備えたHPVワクチンに対する多大なニーズが存在する。

【0005】

再発性呼吸器乳頭腫症（RRP）は、呼吸器官における疣贅（イボ）状の良性乳頭腫の再発性増殖を特徴とする稀な障害である。RRPは、小児および成人の両方に発生する。若年性では10歳までに、通常は5歳までに発症することがほとんどである。RRPは、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）、特にHPV6およびHPV11によって引き起こされる。

【0006】

性器疣贅は非常に一般的で、かつ肛門性器疣贅あるいは尖圭コンジロームなどの他の名前でも知られることもあり、米国だけで毎年50万から100万件の新しい症例が診断される。HPV6およびHPV11が性器疣贅の約90%を占めている。現在の治療の選択肢は、根本的なウイルス感染の除去よりもむしろ、疣贅の除去に主眼が置かれている。現在、様々な治療法が用いられているが、その内容は多岐にわたり、劇的に異なることもある。しかし、すべての患者において、疣贅を除去し、かつ再発を防止する100%の効果を持つ治療法はない。

【0007】

RRPの現在の標準的な治療は、必要に応じて補助療法を伴う外科的切除である。しかし、RRPの特徴的な態様は、手術の繰り返しを必要とする再発の傾向があることである。悪性度は人により違い、数週間おきに手術が必要な人もいれば、年に2回、あるいは生涯で数回しか手術が必要ない人もいる。

【0008】

残念ながら、これまでに開発された治療法では、RRPの多発性再発を防止することはできなかった。RRP患者のためのより良い治療法を開発する必要性がある。本明細書では、革新的な免疫療法のアプローチ、すなわち、RRPおよび性器疣贅などの他のHPV6／11関連疾患の治療および経過を変えるために抗HPV6／11免疫を誘導すること

10

20

30

40

50

を目指す新規治療HPVワクチンについて説明する。

【0009】

ワクチンは、従来、感染症の予防対策として使用されてきた。いくつかのHPVワクチン（GARDASILおよびCERVARIX）は、RRPを引き起こすのと同じ亜型のHPV感染にも関連する子宮頸がんから女性を守るために開発され、食品医薬品局（FDA）によって承認された。

【0010】

GARDASILはHPV6型、11型、および18型（RRPは6型および11型が原因である）に対するワクチンだが、一方でCERVARIXはHPV16型および18型のみに対するワクチンである。Gardasil-9は、高リスク株31、33、45、52、58に対する保護を目的としている。

10

【0011】

上記の予防ワクチンは、健康な人がHPVに感染するのを防ぐだけでなく、以前に感染した患者が再感染するのを防ぐことに成功しているが、HPVに既に感染している患者において治療または治癒することは不可能である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

多くの治療HPVワクチンが臨床試験に到達し、いくつかは有望な結果を示している。MVA E2、組み換え改変ワクシニアアンカラ（Recombinant Modified Vaccinia Ankara）は、女性患者で90%の病変クリアランス、男性患者で100%の病変クリアランスを示したと報告されている。E6およびE7をコードするプラスミドからなるDNAワクチンINO-3106は、再発性呼吸器乳頭腫症患者2名を対象とした試験で臨床的有効性を示したと報告されている。しかし、このような前向きな進展にもかかわらず、承認されたHPV治療ワクチンはほとんどない。実際、本出願の提出日現在、特許出願人はFDAで承認されたHPV治療ワクチンを把握していない。

20

【0013】

参照による援用

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許および特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により援用されることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に援用される。

30

【課題を解決するための手段】

【0014】

本明細書において、免疫応答誘導性ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）ポリペプチドを含む非天然ポリペプチドをコードする非天然ポリヌクレオチド（およびそれから発現されるポリペプチド）を提供する。同様に、本明細書において、様々なポリペプチドリンカー配列によって接続されたHPV免疫応答誘導性ポリペプチドの非天然で可変的に配列された構成、それによってワクチン抗原として有用な融合タンパク質を提供する。

【0015】

40

本発明は、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）、特にHPV6およびHPV11に向けられたワクチン用の抗原を含む、非天然ポリペプチドをコードする、非天然ポリヌクレオチドの組成物、組成物の製造方法および使用、ならびに、これらの特定のHPV剤によって引き起こされる病的状態を処置する治療アプローチを含むが、これらに限定されない。特に、本発明は、ワクチン成分としての使用のため、およびHPV感染に関連する障害の治療のための、HPV6、HPV11およびHPV16由来の多抗原性ポリペプチドおよび他のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド、およびそれによりコードされるポリペプチドを含む。例えば、本発明の「適応」は、HPV6および／またはHPV11（HPV6／11）誘導または関連疾患に対する治療ワクチンとしての本明細書に記載の組成物の使用、例えば、再発性呼吸器乳頭腫症（RRP）、肛門性器疣贅、および他のHPV

50

6 / 1 1 関連疾患の治療であるが、これらに限定されない。

【0016】

本発明は、HPV 6 / 1 1 誘導疾患のための特有かつ革新的な構成のHPVポリペプチドワクチンの設計アプローチを含む。本発明は、設計戦略、例えば、完全なタンパク質配列の使用、ペプチド「断片」の使用、ハイブリッドポリペプチド構築物、アミノ酸置換の導入、ポリペプチドおよびペプチドHPV遺伝子産物（タンパク質）の挿入、欠失および再編成などの組み合わせを含む。本明細書に記載された設計概念の5つの例（設計番号1～5）は、必要に応じて、異なるバリエーションにさらに修飾および／または最適化することができる。

【0017】

上記に示したように、本明細書に記載の抗原の特有の修飾は、特に、発癌性遺伝子の発現を防止し、および／または必須のウイルス機能（例えば、ウイルス複製）を無効にするために、ウイルスポリペプチド配列の点突然変異、置換変異、および／または並び替えを導入することにより行われてきた。

【0018】

特定の実施形態において、HPV初期タンパク質E2およびE4は、HPV 6 / 1 1の新規抗原として同定され、それらを本明細書に記載の設計に組み込んだ。特定の実施形態において、本発明は、HPVからの4つの抗原成分を1つのHPVワクチン設計に新規に組み込むことを含む。特定の実施形態において、本発明は、高癌リスクおよび低癌リスクHPV遺伝子型エピトープの両方を1つのHPV抗原構築物に新規に統合および結合することを含む。本明細書に記載の抗原設計は、インシリコ解析を介して決定されたように、内因性ヒトタンパク質に対する交差反応性のない、ヒト生体内抗原性の可能性について慎重に設計および選択された。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本明細書に記載のデザインを設計し評価するために利用されるツールおよび技術への言及を含む、HPV 6 / 1 1 抗原設計ワークフローの描写である。

【図2-6】HPV 6 / 1 1 抗原設計番号1～5において、そこで使用されるポリペプチドおよびモジュールの概略、配列および構造表現を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

本開示は、本明細書に記載される特定の実施形態に限定されず、そのため変更可能であることを理解されたい。当業者は、本開示の範囲内に包含される、本開示の変形および修正が存在することを認識するであろう。

【0021】

本明細書に記載され、図および配列表に示されるような抗原性成分を接続するために使用される剛直性リンカー、開裂可能リンカー、HPVエピトープリンカーおよびHPVアゴニストエンハンサーリンカーは、可変数の他の配列でさらに構成されることができる。

【0022】

本発明の実施形態は、剛直性リンカーペプチド（E A A A K）_n、すなわち（配列番号：76）_nの使用を含み、ここで、「_n」は、1から10（例えば、E A A A Kは_n=1、E A A A K E A A A Kは_n=2、E A A A K E A A A K E A A A Kは_n=3、など）まで変化することができ、およびこれは、様々なヌクレオチド配列（例えば、配列番号：77～81であるが、これには限定はしない）によってコードされ得る。「E」（別名、Glu、グルタミン酸）、「A」（別名、Ala、アラニン）および「K」（別名、Lys、リジン）残基の数は、同様の組成の剛直性リンカーペプチド配列を生成する際に、数および繰り返しのパターンが変化し得ることも企図される。

【0023】

同様に、本明細書に記載され、図に示されるような抗原断片は、各設計内および各設計

10

20

30

40

50

間の両方で、様々な配列でシャッフルすることができる。

【0024】

本明細書に記載され、図に示されるようなワクチン設計は、再発性呼吸器乳頭腫病態および障害の治療だけでなく、生殖器、肛門生殖器および他の疣贅、ならびに他のHPV誘導性疾患、障害および過剰増殖性病態の治療のために利用することができる。

【0025】

HPV初期(E)領域タンパク質の構成的または誘導された発現は、有効なHPV6/11ワクチンの標的を提供する。

【0026】

HPV初期領域タンパク質の機能として、以下が挙げられる。E1、E2は、ウイルス複製／転写における機能を有し(例えば、E2はE6およびE7の発現を制御し、E1／E2相互作用はウイルス複製に必須である)、E4、E5は、ウイルス複製サイクルの後期において発現が増加し(ただし、HPV11 E4はウイルスゲノム増幅に必須ではない)、およびE6、E7は複製時に協調的に働く(E6はエピソームとしてのゲノムの維持に必要であり、E7はDNA複製において活性な上皮細胞コンパートメントを拡大する)。

【0027】

E2は優れた標的であり、感染細胞で発現し、強い免疫応答を生成することが示されており、ワクチン(プラスミドDNAおよびMVA E2)においてE2を唯一の標的として使用する前臨床および臨床のデータが存在する。

【0028】

E4は特有の標的であり、感染細胞で発現し、遅れて発現が増大し、HPV11複製に必須ではないものの、エピソーム状態の生成に重要な役割を持つ場合がある。ワクチンデータは入手できない。

【0029】

E6およびE7は、感染細胞では発現しているが、健康な細胞では発現していないため、理想的な抗原標的となり、E6およびE7をワクチンの標的として用いた臨床データが存在する。

【0030】

すべての用語は、当業者によって理解されると同様の理解がなされるように意図している。別段に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が関連する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0031】

本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成の目的のためにのみ使用され、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0032】

本開示の様々な特徴は、単一の実施形態の文脈の中で記載できているが、その特徴はまた、別々に、または任意の適切な組み合わせで提供できている。以下の定義は、当業者に対して補足するものであり、かつ本出願に向けられたものであり、関連または無関係な事例、例えば、一般に所有される特許または出願に帰属させるものではない。従って、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のみのものであり、限定することを意図するものではない。

【0033】

定義

本出願において、単数形の使用は、明示的に別段の定めをする場合を除き、複数形を含む。単数形「a」、「an」、および「the」が、本明細書で使用される場合、文脈が明示的に指示する場合を除き、複数の指示対象を含むことに留意されたい。

【0034】

本出願において、「または」の使用は、特に断らない限り、「および／または」を意味する。本明細書で使用される用語「および／または」、「その任意の組み合わせ」および

10

20

30

40

50

それらの文法的等価物は、互換的に使用することができる。これらの用語は、任意の組み合わせが具体的に企図されていることを伝えることができる。単に例示的な目的のために、以下の「A、B、および／またはC」または「A、B、C、またはそれらの任意の組み合わせ」という語句は、「個別的にA、個別的にB、個別的にC、AおよびB、BおよびC、AおよびC、ならびにA、B、およびC」を意味することができる。「または」という用語は、文脈が具体的に離接的使用を指す場合を除いて、接続的または離接的にすることができる。

【0035】

さらに、「含む (including)」だけでなく、他の形態、例えば「含む (include)」、「含む (includes)」および「含んだ (included)」という用語の使用は限定的なものではなく、すなわち、「含む (including)」は「～に限定する」という意味ではない。

10

【0036】

本明細書での、「いくつかの実施形態」、「実施形態」、「一実施形態」または「他の実施形態」への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、または特性が、本開示の少なくともいくつかの実施形態に含まれるが、必ずしもすべての実施形態に含まれるわけではないことを意味する。

【0037】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単語「含む (comprising)」(ならびに、「含む (comprise)」および「含む (comprises)」などの含む (comprising) の任意の形式)、「有する (having)」(ならびに、「有する (have)」および「有する (has)」などの有する (having) の任意の形式)、「含む (including)」(ならびに、「含む (includes)」および「含む (include)」などの含む (including) の任意の形式)または「含む (containing)」(ならびに「含む (contains)」および「含む (contain)」などの含む (containing) の任意の形式)は包括的または非制約的であり、追加の可能な成分、エレメントまたは方法手順を除外しない。本明細書で説明される任意の実施形態は、本開示の任意の方法または構成に関して実施することができ、その逆もまた同様であることが企図される。さらに、本開示の構成は、本開示の方法を達成するために用いることができる。

20

30

【0038】

本明細書で使用される参照数値およびその文法的等価物に関連する「約」という用語は、数値そのものおよびその数値から±10%の値の範囲を含むことができる。

【0039】

「約」または「およそ (approximately)」という用語は、当業者によって決定される特定の値に対する許容可能な誤差範囲内であることを意味することができる。これは、その値が、どのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの制限に一部依存する。例えば、「約」は、当該技術分野における慣例に従って、1以内または1を超える標準偏差を意味することができる。代替として、「約 (about)」は、所与の値の20%まで、10%まで、5%まで、または1%までの範囲を意味することができる。別の例では、量「約10」は、10および9から11までの任意の量を含む。さらに別の例では、参照数値に関連する「約」という用語は、その値から±10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%の値の範囲も含む可能性がある。代替として、特に生体系またはプロセスに関して、この用語「約」は、値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味することができる。本出願および特許請求の範囲において特定の値が記載される場合、別段の記載がない限り、特定の値について許容可能な誤差範囲内であることを意味する「約」という用語が想定されるべきである。

40

【0040】

本明細書で使用される「単離された (isolated)」という用語、およびその文

50

法的等価物は、自然環境から核酸を取り出すことを指す。本明細書で使用される「精製される (purified)」という用語およびその文法的等価物は、自然界から取り出されたか (ゲノムDNAおよびmRNAを含む)、または実験室条件下で合成されたか (cDNAを含む) および／または増幅されたかにかかわらず、純度が高められた分子または組成物を指し、ここで「純度 (purity)」は相対用語であって「絶対純度」ではない。しかしながら、核酸およびタンパク質は、希釈剤または補助剤と共に製剤化することができ、さらに実用的な目的のために単離することができることが理解される。例えば、核酸は通常、細胞への導入に使用される場合、許容される担体または希釈剤と混合される。本明細書で使用される「実質的に精製された (substantially purified)」という用語およびその文法的等価物は、核酸配列、ポリペプチド、タンパク質または本質的に遊離している他の化合物、すなわち、核酸、ポリペプチド、タンパク質または他の化合物が天然に会合する、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチドおよび他の分子を約50%より多く遊離、約70%より多く遊離、約90%より多く遊離しているものを指す。

10

【0041】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド構築物」、「遺伝子」、「遺伝子構築物」、「異種遺伝子」およびそれらの文法的等価物は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドまたは核酸のポリマー状の形態を指す。この用語は、分子の一次構造のみを指す。それ故に、この用語は、二本鎖および一本鎖RNAだけでなく、二本鎖および一本鎖DNA、三重鎖DNAを含む。また、これには、例えば、メチル化および／またはキャッピングによる修飾、ならびにポリヌクレオチドの非修飾形態も含まれる。この用語はまた、非天然または合成ヌクレオチド、ならびにヌクレオチド類似体を含む、分子も含むことを意味する。本明細書に開示または企図される核酸配列およびベクターは、例えば、トランスフェクション、形質転換、またはトランスダクションによって細胞内に導入することができる。

20

【0042】

本発明の「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」、および本明細書で使用される同種または類似の用語および語句は、本発明のポリペプチドを発現 (すなわち、コード) するために使用することができる任意のポリヌクレオチドを含む。実際、同じポリペプチド (すなわち、異なるコドン (ヌクレオチド三重項) 配列によってコードされるが、同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド) をコードし得る任意の数の異なるポリヌクレオチド配列を構築する方法は、当業者には周知であり理解されている。例えば、特定のポリペプチドをコードする様々なポリヌクレオチド配列を生成するために、標準的な遺伝暗号の中でコドンを変化させる使い方があり得る。さらに、所定の生物において観察される「コドン使用頻度」、例えば、以下に示すようなヒトのコドン使用頻度表など (ただし、これに限定されない) を用いて誘導および選択されるようにコドン選択の使用を介して特定のポリペプチドをコードする様々なポリヌクレオチド配列を生成してもよい。

30

【0043】

従って、アミノ酸は、以下の表のようなコドン (ヌクレオチド三重項) によってコードされることも、当業者にとって周知かつ理解されている。

40

【表 1】

表 1：標準的な遺伝子のコード

コドン内のヌクレオチド位置－コード化アミノ酸					
第 1 ヌクレオチド	第 2 ヌクレオチド				第 3 ヌクレオチド
	U	C	A	G	
U	UUU－Phe	UCU－Ser	UAU－Tyr	UGU－Cys	U
	UUC－Phe	UCC－Ser	UAC－Tyr	UGC－Cys	C
	UUA－Leu	UCA－Ser	UAA－*	UGA－*	A
	UUG－Leu	UCG－Ser	UAG－*	UGG－Trp	G
C	CUU－Leu	CCU－Pro	CAU－His	CGU－Arg	U
	CUC－Leu	CCC－Pro	CAC－His	CGC－Arg	C
	CUA－Leu	CCA－Pro	CAA－Gln	CGA－Arg	A
	CUG－Leu	CCG－Pro	CAG－Gln	CGG－Arg	G
A	AUU－Ile	ACU－Thr	AAU－Asn	AGU－Ser	U
	AUC－Ile	ACC－Thr	AAC－Asn	AGC－Ser	C
	AUA－Ile	ACA－Thr	AAA－Lys	AGA－Arg	A
	AUG－Met	ACG－Thr	AAG－Lys	AGG－Arg	G
G	GUU－Val	GCU－Ala	GAU－Asp	GGU－Gly	U
	GUC－Val	GCC－Ala	GAC－Asp	GGC－Gly	C
	GUA－Val	GCA－Ala	GAA－Glu	GGA－Gly	A
	GUG－Val	GCG－Ala	GAG－Glu	GGG－Gly	G

(UはDNA中のT(チミン)の代わりにmRNAに組み込まれる「ウラシル」を示し、いずれも「A」(アデニン)と相補的な塩基対を形成する。「*」は停止コドンを示す。)

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：ヒトのコドン使用頻度表

[人類におけるヌクレオチド三重項の 1000 個あたりの頻度]

UUU [17.6]	UCU [15.2]	UAU [12.2]	UGU [10.6]
UUC [20.3]	UCC [17.7]	UAC [15.3]	UGC [12.6]
UUA [7.7]	UCA [12.2]	UAA [1.0]	UGA [1.6]
UUG [12.9]	UCG [4.4]	UAG [0.8]	UGG [13.2]
CUU [13.2]	CCU [17.5]	CAU [10.9]	CGU [4.5]
CUC [19.6]	CCC [19.8]	CAC [15.1]	CGC [10.4]
CUA [7.2]	CCA [16.9]	CAA [12.3]	CGA [6.2]
CUG [39.6]	CCG [6.9]	CAG [34.2]	CGG [11.4]
AUU [16.0]	ACU [13.1]	AAU [17.0]	AGU [12.1]
AUC [20.8]	ACC [18.9]	AAC [19.1]	AGC [19.5]
AUA [7.5]	ACA [15.1]	AAA [24.4]	AGA [12.2]
AUG [22.0]	ACG [6.1]	AAG [31.9]	AGG [12.0]
GUU [11.0]	GCU [18.4]	GAU [21.8]	GGU [10.8]
GUC [14.5]	GCC [27.7]	GAC [25.1]	GGC [22.2]
GUA [7.1]	GCA [15.8]	GAA [29.0]	GGA [16.5]
GUG [28.1]	GCG [7.4]	GAG [39.6]	GGG [16.5]

10

20

【0044】

さらに、ポリペプチド配列のコンピュータ生成「逆翻訳 (reverse translation)」（「逆翻訳 (Back translation)」としても公知、すなわち、ポリペプチド配列を同じものをコードするヌクレオチド配列に変換する）のために、公的に入手可能なソフトウェア資源が容易に利用可能である。例えば、以下のものを参照されたい。

30

2019年のEMBL-EBI検索および配列解析ツールAPI

Madeira, F., et al., Nucleic Acids Res, 47 (W1), W636-W641 (2019)

DOI: 10.1093/nar/gkz268; EuropePMC: 30976793。

ウェブインタフェースによるEMBL-EBIサービスの利用およびウェブサービスによるプログラマ的な利用

Madeira, F., et al., Curr Protoc in Bioinformatics, 66 (1): e74 (2019)

40

DOI: 10.1002/cpbi.74; EuropePMC: 31039604

EMBL-EBI update: 2017から生物情報学ツールへのプログラマ的アクセス

Chojnacki, S., et al., Nucleic Acids Res. 2017 Jul 3; 45 (W1): W550-W553 (2017)。

DOI: 10.1093/nar/gkx273. PMID: 28431173; PMC ID: PMC5570243。

コドン使用率表のための新規かつ更新されたリソース

Athey, J., et al., BMC Bioinformatics 18:

50

391 (2017)

DOI: 10.1186/s12859-017-1793-7。

タンパク質配列解析のためのMPI生物情報学ツールキット

Biegert, A., et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, Iss. Suppl_2, pp. W335-W339 (2006)

分子生物学のために改良されたツール

Rawitch, A. B., *Science*; Washington Vol. 288, Iss. 5465, pp. 457-458 (2000)。

EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (欧州分子生物学オープンソフトウェアスイート)

Rice, P., et al., *Trends Genet.* 16 (6) 276-277 (2000)

DOI: 10.1016/S0168-9525(00)02024-2; PubMed: 10827456。

タンパク質からDNA配列への逆翻訳および曖昧なDNA配列の解析のためのマイクロコンピュータプログラム

Mount, D. W. and Conrad, B. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 12, Iss. 1, Part 2, pp. 819-823 (1984)。

核酸配列を取り扱うためのコンピュータプログラム

Keller, C., et al., *Nucleic Acids Res.*, Vol. 12, Iss. 1, Part 1, pp. 379-386 (1984)。

【0045】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、「ポリペプチド構築物」および「ペプチド構築物」ならびにそれらの文法的等価物は、アミノ酸残基のポリマーを指す。「成熟タンパク質 (mature protein)」は、全長タンパク質であり、任意で、所与の細胞環境におけるタンパク質に典型的なグリコシル化または他の修飾を含むタンパク質である。本明細書に開示されるように、本発明の実施形態は、本明細書に記載のHPV抗原／抗原性ポリペプチド、ペプチド、および成熟タンパク質、ならびにこれらをコードするポリヌクレオチド (DNAまたはRNA) も含む。本明細書に開示されるポリペプチドおよびタンパク質 (その機能的部分および機能型変異体を含む) は、1つ以上の天然のアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含むことができる。そのような合成アミノ酸は当該技術分野において公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、トランス-3-ヒドロキシプロリンおよびトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 α -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リジン、N', N'-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 α -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 α , γ -ジアミノ酪酸、 α , β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および α -tert-ブチルグリシンが含まれる。

【0046】

核酸および／または核酸配列は、それらが、天然または人工的に、共通の祖先の核酸または核酸配列に由来する場合、「相同」である。タンパク質および／またはタンパク質配列は、それらのコードDNAが、天然または人工的に、共通の祖先の核酸または核酸配列に由来する場合、「相同」である。相同分子は、相同体と称することができる。例えば、本明細書に記載される、任意の天然のタンパク質は、任意の利用可能な変異誘発法によっ

10

20

30

40

50

て修飾することができる。発現した場合、この変異誘発核酸は、元の核酸によってコードされたタンパク質に相同なポリペプチドをコードする。相同性は、一般に、2つ以上の核酸またはタンパク質（またはそれらの配列）の間の配列同一性から推測される。相同性を確立するのに有用な配列間の同一性の正確な割合は、対象の核酸およびタンパク質により変化するが、相同性を確立するために通常使用される配列同一性はわずか25%である。配列同一性のより高いレベル、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%以上も、相同性を確立するために使用することができる。配列同一性の割合を決定するための方法（例えば、デフォルトパラメータを使用したBLASTPおよびBLASTN）が本明細書に記載されており、一般に利用可能である。

10

【0047】

ポリペプチドの2つの核酸配列またはアミノ酸配列の文脈において、本明細書で使用される場合、「同一の」およびその文法的等価物、または「配列同一性」という用語は、特定の比較ウィンドウにわたって最大一致について整列させたときに同じである2つの配列中の残基を指す。本明細書で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20の連続した位置、通常、約50～約200、より通常、約100～約150のセグメントを指し、配列は、2つの配列が最適に整列された後に、同じ数の連続した位置の参照配列と比較されることができる。比較のための配列のアライメント方法は、当該技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアライメントは、SmithとWaterman、Adv. Appl. Math., 2:482 (1981)の局所的な相同性アルゴリズムにより；NeedlemanとWunsch、J. Mol. Biol., 48:443 (1970)のアライメントアルゴリズムにより；PearsonとLipman、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 85:2444 (1988)の類似性の検索法により；(Intelligentics、Mountain View Calif.によるPC/GeneプログラムのCLUSTAL、Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Dr., Madison, Wis., U. S. A.のWisconsin Genetics Software PackageのGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTAを含むが、これらに限らない)これらのアルゴリズムのコンピュータによる実装により、実施されることができる。CLUSTALプログラムは、Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244 (1988)およびHiggins and Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989)；Corpet et al., Nucleic Acids Res., 16:10881-10890 (1988)；Huang et al., Computer Applications in the Biosciences, 8:155-165 (1992)；およびPearson et al., Methods in Molecular Biology, 24:307-331 (1994)によってよく記載されている。また、アライメントは、多くの場合、検査および手動アライメントによって実施される。一群の実施形態において、本明細書におけるポリペプチドは、例えば、デフォルトパラメータを使用して、BLASTP（またはCLUSTAL、もしくは任意の他の利用可能なアライメントソフトウェア）によって測定して、参照ポリペプチド、またはその断片に対して、少なくとも80%、85%、90%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。同様に、核酸もまた、出発核酸を参照して記載することができ、例えば、それらは、例えば、デフォルトパラメータを使用して、BLASTN（またはCLUSTAL、もしくは任意の他の利用可能なアライメントソフトウェア）によって測定して、参照核酸またはその断片に対して、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%または100%の配列同一性を有することができる。1つの分子がより大きな分子とある割合の配列同一性を有すると言われる場合、2つの分子が最適に整列されたときに、より小さな分子内の前記割合の残基が、2つの分子が最適に整列された順序に従ってより大きな分子内の一致する残基を見つけることを意味する。

20

30

40

50

【0048】

核酸またはアミノ酸配列に適用される「実質的に同一」およびその文法的等価物は、核酸またはアミノ酸配列が、標準パラメータを使用して、上記のプログラム、例えば、BLASTを使用した参照配列との比較により、少なくとも90%の配列同一性またはそれ以上、少なくとも95%、少なくとも98%、および少なくとも99%を有する配列を含むことを意味する。例えば、BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列について）は、デフォルトとして、11のワード長（W）、10の期待値（E）、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長（W）、10の期待値（E）、およびBLOSUM62スコアマトリックスを使用する（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)を参照のこと）。配列同一性の割合は、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのための参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。割合は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列で生じる位置の数を決定して、一致した位置の数を、一致した位置の数を、比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、結果に100を乗じて、配列同一性の割合を得ることによって計算される。実施形態において、実質的な同一性は、少なくとも約50個の残基の長さである配列の領域にわたって、少なくとも約100個の残基の領域にわたって存在し、実施形態において、配列は、少なくとも約150個の残基にわたって実質的に同一である。実施形態において、配列は、コード領域の全長にわたって実質的に同一である。

【0049】

「発現ベクター」または「ベクター」は、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、トランスポゾンのように、細胞内でポリヌクレオチドを複製する自律的なユニットとして機能するか（すなわち、それ自身の制御下で複製が可能）、または宿主細胞の染色体に挿入して複製可能状態にし、それに別のポリヌクレオチドセグメントを付着させて、付着したセグメントの複製および／または発現を引き起こすようにした任意の遺伝子エレメントである。適切なベクターとしては、プラスミド、トランスポゾン、哺乳類ウイルス、バクテリオファージおよびコスミドが含まれるが、これらに限定されない。ベクターは、所望の宿主細胞へのベクターのライゲーションまたは挿入をもたらす、付着したセグメントの発現をもたらすために必要なポリヌクレオチド配列を含むことができる。このような配列は宿主生物によって異なり、転写をもたらすプロモーター配列、転写を増大させるエンハンサー配列、リボソーム結合部位配列、ならびに、転写終結配列および翻訳終結配列を含む。代替として、発現ベクターは、宿主細胞DNA配列へのベクターのライゲーションまたは統合なしに、そこにコードされた核酸配列産物を直接発現させることが可能である。いくつかの実施形態において、ベクターは、「エピソーム発現ベクター」または「エピソーム」であり、それらは宿主細胞内で複製することができ、適切な選択圧の存在下で宿主細胞内のDNAの染色体外セグメントとして存続する（例えば、Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742 (2004)参照のこと）。

【0050】

本明細書で使用される「アデノウイルス」および「アデノウイルスベクター」という用語は、アデノウイルスのライフサイクルに加わる能力を保持し、および／または、例えば破壊（例えば、超音波処理）、変性（例えば、熱または溶剤を使用）または架橋（例えば、ホルマリン架橋を介して）により物理的に不活性化された、アデノウイルスを指す。アデノウイルスのライフサイクルは、（1）ウイルス結合および細胞への侵入、（2）アデノウイルスゲノムの転写およびアデノウイルスタンパク質の翻訳、（3）アデノウイルスゲノムの複製、および（4）ウイルス粒子の組織化（例えば、Fields Virology, 5th ed., Knipe et al. (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2006)

）参照のこと）が含まれる。本明細書で使用および記載されるアデノウイルスはまた、天然のウイルスゲノムの1つ以上の部分の欠失により、複製欠損（すなわち、アデノウイルスのライフサイクルに加わる能力を保持しない）状態にされ得る。本明細書で使用および記載される「アデノウイルス」および「アデノウイルスベクター」は、アデノウイルスゲノムが、アデノウイルスゲノムに関して非ネイティブである核酸配列を収容するために操作されたアデノウイルスを含み得る。通常、アデノウイルスベクターは、例えば遺伝子導入のための非ネイティブ核酸配列のアデノウイルスへの挿入を受け入れるように、アデノウイルスのアデノウイルスゲノムに1つ以上の変異（例えば、欠失、挿入、または置換）を導入することによって生成される。

【0051】

本明細書で使用される「選択可能マーカー遺伝子」という用語は、核酸配列を発現する細胞を、対応する選択剤の存在下で、特異的に選択することまたは選択しないことを可能にする核酸配列を指す。適切な選択可能マーカー遺伝子は、当該技術分野で公知であり、例えば、国際特許出願公開WO1992/08796およびWO1994/28143、Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981); Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981); Colberré-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150: 1 (1981); Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984); Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977); Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962); Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980)、ならびに米国特許第5,122,464号および第5,770,359号に記載されている。

【0052】

本明細書で使用される「コード配列」という用語は、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのセグメントを指す。この領域または配列は、5'末端付近が開始コドンによって、3'末端付近が停止コドンによって境界付けられている。コード配列は、オープンリーディングフレームとも呼ばれることがある。

【0053】

本明細書で使用される「作動可能に連結された」という用語は、セグメントがその意図された様式で機能することを可能にするような方法で、DNAセグメントが別のDNAセグメントに物理的および／または機能的に連結されていることを指す。遺伝子産物をコードするDNA配列は、例えばプロモーター、エンハンサーおよび／またはサイレンサーなどの調節配列に、直接または間接的にDNA配列の転写の調節を可能にする方法で連結されているとき、調節配列に作動可能に連結される。例えば、DNA配列は、プロモーターの転写開始部位に関して下流で、転写開始部位に関して正しい読み枠でプロモーターにライゲーションされ、DNA配列を通して転写伸長が進行することを可能にするとき、プロモーターに作動可能に連結される。エンハンサーまたはサイレンサーは、DNA配列の転写をそれぞれ増加または減少させるような方法でDNA配列にライゲーションされるとき、遺伝子産物をコードするDNA配列に作動可能に連結される。エンハンサーおよびサイレンサーは、DNA配列のコード領域の上流、コード領域の下流に位置するか、またはコード領域内に組み込まれることができる。シグナル配列のDNAは、シグナル配列がポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドをコードするDNAと作動可能に連結される。DNA配列と調節配列との連結は、通常、適切な制限部位でのライゲーション、または当業者に公知の制限エンドヌクレアーゼを用いて配列に挿入されたアダプターもしくはリンカーを介して達成される。

【0054】

本明細書で使用される「誘導する」、「誘導」という用語およびその文法的同等物は、

ある転写の基礎レベルに対する、転写調節因子によってもたらされる核酸配列転写、プロモーター活性および／または発現の増加を指す。

【0055】

「転写調節因子」という用語は、ある環境条件下でプロモーター駆動型DNA配列の転写を防止または抑制するように作用する（例えば、リプレッサーまたは核抑制タンパク質）、あるいはある環境条件下でプロモーター駆動型DNA配列の転写を許可または刺激するように作用する（例えば、インデューサーまたはエンハンサー）、生化学エレメントをいう。

【0056】

本明細書で使用される「エンハンサー」という用語は、例えば、それが作動可能に連結している核酸配列の、転写を増加させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から何キロベースも離れて位置することができ、調節因子の結合、DNAメチル化のパターン、またはDNA構造の変化を媒介することができる。様々な異なる供給源からの多数のエンハンサーが、当該技術分野で周知であり、クローン化されたポリヌクレオチドとして、またはクローン化されたポリヌクレオチド内で（例えば、ATCCなどの保管所、ならびに他の商業的または個々の供給源から）入手可能である。プロモーター（一般的に使用されるCMVプロモーターなど）を含むいくつかのポリヌクレオチドは、エンハンサー配列もまた含む。エンハンサーは、コード配列の上流、コード配列内、またはコード配列の下流に位置し得る。「Igエンハンサー」という用語は、免疫グロブリン（Ig）遺伝子座内にマッピングされたエンハンサー領域に由来するエンハンサーエレメントを指す（このようなエンハンサーは、例えば、重鎖（ミュー（mu））5'エンハンサー、軽鎖（カッパ（Kappa））5'エンハンサー、カッパおよびミュー・イントロンエンハンサー、および3'エンハンサー（一般に、Paul W. E. (ed), Fundamental Immunology, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993)、353～363ページ；および米国特許第5,885,827号を参照のこと）を含む）。

【0057】

「プロモーター」という用語は、コーディング配列の転写を開始させるポリヌクレオチドの領域を指す。プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近くに、同じ鎖上で、DNA上の上流（センス鎖の5'領域に向かって）に位置する。プロモーターには、細胞内のあらゆる環境で活性化する構成的なもの、例えば誘導性プロモーターのように、特定の刺激に応答して活性化する制御的なものがある。本明細書で使用される「プロモーター活性」という用語およびその文法的同等物は、活性が測定されるプロモーターに作動可能に連結されたヌクレオチド配列の発現の程度を意味する。プロモーター活性は、例えばノーザンブロット分析によって、生成されたRNA転写物の量を決定することによって直接測定することができるか、またはプロモーターに連結されたレポーター核酸配列などの連結核酸配列によってコードされた生成物の量を決定することによって間接的に測定することができる。

【0058】

本明細書で使用される「誘導性プロモーター」は、転写調節因子、例えば生物学的または生物学的因子の、存在または不在によって活性に誘導されるプロモーターを指す。誘導性プロモーターは、それらに作動可能に連結された遺伝子の発現を、生物の発達の特定の段階または特定の組織においてオンまたはオフにすることができるので有用である。誘導性プロモーターの非限定的な例としては、アルコール制御プロモーター、テトラサイクリン制御プロモーター、ステロイド制御プロモーター、金属制御プロモーター、病原体制御プロモーター、温度制御プロモーターおよび光制御プロモーターが含まれる。誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチまたは遺伝子スイッチの一部であることができる。誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンド誘導性プロモーターであることができる。いくつかの場合において、誘導性プロモーターは、低分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクダ

10

20

30

40

50

伝子スイッチは、限定はしないが、以下に記載されるシステムのいずれかに記載されるようなエクダイソンベースの受容体成分から選択することができる。国際特許出願WO 2001/070816、WO 2002/029075、WO 2002/066613、WO 2002/066614、WO 2002/066612、WO 2002/066615、WO 2003/027266、WO 2003/027289、WO 2005/108617、WO 2009/045370、WO 2009/048560、WO 2010/042189、WO 2011/119773、およびWO 2012/122025、ならびに、米国特許第7,091,038号、第7,776,587号、第7,807,417号、第8,202,718号、第8,105,825号、第8,168,426号、第7,531,326号、第8,236,556号、第8,598,409号、第8,715,959号、第7,601,508号、第7,829,676号、第7,919,269号、第8,030,067号、第7,563,879号、第8,021,878号、第8,497,093号、第7,935,510号、第8,076,454号、第9,402,919号、第9,493,540号、第9,249,207号、および第9,492,482号（それぞれ、その全体が参照により援用される）。

10

20

30

40

50

【0059】

「遺伝子スイッチ」または「遺伝子スイッチ」という用語は、プロモーターに会合した応答エレメントと、例えば、1つ以上のリガンドの存在下で、応答エレメントとプロモーターが組み込まれた遺伝子の発現を調節するEcR（エクダイソン受容体）ベースのシステムとの組み合わせを指す。厳密に制御された誘導性遺伝子発現システムまたは遺伝子スイッチは、遺伝子治療、細胞内でのタンパク質の大量生産、細胞ベースのハイスループットスクリーニングアッセイ、機能ゲノミクス、ならびに遺伝子組み換え植物および動物における形質の制御などの様々な用途に有用である。このような誘導性遺伝子発現システムは、リガンド誘導性異種遺伝子発現システムを含むことができる。

【0060】

「スリーピングビューティー（Sleeping Beauty）（SB）トランスポゾンシステム」は、脊椎動物の染色体にDNA配列を導入するための合成DNAトランスポゾンシステムを指す。このシステムのいくつかの例示的な実施形態は、例えば、米国特許第6,489,458号、第8,227,432号、第9,228,180号および国際出願公開WO/2016/145146号に記載されている。スリーピングビューティートランスポゾンシステムは、スリーピングビューティー（SB）トランスポザーゼおよびSBトランスポゾンから構成される。実施形態において、スリーピングビューティートランスポゾンシステムは、SB11トランスポゾンシステム、SB100Xトランスポゾンシステム、またはSB110トランスポゾンシステムを含むことができる。

【0061】

「トランスポゾン」または「転移因子」（TE）は、ゲノム内の位置を変えることができるベクターDNA配列であり、時には変異を作り出したり復帰させたりして、細胞のゲノムサイズを変化させることができる。転移は、しばしばTEの複製をもたらす。クラスIのTEは2段階でコピーされる。最初に、DNAからRNAに転写され、生成されたRNAは次にDNAに逆転写される。このコピーされたDNAは、次にゲノムの新しい位置に挿入される。逆転写の段階は逆転写酵素によって触媒されるが、この酵素はTE自体によってコードされていることもある。レトロトランスポゾンの特徴は、HIVなどのレトロウイルスに似ている。クラスIIのTEの切り貼り型転移機構は、RNA中間体を介さない。転移はいくつかのトランスポザーゼ酵素によって触媒される。いくつかのトランスポザーゼはDNAの任意の標的部位に非特異的に結合するが、他の酵素は特定のDNA配列の標的に結合する。トランスポザーゼは標的部位で千鳥状の切断を行い、一本鎖の5'または3' DNAのオーバーハング（粘着性のある末端）を形成する。この段階では、DNAトランスポゾンを切り出し、DNAポリメラーゼがギャップを埋め、DNAリガーゼが糖-リン酸の骨格を閉じることで、DNAトランスポゾンは新しい標的部位にライゲーションされる。その結果、標的部位が複製される。DNAトランスポゾンの挿入部位は、

標的DNAの千鳥状の切断、およびDNAポリメラーゼによる充填によって作成できる短い直接反復と、それに続くトランスポザーゼによるTE切除に重要な一連の逆反復とによって同定することができる。切り貼り型TEは、ドナー部位が既に複製されているが、ターゲット部位がまだ複製されていない細胞周期のS期にトランスポジションが行われると、複製される可能性がある。クラスIおよびクラスIIのTEの両方において、転移は自律型あるいは非自律型のいずれかに分類され得る。自律型TEはそれ自体で移動することができるが、非自律型TEは移動するために別のTEの存在を必要とする。これは、非自律性TEがトランスポザーゼ（クラスII）または逆転写酵素（クラスI）を持たないためであることが多い。

【0062】

「トランスポザーゼ」とは、トランスポソンの末端に結合し、切り貼り型機構または複製的転移機構によるゲノムの別の部分へのトランスポゾン移動を触媒する酵素を指す。

【0063】

本明細書で使用される「T細胞」または「Tリンパ球」は、細胞性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球の一種である。T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体（TCR）の存在によって、B細胞およびナチュラルキラー細胞（NK細胞）などの他のリンパ球と区別することができる。

【0064】

「ヘルパーT細胞」（ T_H 細胞）は、B細胞のプラズマ細胞およびメモリーB細胞への成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む、免疫学的プロセスにおいて他の白血球を支援する。ヘルパーT細胞は、表面にCD4糖タンパク質を発現しているため、CD4+T細胞としても公知である。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面に発現しているMHCクラスII分子によってペプチド抗原を提示されると活性化される。一旦、活性化されると、ヘルパーT細胞は急速に分裂し、活発な免疫応答を制御または補助する、サイトカインと呼ばれる小さなタンパク質を分泌する。これらの細胞は、 T_H1 、 T_H2 、 T_H3 、 T_H9 、 T_H17 、 T_H22 、または T_{FH} （濾胞性ヘルパーT細胞）など数種の亜型のいずれかに分化し、異なるサイトカインを分泌して異なるタイプの免疫応答を促進する。APCからのシグナルは、T細胞を特定の亜型に誘導する。

【0065】

「細胞傷害性T細胞」（TC細胞、またはCTL）または「細胞傷害性Tリンパ球」は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、移植拒絶反応にも関与している。これらの細胞は、表面にCD8糖タンパク質を発現していることから、CD8+T細胞としても公知である。これらの細胞は、すべての有核細胞の表面に存在するMHCクラスI分子と会合した抗原と結合することにより、標的を認識する。制御性T細胞によって分泌されるIL-10、アデノシン、および他の分子により、CD8+細胞が不活性化され、アネルギー状態になることで、自己免疫疾患を予防することができる。

【0066】

「記憶T細胞」は、感染症が治った後も長期的に持続する抗原特異的T細胞のサブセットである。記憶T細胞は、同族抗原に再暴露されると速やかに大量のエフェクターT細胞に拡大し、それにより過去の感染に対する記憶を免疫系に与える。メモリーT細胞は、セントラルメモリーT細胞（ T_{CM} 細胞）および2種類のエフェクターメモリーT細胞（ T_{EM} 細胞および T_{EMRA} 細胞）の3つの亜型を含む。メモリー細胞は、CD4+またはCD8+のいずれでもあることができる。メモリーT細胞は、通常、細胞表面タンパク質のCD45RO、CD45RAおよび／またはCCR7を発現する。

【0067】

「制御性T細胞」（ T_{reg} 細胞）は、以前はサプレッサーT細胞として公知であり、免疫寛容の維持としての役割を担っている。その主な役割は、免疫反応の終盤にT細胞性免疫を停止させ、胸腺での負の選択のプロセスを逃れた自己反応性T細胞を抑制することである。

10

20

30

40

50

【0068】

「ナチュラルキラーT細胞」（NK T細胞－自然免疫系のナチュラルキラー細胞と混同しないこと）は、適応免疫系と自然免疫系を橋渡しする。主要組織適合性複合体（MHC）分子によって提示されるペプチド抗原を認識する従来のT細胞とは異なり、NK T細胞はCD1dと呼ばれる分子によって提示される糖脂質の抗原を認識する。一旦、活性化されると、ナチュラルキラーT細胞は、ヘルパーT細胞（T_H）および細胞傷害性T細胞（T_C）の両方による機能（すなわち、サイトカイン産物および細胞溶解／殺傷分子の放出など）を発揮することができる。また、ナチュラルキラーT細胞は一部の腫瘍細胞およびヘルペスウイルスに感染した細胞を認識し、排除することができる。

【0069】

「養子T細胞移植」とは、ワクチン接種単独、または患者の自然な腫瘍反応によって得ることができるよりも多くのT細胞を獲得するために、腫瘍特異的T細胞の分離および生体外での増殖を指す。その後、この腫瘍特異的T細胞をがん患者に注入し、がんを攻撃して殺すことができるT細胞を介して、残存する腫瘍を圧倒する能力を患者の免疫系に与える。腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）の培養、特定のT細胞またはクローンの分離および増殖、さらには腫瘍を強力に認識し攻撃するように操作されたT細胞の使用など、がん治療に用いられる養子T細胞療法には多くの形態がある。

【0070】

本明細書で使用される「抗体」は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、B細胞の単一のクローンによって産生され、同じエピトープに結合する抗体を指す。一方、「ポリクローナル抗体」とは、異なるB細胞によって産生され、同じ抗原の異なるエピトープに結合する抗体群を指す。抗体全体は通常、重（H）鎖ポリペプチドの2つの同一コピーと軽（L）鎖ポリペプチドの2つの同一コピーの、4つのポリペプチドから構成される。各重鎖は、1つのN末端可変（VH）領域と3つのC末端定常（CH1、CH2およびCH3）領域を含み、各軽鎖は1つのN末端可変（VL）領域と1つのC末端定常（CL）領域を含む。軽鎖と重鎖の各組の可変領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。VH領域およびVL領域は類似した一般的な構造を持ち、各領域は4つのフレームワーク領域を含み、その配列は比較的よく保存されている。フレームワーク領域は3つの相補性決定領域（CDR）によって接続されている。CDR1、CDR2、およびCDR3として公知の3つのCDRは、抗原結合を担う抗体の「超可変領域」を形成する。

【0071】

「抗体様分子」は、例えば、相手を選択的に結合することができるIgスーパーファミリーのメンバーのタンパク質であることができる。MHC分子およびT細胞受容体がそのような分子である。一実施形態において、抗体様分子は、TCRである。一実施形態において、TCRは、そのMHC結合親和性を高めるために修飾される。

【0072】

「抗体の断片」、「抗体断片」、「抗体の機能的断片」、「抗原結合部分」という用語またはその文法的同等物は、本明細書では互換的に使用され、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片または部分を意味する（一般的には、Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129(2005)参照のこと）。抗体断片は、例えば、1つ以上のCDR、可変領域（またはその一部）、定常領域（またはその一部）、またはそれらの組み合わせを含むことが望ましい。抗体断片の非限定的な例としては、(i) VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなる1価の断片であるFab断片、(ii) 茎領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片からなる2価の断片であるF(ab')₂断片、(iii) 抗体のシングルアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(iv) 2つのドメインを単一のポリペプチド鎖として合成することを可能にする合成リンカーによって結合された、Fv断片の2つのドメイン（すなわち、VLおよびVH）からなる1価の分子である単鎖Fv(scFv)（例えば、Bird et al., Science, 242:423

10

20

30

40

50

－426 (1988) ; Huston et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 85 : 5879－5883 (1988) 、および Osbourn et al. , Nat. Biotechnol. , 16 : 778 (1998) 参照のこと) 、および (v) ポリペプチド鎖の二量体であるダイアボディであって、各ポリペプチド鎖が、同じポリペプチド鎖上の V H と V L の間の対合を可能にするには短すぎるペプチドリンカーによって V L に接続された V H を含み、それによって、異なる V H－V L ポリペプチド鎖上の相補ドメイン間の対合を駆動して 2 つの機能的抗原結合部位を有する二量体分子を生成する断片、が含まれる。抗体断片は当技術分野で公知であり、例えば米国特許第 8 , 603 , 950 号でより詳細に記載されている。

【0073】

「抗原認識部位」または「抗原認識ドメイン」は、抗原に特異的に結合する分子または分子の一部を指す。一実施形態において、抗原認識部位は、抗体、抗体様分子またはその断片であり、抗原は腫瘍抗原である。

【0074】

「保存的アミノ酸置換」または「保存的変異」という用語は、1つのアミノ酸を、共通の特性を有する別のアミノ酸で置き換えることを指す。個々のアミノ酸間の共通特性を定義する機能的な方法は、同属の生物の対応するタンパク質間のアミノ酸変化の正規化頻度を分析することである (Schulz, G. E. and Schirmer, R. H. , Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)) 。このような解析によれば、アミノ酸のグループは、グループ内のアミノ酸が優先的に相互に交換し、それにより、タンパク質構造全体に対する影響が互いに最も似ている箇所と定義することができる (Schulz, G. E. と Schirmer, R. H. , 上記を参照) 。保存的変異の例としては、上記のサブグループ内のアミノ酸のアミノ酸置換、例えば、正電荷を維持できるようなリジンからアルギニンへの置換およびその逆、負電荷を維持できるようなグルタミン酸からアスパラギン酸への置換およびその逆、遊離基－OH を維持できるようなセリンからスレオニンへの置換、および遊離基－NH₂ を維持できるようなグルタミンからアスパラギンへの置換、が含まれる。代替として、または追加的に、機能型変異体は、少なくとも 1 つの非保存的アミノ酸置換を有する参照タンパク質のアミノ酸配列を含むことができる。

【0075】

「非保存的変異」という用語は、例えば、リジンをトリプトファンに、またはフェニルアラニンをセリンに、などといった異なるグループ間のアミノ酸置換を含む。この場合、非保存的アミノ酸置換に対して、機能型変異体の生物学的活性を妨げない、または抑制しないことが好ましい。非保存的アミノ酸置換は、機能型変異体の生物学的活性が相同親タンパク質と比較して増加するように、機能型変異体の生物学的活性を増強することができる。

【0076】

本明細書で言及される「増殖性疾患」とは、細胞の過剰な増殖および／または細胞マトリックスのターンオーバーが、がんを含む疾患の病因に著しく寄与する統一的な概念を指す。

【0077】

本明細書で使用される「患者」または「対象」は、がんなどの増殖性障害と診断された、またはその疑いがある、あるいはがんなどの増殖性障害を発症している、哺乳類対象を指す。いくつかの実施形態において、「患者」という用語は、がんなどの増殖性障害を発症する可能性が平均よりも高い哺乳類対象を指す。例示的な患者は、ヒト、類人猿、イヌ、ブタ、ウシ、ネコ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類、および本明細書に開示する療法から利益を得ることができる他の哺乳類とすることができる。例示的なヒトの患者は、男性および／または女性とすることができる。「それを必要とする患者」または「それを必要とする対象」は、本明細書では、例えば、限定はされないが、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 感染などの、疾患または障害を有すると診断されたまたはその疑いがある患者を指す

10

20

30

40

50

。

【0078】

「投与すること」は、本明細書では、本明細書に記載の1つ以上の組成物を患者または対象に提供することを指す。例として、そして限定ではなく、組成物の投与、例えば、注射は、静脈内（i.v.）注射、皮下（s.c.）注射、皮内（i.d.）注射、腹腔内（i.p.）注射、または筋肉内（i.m.）注射によって実施することができる。このような経路は1つ以上採用することができる。非経口投与は、例えば、ボーラス注射によるか、または時間をかけて徐々に灌流することによって行うことができる。代替として、または同時に、投与は、経口経路で行うことができる。さらに、投与は、外科的沈着、または医療デバイスの装着によっても行うことができる。医薬組成物は、1つ以上の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせた、本明細書に記載される本発明の組成物を含むことができる。このような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝剤、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、酸化防止剤、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤、補助剤（例えば水酸化アルミニウム）、および保存剤を含むことができる。

10

【0079】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療する」という用語、またはその文法的同等物は、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。実施形態において、効果は治療的であり、すなわち、効果は、疾患および／または疾患に起因する有害症状もしくはは病理学的症状を部分的にまたは完全に治療する。この目的のために、本発明の方法は、本発明の核酸配列、または本発明の核酸配列を含むベクターを発現する本発明の組成物の治療上有効な量を投与することを含む。

20

【0080】

「治療上有効な量」、「治療量」、「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍抑制有効量」という用語またはその文法的同等物は、所望の治療結果を得るために、必要な投与量および期間において、有効な量を指す。治療上有効な量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの要因、ならびに1体以上の対象において所望の反応を生じさせる本明細書に記載の組成物の能力に応じて変化させることができる。

【0081】

代替として、本明細書に記載の1つ以上の組成物の患者または対象への投与の薬理学的および／または生理学的効果とは、「予防的」、すなわち、その効果が疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防することができるということである。「予防的に有効な量」とは、所望の予防的結果（例えば、疾患の予防または標的病態の発現の予防）を得るために、必要な投与量および期間において、有効な量を指す。

30

【0082】

ポリペプチドおよびアミノ酸配列に関する「順番に」という用語または文法的等価物は、配列のN末端からC末端への順序を指す。ポリヌクレオチドおよび核酸配列に関する「順番に」という用語または文法的等価物は、配列の5'（「ファイブプライム」）から3'（「スリープライム」）の順序を指す。

40

【0083】

HPV分子ワクチン

ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）は、200以上の関連ウイルスのグループである。この大きなグループに属する各HPVウイルスには、HPVタイプ（または血清型）と呼ばれる番号が付けられている。HPVは、皮膚や粘膜の細胞に感染する、小型の非エンベロープ型デオキシリボ核酸（DNA）ウイルスである。円形で2本鎖のウイルスゲノムの長さは約8キロベース（kb）である。そのゲノムは、ウイルス複製を担う7つの初期タンパク質（E1～E7）、およびウイルス構造タンパク質である2つの後期タンパク質（L1およびL2）をコードする。各遺伝子は特定の機能を有する。200種類以上の公知のHPVのうち、少なくとも13種類が子宮頸がんの原因となり、その他の肛門性器がんや頭

50

頸部のがんにも関連している。最も一般的な2つの「高リスク」血清型（HPV16およびHPV18）は、子宮頸がん全体の約70%を引き起こす。HPV16およびHPV18では、2つの主要ながんタンパク質である、E6とE7が、HPV関連腫瘍によって構造的に発現し、HPV感染細胞における細胞形質転換の誘導と維持に重要である。また、最近の証拠は、E5タンパク質もウイルスの形質転換に影響を与えることを示唆している。HPVのタイプである、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、および82型は発癌性があると考えられている。2つの「低リスク」HPV6およびHPV11は、かなりの罹患率をもたらす外性器の一般的な良性疾患である性器疣贅を引き起こすとして公知である。HPVは感染力が強く、性行為の開始直後に発症のピークを迎え、ほとんどの人が一生のうちに一度は感染を経験する。

10

【0084】

性器疣贅は非常に一般的であり、米国だけで毎年50万から100万の新しい症例が診断され、肛門性器疣贅または尖圭コンジロームなどの他の名前でも公知である。HPV6およびHPV11が性器疣贅の約90%の原因である。現在の治療の選択肢は、根本的なウイルス感染の除去よりも、疣贅の除去に主眼が置かれている。現在、様々な治療法が用いられていて、その内容は非常に多岐にわたり、劇的な差が出る可能性がある。しかしながら、すべての患者において、疣贅を除去し、再発を防止する100%効果的な治療法はない。

20

【0085】

RRPの現在の標準的な治療法は、必要に応じて補助療法を伴う外科的切除である。しかし、RRPの特徴的な態様は、手術の繰り返しを必要とする再発の傾向があることである。悪性度は患者により違い、数週間おきに手術が必要な人もいれば、年に2回、あるいは生涯で数回しか手術が必要ない人もいる。

【0086】

残念ながら、これまでに開発された治療法では、RRPの多発性再発を防止することはできなかった。RRP患者のためのより良い治療法を開発する必要がある。本明細書では、革新的な免疫療法のアプローチ、すなわち、RRPおよび性器疣贅などの他のHPV6/11関連疾患の治療および経過を変えるために抗HPV6/11免疫を誘導することを目指す新規治療HPVワクチンについて説明する。

30

【0087】

ウイルス様粒子からなる予防ワクチンは、カプシド構造に対する免疫のみを誘導し、細胞形質転換に関与する非構造タンパク質に対する免疫を誘導しない。動物モデルにおける初期のHPV研究では、種特異的な乳頭腫ウイルスを接種すると、免疫応答が誘導され、相同のウイルスの攻撃に対する保護が付与されることが示された。しかし、ネイティブ乳頭腫ウイルスは組織培養で容易に増殖させることができないため、ワクチン開発の基質としては適していない。その後、酵母またはバキュロウイルスベクターなどの異種発現系で構造タンパク質を発現させ、ウイルス粒子を製造する研究が開始された。その結果、L1単独の発現により、形態学的には本物のHPVビリオンに似ているが、ウイルスDNAを含まないウイルス様粒子（VLP）が生成されることを示した。これらのVLPは、異種細胞基質で発現させた場合、L1タンパク質の自己組織化により生成される。動物実験では、VLPは相同のウイルスによる高用量の実験的感染から保護することが示された。HPV VLPはマウスやウサギで高い免疫原性を示し、得られた抗体は、擬似ビリオン中和アッセイで試験した場合、中和性と型制限があることが示された。変性した粒子による免疫は、中和抗体の産生をもたらさず、あるいは実験的なウイルス攻撃から保護されず、中和エピトープが立体構造に依存することが示される。

40

【0088】

本明細書では、HPV組換えワクチンを製造する方法を含む組成物、キット、およびシステムが提供される。本開示におけるHPV組換えワクチン（例えば、HPV設計1から5）は、タンパク質工学を通して操作される。

50

【0089】

送達システム

ゴリラ・アデノウイルス・シャトルベクター

本開示の特定の態様は、本明細書に記載される1つ以上の免疫応答誘導性HPVポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関するものである。特定の実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターである。特定の実施形態において、ベクターは、アデノウイルスベクターである。アデノウイルスは、一般に、ヒトの良性の病理と関連しており、ヒトを含む様々な種から単離されたアデノウイルスのゲノムは、広範囲に研究されてきた。アデノウイルスは、約36kbの二本鎖DNAを含む中型(90~100nm)の非エンベロープ型正20面体ウイルスである。アデノウイルスのカプシドは、ウイルスによる細胞感染の初期段階における重要な相互作用を仲介し、アデノウイルスのライフサイクルの終わりには、アデノウイルスゲノムのパッケージングに必要とされる。カプシドは252個のカプソメアを含み、これは240個のヘキソン、12個のペントン塩基タンパク質、および12個のファイバーを含む(Ginsberg et al., Virology, 28:782-83 (1966))。ヘキソンは、3つの同一のタンパク質、すなわちポリペプチドIIを含む(Roberts et al., Science, 232:1148-51 (1986))。ペントン塩基は5つの同一のタンパク質を含み、ファイバーは3つの同一タンパク質を含む。タンパク質II Ia、VI、およびIXは、アデノウイルスの外被に存在し、ウイルスカプシドを安定化すると考えられている(Stewart et al., Cell, 67:145-54 (1991)、およびStewart et al., EMBO J., 12(7):2589-99 (1993))。pIX(タンパク質IX)を除くカプシドタンパク質の発現は、アデノウイルスのポリメラーゼタンパク質に依存している。それ故に、アデノウイルス粒子の主要成分は、ポリメラーゼタンパク質遺伝子が存在し、発現している場合にのみ、ゲノムから発現される。

10

20

30

40

50

【0090】

アデノウイルスのいくつかの特徴は、治療用途(すなわち、「遺伝子治療」)のために細胞に遺伝物質を導入するため、またはワクチン用途のための抗原送達システムとして使用するための理想的なビークルを作ることである。例えば、アデノウイルスは高力価(例えば、約1013粒子単位(pu))で産生することができ、遺伝物質を非複製細胞および複製細胞に導入することができる。アデノウイルスゲノムは、大量の外因性DNA(約8kbまで)を運ぶように操作することができ、アデノウイルスカプシドは、さらに長い配列の導入を増強することができる(Curiel et al., Hum. Gene Ther., 3:147-154 (1992))。さらに、アデノウイルスは一般に宿主細胞の染色体に組み込まれず、むしろ線状エピソームとして維持され、それによって組換えアデノウイルスが正常な細胞機能を妨害する可能性を最小化する。

【0091】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のアデノウイルスは、ゴリラから単離される。ゴリラは、東ゴリラ(*Gorilla beringei*)と西ゴリラ(*Gorilla gorilla*)の2種の中に、広く知られている4つの亜種がある。西ゴリラ種には、西ローランドゴリラ(*Gorilla gorilla gorilla*)およびクロスリバーゴリラ(*Gorilla gorilla diehli*)という亜種がある。東ゴリラ種は、亜種のマウンテンゴリラ(*Gorilla beringei beringei*)および東ローランドゴリラ(*Gorilla beringei graueri*)を含む(例えば、Wilson and Reeder, eds., Mammalian Species of the World, 3rd ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland (2005))参照のこと)。いくつかの実施形態において、本開示のアデノウイルスは、マウンテンゴリラ(*Gorilla beringei beringei*)から単離される。

【0092】

様々なゴリラアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、国際特許出願公開のWO 2013/052832、WO 2013/052811、およびWO 2013/052799に記載され、それぞれその全体が参照により本明細書に援用される。

【0093】

アデノウイルスは、アデノウイルスベクター、例えば、遺伝子送達ビークルとして使用するために、従来公知のアデノウイルスと同じ方法で修飾することができる。アデノウイルスおよびアデノウイルスベクターは、複製可能、条件付き複製可能、または複製欠損であることができる。

【0094】

複製可能アデノウイルスまたは複製可能アデノウイルスベクターは、典型的な宿主細胞、すなわち、アデノウイルスによって感染することが通常可能な細胞において複製することができる。複製可能アデノウイルスまたは複製可能アデノウイルスベクターは、宿主細胞におけるウイルス複製を抑制しないアデノウイルスゲノムにおいて、野生型アデノウイルスと比較して1つ以上の変異（例えば、1つ以上の欠失、挿入、および／または置換）を有することができる。例えば、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスまたはアデノウイルスゲノムの増殖に必須ではない、E3領域として公知のアデノウイルス初期領域の一部または全体の欠失を有することができる。

【0095】

条件付き複製アデノウイルスまたは条件付き複製アデノウイルスベクターは、予め決められた条件下で複製するように操作されたアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターである。例えば、複製必須遺伝子機能、例えばアデノウイルス初期領域によってコードされる遺伝子機能は、誘導可能、抑制可能、または組織特異的な転写制御配列、例えばプロモーターに作動可能に連結されることができる。このような実施形態では、複製は、転写制御配列と相互作用する特定の因子の存在または不在を必要とする。条件付き複製アデノウイルスベクターは、米国特許第5,998,205号にさらに記載されている。

【0096】

複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターは、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが典型的な宿主細胞、特にアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターによって感染されるべきヒトの細胞において複製しないように、例えば、1つ以上の複製必須遺伝子機能または領域における欠損の結果として、複製に必要なアデノウイルスゲノムの機能または領域の相補が必要なアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターである。

【0097】

本明細書で使用される遺伝子機能またはゲノム領域の欠損とは、核酸配列の全部または一部が破壊（例えば、欠失）された（例えば、遺伝子産物の機能が少なくとも約2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、または50倍低下するように）遺伝子の機能を抹消または損なわせるアデノウイルスゲノムの十分な遺伝物質の破壊（例えば、欠失）である、と定義する。遺伝子領域全体の欠失は、複製必須遺伝子機能の破壊には必要ないことが多い。しかし、アデノウイルスゲノムに1つ以上の導入遺伝子のための十分なスペースを提供する目的のために、1つ以上の遺伝子領域の大部分の除去が望ましい可能性がある。遺伝物質の欠失が好ましいが、付加または置換による遺伝物質の変異もまた、遺伝子機能を崩壊するのに適している。複製必須遺伝子機能とは、アデノウイルスの複製（例えば、増殖）に必要な遺伝子機能であり、例えば、アデノウイルスの初期領域（例えば、E1、E2、およびE4領域）、後期領域（例えば、L1、L2、L3、L4、およびL5領域）、ウイルスパッケージングに関わる遺伝子（例えば、IVa2遺伝子）、ウイルス会合RNA（例えば、VA-RNA-1および／またはVA-RNA-2）によってコードされる。

【0098】

アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが複製可能であろうと複製欠損であろうと、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターはアデノウイルスゲノムの少なくとも

10

20

30

40

50

一部分を保持する。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、タンパク質コード領域および非タンパク質コード領域を含む、アデノウイルスゲノムの任意の部分を含むことができる。望ましくは、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含む。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、例えば、初期領域遺伝子（すなわち、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、および／またはE4領域）のいずれか1つによってコードされるタンパク質、またはウイルス構造タンパク質（すなわち、L1、L2、L3、L4、およびL5領域）をコードする後期領域遺伝子のいずれか1つによってコードされるタンパク質などの任意の適切なアデノウイルスタンパク質をコードする核酸配列を含むことができる。

【0099】

10

アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、望ましくは、pIXタンパク質、DNAポリメラーゼタンパク質、ペントントタンパク質、ヘキソントタンパク質、および／またはファイバタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列を含む。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスタンパク質の全長アミノ酸配列をコードする全長核酸配列を含むことができる。代替として、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスタンパク質の全長アミノ酸配列の一部をコードする全長核酸配列の一部を含むことができる。

【0100】

核酸配列の「一部」は、少なくとも10ヌクレオチド（例えば、約10～約5000ヌクレオチド）を含む。好ましくは、核酸配列の「一部」は、10以上（例えば、15以上、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、45以上、50以上、または100以上）のヌクレオチドで、しかし5,000未満（例えば、4900以下、4000以下、3000以下、2000以下、1000以下、800以下、500以下、300以下、または100以下）のヌクレオチドを含む。好ましくは、核酸配列の一部は、約10～約3500ヌクレオチド（例えば、約10、20、30、50、100、300、500、700、1000、1500、2000、2500、または3000ヌクレオチド）か、約10～約1000ヌクレオチド（例えば、約25、55、125、325、525、725、または925ヌクレオチド）か、または約10～約500ヌクレオチド（例えば、約15、30、40、50、60、70、80、90、150、175、250、275、350、375、450、475、480、490、495、または499ヌクレオチド）、あるいは前述の値のうちの任意の2つによって定義される範囲である。より好ましくは、核酸配列の「一部」は、約3200以下のヌクレオチド（例えば、約10～約3200ヌクレオチド、約10～3000ヌクレオチド、または約30～約500ヌクレオチド、あるいは前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲）を含む。

20

30

【0101】

アミノ酸配列の「一部」は、少なくとも3アミノ酸（例えば、約3～約1,200アミノ酸）を含む。好ましくは、アミノ酸配列の「一部」は、3以上（例えば、5以上、10以上、15以上、20以上、25以上、30以上、40以上、または50以上）のアミノ酸で、しかし1,200未満（例えば、1,000以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、または100以下）のアミノ酸を含む。好ましくは、アミノ酸配列の一部は、約3～約500アミノ酸（例えば、約10、100、200、300、400、または500アミノ酸）、約3～約300アミノ酸（例えば、約20、50、75、95、150、175、または200アミノ酸）、または約3～約100アミノ酸（例えば、約15、25、35、40、45、60、65、70、80、85、90、95、または99アミノ酸）、あるいは前述の値のうちの任意の2つによって定義される範囲のアミノ酸を含む。より好ましくは、アミノ酸配列の「一部」は、約500以下のアミノ酸（例えば、約3～約400のアミノ酸、約10～約250のアミノ酸、または約50～約100のアミノ酸、あるいは前述の値のうちの任意の2つによって定義される範囲のアミノ酸）を含む。

40

【0102】

50

アデノウイルス pIX タンパク質は、アデノウイルスカプシドに存在し、ヘキソンノナー相互作用を強化することが示されており、全長ゲノムのパッケージングに必須である（例えば、Boulanger et al., J. Gen. Virol., 44:783-800 (1979)、Horwitz M. S., "Adenoviridae and their replication" in Virology, 2nd ed., B. N. Fields et al. (eds.), Raven Press, Ltd., New York, pp. 1679-1721 (1990)、Ghosh-Choudhury et al., EMBO J., 6:1733-1739 (1987)、および、van Oostrum et al., J. Virol., 56:439-448 (1985) 参照のこと）。pIX は、アデノウイルスの構造への寄与に加えて、アデノウイルス主要後期プロモーター (MLP) 活性の刺激などの転写特性も見せることが示されている（例えば、Lutz et al., J. Virol., 71(7):5102-5109 (1997) 参照のこと）。

10

【0103】

アデノウイルス DNA ポリメラーゼタンパク質は、生体外および生体内の両方でウイルス DNA 複製に必須である。このポリメラーゼは、アデノウイルス DNA の 5' 末端に共有結合している末端タンパク質 (TP) の前駆体 (pTP) と複合体を形成して共精製する (Field et al., J. Biol. Chem., 259:9487-9495 (1984))。アデノウイルス DNA ポリメラーゼおよび pTP は共に E2 領域によってコードされる。ポリメラーゼタンパク質は、pIX を除くすべての構造タンパク質の発現に必要である。ポリメラーゼタンパク質の遺伝子配列がないと、ポリメラーゼタンパク質は作られない。その結果、ウイルスゲノムは複製されず、主要後期プロモーターは活性化されず、カプシドタンパク質は発現しない。

20

【0104】

アデノウイルスのヘキソタンパク質は、アデノウイルスのカプシドの中で最大かつ最も豊富なタンパク質である。ヘキソタンパク質は、ウイルスカプシドの組織化、カプシドの正 20 面体対称性の決定（これによりカプシドの体積および DNA パッケージングサイズの限界を規定する）、およびカプシドの完全性に必須である。さらに、ヘキソンは、アデノウイルスベクターの中和を低減するための修飾の主要な標的である（例えば、Gall et al., J. Virol., 72:10260-264 (1998)、および Rux et al., J. Virol., 77(17):9553-9566 (2003) 参照のこと）。ヘキソタンパク質の主要な構造的特徴は、血清型を超えてアデノウイルスに共有されているが、ヘキソタンパク質は血清型間でサイズおよび免疫学的特性が異なる (Jornvall et al., J. Biol. Chem., 256(12):6181-6186 (1981))。15 種類のアデノウイルスヘキソタンパク質の比較により、ヘキシソンの優勢な抗原性および血清型の特異的な領域はループ 1 およびループ 2（すなわち、それぞれ LI または l1、および LII または l2）にあると思われる、その中に、アデノウイルス血清型間で長さおよび配列が異なる 7 つの離散的超変動領域 (HVR1 から HVR7) があることが明らかになった (Crawford-Mikszas et al., J. Virol., 70(3):1836-1844 (1996))。

30

40

【0105】

アデノウイルスファイバータンパク質は、テール、シャフト、およびノブの 3 つのドメインを持つアデノウイルスポリペプチド IV のホモ三量体である。(Devaux et al., J. Molec. Biol., 215:567-88 (1990)、Yeh et al., Virus Res., 33:179-98 (1991))。ファイバータンパク質は、ノブおよびシャフトドメインを介して細胞表面上の受容体への一次的なウイルス結合を仲介する (Henry et al., J. Virol., 68(8):5239-46 (1994))。三量化のためのアミノ酸配列はノブに位置しており、これはファイバーのアミノ末端（テール）がペントン塩基と適切に会合するために必要であると

50

思われる (Novelli et al., Virology, 185:365-76 (1991))。細胞受容体の認識とペントン塩基との結合に加えて、ファイバーは血清型の同一性に寄与する。異なるアデノウイルス血清型からのファイバータンパク質はかなり異なる (例えば、Green et al., EMBO J., 2:1357-65 (1983))、Chroboczek et al., Virology, 186:280-85 (1992)、および Signas et al., J. Virol., 53:672-78 (1985) 参照のこと)。このように、ファイバータンパク質はアデノウイルスのライフサイクルの鍵となる多様な機能を有している。

【0106】

アデノウイルスのペントン塩基タンパク質は、正20面体カプシドの頂点に位置し、5つの同一モノマーを含む。ペントン塩基タンパク質は、正20面体カプシドの複数の面にあるヘキソタンパク質を橋渡しするための構造を提供し、ファイバータンパク質がカプシドに組み込まれるために必須の界面を提供する。ペントン塩基の各モノマーはRGDトリペプチドモチーフを含む (Neumann et al., Gene, 69:153-157 (1988))。RGDトリペプチドは α vインテグリンへの結合を仲介し、ペントン塩基のRGD配列に点突然変異を有するアデノウイルスは、細胞への感染能力を制限される (Bai et al., J. Virol., 67:5198-5205 (1993))。このように、ペントン塩基タンパク質は、カプシドの構造およびウイルスと細胞との相互作用の最大効率に必須である。

【0107】

本明細書に記載する核酸またはアミノ酸配列の「同一性」は、目的の核酸またはアミノ酸配列を参照の核酸またはアミノ酸配列と比較することによって決定することができる。目的の配列をもたらすように参照配列において (例えば、点突然変異、挿入、または欠失によって) 変更および/または修飾されたヌクレオチドまたはアミノ酸残基の数がカウントされる。そのような変化の総数を目的の配列の全長から差し引き、その差を目的の配列の長さで割って割合で表現する。最適なアライメントを求め、2つ以上の配列間の同一性を計算するための多くの数学的アルゴリズムが公知であり、多くの利用可能なソフトウェアプログラムに組み込まれている。このようなプログラムの例としては、CLUSTAL-W、T-Coffee、およびALIGN (核酸およびアミノ酸配列のアライメント用)、BLASTプログラム (例えば、BLAST2.1、BL2SEQ、およびそれらの後のバージョン)、およびFASTAプログラム (例えば、FASTA3x、FASTAM、およびSEARCH) (配列アライメントおよび配列類似性の検索用) などが含まれる。配列アライメントアルゴリズムも、例えば、Altschul et al., J. Molecular Biol., 215 (3):403-410 (1990)、Beigert et al., Proc. Natl. Acad. USA, 106 (10):3770-3775 (2009)、Durbin et al., eds., Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009)、Soding, Bioinformatics, 21 (7):951-960 (2005)、Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25 (17):3389-3402 (1997)、およびGusfield, Algorithms on Strings, Tree and Sequences, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1997) に開示されている。

【0108】

アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、前述の配列のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、または5つすべてを単独で、または任意の組み合わせで含むことができる。この点で、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、前述の配列のうちの任意の2つの組み合わせ、前述の配列のうちの任意の3つの組み合わせ、前述の配列のうちの任意

10

20

30

40

50

の4つの組み合わせ、または前述の配列のうちのすべての5つの組み合わせを含むことができる。

【0109】

本明細書で説明されるように、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、複製可能、条件付き複製可能、または複製欠損であることができる。好ましくは、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターが、増殖（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）のためにアデノウイルスゲノムの1つ以上の領域の少なくとも1つの複製必須遺伝子機能の相補性を必要とするように、複製欠損である。

【0110】

複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターは、増殖のためのアデノウイルスゲノムの1つ以上の領域の1つ以上の複製必須遺伝子機能の欠損を引き起こすために、任意の適切な方法で修飾することができる。アデノウイルスゲノムの1つ以上の領域の1つ以上の複製必須遺伝子機能の欠損の相補とは、欠損した複製必須遺伝子機能を提供するための外因性手段の使用を指す。このような相補性は、例えば、相補性細胞および／または欠損した複製必須遺伝子機能をコードする外因性DNA（例えば、ヘルパーアデノウイルス）を使用することによって、任意の適切な方法で効果を発揮することができる。

【0111】

アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの初期領域（すなわち、E1～E4領域）のみ、アデノウイルスゲノムの後期領域（すなわち、L1～L5領域）のみ、アデノウイルスゲノムの初期および後期領域の両方、またはすべてのアデノウイルス遺伝子の、1つ以上の複製必須遺伝子機能を欠損することができる（すなわち、大容量アデノベクター（HC-Ad））。Morsy et al., Proc. Natl., Acad. USA, 95:965-976 (1998)、Chen et al., Proc. Natl., Acad. USA, 94:1645-1650 (1997)、およびKochanek et al., Hum. Gene Ther., 10:2451-2459 (1999)を参照のこと。複製欠損アデノウイルスベクターの例は、米国特許第5,837,511号、第5,851,806号、第5,994,106号、第6,127,175号、第6,482,616号、および第7,195,896号、ならびに国際特許出願公開WO1994/028152、WO1995/002697、WO1995/016772、WO1995/034671、WO1996/022378、WO1997/012986、WO1997/021826およびWO2003/022311に開示されている。

【0112】

アデノウイルスゲノムの初期領域は、E1領域、E2領域、E3領域、およびE4領域を含む。E1領域はE1AおよびE1Bサブ領域を含み、ならびにE1領域における複製必須遺伝子機能の1つ以上の欠損は、E1AおよびE1Bサブ領域のいずれかまたは両方における複製必須遺伝子機能の1つ以上の欠損を含むことができ、それによって、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが増殖する（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）ためにアデノウイルスゲノムのE1Aサブ領域および／またはE1Bサブ領域の相補性が必要となる。E2領域は、E2AおよびE2Bサブ領域を含み、ならびにE2領域における複製必須遺伝子機能の1つ以上の欠損は、E2AおよびE2Bサブ領域のいずれかまたは両方における複製必須遺伝子機能の1つ以上の欠損を含むことができ、それによって、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが増殖する（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）ためにアデノウイルスゲノムのE2Aサブ領域および／またはE2Bサブ領域の相補性が必要となる。

【0113】

E3領域は、E3領域の一部または全体の欠失が、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが増殖する（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）ためにE3領

10

20

30

40

50

域における任意の遺伝子機能の相補性を必要としないように、複製必須遺伝子機能を含まない。本開示の文脈において、E3領域は、ヒトアデノウイルス5型のE3領域（NCBI参照配列AP__000218）からの12.5Kタンパク質に高い相同性を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームで始まり、ヒトアデノウイルス5のE3領域（NCBI参照配列AP__000224.1）からの14.7Kタンパク質に高い相同性を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームで終了する領域として定義される。E3領域は、全体または一部を欠失させることが可能であり、または全体または一部が保持されることが可能である。欠失の大きさは、ゲノムが最適ゲノムパッケージングサイズに厳密に一致するアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターを保持するように調整されることができる。より大きな欠失は、アデノウイルスまたはアデノウイルスゲノムにおける、より大きな異種核酸配列の挿入を受け入れることになる。本開示の一実施形態において、E3領域に存在するL4ポリアデニル化シグナル配列は、保持される。

10

【0114】

E4領域は、複数のオープンリーディングフレーム（ORF）を含む。ORF6、および場合によってはORF3を除くE4領域のオープンリーディングフレームのすべてが欠失したアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが増殖する（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）ためにE4領域の任意の遺伝子機能の相補性を必要としない。逆に、E4領域のORF6、および場合によってはORF3の破壊または欠失を有する（例えば、E4領域のORF6および／またはORF3に基づく複製必須遺伝子機能の欠損を有する）アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、E4領域の他のオープンリーディングフレームのいずれかまたはネイティブE4プロモーター、ポリアデニル化配列、および／または右側逆位末端配列（ITR）の破壊または欠失の有無にかかわらず、E4領域（特に、E4領域のORF6および／またはORF3）の相補性は、アデノウイルスベクターが増殖する（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）ために必要となる。アデノウイルスゲノムの後期領域は、L1、L2、L3、L4、およびL5領域を含む。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターはまた、国際特許出願公開WO2000/000628で説明されているように、主要後期プロモーター（MLP）に変異を有することができ、これは、所望によりアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターを複製不全状態にすることができる。

20

30

【0115】

複製必須遺伝子機能の1つ以上の欠損を含むアデノウイルスゲノムの1つ以上の領域には、望ましくは、アデノウイルスゲノムの1つ以上の初期領域、すなわち、E1領域、E2領域、および／またはE4領域、任意にE3領域の一部または全部の欠失がある。

【0116】

複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターはまた、宿主細胞におけるウイルス複製を抑制しないアデノウイルスゲノムにおいて、野生型アデノウイルスと比較して1つ以上の変異（例えば、1つ以上の欠失、挿入、および／または置換）を有することができる。よって、複製必須遺伝子機能における1つ以上の欠損に加えて、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、複製必須ではない他の点で欠損することができる。例えば、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスまたはアデノウイルスゲノムの増殖に必須ではない、E3領域として公知のアデノウイルス初期領域の一部または全部の欠失を有することができる。

40

【0117】

一実施形態において、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは複製欠損であり、増殖（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）のために、せいぜい、アデノウイルスゲノムのE1領域またはE4領域の相補性を必要とするだけである。よって、複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターは、増殖（例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する）のために、アデノウイルスゲノムのE1Aサブ領域および／またはE1B領域（E1-欠損アデノウイルスベクターと表記）またはアデノウ

50

ルスゲノムの E 4 領域 (E 4 - 欠損アデノウイルスベクターと表記) の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能の相補性を必要とする。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの E 1 領域の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能 (望ましくはすべての複製必須遺伝子機能) およびアデノウイルスゲノムの非必須 E 3 領域の少なくとも 1 つの遺伝子機能を欠損することができる (E 1 / E 3 - 欠損アデノウイルスベクターと表記)。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの E 4 領域の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能 (望ましくはすべての複製必須遺伝子機能) およびアデノウイルスゲノムの非必須 E 3 領域の少なくとも 1 つの遺伝子機能を欠損することができる (E 3 / E 4 - 欠損アデノウイルスベクターと表記)。

【0118】

1 つの実施形態において、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは複製欠損であり、増殖 (例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する) のために、せいぜい、アデノウイルスゲノムの E 2 領域、好ましくは E 2 A サブ領域の相補性を必要とするだけである。よって、複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターは、増殖 (例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する) のために、アデノウイルスゲノムの E 2 A サブ領域の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能 (E 2 A - 欠損アデノウイルスベクターと表記) の相補性を必要とする。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの E 2 A 領域の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能 (望ましくはすべての複製必須遺伝子機能) およびアデノウイルスゲノムの非必須 E 3 領域の少なくとも 1 つの遺伝子機能を欠損することができる (E 2 A / E 3 - 欠損アデノウイルスベクターと表記)。

【0119】

一実施形態において、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、複製欠損であり、増殖 (例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する) のために、せいぜい、アデノウイルスゲノムの E 1 領域および E 4 領域の相補性を必要とするだけである。よって、複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターは、増殖 (例えば、アデノウイルスベクター粒子を形成する) のために、アデノウイルスゲノムの E 1 領域および E 4 領域の両方の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能の相補性を必要とする (E 1 / E 4 - 欠損アデノウイルスベクターと表記)。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの E 1 領域の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能 (望ましくはすべての複製必須遺伝子機能)、アデノウイルスゲノムの E 4 領域の少なくとも 1 つの複製必須遺伝子機能、およびアデノウイルスゲノムの非必須 E 3 領域の少なくとも 1 つの遺伝子機能を欠損することができる (E 1 / E 3 / E 4 - 欠損アデノウイルスベクターと表記)。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、好ましくは、増殖のために、せいぜい、アデノウイルスゲノムの E 1 領域の相補性を必要とするだけであり、増殖のためにアデノウイルスゲノムの任意の他の欠損の相補性を必要としない。より好ましくは、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、せいぜい、増殖のためにアデノウイルスゲノムの E 1 領域および E 4 領域の相補性を必要とするだけであり、増殖のためにアデノウイルスゲノムの任意の他の欠損の相補性を必要としない。

【0120】

アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの複数の複製必須遺伝子機能が欠損している (例えば、E 1 / E 4 - 欠損アデノウイルスベクター) 場合、単一の複製必須遺伝子機能において欠損したアデノウイルスまたはアデノウイルスベクター (例えば、E 1 - 欠損アデノウイルスベクター) によって得られるものと同様の相補性細胞株におけるウイルス増殖を提供するためのスペーサー配列を含むことができる。スペーサー配列は、少なくとも約 15 塩基対の配列 (例えば、約 15 ヌクレオチドと約 12, 000 ヌクレオチドとの間)、好ましくは約 100 ヌクレオチドから約 10, 000 ヌクレオチド、より好ましくは約 500 ヌクレオチドから約 8, 000 ヌクレオチド、さらに好ましくは約 1, 500 ヌクレオチドから約 6, 000 ヌクレオチド、最も好ましくは約 2, 000 ヌクレオチドから約 3, 000 ヌクレオチド、または前述の値の任意の 2

10

20

30

40

50

つによって定められる範囲、のような所望の長さである、任意のヌクレオチド配列、または配列を含むことができる。スペーサー配列は、アデノウイルスゲノムに関して、コードまたは非コード、およびネイティブまたは非ネイティブであることができるが、欠損領域に対して複製必須機能を回復させない。スペーサーはまた、発現カセットを含むことができる。より好ましくは、スペーサーは、ポリアデニル化配列および／またはアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターに関して非ネイティブである遺伝子を含む。アデノウイルスベクターにおけるスペーサーの使用は、例えば、米国特許第5,851,806号および国際特許出願公開WO1997/021826においてさらに詳しく記載されている。

【0121】

アデノウイルスゲノムの全部または一部、例えば、アデノウイルスゲノムのE1領域、E3領域、およびE4領域を除去することにより、得られたアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、アデノウイルスカプシドにパッケージされる能力を保持したまま、外因性核酸配列の挿入を受け入れることができるようになる。外因性核酸配列は、その位置への挿入がアデノウイルスまたはアデノウイルスベクター粒子の形成を可能にする限り、アデノウイルスゲノム中の任意の位置に挿入されることができる。外因性核酸配列は、好ましくは、アデノウイルスゲノムのE1領域、E3領域、またはE4領域に配置される。

【0122】

本開示の複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターは、高力価のウイルスベクターストックを生成するために、複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターには存在しないがウイルス増殖に必要な遺伝子機能を適切なレベルで提供する相補性細胞株で産生することができる。このような相補性細胞株は公知であり、293細胞（例えば、Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59-72 (1977)に記載）、PER.C6細胞（例えば、国際特許出願公開WO1997/000326、ならびに米国特許第5,994,128号および第6,033,908号に記載）、および293-ORF6細胞（例えば、国際特許出願公開WO95/34671、およびBrough et al., J. Virol., 71:9206-9213 (1997)に記載）が含まれるが、これらに限定されない。本開示の複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターを産生するための他の適切な相補性細胞株は、発現が宿主細胞におけるウイルス増殖を抑制する導入遺伝子をコードするアデノウイルスベクターを増殖させるために生成された相補性細胞（例えば、米国特許出願公開第2008/0233650号を参照のこと）を含む。追加の適切な相補性細胞は、例えば、米国特許第6,677,156号および第6,682,929号、ならびに国際特許出願公開WO2003/020879に記載されている。いくつかの実施例において、細胞ゲノムは、複製欠損アデノウイルスベクターの欠損のすべてを相補する遺伝子産物の核酸配列を含む必要がない。複製欠損アデノウイルスベクターに欠けている1つ以上の複製必須遺伝子機能は、ヘルパーウイルス、例えば、複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターの複製に必要な1つ以上の必須遺伝子機能をトランスで供給するアデノウイルスベクター、によって供給されることができる。代替として、本発明のアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、本発明の複製欠損アデノウイルスまたは複製欠損アデノウイルスベクターに欠けている1つ以上の複製必須遺伝子機能を相補する非ネイティブ複製必須遺伝子を含むことができる。例えば、E1/E4-欠損アデノウイルスベクターは、異なるアデノウイルス（例えば、本発明のアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターとは異なる血清型のアデノウイルス、または本発明のアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターとは異なる種のアデノウイルス）から取得されたかまたは由来するE4 ORF6をコードする核酸配列を含むように操作することができる。

【0123】

アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、導入遺伝子をさらに含むことができる。この「導入遺伝子」という用語は、本明細書において、非ネイティブ核酸配列がタン

10

20

30

40

50

パク質（例えば、ペプチドまたはポリペプチド）を産生するために発現できるように、適切な調節エレメント（例えば、プロモーター）に作動可能に連結されている非ネイティブ核酸配列として定義される。調節エレメント（例えば、プロモーター）は、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターに対してネイティブまたは非ネイティブであることができる。

【0124】

「非ネイティブ」核酸配列は、任意の核酸配列（例えば、DNA、RNA、またはcDNA配列）であって、天然に存在する位置の天然のアデノウイルスの核酸配列でない。よって、非ネイティブ核酸配列は、アデノウイルスに天然に存在することができるが、アデノウイルスゲノム内の非ネイティブ場に位置し、および／または非ネイティブプロモーターに作動可能に連結されることができる。「非ネイティブ核酸配列」、「異種核酸配列」、および「外因性核酸配列」という用語は、本開示の文脈では同義であり、かつ同じ意味で使用されることができる。非ネイティブ核酸配列は、好ましくはDNAであり、かつ好ましくはタンパク質をコードする（すなわち、1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列）。

【0125】

非ネイティブ核酸配列は、疾患に対して哺乳類を予防的または治療的に処置するために使用することができる治療タンパク質をコードすることができる。適切な治療タンパク質の例としては、サイトカイン、毒素、腫瘍抑制タンパク質、成長因子、ホルモン、受容体、ミトジェン、免疫グロブリン、神経ペプチド、神経伝達物質、および酵素が含まれる。代替として、非ネイティブ核酸配列は病原体（例えば、細菌またはウイルス）の抗原をコードすることができ、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、ワクチンとして使用することができる。

【0126】

ウイルスベース送達システム

本開示はまた、本明細書に記載の核酸が挿入される、ウイルスベースのシステムなどの送達システムも提供する。代表的なウイルス発現ベクターには、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベース・ベクター、レンチウイルスベース・ベクター、レトロウイルスベクター、およびヘルペスウイルス塩基・ベクターが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期的で安定的な取り込み、および娘細胞におけるその増殖を可能にするので、長期的な遺伝子導入を達成するのに適切なツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞を形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルスに由来するベクターよりも追加の利点を有する。これらはまた、低免疫原性という追加の利点も有する。追加の実施形態において、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターである。さらなる実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。一般に、および実施形態において、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、簡便な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つ以上の選択可能マーカーを含む。

【0127】

追加の適切なベクターは、宿主細胞のDNAにランダムに組み込むことができるか、または発現ベクターと宿主細胞の染色体との間の特定の組換えを可能にする組換え部位を含むことができる、統合発現ベクターを含む。このような統合発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を利用して、所望のタンパク質の発現を効果的に行うことができる。部位特異的な方法で統合するベクターの例としては、例えば、Invitrogen (Carlsbad, Calif.) からのflp-inシステムのコンポーネント（例えば、pcDNA TM5 / FRT）、またはStratagene (La Jolla, Calif.) からのpExchange-6 Core Vectorsに見られるようなcre-loxシステムが含まれる。宿主細胞の染色体にランダムに統合するべ

クターの例としては、例えば、Invitrogen (Carlsbad, Calif.) からの pCDNA3.1 (T 抗原の不在下で導入した場合)、および Promega (Madison, Wis.) からの pCI または pFN10A (ACT) FLEXITM が含まれる。追加のプロモーターエレメント、例えば、エンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。通常、これらは、開始部位の上流の領域 30~110 塩基対 (bp) に位置するが、多くのプロモーターが開始部位の下流にも同様に機能的エレメントを含むことが、最近、示されている。プロモーターエレメント間の間隔はしばしば柔軟性があり、その結果、エレメントが互いに対して反転または移動するときに、プロモーター機能が保存される。チミジンキナーゼ (tk) プロモーターでは、活性が低下し始める前に、プロモーターエレメント間の間隔を 50 bp 離れるまで増加させることができる。プロモーターに 10
応じて、個々のエレメントは、協調的または独立してのいずれかで機能して、転写を活性化することができるように見える。

【0128】

適切なプロモーターの一例は、前初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに作動可能に連結した任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することが可能な強力な構成的プロモーター配列である。

【0129】

しかしながら、限定されないが、シミアンウイルス 40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 長末端反復 (LTR) プロモーター、MoMuLV プロモーター、トリ白血球ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターを含む、他の構成的プロモーター配列も使用することができる。さらに、本開示は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターもまた、本開示の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、そのような発現が所望される場合に、作動可能に連結されるポリヌクレオチド配列の発現をオンにすることができるか、または発現が所望されない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例としては、限定されないが、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーターが含まれる。 20
30

【0130】

遺伝子を細胞内に導入し発現させる方法は、当該技術分野で公知である。発現ベクターの文脈において、ベクターは、当該技術分野における任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母、または昆虫細胞内に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的手段によって宿主細胞内に導入することができる。

【0131】

ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための物理的方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝突、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが含まれる。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)) を参照されたい。実施形態において、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションまたはポリエチレンジアミン (PEI) トランスフェクションである。 40

【0132】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための生物学的方法には、DNA および RNA ベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、および特にレトロウイルスベク 50

ターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞内に遺伝子を挿入するために最も広範に使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスⅠ型、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。非ウイルスベース送達システム

【0133】

ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための化学的手段には、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、ならびに水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む、脂質ベースの系が含まれる。生体外および生体内で送達ビークルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【0134】

脂質製剤の使用は、（生体外または生体内で）宿主細胞への核酸の導入のために企図される。別の態様において、核酸は、脂質と会合することができる。脂質と会合する核酸は、リポソームの水性内部にカプセル化され得るか、リポソームの脂質二重層内に散在され得るか、リポソームおよびオリゴヌクレオチドの両方と会合する連結分子を介してリポソームに付着され得るか、リポソーム内に捕捉され得るか、リポソームと複合体化され得るか、脂質を含む溶液中に分散され得るか、脂質と混合され得るか、脂質と結合され得るか、脂質中に懸濁液として含まれ得るか、ミセルに含まれ得るか、もしくはミセルと複合体化され得るか、またはそれら以外の場合、脂質と会合され得る。脂質、脂質／DNAまたは脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液中の任意の特定の構造に限定されない。例えば、それらは二層構造で、ミセルとして、または「崩壊した」構造で存在することができる。それらはまた、単に溶液中に散在していることもでき、場合によっては、サイズまたは形状が均一ではない凝集体を形成していることもできる。脂質は、天然の脂質または合成脂質であり得る脂肪性物質である。例えば、脂質には、細胞質内に天然の脂肪小滴、ならびに、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素およびその誘導体を含む化合物のクラスが含まれる。

【0135】

使用に適切な脂質は、商業的な供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, Mo. から得ることができ、リン酸ジセチル（「DCP」）は、K & K Laboratories (Plainview, N. Y.) から得ることができ、コレステロール（「Choi」）はCalbiochem-Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) から得ることができる。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中の脂質のストック溶液は、約-20℃で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりも蒸発しやすいので、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成される様々な単層および多層脂質ビークルを包含する一般名称である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内側水性媒体を有する小胞構造を有することを特徴とすることができる。多層リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質を過剰の水溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は、閉鎖構造の形成前に自己再編成を行い、脂質二重層間に水および溶解した溶質を捕捉する（Ghosh et al., Glycobiology 5:505-10 (1991)）。しかしながら、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物もまた、包含される。例えば、脂質はミセル構造とみなすことができるか、あるいは単に脂質分子の不均一な凝集体として存在することもできる。リポフェクタミン-核酸複合体も企図される。

【0136】

いくつかの実施例において、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、例え

10

20

30

40

50

ば、脊椎動物の染色体にDNA配列を導入するための合成DNAトランスポゾンシステムを指す「スリーピングビューティー（SB）トランスポゾンシステム」などの、非ウイルス塩基送達システムを使用して細胞に導入することができる。このシステムのいくつかの例示的な実施形態は、例えば、米国特許第6,489,458号および第8,227,432号に記載されている。スリーピングビューティートランスポゾンシステムは、スリーピングビューティー（SB）トランスポザーゼおよびSBトランスポゾンから構成される。実施形態において、スリーピングビューティートランスポゾンシステムは、SB11トランスポゾンシステム、SB100Xトランスポゾンシステム、またはSB110トランスポゾンシステムを含むことができる。

【0137】

DNAトランスポゾンは、単純な切り貼り方式で、あるDNA部位から別のDNA部位に転座する。転移は、定義されたDNAセグメントが1つのDNA分子から切り取られ、同じまたは異なるDNA分子またはゲノムの別の部位に移される精密なプロセスである。他のTc1／マリナー型トランスポザーゼと同様に、SBトランスポザーゼはトランスポゾンをレシピエントDNA配列のTAジヌクレオチド塩基対に挿入する。挿入部位は、同じDNA分子内の他の場所、または、別のDNA分子（または染色体）内でもよい。ヒトを含む哺乳類ゲノムには、約2億のTA部位が存在する。TA挿入部位は、トランスポゾンが統合される過程で複製される。このTA配列の複製は転移の顕著な特徴であり、一部の試験ではその機構を確認するために用いられている。トランスポザーゼは、トランスポゾン内にコードされているか、または別の供給源、例えばDNAまたはmRNA供給源によって供給される可能性があり、その場合、トランスポゾンは非自律的型エレメントとなる。非自律型トランスポゾンは、挿入後、独立して切除と再挿入を続けることができないため、遺伝子ツールとして最も有用である。SBトランスポゾンは、脊椎動物のゲノムに遺伝子を導入するための非ウイルスベクターとして、および遺伝子治療のために使用されることが想定されている。

【0138】

宿主細胞内に外因性核酸を導入するために使用される方法に関わらず、またはそうでなければ本開示の抑制因子に細胞を曝露するために使用される方法に関わらず、宿主細胞内の組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを実施することができる。このようなアッセイには、例えば、サザンおよびノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRなどの当業者に周知の分子アッセイ、特定のペプチドの存在または不在を検出するなどの「生化学」アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）または本開示の範囲に属する薬剤を特定するための本明細書に記載のアッセイによるアッセイが含まれる。

【0139】

実施形態において、本明細書に記載の修飾エフェクター細胞および他の遺伝子エレメントは、SB11トランスポゾンシステム、SB100Xトランスポゾンシステム、SB110トランスポゾンシステム、piggyBacトランスポゾンシステム（Wilson et al., "PiggyBac Transposon-mediated Gene Transfer in Human Cells," *Molecular Therapy* 15:139-145 (2007)を参照のこと、そしてその全体が参照により本明細書に援用される）、および／またはpiggyBacトランスポゾンシステム（Mitra et al., "Functional characterization of piggyBac from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:234-239 (2013)参照のこと）を用いて細胞に送達される。追加のトランスポザーゼおよびトランスポゾンシステムは、米国特許第6,489,458号、6,613,752号、7,148,203号、7,985,739号、8,227,432号、9,228,180号、米国特許公開第2011/0117072号、Mates et al., *Nat Ge*

10

20

30

40

50

net. 41 (6) : 753-61 (2009). doi: 10.1038/ng.343. 電子出版 2009 May 3, Gene Ther., 18 (9) : 849-56 (2011). doi: 10.1038/gt.2011.40. 電子出版 2011 May 31、および Ivics et al., Cell, 91 (4) : 501-10 (1997) に記載されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0140】

追加の適切な非ウイルスシステムは、宿主細胞の DNA にランダムに統合することができるか、または発現ベクターと宿主細胞の染色体との間の特定の組換えを可能にするための組換え部位を含むことができる統合発現ベクターを含むことができる。予め定義された遺伝子座への導入遺伝子の標的統合は、多くの用途において望ましい目標である。最初に、部位特異的リコンビナーゼのための第1の組換え部位を、ゲノム部位に、ランダムにまたは所定の位置に挿入する。その後、目的の遺伝子または目的の DNA と第2の組換え部位を有するプラスミド、およびリコンビナーゼの供給源（発現プラスミド、RNA、タンパク質、またはウイルス発現リコンビナーゼ）で細胞に導入する。第1組換え部位と第2組換え部位との間の組換えにより、プラスミド DNA の統合がもたらされる。

【0141】

このような統合発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を利用して、所望のタンパク質の発現を効果的に行うことができる。いくつかの実施形態において、標的統合は、統合部位をフランキングする配列と相同であるドナーポリヌクレオチド上の配列の存在によって促進される。例えば、本明細書に記載のドナーポリヌクレオチドを用いた標的統合は、従来型のトランスフェクション技術、例えば、相同組換えによる遺伝子ノックアウトまたは遺伝子ノックインを作成するために用いられる技術に従って達成することができる。他の実施形態において、標的統合は、統合部位をフランキングする配列と相同であるドナーポリヌクレオチド上の配列の存在、および部位特異的リコンビナーゼの存在下における細胞とドナーポリヌクレオチドとの接触の両方によって促進される。部位特異的リコンビナーゼ、または単にリコンビナーゼとは、その適合する組換え部位間の保存型部位特異的組換えを触媒するポリペプチドを意味する。本明細書で使用される場合、部位特異的リコンビナーゼは、ネイティブポリペプチドだけでなく、活性を保持する誘導体、変異体および／または断片、ならびに活性を保持するリコンビナーゼをコードするネイティブポリヌクレオチド、誘導体、変異体および／または断片を含む。

【0142】

また、本明細書において、宿主細胞に異種遺伝子を組み込むためのシステムであって、1つ以上の遺伝子発現カセットを含むシステムを提供する。いくつかの実施例において、システムは、第1のポリペプチド構築物をコードする第1のポリヌクレオチドを含む第1の遺伝子発現カセットを含む。他の実施例では、システムは、第2のポリペプチド構築物をコードする第2のポリヌクレオチドを含む第2の遺伝子発現カセットを含むことができる。さらに他の実施例では、システムは、第3の遺伝子発現カセットを含むことができる。一実施形態において、遺伝子発現カセットの1つは、(i) トランス活性化ドメイン、(ii) 核内受容体リガンド結合ドメイン、(iii) DNA 結合ドメイン、および (iv) エクダイソン受容体結合ドメイン、のうちの1つ以上をコードする遺伝子スイッチポリヌクレオチドを含むことができる。別の実施形態において、システムは、組換え付着部位、およびセリンリコンビナーゼをさらに含み、前記セリンセリンリコンビナーゼの存在下で、少なくとも前記第1の遺伝子発現カセットと前記宿主細胞を接触させると、前記異種遺伝子が前記宿主細胞内に組み込まれるようになる。

【0143】

いくつかの実施例において、システムはさらにリガンドを含み、前記リガンドの存在下で、前記宿主細胞と接触すると、前記異種遺伝子が前記宿主細胞で発現されるようになる。一実施例では、システムは、組換え付着部位をも含む。いくつかの実施例において、1つの組換え付着部位は、ファージゲノム組換え付着部位 (attP) または細菌ゲノム組

換え付着部位 (a t t B) である。一実施例では、宿主細胞は真核生物細胞である。別の実施例では、宿主細胞はヒト細胞である。さらなる実施例では、宿主細胞は T 細胞または NK 細胞である。

【0144】

プロモーター

「プロモーター」とは、コーディング配列の転写を開始するポリヌクレオチドの領域を指す。プロモーターは、遺伝子の転写開始部位の近くに、同じ鎖上で、DNA の上流（センス鎖の 5' 領域に向かって）に位置する。プロモーターには、細胞内のあらゆる環境で活性化する構造的なものと、例えば誘導性プロモーターのように、特定の刺激に応答して活性化する制御的なものがある。また、組織特異的なプロモーター、または活性化されたプロモーターもあり、T 細胞特異的なプロモーターも含まれるが、これらに限定されない。

10

【0145】

本明細書で使用される「プロモーター活性」という用語およびその文法的同等物は、活性が測定されるプロモーターに作動可能に連結されたヌクレオチド配列の発現の程度を意味する。プロモーター活性は、例えばノーザンブロット分析によって、生成された RNA 転写物の量を決定することによって直接測定することができるか、またはプロモーターに連結されたレポーター核酸配列などの連結核酸配列によってコードされた生成物の量を決定することによって間接的に測定することができる。

【0146】

本明細書で使用される「誘導性プロモーター」は、転写調節因子、例えば生物的または非生物的因子の、存在または不在によって活性に誘導されるプロモーターを指す。誘導性プロモーターは、それらに作動可能に連結された遺伝子の発現を、生物の発達の特定の段階または特定の組織においてオンまたはオフにすることができるので、有用である。誘導性プロモーターの例は、アルコール制御プロモーター、テトラサイクリン制御プロモーター、ステロイド制御プロモーター、金属制御プロモーター、病原体制御プロモーター、温度制御プロモーターおよび光制御プロモーターである。一実施形態において、誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチの一部である。誘導性プロモーターは、遺伝子スイッチリガンド誘導性プロモーターであることができる。いくつかの場合において、誘導性プロモーターは、R H E O S W I T C H（登録商標）遺伝子スイッチなどの、低分子リガンド誘導性 2 ポリペプチドエクダイソン受容体ベースの遺伝子スイッチであることができる。いくつかの場合において、遺伝子スイッチは、限定はしないが、以下に記載されるシステムのいずれかに記載されるようなエクダイソン受容体ベースの構成エレメントから選択することができる。それらは、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 1 / 0 0 9 0 5 0 号 (W O 2 0 0 1 / 0 7 0 8 1 6)、米国特許第 7, 0 9 1, 0 3 8 号、第 7, 7 7 6, 5 8 7 号、第 7, 8 0 7, 4 1 7 号、第 8, 2 0 2, 7 1 8 号、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 1 / 0 3 0 6 0 8 号 (W O 2 0 0 2 / 0 2 9 0 7 5)、米国特許第 8, 1 0 5, 8 2 5 号、第 8, 1 6 8, 4 2 6 号、国際出願第 P C T / 1 J 5 2 0 0 2 / 0 0 5 2 3 5 号 (W O 2 0 0 2 / 0 6 6 6 1 3)、米国出願第 1 0 / 4 6 8, 2 0 0 号 (米国公開第 2 0 1 2 0 1 6 7 2 3 9 号)、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 2 / 0 0 5 7 0 6 号 (W O 2 0 0 2 / 0 6 6 6 1 4)、米国特許第 7, 5 3 1, 3 2 6 号、第 8, 2 3 6, 5 5 6 号、第 8, 5 9 8, 4 0 9 号、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 2 / 0 0 5 0 9 0 号 (W O 2 0 0 2 / 0 6 6 6 1 2)、米国特許第 8, 7 1 5, 9 5 9 号 (米国公開第 2 0 0 6 0 1 0 0 4 1 6 号)、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 2 / 0 0 5 2 3 4 号 (W O 2 0 0 3 / 0 2 7 2 6 6)、米国特許第 7, 6 0 1, 5 0 8 号、第 7, 8 2 9, 6 7 6 号、第 7, 9 1 9, 2 6 9 号、第 8, 0 3 0, 0 6 7 号、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 2 / 0 0 5 7 0 8 号 (W O 2 0 0 2 / 0 6 6 6 1 5)、米国出願第 1 0 / 4 6 8, 1 9 2 号 (米国公開第 2 0 1 1 0 2 1 2 5 2 8 号)、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 2 / 0 0 5 0 2 6 号 (W O 2 0 0 3 / 0 2 7 2 8 9)、米国特許第 7, 5 6 3, 8 7 9 号、第 8, 0 2 1, 8 7 8 号、第 8, 4 9 7, 0 9 3 号、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 5 / 0 1 5 0 8 9 号 (W O 2 0 0 5 / 1 0 8 6 1 7

20

30

40

50

）、米国特許第7,935,510号、第8,076,454号、国際出願第PCT/U52008/011270号(WO2009/045370)、米国出願第12/241,018号(米国特許公開第20090136465号)、国際出願第PCT/US2008/011563号(WO2009/048560)、米国出願第12/247,738号(米国公開第20090123441号)、国際出願第PCT/US2009/005510号(WO2010/042189号)、米国出願第13/123,129号(米国公開第20110268766号)、国際出願第PCT/US2011/029682号(WO2011/119773)、米国出願第13/636,473号(米国公開第20130195800号)、国際出願第PCT/US2012/027515号(WO2012/122025)、および、米国特許第9,402,919号であり、それぞれその全体が参照により援用される。

10

【0147】

本明細書で提供される方法は、少なくとも2つの機能性タンパク質またはその一部を含む本明細書に記載のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド、少なくとも1つのプロモーター、および少なくとも1つの操作された組換え部位を含む少なくとも1つの非ウイルスベクターを対象に投与することを含む方法であって、前記少なくとも1つのプロモーターは前記少なくとも2つの機能性タンパク質の発現を駆動する、方法である。いくつかの場合において、少なくとも1つのプロモーターは、構成的であることができる。場合によっては、少なくとも1つのプロモーターは、組織特異的であることができる。場合によっては、少なくとも1つのプロモーターは誘導性であることができる。いくつかの場合において、誘導性プロモーターは、低分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクダイソン受容体ベースの遺伝子スイッチである。他の場合では、少なくとも1つのプロモーターが誘導可能であって少なくとも1つのプロモーターが活性化特異的であり得るプロモーターの組み合わせを、利用することができる。

20

【0148】

誘導性プロモーターは、前記少なくとも2つの遺伝子の発現を用量調節制御するために、リガンドを利用する。いくつかの場合において、リガンドは、エクジステロイド、9-シス-レチノイン酸、レチノイン酸の合成アナログ、N,N'-ジアシルヒドラジン、オキサジアゾリン、ジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン、N-アルキル-N,N'-ジアロイルヒドラジン、N-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジン、N-アロイル-N-アルキル-N'-アロイルヒドラジン、アルニドケトン、3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-N-イソブチル-ベンズアミド、8-O-アセチルハルパギド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-硫酸(ECHS)、7-ケトコレステロール-3-硫酸、フレームソール(framesol)、胆汁酸、1,1-ビスホスホン酸エステル、幼若ホルモンIII、RG-115819(3,5-ジメチル-安息香酸N-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-N'-(2-メチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、RG-115932((R)-3,5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、およびRG-115830(3,5-ジメチル-安息香酸N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル)-ヒドラジド)、およびそれらの任意の組み合わせ、からなる群から選択することができる。

30

40

【0149】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、誘導性プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、非誘導性プロモーターである。いくつかの場合において、プロモーターは、組織特異的プロモーターであることができる。ここで「組織特異的」とは、組織または細胞型のサブセットにおける遺伝子の発現が調節されることを指す。いくつかの場合において、組織特異的プロモーターは、プロモーターが生物の特定の組織または細胞型においてのみ発現を促進するように、空間的に制御されること

50

の場合において、組織特異的プロモーターは、プロモーターが細胞型または組織における発現を、生物の発達の間など、経時的に異なる形で促進するように、時間的に制御されることができる。いくつかの場合において、組織特異的プロモーターは、空間的および時間的の両方において制御される。特定の実施形態において、組織特異的プロモーターは、特定の細胞型において、細胞型の特定の時期または段階において構成的にまたは断続的に活性化される。例えば、組織特異的プロモーターは、T細胞またはNK細胞などの特定の細胞が活性化されるときに活性化されるプロモーターであることができる。T細胞は、例えば、MHCクラスII分子によってペプチド抗原を提示されると、様々な方法で活性化されることができる。

【0150】

1つの場合において、少なくとも1つのプロモーターは、操作されたプロモーターまたはその変異体である。本明細書に記載されるように、プロモーターは、IL-2からの最小プロモーター配列および以下の1つ以上を組み込むことができる。それらは活性化T細胞核因子(NFAT)応答エレメント(複数可)、NFIL2D応答エレメント、NFkB/TCF応答エレメント、NFAT/NFIL2B応答エレメント、またはNFIL2A/OCT応答エレメントである。応答エレメントの例は、Mattila et al., EMBO J. 9(13):4425-33(1990)に記載されており、その全体が本明細書に援用される。

【0151】

本明細書に記載されたIL-12発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチの使用は、例えば、制御された発現を可能にし、治療指数を改善することによって、IL-12の安全性プロファイルを改善することができる。しかしながら、遺伝子スイッチ(複数可)を用いるIL-12のリガンド用量依存性発現の条件は、活性化因子リガンド(例えば、veledime x)の存在または非存在である。特定の実施形態において、IL-12発現の誘導のための追加の条件付き制御が企図される。T細胞活性化特異的プロモーターの制御下にある遺伝子スイッチコンポーネントが提供される。この結果、遺伝子スイッチの制御下にある導入遺伝子(複数可)のveledime x制御発現に必要な遺伝子スイッチコンポーネントの条件付き発現(例えば、T細胞活性化)がもたらされる。いくつかの実施形態において、この結果は、veledime xが存在し、かつT細胞が活性化される場合、腫瘍特異的T細胞によるIL-12またはIL-15のようなサイトカインの優先的な発現をもたらす。これは、遺伝子スイッチ制御の導入遺伝子発現の局所的なレベルの上昇につながる可能性がある。

【0152】

例えば、遺伝子スイッチコンポーネントのT細胞活性化特異的発現は、活性化T細胞核因子(NFAT)応答エレメント(複数可)を含むプロモーターによって制御することができる。NFAT転写因子は、エフェクターT細胞状態の重要な調節因子である。NFATは初期の転写チェックポイントであり、徐々に疲弊を引き起こす。NFATは、TCR刺激後にT細胞内で急速に活性化され、適切な共刺激シグナルによって誘導されたAP-1とタンパク質複合体を形成し、エフェクター遺伝子およびT細胞機能を制御する。NFAT応答エレメント(複数可)は、他の最小プロモーター配列(例えばIL2最小プロモーター)と融合させて、T細胞の活性化に応答して導入遺伝子の発現を促進することができる。

【0153】

活性化特異的プロモーターの他の例としては、インターロイキン-2(IL2)プロモーターおよびプログラム死(PD)-1(CD279)プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。遺伝子スイッチコンポーネントは、炎症性シグナル伝達経路のNFkBのような他の核因子の結合部位を最小のプロモーター配列(例えばIL2)に融合させることにより、免疫細胞の活性化時に条件付きで発現させることもできる。

【0154】

特定の実施形態において、プロモーターは、以下のいずれか1つ以上であることができ

る。それらは、IL-2 コアプロモーター、IL-2 最小プロモーター、IL-2 エンハンサーおよびプロモーター変異体、(NF-κB) 1-IL2 プロモーター変異体、(NF-κB) 3-IL2 プロモーター変異体、(NF-κB) 6-IL2 プロモーター変異体、1X NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体、3X NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体、6X NFAT 応答エレメント-IL2 プロモーター変異体、ヒトEEF1A1 プロモーター変異体、ヒトEEF1A1 プロモーターおよびエンハンサー、ヒトUBC プロモーターおよび合成最小プロモーター1である。

【0155】

遺伝子スイッチ

本明細書に提供されるものは、遺伝子スイッチポリペプチド、リガンド誘導性遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを組み込む方法およびシステムである。特定の態様において、本開示は、異種遺伝子発現の誘導可能な制御のための遺伝子スイッチシステムをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、異種遺伝子発現が前記遺伝子スイッチシステムによって制御され、および、前記異種遺伝子が、本開示の1つ以上の免疫応答誘導性ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) ポリペプチドを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドに向けられる。

【0156】

「遺伝子スイッチ」という用語は、プロモーターに会合した応答エレメントと、例えば、1つ以上のリガンドの存在下で、応答エレメントとプロモーターが組み込まれた遺伝子の発現を調節するEcRベースのシステムとの組み合わせを指す。厳密に制御された誘導性遺伝子発現システムまたは遺伝子スイッチは、遺伝子治療、細胞内でのタンパク質の大量生産、細胞ベースのハイスループットスクリーニングアッセイ、機能ゲノミクス、遺伝子組み換え植物および動物における形質の制御などの様々な用途に有用である。このような誘導性遺伝子発現システムは、リガンド誘導性異種遺伝子発現システムを含むことができる。

【0157】

EcRベースの遺伝子スイッチの初期バージョンでは、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) EcR (DmEcR) およびハツカネズミ (*Mus musculus*) RXR (MmRXR) ポリペプチドを用いて、ステロイドであるポナステロンA存在下でこれらの受容体が哺乳類細胞株および遺伝子組み換えマウスにおいてレポーター遺伝子をトランス活性化することを示した (Christopher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (14): 6314-18 (1992)、No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (8): 3346-51 (1996))。その後、Suhr et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (14): 7999-8004 (1998)) は、非ステロイド性エクダイソンアゴニストであるテブフェノジドが、外因性のヘテロダイマーパートナーの不在下でカイコ (カイコガ) (*Bombyx mori*) EcR (BmEcR) を通じて哺乳類細胞のレポーター遺伝子の高レベルなトランス活性化を誘導したことを示した。

【0158】

国際特許出願第PCT/US97/05330号 (WO97/38117) および第PCT/US99/08381号 (WO99/58155) は、外因性遺伝子およびエクダイソン応答エレメントを含むDNA構築物が、そのリガンドの存在下、および任意にサイレントパートナーとして作用可能な受容体の存在下で、エクダイソン応答エレメントに結合して遺伝子発現を誘導するエクダイソン受容体を含む第2のDNA構築物によって活性化されている外因性遺伝子の発現を調節する方法を開示している。この例では、エクダイソン受容体はキイロショウジョウバエから単離された。通常、このようなシステムでは、最適な活性化を行うために、サイレントパートナー、好ましくはレチノイドX受容体 (RXR) の存在を必要とする。哺乳類細胞では、昆虫エクダイソン受容体 (EcR) は哺乳

10

20

30

40

50

類レチノイドX受容体(RXR)とヘテロ二量化することができ、それにより、リガンド依存的方法で標的遺伝子または異種遺伝子の発現を調節するために使用される。国際特許出願第PCT/US98/14215号(WO99/02683)は、カイコ(カイコガ)から単離されたエクダイソン受容体が、外因性の二量体パートナーを必要とせずに哺乳類のシステムで機能することを開示している。

【0159】

米国特許第6,265,173号は、受容体のステロイド/甲状腺スーパーファミリーの多様なメンバーが、遺伝子発現システムで使用するために、キイロショウジョウバエのウルトラスピラクル受容体(USP)またはUSPの少なくとも二量化ドメインを含むその断片と結合できることを開示している。米国特許第5,880,333号は、トランス活性化ドメインおよびDNA結合ドメインが2つの異なるハイブリッドタンパク質上に配置されている、植物で使用されるキイロショウジョウバエEcRおよびウルトラスピラクル(USP)ヘテロ二量体システムを開示している。これらの場合の各々において、トランス活性化ドメインおよびDNA結合ドメイン(国際特許出願第PCT/US98/14215号のようなネイティブEcRとして、または国際特許出願第PCT/US97/05330号のような修飾EcRとして)を1つの分子に組み込み、他のヘテロ二量体パートナー、USPまたはRXRをネイティブの状態で使用した。

【0160】

国際特許出願第PCT/US01/0905号は、トランス活性化ドメインとDNA結合ドメインを2つの異なるタンパク質上に配置することによって互いに分離させたエクダイソン受容体ベースの誘導性遺伝子発現システムが、リガンドの不在下では大幅に減少したバックグラウンド活性をもたらし、リガンドの存在下ではバックグラウンドよりも著しく増加した活性をもたらすことを開示している。このツーハイブリッドシステムは、国際出願第PCT/US97/05330号およびPCT/US98/14215号に開示された2つのシステムと比較して、著しく改善された誘導性遺伝子発現調節システムである。ツーハイブリッドシステムは、DNA結合ドメインが遺伝子上のDNA結合部位に結合すると、トランス活性化ドメインがより効果的にプロモーターを活性化するように、トランス活性化ドメインをDNA結合ドメインに対してより好ましい位置に持っていく一対の相互作用タンパク質の能力を利用していると考えられている(例えば、米国特許第5,283,173号参照のこと)。ツーハイブリッド遺伝子発現システムは、2つの遺伝子発現カセットを含み、第1は核内受容体ポリペプチドに融合したDNA結合ドメインをコードし、第2は異なる核内受容体ポリペプチドに融合したトランス活性化ドメインをコードする。リガンドの存在下では、構造変化が起こり、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドの相互作用が促進され、それによりDNA結合ドメインとトランス活性化ドメインの二量化がもたらされると考えられている。DNA結合ドメインおよびトランス活性化ドメインは2つの異なる分子上に存在するため、リガンド非存在下でのバックグラウンド活性は大幅に減少する。

【0161】

いくつかの場合において、誘導性プロモーターは、Intrexon社のRHEOSWITCH(登録商標)遺伝子スイッチなどの、低分子リガンド誘導性2ポリペプチドエクダイソン受容体ベースの遺伝子スイッチであることができる。いくつかの場合において、遺伝子スイッチは、限定はしないが、以下に記載されるシステムのいずれかに記載されるようなエクダイソン受容体ベースの構成エレメントから選択することができる。それらは国際出願第PCT/US2001/009050号(WO2001/070816)、米国特許第7,091,038号、第7,776,587号、第7,807,417号、第8,202,718号、国際出願第PCT/US2001/030608号(WO2002/029075)、米国特許第8,105,825号、第8,168,426号、国際出願第PCT/1J52002/005235号(WO2002/066613)、米国出願第10/468,200号(米国公開第2012167239号)、国際出願第PCT/US2002/005706号(WO2002/066614)、米国特許第7,5

31, 326号、第8, 236, 556号、第8, 598, 409号、国際出願第PCT/U52002/005090号(WO2002/066612)、米国特許第8, 715, 959号(米国公開第20060100416号)、国際出願第PCT/US2002/005234号(WO2003/027266)、米国特許第7, 601, 508号、第7, 829, 676号、第7, 919, 269号、第8, 030, 067号、国際出願第PCT/U52002/005708号(WO2002/066615)、米国出願第10/468, 192号(米国公開第20110212528号)、国際出願第PCT/US2002/005026号(WO2003/027289)、米国特許第7, 563, 879号、第8, 021, 878号、第8, 497, 093号、国際出願第PCT/US2005/015089号(WO2005/108617)、米国特許第7, 935, 510号、第8, 076, 454号、国際出願第PCT/US2008/011270号(WO2009/045370)、米国出願第12/241, 018号(米国公開第20090136465号)、国際出願第PCT/US2008/011563号(WO2009/048560)、米国出願第12/247, 738号(米国公開第20090123441号)、国際出願第PCT/US2009/005510号(WO2010/042189号)、米国出願第13/123, 129号(米国公開第20110268766号)、国際出願第PCT/US2011/029682号(WO2011/119773)、米国出願第13/636, 473号(米国公開第20130195800号)、国際出願第PCT/US2012/027515号(WO2012/122025)および、米国特許第9, 402, 919号、であり、それぞれその全体が参照により援用される。

10

20

【0162】

提供されるシステムは、本明細書に開示される遺伝子スイッチポリペプチドを発現するポリヌクレオチドを含む、宿主細胞における異種遺伝子およびインターロイキンの発現を調節するためのシステムである。

【0163】

いくつかの実施形態は、宿主細胞における異種遺伝子およびサイトカインの発現を調節するためのシステムであって、第1のポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドを含む第1の遺伝子発現カセット、第2のポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む第2の遺伝子発現カセット、およびリガンドを含み、ここで前記第1および第2のポリペプチドは、(i) トランス活性化ドメイン、(ii) DNA結合ドメイン、および(iii) リガンド結合ドメイン、(iv) 前記異種遺伝子、ならびに(v) 前記リガンドの存在下で前記宿主細胞を前記第1遺伝子発現カセットおよび前記第2遺伝子発現カセットと接触させると、前記異種遺伝子および前記サイトカインが前記宿主細胞内で発現するような、前記サイトカイン、の1つ以上を含むシステムである。いくつかの場合において、異種遺伝子は、本明細書に記載の抗原結合ポリペプチドを含む。いくつかの場合において、サイトカインは、少なくとも1つのケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、またはそれらの変異体もしくは組み合わせを含む。いくつかの場合において、サイトカインは、インターロイキンである。いくつかの場合において、インターロイキンは、IL12、IL2、IL15、IL21、およびそれらの機能型変異体および断片のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態において、サイトカインは、膜結合型または分泌型であることができる。他の実施形態においては、サイトカインは、細胞内であることができる。インターロイキンは、膜結合型IL-15(mbIL-15)またはIL-15とIL-15R α の融合体を含むことができる。いくつかの実施形態において、mbIL-15は、本明細書に記載の修飾エフェクター細胞と共発現させることができる膜結合型キメラIL-15である。いくつかの実施形態において、mbIL-15は、全長IL-15R α またはその機能的断片もしくは変異体とフレーム内で融合した、全長IL-15(例えば、ネイティブIL-15ポリペプチド)またはその断片もしくは変異体を含む。いくつかの場合において、IL-15は、リンカーを通じてIL-15R α に間接的に連結される。いくつかの実施例において、mb

30

40

50

IL-15は、Hurton et al.,、「Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells (テザーIL-15は抗腫瘍活性を増強し、腫瘍特異的T細胞における幹細胞記憶サブセットを促進する)」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (48): E7788-E7797 (2016)に記載されている通りである。別の態様においては、インターロイキンは、IL-12を含むことができる。いくつかの実施形態において、IL-12は、単鎖IL-12 (scIL-12)、プロテアーゼ感受性型IL-12、不安定型IL-12、膜結合型IL-12、インターカレート型IL-12である。いくつかの実施例において、IL-12変異体は、WO2015/095249、WO2016/048903、WO2017/062953に記載されている通りであり、これらのすべては、参照によりその全体が援用される。

10

【0164】

本明細書に提供されるものは、遺伝子スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記遺伝子スイッチポリペプチドは、a) 核受容体リガンド結合ドメインに融合したDNA結合ドメインを含む第1の遺伝子スイッチポリペプチド、およびb) 核受容体リガンド結合ドメインに融合したトランス活性化ドメインを含む第2の遺伝子スイッチポリペプチド、を含み、ここで、第1の遺伝子スイッチポリペプチドと第2の遺伝子スイッチポリペプチドはリンカーにより接続されている、ポリヌクレオチドである。いくつかの場合において、リンカーは、本明細書に記載のリンカー、例えばGSGリンカー、

20

【0165】

いくつかの場合において、DNA結合ドメイン (DBD) は、本明細書に記載のDBD、例えばGAL4 (GAL4 DBD)、LexA DBD、転写因子DBD、ステロイド/甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバーDBD、細菌LacZ DBD、および酵母DBDの少なくとも1つを含む。トランス活性化ドメインは、本明細書に記載のトランス活性化ドメイン、例えばVP16トランス活性化ドメイン、p53トランス活性化ドメインおよびB42酸性活性化因子トランス活性化ドメインのうちの1つを含むことができる。核内受容体リガンド結合ドメインは、エクダイソン受容体 (EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用タンパク質15、肝臓X受容体β、ステロイドホルモン受容体様タンパク質、肝臓X受容体、肝臓X受容体α、ファルネソイドX受容体、受容体相互作用タンパク質14およびフレームソール受容体の少なくとも1つを含むことができる。

30

【0166】

いくつかの場合において、ポリペプチドリンカーまたはリボソームスキッピング配列によって接続された遺伝子スイッチポリペプチドは、遺伝子スイッチポリペプチドがIRESなどの非コード配列によって接続されているリガンド誘導性遺伝子スイッチと比較して、遺伝子発現における用量依存性のリガンド誘導性制御が改善したことを示す。いくつかの場合において、2Aリンカーによって接続された遺伝子スイッチポリペプチドは、前記遺伝子スイッチポリペプチドがIRESによって分離されている遺伝子スイッチと比較して、異種遺伝子発現における用量依存性のリガンド誘導性制御が改善したことを示すことができる。

40

【0167】

いくつかの実施形態において、遺伝子スイッチは、VP16トランス活性化ドメインを含む。一実施形態において、遺伝子スイッチは、エクダイソン受容体 (EcR)、ユビキタス受容体、オーファン受容体1、NER-1、ステロイドホルモン核内受容体1、レチノイドX受容体相互作用タンパク質15、肝臓X受容体β、ステロイドホルモン受容体様

50

タンパク質、肝臓 X 受容体、肝臓 X 受容体 α 、ファルネソイド X 受容体、受容体相互作用タンパク質 14、フレームソール受容体の少なくとも 1 つを含む。別の実施形態において、遺伝子スイッチの DNA 結合ドメイン (DBD) は、GAL4 (GAL4 DBD)、LexA DBD、転写因子 DBD、ステロイド／甲状腺ホルモン核内受容体スーパーファミリーメンバー DBD、細菌 LacZ DBD、および酵母 DBD の少なくとも 1 つを含む。さらに別の場合では、遺伝子スイッチは、ウルトラスピラクルタンパク質 (USP)、レチノイド受容体 X (RXR)、それらの機能的断片および変異体の少なくとも 1 つをさらに含み、前記機能的断片および変異体は EcR に結合することができる。

【0168】

本明細書に記載のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、操作された細胞で発現させることができる。本明細書において、操作された細胞は、その天然または内因性状態から修飾された細胞である。操作された細胞の例は、例えば、遺伝子スイッチポリペプチド、目的の遺伝子 (GOI)、細胞タグ、異種遺伝子、および本明細書に記載の任意の他のポリペプチドおよびポリヌクレオチドをコードするように (例えば、ポリヌクレオチドの細胞へのトランスフェクションによって) 修飾されている本明細書に記載の細胞である。

【0169】

リガンド

いくつかの実施形態において、誘導性遺伝子スイッチ制御に使用されるリガンドは、以下のいずれかから選択することができるが、これらに限定されない。それらは、N-[(1R)-1-(1,1-ジメチルエチル)ブチル]-N'-(2-エチル-3-メトキシベンゾイル)-3,5-ジメチルベンゾヒドラジド (ベレディメックスとも称する)、(2S,3R,5R,9R,10R,13R,14S,17R)-17-[(2S,3R)-3,6-ジヒドロキシ-6-メチルヘプタン-2-イル]-2,3,14-トリヒドロキシ-10,13-ジメチル-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-デカヒドロ-1H-シクロペンタ [a] フェナントレン-6-オン、N'-(3,5-ジメチルベンゾイル)-N'-(3R)-2,2-ジメチル-3-ヘキサニル]-2-エチル-3-メトキシベンゾヒドラジド、5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド、5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド、5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-ヒドラジド、5-メチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド、5-エチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド、5-エチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-N'-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-ヒドラジド、5-エチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3,5-ジメチル-ベンゾイル)-ヒドラジド、5-エチル-2,3-ジヒドロ-ベンゾ [1,4] ジオキシシン-6-カルボン酸 N'-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3,5-ジメトキシ-4-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド、3,5-ジメチル-安息香酸 N-(1-エチル-2,2-ジメチル-プロピル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド、3,5-ジメチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ブチル)-N'-(3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル)-ヒドラジド、3,5-ジメチル-安息香酸 N-(1-tert-ブチル-ブチル)-

N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド、3, 5-ジメチル-安息香酸N - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド、3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸N - (1-エチル-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド、3, 5-ジメチル-安息香酸N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド、3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド、2-メトキシ-ニコチン酸N - (1-tert-ブチル-ペンチル) - N' - (4-エチル-ベンゾイル) - ヒドラジド、3, 5-ジメチル-安息香酸N - (2, 2-ジメチル-1-フェニル-プロピル) - N' - (4-エチル-ベンゾイル) - ヒドラジド、3, 5-ジメチル-安息香酸N - (1-tert-ブチル-ペンチル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド、および3, 5-ジメトキシ-4-メチル-安息香酸N - (1-tert-ブチル-ペンチル) - N' - (3-メトキシ-2-メチル-ベンゾイル) - ヒドラジド、である。

10

20

30

40

50

【0170】

いくつかの場合において、エクダイソン受容体ベースの誘導性遺伝子スイッチの用量調節制御に用いられるリガンドは、エクダイソン、20-ヒドロキシエクダイソン、ポナステロンA、ムリストロンAなどのエクジステロイド、米国特許第6, 013, 836号、第5, 117, 057号、第5, 530, 028号および第5, 378, 726号ならびに米国出願公開第2005/0209283号および2006/0020146号などで開示された、9-シスレチノイン酸、レチノイン酸の合成アナログ、N, N'-ジアシルヒドラジン、米国出願公開第2004/0171651号に記載されたオキサジアゾリン、欧州出願第461, 809号に開示されているようなジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン、米国特許第5, 225, 443号に開示されているようなN-アルキル-N, N'-ジアロイルヒドラジン、欧州出願第234, 994号に開示されているようなN-アシル-N-アルキルカルボニルヒドラジン、米国特許第4, 985, 461号に記載されているようなN-アロイル-N-アルキル-N'-アロイルヒドラジン、米国公開第2004/0049037号に記載されているようなアルニドケトン、3, 5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシ-N-イソブチル-ベンズアミド、8-O-アセチルハルパギド、オキシステロール、22(R)ヒドロキシコレステロール、24(S)ヒドロキシコレステロール、25-エポキシコレステロール、T0901317、5-アルファ-6-アルファ-エポキシコレステロール-3-硫酸(ECHS)、7-ケトコレステロール-3-硫酸、フレイムソール、胆汁酸、1, 1-ビスホスホン酸エステル、幼若ホルモンEII、などを含む、その各々は、参照によりその全体が本明細書に援用される、他の類似物質のいずれかから選択することができるが、これに限定されない。本開示において有用なジアシルヒドラジンリガンドの例としては、RG-115819(3, 5-ジメチル-安息香酸N - (1-エチル-1-2, 2-ジメチル-プロピル) - N' - (2-メチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド)、RG-115932((R)-3, 5-ジメチル-安息香酸N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (2-エチル-1-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド)、およびRG-115830(3, 5-ジメチル-安息香酸N - (1-tert-ブチル-ブチル) - N' - (2-エチル-3-メトキシ-ベンゾイル) - ヒドラジド)を含む。米国特許出願第12/155, 111号、および国際出願第PCT/US2008/006757号を参照し、これらの両方は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0171】

サイトカイン

特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、他のサイトカインと共に、(例えば、同じHPV抗原送達ベクターの一部としてまたは別のベクターを介して)共送達および/または共発現される。特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、遺伝子スイッチポリペプチドおよびサイトカイン、または

その変異体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチド、ならびにそれらを組み込んだ方法およびシステムである。サイトカインは、細胞シグナル伝達に關与する約5～20kDAの間の小タンパク質のカテゴリーである。いくつかの実施例において、サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子または腫瘍壊死因子を含む。いくつかの実施形態において、ケモカインは、細胞の遊走を誘導する化学誘引物質としての役割を果たし、CXC、CC、CX3C、およびXCの4つのサブファミリーに分類される。例示的なケモカインとしては、CCサブファミリー：CCL1、CCL2（MCP-1）、CCL3、CCL4、CCL5（RANTES）、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9（またはCCL10）、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27およびCCL28；CXCサブファミリー：CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、およびCXCL17；XCサブファミリー：XCL1およびXCL2；ならびにCX3Cサブファミリー：CX3CL1に属するケモカインが含まれる。

10

【0172】

特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、インターフェロンと共に、（例えば、同じHPV抗原送達ベクターの一部としてまたは別のベクターを介して）共送達および／または共発現される。インターフェロン（IFN）は、インターフェロンI型（例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、およびIFN- ω ）、インターフェロンII型（例えば、IFN- γ ）、およびインターフェロンIII型を含む。いくつかの実施形態において、IFN- α は、さらにIFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17、およびIFNA21を含む約13種類の亜型に分類される。

20

【0173】

特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、他のインターロイキンと共に、（例えば、同じHPV抗原送達ベクターの一部として、または別のベクターを介して）共送達および／または共発現される。インターロイキンは、白血球によって発現され、それらはTリンパ球およびBリンパ球ならびに造血細胞の増殖および分化を促進する。例示的なインターロイキンは、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8（CXCL8）、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35およびIL-36である。いくつかの実施形態において、インターロイキンは、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、またはIL-15とIL-15 α の融合体である。

30

【0174】

いくつかの態様において、インターロイキンは、IL-12を含むことができる。いくつかの実施形態において、IL-12は、単鎖IL-12（scIL-12）、プロテアーゼ感受性型IL-12、不安定型IL-12、膜結合型IL-12、インターカレート型IL-12である。いくつかの実施例において、IL-12変異体は、WO2015/095249、WO2016/048903、WO2017/062953に記載されている通りであり、これらのすべては、参照によりその全体が援用される。

40

【0175】

いくつかの実施形態において、インターロイキンはmbIL-15を含む。いくつかの実施形態において、mbIL-15は、本明細書に記載の修飾エフェクター細胞と共発現させることができる膜結合型キメラIL-15である。いくつかの実施形態において、m

50

bIL-15は、全長IL-15R α 、その機能的断片または変異体とフレーム内で融合した、全長IL-15（例えば、ネイティブIL-15ポリペプチド）またはその断片または変異体を含む。いくつかの場合において、IL-15は、リンカーを通じてIL-15R α に間接的に連結される。いくつかの実施例において、mbIL-15は、Hurton et al., 「Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells（テザーIL-15は抗腫瘍活性を増強し、腫瘍特異的T細胞における幹細胞記憶サブセットを促進する）」PNAS 2016に記載されている通りである。

【0176】

特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、腫瘍壊死因子と共に、（例えば、同じHPV抗原送達ベクターの一部としてまたは別のベクターを介して）共送達および／または共発現される。腫瘍壊死因子（TNF）は、アポトーシスを調節するサイトカインの一群である。いくつかの実施例において、TNFファミリー内に約19のメンバーが存在し、これには、TNF α 、リンホトキシン α -1（LT α ）、リンホトキシン β （LT β ）、T細胞抗原gp39（CD40L）、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L、およびTNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）を含むが、それらに限らない。

【0177】

特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、コロニー刺激因子と共に（例えば、同じHPV抗原送達ベクターの一部として、または別のベクターを介して）共送達および／または共発現される。コロニー刺激因子（CSF）は、造血幹細胞表面の受容体タンパク質と相互作用し、その後、細胞の増殖および特定の種類の血液細胞への分化を調節する分泌された糖タンパク質である。いくつかの実施例において、CSFはマクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）またはプロメガポイエチンを含む。

【0178】

いくつかの実施形態において、サイトカインは、本明細書に記載のキメラ抗原受容体と共に共発現する、膜結合型サイトカインである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の1つ以上の方法は、サイトカインの投与をさらに含む。いくつかの実施例において、サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子または腫瘍壊死因子を含む。いくつかの実施例において、本明細書に記載の1つ以上の方法は、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子または腫瘍壊死因子から選択されるサイトカインの投与をさらに含む。いくつかの実施例において、本明細書に記載の1つ以上の方法は、IL2、IL7、IL12、IL15、IL-15とIL-15R α の融合体、IL21、IFN γ またはTNF α から選択されるサイトカインの投与をさらに含む。

【0179】

インターロイキン-12

特定の実施形態において、本明細書で提供されるHPVワクチン抗原は、インターロイキン-12サイトカインの送達および／または発現と共に、対象に送達および／または発現される（例えば、IL-12ポリペプチドが、HPVワクチン抗原の送達または発現と共に同じHPVワクチン発現ベクターから発現するか、別ベクターから発現する）。特定の実施形態において、HPVワクチン抗原の送達または発現と共に、対象におけるIL-12の発現が、発現の構成的または誘導的制御によって制御される。好ましい実施形態においては、HPVワクチン抗原の送達または発現と共に、対象におけるIL-12の発現が、発現の誘導的制御によって制御される（IL-12の誘導性制御発現、とも呼ばれる）。インターロイキン12（IL-12）は、抗原刺激に応答して、樹状細胞、マクロファージ、好中球、およびヒトBリンパ芽球系細胞（NC-37）によって自然に産生されるインターロイキンである。IL-12は、4本のアルファヘリックスからなる束で構成

10

20

30

40

50

されている。これは、I L - 1 2 A (p 3 5) および I L - 1 2 B (p 4 0) という 2 つの別の遺伝子によってコードされるヘテロ二量体のサイトカインである。活性のヘテロ二量体 (p 7 0 と呼ばれる) および、p 4 0 のホモ二量体は、タンパク質合成後に形成される。I L - 1 2 は、免疫システムのマスターレギュレーターである。I L - 1 2 は、N K 細胞および T 細胞を活性化することにより、免疫反応を促進する (図 1 1) 。

【 0 1 8 0 】

本明細書に提供されるのは、H P V 組換えワクチンを含む組成物、キット、およびシステム、ならびに H P V 組換えワクチンを製造する方法である。また、本明細書では、遺伝子スイッチポリペプチドおよび I L - 1 2 またはその変異体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチド、ならびにそれを組み込んだ方法およびシステムが提供される。

10

【 0 1 8 1 】

リンカー

また、本明細書に記載のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現および機能性を促進するためのリンカーを含む構築物が開示される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書に記載のポリヌクレオチドで利用することができる。ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターに適合する末端構造を作成するために付加することができる、所望の制限部位を含む D N A の二本鎖セグメントであることができる。いくつかの場合において、ポリヌクレオチドリンカーは、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを修飾するのに有用であることができる。例えば、ポリヌクレオチドリンカーを含むベクターの修飾は、多重クローニング部位の変更、またはポリヒスチジン尾部の付加であることができる。ポリヌクレオチドリンカーはまた、凝集性末端終端を有する制限酵素で切断されたベクターへのクローニングのために、鈍いインサート D N A の末端を適合させるために使用することができる。ポリヌクレオチドリンカーの使用は、ベクターへのブラントライゲーションよりも効率的であり得、かつ下流への適用においてベクターからインサートを放出する方法を提供することができる。いくつかの場合においては、インサートは、治療用途に有用なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であることができる。いくつかの場合においては、リンカーは、開裂可能リンカーであることができる。

20

【 0 1 8 2 】

ポリヌクレオチドリンカーは、オリゴマーであることができる。ポリヌクレオチドリンカーは、D N A の二本鎖、一本鎖、またはそれらの組み合わせであることができる。いくつかの場合において、リンカーは R N A であることができる。ポリヌクレオチドリンカーは、いくつかの場合においては、T 4 リガーゼによって、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターにライゲーションされることができる。ライゲーションを促進するために、過剰のポリヌクレオチドリンカーを、インサートおよびベクターを含む組成物に添加することができる。いくつかの場合において、リンカーが導入される前に、インサートおよびベクターを前処理する。例えば、メチラーゼで前処理することで、インサート D N A の不要な開裂を防ぐことができる。

30

【 0 1 8 3 】

特定の実施形態において、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる 2 つ以上のポリペプチドは、介在リンカーポリペプチドをコードする介在配列によって分離することができる。本明細書において、ポリヌクレオチドによってコードされる 2 つ以上のポリペプチドを分離するアミノ酸配列を指す用語である「介在リンカーポリペプチド」は、膜貫通型ドメインを細胞表面ポリペプチドに接続するために本明細書に開示されるポリペプチド構築物 (例えば、天然ポリペプチドの切断型 (t r u n c a t e d) 変異体を含む) に任意で含まれるアミノ酸配列を指す用語である「ペプチドリンカー」とは区別される。特定の場合において、介在リンカーは、開裂感受性介在リンカーポリペプチドである。いくつかの実施形態において、リンカーは、開裂可能なまたはリボソームスキッピングリンカーである。いくつかの実施形態において、開裂可能リンカーまたはリボソームスキッピングリンカー配列は、2 A、G S G - 2 A、G S G リンカー、S G S G リンカー、

40

50

フューリンリンク変異体およびそれらの誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、2 A リンカーは、p 2 A リンカー、T 2 A リンカー、F 2 A リンカーまたは E 2 A リンカーである。いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドは、開裂感受性介在リンカーポリペプチドによって連結された融合タンパク質として発現される。特定の実施形態において、開裂感受性介在リンカーポリペプチド（複数可）は、F / T 2 A、T 2 A、p 2 A、2 A、G S G-p 2 A、G S G リンカー、およびフューリンリンク変異体、のいずれか1つ以上であることができる。2017年5月18日に公開された国際出願第 P C T / U S 2 0 1 6 / 0 6 1 6 6 8 号（W O 2 0 1 7 0 8 3 7 5 0）に開示されているようなリンカー（ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列）は、参照により本明細書に援用される。

10

【0184】

特定の実施形態において、リンカーポリペプチドは、以下の表に開示されたものを含む。

【表3】

表3：リンカーアミノ酸配列。

配列番号:	リンカータイプ	アミノ酸配列
34,76	剛直性リンカー	E A A A K _(n) (ここで、n = 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回など、任意の複数回を繰り返す配列)
40	HPV6 E6 エピトープ／リンカー	TAEIYSYAYKQLKVL
42	HPV11 E6 エピトープ／リンカー	TAEIYAYAYKNLKV
45	HPV11 E7 エピトープ／リンカー	HCYEQLEDSSSEDEV
52	HPV11 E7 アゴニスト	RTLEDLLMGV
48	HPV16 E6 アゴニスト1	KLPQLCTEV
50	HPV16 E6 アゴニスト2	QLYNKPLCDV
57	可撓性リンカー1	VSQTSKLTR

20

30

【0185】

いくつかの場合において、ウイルス2 A 配列を使用することができる。2 A エLEMENT は、I R E S より短くすることができ、5 から100の塩基対を有することができる。いくつかの場合において、2 A 配列は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または100ヌクレオチドの長さを有することができる。2 A 連結遺伝子は、1つの単一オープンリーディングフレームで発現することができ、「自己開裂」は、2 A ポリペプチドのC末端で最後の2つのアミノ酸、G P の間で共翻訳的に起こすことができ、等量の共発現タンパク質を生じさせることができる。

40

【0186】

ウイルス2 A 配列は、約20個のアミノ酸であることができる。いくつかの場合において、ウイルス2 A 配列は、コンセンサスモチーフ A s p - V a l / I I e - G l u - X - A s n - P r o - G l y - P r o を含むことができる。コンセンサスモチーフ配列は、共翻訳的に作用することができる。例えば、グリシン残基とプロリン残基の間の正常なペプチド結合の形成が妨げられ、リボソームのスキップおよび新生ポリペプチドの開裂が起こる可能性がある。この効果により、複数の遺伝子を等モルレベルで産生することができる。

【0187】

2 A ペプチドは、単一のオープンリーディングフレームにおける複数のタンパク質のポ

50

リペプチドへの翻訳を可能にし、ポリペプチドは、続いて、リボソームスキッピング機構を通じて個々のポリペプチドに開裂されることができる (Funston et al., J. Gen. Virol. 89 (Pt 2): 389-96 (2008))。いくつかの実施形態において、2A配列は、F/T2A、T2A、p2A、2A、T2A、E2A、F2A、およびBmCPV2A、BmIFV2A、ならびにそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

【0188】

いくつかの場合において、ベクターは、IRES配列および2Aリンカー配列を含むことができる。他の場合において、2Aペプチドと連結した複数の遺伝子の発現は、2Aペプチドの前方にあるスパーサー配列 (GSG) により促進することができる。いくつかの場合において、構築物は、スパーサー、リンカー、アダプター、プロモーター、またはそれらの組み合わせを組み合わせることができる。例えば、リンカーは、異なる2Aペプチドを有するスパーサー (SGSGまたはGSGまたはWhitlowリンカー) およびフューリンリンカー (R-A-K-R) 開裂部位を有することができる。スパーサーは、Iceuiであることができる。いくつかの場合において、リンカーは操作することができる。例えば、リンカーは、疎水性のような化学的特性を有するように設計することができる。いくつかの場合において、少なくとも2つのリンカー配列は同じタンパク質を産生することができる。他の場合において、複数のリンカーをベクター内で使用することができる。例えば、目的の遺伝子は、少なくとも2つのリンカーによって分離することができる。

10

20

【0189】

特定の実施形態において、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる2つ以上のポリペプチドは、リンカーポリペプチドをコードする介在配列によって分離することができる。特定の場合において、リンカーは、開裂感受性リンカーである。いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドは、開裂感受性リンカーポリペプチドによって連結された融合タンパク質として発現される。特定の実施形態において、開裂感受性リンカーポリペプチド (複数可) は、フューリンリンク、fmdv、p2a、GSG-p2a、および/または以下に記載するfp2aのいずれか1つまたは2つであることができる。いくつかの場合において、リンカーは、APVKQGSGである。

【0190】

特定の場合において、リンカーポリペプチドは、アミノ酸配列「RAKR」を含むことができる。特定の場合において、フューリンリンカーポリペプチドは、「CGTGCAAGCGT」または「AGAGCTAAGAGG」を含むポリヌクレオチド配列によってコードすることができる。

30

【0191】

いくつかの実施形態において、リンカーは、本明細書に記載のポリヌクレオチドにおいて利用することができる。リンカーは、可撓性リンカー、剛直性リンカー、生体内開裂性リンカー、またはそれらの任意の組み合わせであることができる。いくつかの場合において、リンカーは、(可撓性リンカーおよび剛直性リンカーのように) 機能ドメインを一緒に連結するか、または生体内開裂性リンカーのように生体内で遊離機能ドメインを放出することができる。

40

【0192】

リンカーは、生物学的活性を改善し、発現量を増加させ、望ましい薬物動態プロファイルを達成することができる。リンカーはまた、ヒドラゾン、ペプチド、ジスルフィド、またはチオエステルを含んでなることができる。

【0193】

いくつかの場合において、本明細書に記載のリンカー配列は、可撓性リンカーを含むことができる。可撓性リンカーは、結合したドメインがある程度の動きや相互作用を必要とする場合に適用することができる。可撓性リンカーは、小さな非極性 (例えば、Gly) または極性 (例えば、SerまたはThr) アミノ酸で構成することができる。可撓性リ

50

ンカーは、主にG l yおよびS e rの残基のストレッチからなる配列を有することができる（「G S」リンカー）。可撓性リンカーの例は、（G l y－G l y－G l y－G l y－S e r）nの配列を有することが可能である。この例のG Sリンカーの長さは、コピー数「n」を調整することにより、機能ドメインの適切な分離を達成したり、必要なドメイン間相互作用を維持したりするために最適化することができる。G Sリンカー以外に、他の可撓性リンカーも組換え融合タンパク質に利用することができる。いくつかの場合において、可撓性リンカーはまた、G l yおよびS e rのような小さなアミノ酸や極性アミノ酸に富み、柔軟性を維持するためにT h rおよびA l aなどのアミノ酸を追加で含むことができる。他の場合において、溶解度を向上させるために、L y sおよびG l uなどの極性アミノ酸を使用することができる。

10

【0194】

本明細書に記載のリンカー配列に含まれる可撓性リンカーは、良好な柔軟性および溶解性を提供するために、G l yおよびS e rなどの小さいアミノ酸または極性アミノ酸が豊富であることができる。可撓性リンカーは、融合タンパク質ドメインに特定の動きまたは相互作用が望まれる場合に、適した選択になることができる。さらに、可撓性リンカーは、剛直な構造を持つことはできないが、機能ドメイン間の距離を保つための受動的なリンカーとして機能することができる。可撓性リンカーの長さは、適切なフォールディングを可能にするため、あるいは融合タンパク質の最適な生物学的活性を達成するために調整することができる。

【0195】

20

本明細書に記載のリンカーは、いくつかの場合において、剛直性リンカーをさらに含むことができる。剛直性リンカーは、ポリペプチドのドメイン間の固定距離を維持するために利用することができる。剛直性リンカーのいくつかの例としては、アルファヘリックス形成性リンカー、P r oリッチ配列、（X P）n、X－P r oバックボーン、A（E A A A K）n A（n＝2～5）、などが含まれる。剛直性リンカーは、αヘリカル構造を採用することによって、または場合によっては複数のP r o残基を含むことによって、比較的剛直な構造を示すことができる。

【0196】

本明細書に記載のリンカーは、いくつかの場合において開裂可能であることができる。他の場合においては、リンカーは開裂可能ではない。開裂可能でないリンカーは、機能ドメインを共有結合して、生体内プロセスまたは生体外プロセスを通して1分子として作用することができる。リンカーはまた、生体内で開裂可能であることもできる。開裂可能リンカーは、生体内で遊離機能ドメインを放出するために導入することができる。開裂可能リンカーは、いくつか例として、還元試薬、プロテアーゼの存在によって開裂可能になる。例えば、ジスルフィド結合の還元を利用して開裂可能リンカーを生成することができる。ジスルフィドリンカーの場合、グルタチオンなどのチオールとのジスルフィド交換による開裂事象が開裂を生成することができる。他の場合において、生体内での組換え融合タンパク質内のリンカーの開裂は、病理学的条件下（例えば、がんまたは炎症）において、特定の細胞または組織において、または特定の細胞コンパートメント内で制約を受ける中で、生体内で発現することができるプロテアーゼによっても実施することができる。いくつかの場合において、開裂可能リンカーは、標的とした開裂を可能にすることができる。例えば、多くのプロテアーゼの特異性により、制約のあるコンパートメントでリンカーをゆっくりと開裂することができる。開裂可能リンカーは、ヒドラゾン、ペプチド、ジスルフィド、またはチオエステルを含むこともできる。例えば、ヒドラゾンは血清安定性を付与することができる。他の場合において、ヒドラゾンは酸性コンパートメントでの開裂を可能にすることができる。酸性コンパートメントは、7までのp Hを有することができる。リンカーはまた、チオエーテルを含むことができる。チオエーテルは非還元性であることができる。チオエーテルは細胞内タンパク質分解のために設計することができる。

30

40

【0197】

場合によっては、遺伝子は2、3、4、5、6、7、8、9、または最大10個のリン

50

カーによって分離することができる。

【0198】

リンカーは、操作されたリンカーであることができる。リンカーを設計する方法は、計算で行うことができる。いくつかの場合において、計算方法は、グラフィック技術を含むことができる。計算方法は、データベースから得られる3次元ペプチド構造のライブラリから適切なペプチドを検索するために用いることができる。例えば、ブルックヘブタンパク質データバンク(Brookhaven Protein Data Bank(PDB))を使用して、リンカーの選択されたアミノ酸間の空間における距離を測ることができる。

【0199】

いくつかの実施形態において、フューリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドを含むポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドであって、フューリンポリペプチドおよび2Aポリペプチドは、少なくとも3つの疎水性アミノ酸を含むポリペプチドリンカーによって連結されている。いくつかの場合において、少なくとも3つの疎水性アミノ酸は、グリシン(Gly)(G)、アラニン(Ala)(A)、バリン(Val)(V)、ロイシン(Leu)(L)、イソロイシン(Ile)(I)、プロリン(Pro)(P)、フェニルアラニン(Phe)(F)、メチオニン(Met)(M)、トリプトファン(Trp)(W)からなるリストから選択される。いくつかの場合において、ポリペプチドリンカーはまた、1つ以上のGSリンカー配列、例えば、(GS)_n、(SG)_n、(GSG)_n、および(SGSG)_n、を含むことができ、ここでnは0から15までの任意の数であることができる。

【0200】

以下を含む、ポリペプチド構築物の改善された発現を得る方法が提供される。第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドを含む前記ポリペプチド構築物をコードするポリヌクレオチドを提供するステップであって、前記第1の機能性ポリペプチドおよび第2の機能性ポリペプチドは、配列APVKQと少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペプチドによって接続されている、ステップ、ならびに、宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させるステップであって、前記発現が、配列APVKQと少なくとも60%の同一性を有する配列を含むリンカーポリペプチドを有しない対応するポリペプチド構築物と比較して、ポリペプチド構築物の発現の改善をもたらす、ステップ、である。

【0201】

IRESエレメント

また、本明細書に記載のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現および機能性を促進するためのIRESエレメントを含む構築物が開示される。本明細書で使用される「内部リボソーム進入部位(IRES)」という用語は、内部リボソーム進入部位を意味するものとして用いることができる。IRES配列を含むベクターにおいて、最初の遺伝子は、それ自身の5'-UTRを有するキャップ依存的な、リボソームスキヤニング、メカニズムによって翻訳されることができ、一方で、後続の遺伝子の翻訳は、キャップ非依存的にIRESへのリボソームの直接リクルートによって達成されることができる。IRES配列は、真核生物のリボソームが5'キャップ末端に結合することなく、結合して翻訳を開始することを可能にする。IRES配列は、1つの転写物から複数の遺伝子を発現させることができる(Mountford and Smith, Trends Genet. 11(5):179-84(1995))。

【0202】

本明細書で使用される「CAP」または「キャップ」という用語は、真核生物のmRNAの5'末端に、そのmRNAからのタンパク質の発現中に通常の翻訳開始経路の必須エレメントとして機能する修飾ヌクレオチド、一般的に、3'から5'に連結した7メチルグアノシン(7meGppp-G)、を指す。

【0203】

10

20

30

40

50

特定の場合において、IRES領域は、ピコルナウイルス、脳心筋炎ウイルス、C型肝炎ウイルスIRES配列など、ウイルスに由来であり得る。他の場合において、IRES配列は、脳心筋炎ウイルスに由来することができる。本明細書で使用される「EMCV」または「脳心筋炎ウイルス」という用語は、ピコルナウイルス科の属における脳心筋炎ウイルス種の任意のメンバー単離物または菌株を指す。例としては、EMCV-R (Rueckert) 株ウイルス、コロンビアSKウイルスである。いくつかの場合において、細胞性IRESエレメント、例えば、真核生物開始因子4G、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質、c-myc癌原遺伝子、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子-1 IRES、またはこれらの任意の組み合わせもしくは修飾、を使用することができる。いくつかの場合において、細胞性IRESは、ウイルス性IRESと比較して、遺伝子発現の増加をもたらすことができた。

10

【0204】

ウイルス性、細胞性、またはそれらの組み合わせのIRES配列をベクターで利用することができる。IRESは、脳心筋炎ウイルス(EMCV)またはポリオウイルス(PV)由来であることができる。いくつかの場合において、IRESエレメントは、ポリオウイルス(PV)、脳脊髄炎ウイルス(EMCV)、口蹄疫ウイルス(FMDV)、豚テスコウイルス-1(PTV-1)、アイチウイルス(AiV)、セネカバレーウイルス(SVV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、古典的豚熱ウイルス(CSFV)、ヒト免疫不全ウイルス-2(HIV-2)、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒトサイトメガロウイルス潜伏(pUL138)、エプスタイン・バーウイルス(EBNA-1)、ヘルペスウイルスマレーク病(MDV RLORF9)、SV40ポリシストロニック19S(SV40 19S)、ムギクビレアブラムシウイルス(RhPV)、コオロギ麻痺ウイルス(CrPV)、昆虫ピコルナ様ウイルス(EoPV)、チャバネアオカメムシ腸管ウイルス(PSIV)、トリアトーマウイルス(TrV)、蜂急性麻痺ウイルス(IAPV、KBV)、カシス復帰ウイルス(BRV)、ペラルゴニウムフラワーブレイクウイルス(PFBV)、ハイビスカス萎黄病リングスポットウイルス(HCRSV)、アブラナ科感染トバモウイルス(CrTMV)、ジャガイモ葉巻ポレロウイルス(PLRV)、タバコエッチウイルス(TEV)、ジアルジアウイルス(GLV)、リーシュマニアRNAウイルス-1(LRV-1)、およびこれらの組み合わせまたは修飾、からなる群から選択される。いくつかの場合において、IRESは、Apaf-1、XIAP、HIAP2/c-IAP1、DAP5、Bcl-2、c-myc、CAT-1、INR、分化LEF-1、PDGF2、HIF-1a、VEGF、FGF2、Bip、BAG-1、CIRP、p53、SHMT1、PITSLREp58、CDK1、Rpr、hid、hsp70、grim、skl、アンテナペディア(Antennapedia)、dFoxO、dInR、Adh-Adhr、HSP101、ADH、URE-2、GPR1、NCE102、YMR181a、MSN1、BOI1、FLO8、GIC1、およびこれらの任意の組み合わせまたは修飾からなる群から選択される。IRESエレメントが2つのオープンリーディングフレーム(ORF)の間に含まれる場合、翻訳の開始は、第1のORFでは正規の5'-m7GpppNキャップ依存機構により、IRESエレメントの下流の第2のORFではキャップ非依存機構により起こる可能性がある。

20

30

40

【0205】

いくつかの場合において、遺伝子は内部リボソーム侵入部位(IRES)によって連結することができる。IRESは、複数の遺伝子の同時発現を可能にすることができる。例えば、IRES配列は、1つのmRNA転写物から複数のタンパク質を生産することを可能にすることができる。リボソームは、5'末端キャップに依存しない方法でIRESに結合し、翻訳を開始することができる。

【0206】

いくつかの場合において、IRES配列は、塩基対であることができるか、または約5

50

00塩基対であることができる。IRES配列は、300塩基対から1000塩基対であることができる。例えば、IRESは、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000塩基対の長さであることができる。

【0207】

いくつかの場合において、IRES配列を含むベクター内での下流遺伝子の発現は、減少させることができる。例えば、IRES配列に続く遺伝子は、IRES配列に先行する遺伝子よりも減少した発現を有することができる。減少した発現は、先行する遺伝子に対して1%から99%の減少である可能性がある。

【0208】

発現制御方法

一実施形態において、操作された細胞における異種遺伝子の発現を制御する方法が提供される。異種遺伝子発現のリガンド誘導性制御のための遺伝子スイッチポリペプチド、抗原結合ポリペプチド、および異種遺伝子をコードするポリヌクレオチドが、提供される。いくつかの実施例において、ポリヌクレオチドは、図1から図16のいずれか1つに描かれているような1つ以上の遺伝子発現カセットに含まれる。別の実施例において、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを介して、操作された細胞に組み込まれる。ウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターを含むことができる。非ウイルスベクターは、スリーピングビューティートランスポゾンを含むことができる。他の実施例において、ポリヌクレオチドは、リコンビナーゼまたは遺伝子編集技術を介して、操作された細胞に組み込まれる。リコンビナーゼの例は、本明細書に記載されるようなセリンリコンビナーゼである。遺伝子編集技術の例は、CRISPRシステムまたはアルゴノートシステムを含むことができる。本明細書において「CRISPRシステム」の「CRISPR遺伝子編集システム」は、DNA配列の変化をゲノムの特定の領域に標的化するための、任意のRNA誘導Casタンパク質媒介プロセスを指す。本明細書において「アルゴノート遺伝子編集システム」は、DNA配列の変化をゲノムの特定の領域に標的化するための、任意の一本鎖DNA誘導アルゴノートエンドヌクレアーゼ媒介プロセスを指す。

【0209】

医薬組成物と投与量

本開示は、本明細書に記載のアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターと、そのための担体（例えば、薬学的に許容される担体）とを含む組成物を提供する。この組成物は、望ましくは、担体、好ましくは生理学的に（例えば、薬学的に）許容される担体、およびアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターを含む、生理学的に（例えば、薬学的に）許容される組成物である。任意の適切な担体は、本開示の文脈内で使用することができる、そのような担体は、当該技術分野において周知である。担体の選択は、部分的には、組成物の特定の使用（例えば、動物への投与）および組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定することができる。理想的には、複製欠損アデノウイルスベクターの文脈では、医薬組成物は、好ましくは、複製可能アデノウイルスを含まないものである。医薬組成物は、任意に無菌であることができる。

【0210】

適切な組成物には、酸化防止剤、緩衝剤、および静菌剤を含むことができる水性および非水性の等張無菌溶液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含むことができる水性および非水性の無菌懸濁液が含まれる。組成物は、アンプルおよび小瓶などの単位用量以上の密封容器で提供することができ、使用直前に無菌液体担体、例えば水を加えるだけで済む凍結乾燥（lyophilized）状態で保存することができる。また、無菌の粉末、顆粒、および錠剤から、即席の溶液や懸濁液を調製することができる。好ましくは、担体は緩衝生理食塩水である。より好ましくは、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターは、投与前にアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターを損傷から保護するように製剤化された組成物の一部である。例えば、組成物は、ガラス

10

20

30

40

50

器具、注射器、または針など、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターを調製、保存、または投与するために使用されるデバイス上でのアデノウイルスまたはアデノウイルスベクターの損失を低減するように製剤化することができる。組成物は、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターの光感受性および／または温度感受性を低下させるように処方することができる。この目的のために、組成物は、好ましくは、例えば、上述のものなどの薬学的に許容される液体担体、ならびに、ポリソルベート-80、L-アルギニン、ポリビニルピロリドン、トレハロース、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される安定化剤を含む。このような組成物を使用することにより、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターの保存可能期間を延長し、かつその投与を容易にすることができる。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクター含有組成物のための製剤化は、例えば、米国特許第6,225,289号、米国特許第6,514,943号、および国際特許出願公開WO2000/034444にさらに記載されている。

10

【0211】

組成物はまた、導入効率を高めるために製剤化することができる。加えて、当業者であれば、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが、他の治療剤または生物活性剤と共に組成物中に存在し得ることを理解するであろう。例えば、イブuproフェンまたはステロイドなどの炎症を制御する因子は、アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターの生体内投与に関連する腫れおよび炎症を低減するために組成物の一部であることができる。アデノウイルスまたはアデノウイルスベクターが、抗原をコードする核酸配列を宿主に送達するために使用される場合、免疫系刺激剤または補助剤、例えば、インターロイキン、リポ多糖類、または二本鎖RNAは、抗原に対する任意の免疫応答を強化または修飾するために投与することができる。抗生物質、すなわち、殺菌剤および殺真菌剤は、既存の感染症を治療するため、および／または遺伝子導入処置と関連付けられる感染症などの将来の感染症のリスクを低減するために存在することができる。

20

【0212】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるものは、対象への投与のために本明細書に開示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む組成物である。いくつかの実施例において、本明細書に開示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをコードし、任意選択でサイトカインおよび／または追加の治療薬を含む修飾エフェクター細胞組成物である。いくつかの実施例において、本明細書には、エフェクター細胞の修飾のためのキメラ抗原受容体の発現を調節するための遺伝子スイッチポリペプチドをコードするベクターも含まれる。

30

【0213】

いくつかの実施例において、遺伝子スイッチポリペプチドおよびキメラ抗原受容体をコードする修飾エフェクター細胞またはベクターの医薬組成物は、活性化化合物を薬学的に使用できるように製剤化することを容易にする、賦形剤および補助剤を含む1つ以上の生理学的に許容できる担体を用いて従来手法で製剤化される。適切な製剤化は、選択される投与経路に依存する。本明細書に記載される医薬組成物の要約は、例えば、本明細書に記載される医薬組成物の要約は、例えば、Remingtonの中で見ることができる。それらは、The Science and Practice of Pharmacy Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, (1995)、Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975、Lieberman, H. A. & Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980、および、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)である。

40

【0214】

50

医薬組成物は、例示に過ぎないが、従来の混合、溶解、造粒、ドラジェ化、粉末化、乳化、カプセル化、封入または圧縮プロセス手段などにより、従来の方法で、任意に製造される。

【0215】

特定の実施形態において、組成物はまた、酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸および塩酸などの酸、水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウムおよびトリスヒドロキシメチルアミノメタンなどの塩基、ならびにクエン酸塩／デキストロース、炭酸水素ナトリウムおよび塩化アンモニウムなどの緩衝剤を含む、1つ以上のpH調整剤または緩衝剤を含むことができる。このような酸、塩基および緩衝剤は、組成物のpHを許容範囲に維持するために必要な量で含まれる。

10

【0216】

他の実施形態において、組成物はまた、組成物のオスモル濃度を許容範囲にするために必要な量の1つ以上の塩を含むことができる。そのような塩には、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムカチオン、および塩化物、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸水素塩、硫酸塩、チオ硫酸塩または亜硫酸水素塩アニオンを有するものがあり、適切な塩には塩化ナトリウム、塩化カリウム、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウムおよび硫酸アンモニウムが含まれる。

【0217】

本明細書に記載の医薬組成物は、経口、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、脳内、脳室内、関節内、腹腔内、または頭蓋内）、鼻腔内、頬、舌下、または直腸投与経路を含むが、これらに限定しない任意の適した投与経路で投与される。いくつかの実施例において、医薬組成物は、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、脳内、脳室内、関節内、腹腔内、または頭蓋内）投与用に処方される。

20

【0218】

本明細書に記載の医薬組成物は、治療すべき個体が経口摂取するための水性経口分散液、液体、ゲル、シロップ、エリキシル、スラリー、懸濁液などを含むが、これらに限定されない任意の適切な剤形、固体経口剤形、エアゾル、制御放出製剤、速溶製剤、発泡製剤、凍結乾燥製剤、錠剤、粉末剤、丸薬、ドラジェ、カプセル、遅延放出製剤、持続性放出製剤、拍動放出製剤、多粒子製剤、および混合即時放出および制御放出製剤、として製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、カプセルに製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、溶液（例えば、IV投与のため）に製剤化される。いくつかの場合において、医薬組成物は、輸液として製剤化される。いくつかの場合において、医薬組成物は、注射剤として製剤化される。

30

【0219】

本明細書に記載の医薬用固形剤の種類としては、任意に、本明細書に記載の化合物、および適合する担体、結合剤、充填剤、懸濁化剤、香味剤、甘味剤、崩壊剤、分散剤、界面活性剤、潤滑剤、着色剤、希釈剤、可溶化剤、保湿剤、可塑剤、安定剤、浸透促進剤、湿潤剤、消泡剤、酸化防止剤、保存剤、またはこれらの1つ以上の組み合わせなどの薬学的に許容できる添加物が含まれる。

40

【0220】

さらに他の態様において、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition (2000)に記載されているような標準的なコーティング手順を用いる場合、フィルムコーティングが組成物の周囲に提供される。いくつかの実施形態において、組成物は（例えばカプセルによる投与のために）粒子に製剤化（処方）され、粒子の一部または全部がコーティングされる。いくつかの実施形態において、組成物は（例えばカプセルによる投与のために）粒子に製剤化（処方）され、粒子の一部または全部がマイクロカプセル化される。いくつかの実施形態において、組成物は（例えばカプセルによる投与のために）粒子に製剤化（処方）され、粒子の一部または全部はマイクロカプセル化されず、非コーティングである。

50

【0221】

特定の実施形態において、本明細書で提供される組成物は、微生物の活性を抑制するために1つ以上の保存剤も含むことができる。適切な保存剤としては、メルフェンおよびチオメルサルなどの水銀含有物質、安定化二酸化塩素、ならびに塩化ベンザルコニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、および塩化セチルピリジニウムなどの第4級アンモニウム化合物が含まれる。

【0222】

「消泡剤」は、水性分散液の凝固、完成したフィルムの気泡、または一般的に処理を損なう可能性のある処理中の発泡を低減する。例示的な消泡剤には、シリコンエマルジョンまたはセスキオレイン酸ソルビタンが含まれる。

10

【0223】

「酸化防止剤」には、例えば、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸、二亜硫酸ナトリウムおよびトコフェロールが含まれる。特定の実施形態において、酸化防止剤は、必要な場合に化学的安定性を高める。

【0224】

本明細書に記載の製剤は、酸化防止剤、金属キレート剤、チオール含有化合物および他の一般的な安定化剤から恩恵を得ることができる。そのような安定化剤の例としては、以下のものが含まれるが、これらに限定されない。それらは、(a) 約0.5%~約2% w/vのグリセロール、(b) 約0.1%~約1% w/vのメチオニン、(c) 約0.1%~約2% w/vのモノチオグリセロール、(d) 約1mM~約10mMのEDTA、(e) 約0.01%~約2% w/vのアスコルビン酸、(f) 0.003%~約0.02% w/vのポリソルベート-80、(g) 0.001%~約0.05% w/vのポリソルベート-20、(h) アルギニン、(i) ヘパリン、(j) デキストラン硫酸、(k) シクロデキストリン、(l) ペントサンポリスルフェートおよび他のヘパリン類似物質、(m) マグネシウムおよび亜鉛などの二価カチオン、または(n) それらの組み合わせである。

20

【0225】

「結合剤」は、凝集性を付与し、例として、以下が含まれる。それらは、アルギン酸およびその塩、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース（例えば、Methocel（登録商標））、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース（例えば、Klucel（登録商標））、エチルセルロース（例えば、Ethocel（登録商標））、および微結晶セルロース（例えば、Avicel（登録商標））などのセルロース誘導体、微結晶デキストロース、アミロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、多糖類酸、ペントナイト、ゼラチン、ポリビニルピロリドン/酢酸ビニル共重合体、クロスボリドン、ポリドン、デンプン、アルファ化デンプン、トラガカント、デキストリン、糖類（スクロース（例えば、Dipac（登録商標））、グルコース、デキストロース、糖蜜、マンニトール、ソルビトール、キシリトール（例えば、Xylitab（登録商標））、および乳糖など）、アカシア、トラガカント、ガッティガム、イサポールハスクの粘液、ポリビニルピロリドン（例えば、Polyvidone（登録商標）CL、Kollidon（登録商標）CL、Polyplasdone（登録商標）XL-10）、カラマツアラビノガラクトン、Veegum（登録商標））、ポリエチレングリコール、ワックス、およびアルギン酸ナトリウムなどの天然または合成のガムである。

30

40

【0226】

「担体」または「担体材料」は、薬学において一般的に使用される任意の賦形剤を含み、イブuprofenおよび抗癌剤の化合物などの、本明細書に開示される化合物との適合性、ならびに所望の剤形の放出プロファイル特性に基づいて選択されるべきである。例示的な担体材料には、例えば、結合剤、懸濁化剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定剤、潤滑剤、湿潤剤、希釈剤などが含まれる。「薬学的に適合する担体材料」には、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（P

50

VP)、コレステロール、コレステロールエステル、カゼインナトリウム、大豆レシチン、タウロコール酸、ホスホチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸ニカリウム、セルロースおよびセルロース結合体、糖類ステアロイル乳酸ナトリウム、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、アルファ化デンプン、などが含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995)、Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975、Lieberman, H. A. と Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980、および、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999) を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0227】

「分散剤」および／または「粘度調整剤」は、液体媒体または造粒法もしくはブレンド法による薬剤の拡散および均質性を制御する材料を含む。いくつかの実施形態において、これらの剤はまた、コーティングまたは侵食マトリックスの有効性を促進する。例示的な拡散促進剤／分散剤としては、例えば、親水性ポリマー、電解質、Tween (登録商標) 60 または 80、PEG、ポリビニルピロリドン (PVP、Plasdone (登録商標) として商業的に公知)、および例えば、ヒドロキシプロピルセルロース (例えば、HPC、HPC-SL、および HPC-L) などの炭水化物ベースの分散剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (例えば、HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M、および HPMC K100M)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート (HPMCAS)、非結晶セルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、トリエタノールアミン、ポリビニルアルコール (PVA)、ビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体 (S630)、酸化エチレンおよびホルムアルデヒドを含有する 4- (1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル) -フェノール重合体 (チロキサポールとして公知)、ポロキサマー (例えば、酸化エチレンと酸化プロピレンのブロック共重合体である Pluronic F68 (登録商標)、F88 (登録商標)、および F108 (登録商標))、ならびにポロキサミン (例えば、Poloxamine 908 (登録商標) として公知の、Tetronic 908 (登録商標)、これはエチレンジアミンに酸化プロピレンと酸化エチレンを順次付加して得られる四官能性ブロック共重合体 (BASF Corporation, Parsippany N. J.))、ポリビニルピロリドン K12、ポリビニルピロリドン K17、ポリビニルピロリドン K25、またはポリビニルピロリドン K30、ポリビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体 (S-630)、ポリエチレングリコール (例えば、ポリエチレングリコールは、約 300 ~ 約 6000、または約 3350 ~ 約 4000、または約 7000 ~ 約 5400 の分子量を有することができる)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、例えば、トラガカントガムおよびアカシアガム、グアーガム、キサンタンガムを含むキサンタンなどのゴム、糖、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、などのセルロース誘導体、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、ポリエトキシ化ソルビタンモノラウレート、ポビドン、カルボマー、ポリビニルアルコール (PVA)、アルギン酸塩、キトサンおよびこれらの組み合わせ、が含まれる。セルロースまたはトリエチルセルロースなどの可塑剤も分散剤として使用することができる。リポソーム分散液および自己乳化分散液に特に有用な分散剤は、ジミリストイルホスファチジルコリン、卵由来の天然

ホスファチジルコリン、卵由来の天然ホスファチジルグリセロール、コレステロールおよびミリスチン酸イソプロピルである。

【0228】

1つ以上の浸食促進剤と1つ以上の拡散促進剤との組み合わせも、本発明の組成物において使用することができる。

【0229】

「希釈剤」という用語は、送達前に目的の化合物を希釈するために使用される化学化合物を指す。希釈剤は、より安定した環境を提供することができるため、化合物を安定させるために使用することもできる。緩衝液に溶解した塩（これはまた、pH制御または維持を提供することができる）は、リン酸緩衝生理食塩水（これに限定はされない）を含めて、当該技術分野において希釈剤として利用される。特定の実施形態において、希釈剤は、圧縮を容易にするために組成物の容量を増やすか、またはカプセル充填のための均質なブレンドのために十分な容量を作成する。このような化合物には、例えば、以下のものが含まれる。それらは、乳糖、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、Avicel（登録商標）などの微結晶セルロース、二塩基性リン酸カルシウム、リン酸ニカルシウム二水和物、リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム、無水乳糖、スプレードライ乳糖、アルファ化デンプン、Dierpac（登録商標）（Amstar）などの圧縮性糖、マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート、ショ糖ベースの希釈剤、粉砂糖、一塩基性硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物、乳酸カルシウム三水和物、デキストレート、加水分解穀類固形物、アミロース、粉末セルロース、炭酸カルシウム、グリシン、カオリン、マンニトール、塩化ナトリウム、イノシトール、ベントナイトなどである。

10

20

【0230】

「充填剤」としては、乳糖、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、二塩基性リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶セルロース、粉末セルロース、デキストロース、デキストレート、デキストラン、デンプン、アルファ化デンプン、ショ糖、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールなどの化合物が含まれる。

【0231】

「潤滑剤」および「滑剤」は、材料の付着または摩擦を防止、低減または抑制する化合物である。例示的な潤滑剤には、例えば、以下のような化合物がある。それらは、ステアリン酸、水酸化カルシウム、タルク、フマル酸ステアリルナトリウム、鉱油などの炭化水素、または硬化大豆油（Sterotex（登録商標））などの硬化植物油、高級脂肪酸およびそのアルカリ金属塩、アルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛などのアルカリ土類金属塩、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、タルク、ワックス、Stearowet（登録商標）、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール（例えば、PEG-4000）、Carbowax（商標）などのメトキシポリエチレングリコール、オレイン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、Syloid（商標）、Cabo-Sil（登録商標）などのコロイド状シリカ、コーンスターチなどのデンプン、シリコンオイル、界面活性剤、などである。

30

40

【0232】

「可塑剤」は、マイクロカプセル化材料またはフィルムコーティングを軟化させて、脆さを減らすために使用される化合物である。適切な可塑剤としては、例えば、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350、およびPEG 800などのポリエチレングリコール、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロースおよびトリアセチンなどが含まれる。いくつかの実施形態において、可塑剤は、分散剤または湿潤剤としても機能することができる。

【0233】

50

「可溶化剤」としては、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カプリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクサートナトリウム、ビタミンE TPGS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁酸塩、ポリエチレングリコール200～600、グリコフロール、トランスキトール、プロピレングリコール、ジメチルイソソルビド、などの化合物が含まれる。

【0234】

「安定剤」は、任意の酸化防止剤、緩衝剤、酸、保存剤などの化合物を含む。

【0235】

「懸濁化剤」には、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30、ビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体(S630)などのポリビニルピロリドン、例えば約300～約6000、または約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有することができるポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースステアレート、ポリソルベート-80、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、例えばトラガカントガム、アカシアガム、グアーガム、キサンタン類(キサンタンガムを含む)などのゴム、糖類、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース類、ポリソルベート-80、アルギン酸ナトリウム、ポリエトキシ化ソルビタンモノラウレート、ポビドン、などの化合物が含まれる。

【0236】

「界面活性剤」は、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクサートナトリウム、Tween60または80、トリアセチン、ビタミンE TPGS、モノオレイン酸ソルビタン、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート、ポラクソマー、胆汁酸塩、モノステアリン酸グリセリル、例えば、Pluronic(登録商標)(BASF)のような酸化エチレンと酸化プロピレンの共重合体、などの化合物が含まれる。他のいくつかの界面活性剤としては、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油、例えば、ポリオキシエチレン(60)硬化ヒマシ油、およびポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40、が含まれる。いくつかの実施形態において、物理的安定性を高めるため、または他の目的のために、界面活性剤を含めることができる。

【0237】

「粘度向上剤」としては、例えば、メチルセルロース、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩、アカシア、キトサンおよびこれらの組み合わせが含まれる。

【0238】

「湿潤剤」としては、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ドクサートナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、トリアセチン、Tween80、ビタミンE TPGS、アンモニウム塩等の化合物が含まれる。

【0239】

キット／製造品

特定の実施形態において、本明細書に開示されるものは、本明細書に記載される1つ以上の方法と共に使用するためのキットおよび製造品である。そのようなキットとしては、

10

20

30

40

50

小瓶、チューブなどの1つ以上の容器を受けられるように区分化された担体、パッケージ、または容器が挙げられ、容器（複数可）のそれぞれは、本明細書に記載の方法で使用される別個の要素の1つを含む。適切な容器には、例えば、ボトル、小瓶、注射器、および試験管が含まれる。一実施形態において、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から作られる。

【0240】

本明細書で提供される製造品は、包装材料を含む。医薬品包装材料の例としては、ブリスターパック、ボトル、チューブ、バッグ、容器、ならびに選択された製剤および意図した投与および治療の様式に適した任意の包装材料が含まれるが、これらに限定されない。

【0241】

キットは、通常、内容物および／または使用方法を記載したラベル、および使用方法を記載した添付文書を含む。また、通常、説明書のセットも含まれる。

【0242】

いくつかの実施形態において、ラベルは容器上に付されているかまたは容器に付随している。一実施形態において、ラベルは、ラベルを形成する文書、数字または他の文字が容器自体に添付、成形またはエッチングされる場合は容器上に付されていて、ラベルは、例えば、添付文書として、容器も保持する入れ物または担体内に存在する場合は容器に付随している。一実施形態において、ラベルは、内容物が特定の治療用途に使用されることを示すために使用される。ラベルはまた、本明細書に記載される方法など、内容物の使用に関する指示を示す。

【0243】

HPVワクチン設計のための抗原性生物情報学ワークフロー
新しいHPV抗原成分の同定

HPV E2およびE4遺伝子成分がHPVの本質的な機能において果たす重要な役割、対応するタンパク質の位置、およびインシリコ予測に基づいて、E2およびE4由来の抗原をHPV治療ワクチン用に同定した。図1を参照されたい。HPV E2およびE6タンパク質のように、HPVタンパク質からウイルスおよび発癌性生物活性を除去するために、非発癌性およびウイルス不活性化遺伝子修飾も適用した。また、ペプチドの免疫原性機能を保持しつつ、E7およびE4それぞれの発癌性機能およびウイルス増幅機能を除去するような方法で並び替えたタンパク質配列の生産を達成するために、遺伝子操作を適用した。

【0244】

このように、本明細書で例示する5つの設計の革新的な態様は以下の通りである。（1）4つ以上の異なるHPVタンパク質を含む融合タンパク質をコードする遺伝子構築物の使用、（2）発癌性および必須ウイルス機能を不活性化するためのアミノ酸点突然変異および重複ポリペプチド配列シャッフリング技術の組み合わせ、（3）宿主感染細胞で高度発現するHPVタンパク質から複数の抗原成分を含むHPVタンパク質の組み込み、（4）初めて知られたハイブリッド抗原設計、（5）高癌リスクおよび低癌リスクのHPV株からのエピトープの組み合わせ、（6）混合リンカーおよび規則的反復リンカーの使用、（7）ポリペプチドのサブユニットを安定化し、望ましくない分子内相互作用を防止する剛直性リンカーの使用、（8）エピトープ間の開裂可能リンカーの使用、（9）タンパク質-タンパク質リンカー（-）機能だけでなく、それ自体で抗原やエピトープを提供するためのリンカー配列の二重使用（すなわち、リンカー配列によって付与される抗原性）。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. インシリコ評価

設計 番号	抗原性		アレルゲン性	宿主交差反応性
	ウイルス	腫瘍		
1	0.5288	0.6134	非アレルギー性	ヒットしない
2	0.5252	0.5814	非アレルギー性	ヒットしない
3	0.5587	0.6322	非アレルギー性	ヒットしない
4	0.5451	0.5809	非アレルギー性	ヒットしない
5	0.4964	0.5997	非アレルギー性	ヒットしない

10

【0245】

抗原性とは、抗体または細胞性免疫応答の産生を刺激する能力である。最終設計配列の抗原性は、アミノ酸配列の主な化学的性質に基づく抗原認識のためのアライメント非依存モデルである Vax j en ソフトウェアによって予測された。その結果は、5つの抗原配列は抗原性であることを示している。表 4（抗原性／ウイルスおよび腫瘍）を参照されたい。

【0246】

アレルゲンは、一般的に抗体反応を引き起こす小さな抗原である。抗原がアレルゲンであるか非アレルゲンであるかというアレルゲン性は、分類のための機械学習法を用いた生物情報学ベースのアレルゲン予測ソフトウェアである ALLERTOP によって予測された。ALLERTOP には、ロジスティック回帰（LR）、決定木（DT）、ナイーブベイズ（NB）、ランダムフォレスト（RF）、多層パーセプトロン（MLP）、および k 近傍法（kNN）が含まれる。その結果は、5つの抗原配列は非アレルゲンであることを示している。表 4（アレルゲン性）を参照されたい。

20

【0247】

様々な組織における交差反応性または自己免疫副作用の発動は、養子免疫療法における安全性に重要な影響を及ぼす。これらの新規抗原がヒトプロテオームと交差反応性を有するかどうかを評価するために、基本的なローカルアライメント検索ツールである blast 検索を用いて配列の相同性分析を行った。これらの5つの抗原配列では、宿主の交差反応性は確認されなかった。表 4（宿主交差反応性）を参照されたい。

30

ソフトウェア／ツール：

【0248】

本明細書に記載された設計の実行に利用されたソフトウェアツールには、以下のものが含まれる。

ALLERTOP (AllerTOP v. 2 -- a server for silicoprediction of allergens, J Mol Model. 2014年6月、20(6):2278. doi:10.1007/s00894-014-2278-5. 電子出版2014年5月31日、を参照のこと。)

ANN (Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations, Protein Sci. 2003年5月、12(5):1007-17、を参照のこと)

40

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA)

CLUSTALW2 (EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK. +4

50

4 (0) 1 2 2 3 4 9 4 4 4 4)

GENEJOUS V11.1.5 (geneious.com/biopharma/を参照のこと)

IEDB CONSENSUS (A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T (CD8+) -cell response to vaccinia virus、Nat Biotechnol. 2006年7月、24 (7) : 817-9. 電子出版2006年6月11日を参照のこと)

NETMHCPAN4.0 (Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system、Bioinformatics. 2016年2月15日、32 (4) : 511-7. doi:10.1093/bioinformatics/btv639. 電子出版2015年10月29日を参照のこと)

PHYRE2 (The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis、2015年5月7日、nature.com/articles/nprot.2015.053、doi.org/10.1038/nprot.2015.053. を参照のこと)

PYMOLE MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM V2.1.1 (pymol.org/2/、sourceforge.net/projects/pymol/supportを参照のこと)

VAXJEN (VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines、BMC Bioinformatics. 2007年1月5日、8 : 4. を参照のこと)

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. 抗原設計および構成成分の用語体系

割り当てられた 成分シンボル	配列番号 および 配列タイプ	記述名	配列タイプ
A	1 AA	HPV6 E2*	アミノ酸
	2 DNA	HPV6 E2*	核酸
B	3 AA	HPV6 E4 1-56	アミノ酸
	4 DNA	HPV6 E4 1-56	核酸
C	5 AA	HPV6 E7 70-98	アミノ酸
	6 DNA	HPV6 E7 70-98	核酸
D	7 AA	HPV6 E4 36-90	アミノ酸
	8 DNA	HPV6 E4 36-90	核酸
E	9 AA	HPV6 E7 1-58	アミノ酸
	10 DNA	HPV6 E7 1-58	核酸
F	11 AA	HPV6 E6*	アミノ酸
	12 DNA	HPV6 E6*	核酸
G	13 AA	HPV6 E2* 1-368 D E1_206-306	アミノ酸
	14 DNA	HPV6 E2* 1-368 D E1_206-306	核酸
H	15 AA	HPV6 E4 1-70 DE1 _21-50	アミノ酸
	16 DNA	HPV6 E4 1-70 DE1 _21-50	核酸
I	17 AA	HPV6 E4 51-70	アミノ酸
	18 DNA	HPV6 E4 51-70	核酸
	19 DNA	HPV6 E4 51-70	核酸
J	20 AA	HPV6 E6* 1-120 D el C-term	アミノ酸
	21 DNA	HPV6 E6* 1-120 D el C-term	核酸

10

20

30

40

50

K	22 AA	HPV6 E7 1・98 Del —40—75	アミノ酸
	23 DNA	HPV6 E7 1・98 Del —40—75	核酸
L	24 AA	HPV6 E2* 1・205	アミノ酸
	25 DNA	HPV6 E2* 1・205	核酸
M	26 AA	HPV6 E4 1・20	アミノ酸
	27 DNA	HPV6 E4 1・20	核酸
N	28 AA	HPV6 E2* 307—368	アミノ酸
	29 DNA	HPV6 E2* 307—368	核酸
O	30 AA	HPV6 E4 エピトープ—第1	アミノ酸
	31 DNA	HPV6 E4 エピトープ—第1	核酸
P	32 AA	HPV6 E4 エピトープ—第2	アミノ酸
	33 DNA	HPV6 E4 エピトープ—第2	核酸
L1	34 AA	剛直性リンカー	アミノ酸
	35 DNA	剛直性リンカー	核酸
	36 DNA	剛直性リンカー	核酸
	37 DNA	剛直性リンカー	核酸
	38 DNA	剛直性リンカー	核酸
	39 DNA	剛直性リンカー	核酸
L2	40 AA	HPV6 E6 エピトープリンカー	アミノ酸
	41 DNA	HPV6 E6 エピトープリンカー	核酸
L3	42 AA	HPV11 E6 エピトープリンカー	アミノ酸
	43 DNA	HPV11 E6 エピトープリンカー	核酸
	44 DNA	HPV11 E6 エピトープリンカー	核酸
L4	45 AA	HPV11 E7 エピトープリンカー	アミノ酸

10

20

30

40

50

	46 DNA	HPV11 E7 エピトープリン カー	核酸
	47 DNA	HPV11 E7 エピトープリン カー	核酸
L5	48 AA	HPV16 E6 アゴニストエン ハンサー第1	アミノ酸
	49 DNA	HPV16 E6 アゴニストエン ハンサー第1	核酸
L6	50 AA	HPV16 E6 アゴニストエン ハンサー第2	アミノ酸
	51 DNA	HPV16 E6 アゴニストエン ハンサー第2	核酸
L7	52 AA	HPV16 E7 アゴニストエン ハンサー	アミノ酸
	53 DNA	HPV16 E7 アゴニストエン ハンサー	核酸
	54 DNA	HPV16 E7 アゴニストエン ハンサー	核酸
	55 DNA	HPV16 E7 アゴニストエン ハンサー	核酸
	56 DNA	HPV16 E7 アゴニストエン ハンサー	核酸
L8	57 AA	可撓性リンカー	アミノ酸
	58 DNA	可撓性リンカー	核酸
	59 DNA	可撓性リンカー	核酸
	60 DNA	可撓性リンカー	核酸
	61 DNA	可撓性リンカー	核酸
	62 DNA	可撓性リンカー	核酸
	63 DNA	可撓性リンカー	核酸
	64 DNA	可撓性リンカー	核酸
	65 DNA	可撓性リンカー	核酸
D1	66 AA	設計番号1	アミノ酸
	67 DNA	設計番号1	核酸
D2	68 AA	設計番号2	アミノ酸
	69 DNA	設計番号2	核酸

10

20

30

40

50

D 3	7 0 A A	設計番号 3	アミノ酸
	7 1 D N A	設計番号 3	核酸
D 4	7 2 A A	設計番号 4	アミノ酸
	7 3 D N A	設計番号 4	核酸
D 5	7 4 A A	設計番号 5	アミノ酸
	7 5 D N A	設計番号 5	核酸
L 9	7 6 A A	剛直性リンカーポリペプチド	アミノ酸
	7 7 D N A	剛直性リンカーDNA	核酸
	7 8 D N A	剛直性リンカーDNA	核酸
	7 9 D N A	剛直性リンカーDNA	核酸
	8 0 D N A	剛直性リンカーDNA	核酸
	8 1 D N A	剛直性リンカーDNA	核酸

10

20

30

40

50

【0249】

発明の追加の実施形態

本発明の実施形態（「E」）としては以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

E 1．低がんリスクヒト乳頭腫ウイルス（HPV）タンパク質に由来する少なくとも1つのエピトープおよび高がんリスクHPVタンパク質に由来する少なくとも1つのエピトープを含む非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

E 2．ヒト乳頭腫ウイルス6型（HPV6）由来の少なくとも1つのエピトープおよびヒト乳頭腫ウイルス11型（HPV11）由来の少なくとも1つのエピトープを含む非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

E 3．非天然ポリペプチドが、ヒト乳頭腫ウイルス16型（HPV16）由来の少なくとも1つのエピトープをさらに含む、E 2に記載のポリヌクレオチド。

E 4．以下のいずれか4つに由来するHPVエピトープを含む非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド：

HPV 6 E 2 タンパク質、

HPV 6 E 4 タンパク質、

HPV 6 E 6 タンパク質、

HPV 6 E 7 タンパク質、

HPV 11 E 6 タンパク質、および／または

HPV 11 E 7 タンパク質、

ここで、ポリペプチドは、少なくとも1つのHPV6エピトープおよび少なくとも1つのHPV11エピトープを含む。

E 5．非天然ポリペプチドが、HPV16タンパク質に由来する少なくとも1つのエピトープをさらに含む、E 4に記載のポリヌクレオチド。

E 6. 以下のいずれか 3 つに由来する H P V エピトープを含む非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド:

- H P V 6 E 2 タンパク質、
- H P V 6 E 4 タンパク質、
- H P V 6 E 6 タンパク質、または
- H P V 6 E 7 タンパク質、

ここで、H P V エピトープは H P V ゲノムによって自然にコードされていないアミノ酸配列によって連結されている。

E 7. 以下の各々に由来する H P V エピトープを含む非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド:

- H P V 6 E 2 タンパク質、
- H P V 6 E 4 タンパク質、
- H P V 6 E 6 タンパク質、および
- H P V 6 E 7 タンパク質、

ここで、H P V エピトープは H P V ゲノムによって天然ではコードされていないアミノ酸配列によって連結されている。

E 8. H P V エピトープの少なくとも 2 つを連結するアミノ酸配列が、配列番号 3 4 の配列を含む、E 6 または E 7 に記載のポリヌクレオチド。

E 9. 非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記非天然ポリペプチドが、以下に由来する H P V エピトープを含むポリヌクレオチド。

a) H P V 6 E 2 タンパク質、H P V 6 E 4 タンパク質、H P V 6 E 6 タンパク質、H P V 6 E 7 タンパク質、H P V 1 1 E 6 タンパク質、および H P V 1 1 E 7 タンパク質、または、

b) H P V 6 E 2 タンパク質、H P V 6 E 4 タンパク質、H P V 6 E 6 タンパク質、H P V 6 E 7 タンパク質、H P V 1 1 E 6 タンパク質、H P V 1 1 E 7 タンパク質、H P V 1 6 E 6 タンパク質、および H P V 1 6 E 7 タンパク質。

E 1 0. 1 つ以上のポリペプチドリンカーをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド配列をさらに含み、ここで、1 つ以上のリンカーは、以下のアミノ酸配列を含む、E 9 に記載のポリヌクレオチド。

- a) 配列番号 4 5、
- b) 配列番号 4 2、
- c) 配列番号 4 0、
- d) 配列番号 3 4、
- e) 配列番号 5 2、
- f) 配列番号 4 8、
- g) 配列番号 5 0、および／または、
- h) 配列番号 5 7。

E 1 1. 非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記非天然ポリペプチドが、

a) H P V 6 E 2 タンパク質、H P V 6 E 4 タンパク質、H P V 6 E 6 タンパク質、H P V 6 E 7 タンパク質、H P V 1 1 E 6 タンパク質、および H P V 1 1 E 7 タンパク質に由来する H P V エピトープを含み、ここで、前記ポリペプチドは配列番号 4 5、配列番号 4 2、または配列番号 4 0 の少なくとも 1 つのリンカー配列をさらに含むか、

b) H P V 6 E 2 タンパク質、H P V 6 E 4 タンパク質、H P V 6 E 6 タンパク質、H P V 6 E 7 タンパク質、H P V 1 1 E 6 タンパク質、および H P V 1 1 E 7 タンパク質に由来する H P V エピトープを含み、ここで、前記ポリペプチドは配列番号 3 4 の少なくとも 1 つのリンカー配列をさらに含むか、

c) H P V 6 E 2 タンパク質、H P V 6 E 4 タンパク質、H P V 6 E 6 タンパク質、H P V 1 1 E 6 タンパク質、H P V 1 1 E 7 タンパク質、H P V 1 6 E

10

20

30

40

50

6 タンパク質、HPV 16 E7 タンパク質に由来する HPV エピトープを含み、ここで、前記ポリペプチドは配列番号 52、配列番号 48、または配列番号 50 の少なくとも 1 つのリンカー配列をさらに含むか、あるいは、

d) HPV 6 E2 タンパク質、HPV 6 E4 タンパク質、HPV 6 E6 タンパク質、HPV 11 E6 タンパク質、HPV 11 E7 タンパク質、HPV 16 E6 タンパク質、および HPV 16 E7 タンパク質に由来する HPV エピトープを含み、ここで、前記ポリペプチドは配列番号 57 の少なくとも 1 つのリンカー配列をさらに含む、
ポリヌクレオチド。

E12. 以下の配列に対して、少なくとも 80% 同一、少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 98% 同一または 100% 同一の配列を含むポリヌクレオチド。

- a) 配列番号 67、
- b) 配列番号 69、
- c) 配列番号 71、
- d) 配列番号 73、または、
- e) 配列番号 75。

E13. 以下の配列に対して、少なくとも 80% 同一のアミノ酸配列を含む非天然ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチド。

- a) 配列番号 66、
- b) 配列番号 68、
- c) 配列番号 70、
- d) 配列番号 72、または、
- e) 配列番号 74。

E14. アミノ酸配列が、a)、b)、c)、d)、または e) のいずれか 1 つと少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 98% 同一、または 100% 同一である、E13 に記載のポリヌクレオチド。

E15. 1 つ以上の HPV エピトープが、対応する野生型 HPV 配列と比較して、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸配列欠失、アミノ酸配列分離またはアミノ酸配列再編成を含み、前記アミノ酸配列置換、挿入、欠失、分離または再編成が、天然の HPV 発癌性生物活性または必須のウイルス複製機能を除去するように機能する、E1～E14 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド。

E16. 前記ポリヌクレオチドが、哺乳動物における HPV 6 抗原または HPV 11 抗原に対する生体内免疫応答を生成するのに有用であるか、あるいは前記ポリヌクレオチドが、哺乳動物における HPV 6 抗原および HPV 11 抗原に対する生体内免疫応答を生成するのに有用である、E1～E15 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド。

E17. E1～E16 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

E18. E1～E16 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドをコードするベクター。

E19. 前記ベクターが、プラスミド、ウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、E18 に記載のベクター。

E20. 前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、E19 に記載のベクター。

E21. 前記アデノウイルスベクターが、非ヒト霊長類ウイルスベクターである、E20 に記載のベクター。

E22. 薬学的に許容される担体と、E1～E16 のいずれか 1 つのポリヌクレオチド、E17 のポリペプチド、または E18～E21 のベクターを含む、組成物またはワクチン。

E23. HPV 6 および HPV 11 の組成物、ワクチン、または組成物もしくはワクチン

10

20

30

40

50

ンで使用するための非天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを生成する方法であって、天然のHPVポリペプチドの誘導体をコードするようにHPVポリヌクレオチド配列を操作することを含み、ウイルスポリペプチドの少なくとも1つは発癌性生物活性または必須ウイルス複製機能を有しており、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失、挿入、分離、または再編成の組み合わせは、組成物、ワクチンを介して発現されるか、またはポリヌクレオチドによってコードされて誘導体ウイルスポリペプチドを生成し、HPV発癌性生物活性または必須HPV複製機能が誘導体ウイルスポリペプチドから除去されるが、誘導体ウイルスポリペプチドに対する宿主免疫応答性および／または免疫原性活性は、対応する天然のウイルスポリペプチドと比較して保持または強化される、方法。

E 2 4 . ポリヌクレオチドまたは誘導体ウイルスポリペプチドが、生体内抗原エピトープ認識のインシリコ予測、生体内アレルゲン認識のインシリコ予測、ヒトプロテオーム交差反応配列相同性解析、アミノ酸配列生理化学的特性解析、3次元(3D)構造解析、発癌性および／またはウイルス機能の不活性化変異、欠失、置換および／または再編成の特定、のいずれか2つ以上と組み合わせた、ウイルス抗原を同定することを含むステップを利用して設計される、E 2 3に記載の方法。

E 2 5 . 誘導体ウイルスポリペプチドの免疫原性、免疫保護効果、発癌性、またはウイルス機能の生体外または生体内評価をさらに含む、E 2 4に記載の方法。

E 2 6 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5のうちの任意の2つ以上の成分の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 2 7 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、OまたはPのうちの任意の2つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 2 8 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分L 1、L 2、L 3、L 4、L 5、L 6、L 7、L 8またはL 9のうちの任意の1つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 2 9 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分A、B、C、D、E、またはFのうちの任意の2つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 0 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分A、B、C、D、E、F、L 1、L 2、L 3、またはL 4のうちの任意の2つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 1 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分A、B、C、D、E、F、またはL 1のうちの任意の2つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 2 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分A、B、C、D、E、F、L 2、L 3、またはL 4のうちの任意の2つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 3 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが表5の成分A、B、C、D、E、F、およびL 1の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 4 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分A、B、C、D、E、F、L 2、L 3およびL 4の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 5 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表5の成分G、H、I、J、またはKのうちの任意の2つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

E 3 6 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 G、H、I、J、K、L 1、L 2、または L 4 のうちの任意の 2 つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 7 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 G、H、I、J、および K の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 8 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 G、H、I、J、K、L 1、L 2、および L 4 の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 3 9 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 I、L、M、または N のうちの任意の 2 つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 0 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 I、L、M、N、L 2、L 4、L 5、L 6、または L 7 のうちの任意の 2 つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 1 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 I、L、M、および N の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 2 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 I、L、M、N、L 2、L 4、L 5、L 6、および L 7 の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 3 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 N、O、または P のうちの任意の 2 つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 4 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 N、O、P、L 2、L 3、L 4、L 5、L 6、L 7 または L 8 のうちの任意の 2 つ以上の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 5 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 N、O、および P の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 6 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 N、O、P、L 2、L 3、L 4、L 5、L 6、L 7、および L 8 の配列を含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 7 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 A、B、C、D、E、F、および L 1 の配列を任意の順番で含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 8 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の配列成分を A、L 1、B、L 1、C、L 1、D、L 1、E、L 1、および F の配列順に含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 4 9 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 A、B、C、D、E、F、L 2、L 3、および L 4 の配列を任意の順番で含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 0 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の配列成分を A、L 4、B、L 3、C、L 2、D、L 3、E、L 4、および F の配列順に含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 1 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 G、H、I、J、K、L 1、L 2、および L 4 の配列を任意の順番で含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 2 . 非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまた

10

20

30

40

50

はポリヌクレオチドが、表 5 の配列成分を G、L 1、L 2、L 1、H、L 1、L 4、L 1、I、L 1、J、L 1、および K の配列順に含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 3．非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 I、L、M、N、L 2、L 4、L 5、L 6、および L 7 の配列を任意の順番で含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 4．非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の配列成分を L、L 7、L 2、L 7、M、L 5、L 4、L 6、I、L 7、L 2、L 7、および N の配列順に含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

10

E 5 5．非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の成分 N、O、P、L 2、L 3、L 4、L 5、L 6、L 7、および L 8 の配列を任意の順番で含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 6．非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、表 5 の配列成分を N、L 8、L 2、L 8、O、L 8、P、L 8、L 4、L 8、L 3、L 8、L 5、L 8、L 6、L 8、および L 7 の配列順に含む、非天然ポリペプチドまたはポリヌクレオチド。

E 5 7．任意の 1 つ以上の L 1 配列成分が、表 5 の L 9 配列成分で置換されている、E 2 6～E 5 6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチド。

E 5 8．下記の A A サブセット番号 1、A A サブセット番号 2、A A サブセット番号 3、A A サブセット番号 4、または A A サブセット番号 5 のうちの任意の 2 つ以上の配列を含むポリペプチドであって、これらの配列を任意の順番か、または以下に示すような順番で含む、ポリペプチド。

20

E 5 9．下記の A A サブセット番号 1、A A サブセット番号 2、A A サブセット番号 3、A A サブセット番号 4、または A A サブセット番号 5 の配列を含むポリペプチドであって、これらの配列を任意の順番か、または以下に示すような順番で含む、ポリペプチド。

E 6 0．下記の A A サブセット番号 1、A A サブセット番号 2、A A サブセット番号 3、A A サブセット番号 4、または A A サブセット番号 5 のうちの任意の 2 つ以上の配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドであって、これらの配列を任意の順番か、または以下に示すような順番で含む、ポリヌクレオチド。

30

E 6 1．下記の A A サブセット番号 1、A A サブセット番号 2、A A サブセット番号 3、A A サブセット番号 4、または A A サブセット番号 5 の配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドであって、これらの配列を任意の順番か、または以下に示すような順番で含む、ポリヌクレオチド。

A A サブセット番号 1：

配列番号 1 (HPV 6 E 2*)、
配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
配列番号 3 (HPV 6 E 4 1-56)、
配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
配列番号 5 (HPV 6 E 7 70-98)、
配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
配列番号 7 (HPV 6 E 4 36-90)、
配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
配列番号 9 (HPV 6 E 7 1-58)、
配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、および／または、
配列番号 1 1 (HPV 6 E 6*)。

40

A A サブセット番号 2：

配列番号 1 (HPV 6 E 2*)、
配列番号 4 5 (HPV 1 1 E 7 エピトープリンカー)、
配列番号 3 (HPV 6 E 4)、

50

配列番号 4 2 (HPV 1 1 E 6 リンカー)、
 配列番号 5 (HPV 6 E 7)、
 配列番号 4 0 (HPV 6 E 6 リンカー)、
 配列番号 7 (HPV 6 E 4)、
 配列番号 4 2 (HPV 1 1 E 6 リンカー)、
 配列番号 9 (HPV 6 E 7)、
 配列番号 4 5 (HPV 1 1 E 7 エピトープリンカー)、および/または、
 配列番号 1 1 (HPV 6 E 6*)。

A A サブセット番号 3 :

配列番号 1 3 (HPV 6 E 2* 1-3 6 8 (Del 2 0 6-3 0 6))、
 配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
 配列番号 4 2 (HPV 1 1 E 6 エピトープリンカー)、
 配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
 配列番号 1 5 (HPV 6 E 4 1-7 0 (Del 2 1-5 0))、
 配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
 配列番号 4 5 (HPV 1 1 E 7 エピトープリンカー)、
 配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
 配列番号 1 7 (HPV 6 E 4 5 1-7 0)、
 配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、
 配列番号 2 0 (HPV 6 E 6* 1-1 2 0 (Del C-term))、
 配列番号 3 4 (剛直性リンカー)、および/または、
 配列番号 2 2 (HPV 6 E 7 1-9 8 (Del 4 0-7 5))。

A A サブセット番号 4

配列番号 2 4 (HPV 6 E 2* 1-2 0 5)、
 配列番号 5 2 (HPV 1 6 E 7 アゴニストエンハンサーリンカー)、
 配列番号 4 2 (HPV 1 1 E 6 エピトープリンカー)、
 配列番号 5 2 (HPV 1 6 E 7 アゴニストエンハンサーリンカー)、
 配列番号 2 6 (HPV 6 E 4 1-2 0)、
 配列番号 4 8 (HPV 1 6 E 6 アゴニストエンハンサー第 1 リンカー)、
 配列番号 4 5 (HPV 1 1 E 7 エピトープリンカー)、
 配列番号 5 0 (HPV 1 6 E 6 アゴニストエンハンサー第 2 リンカー)、
 配列番号 1 7 (HPV 6 E 4 5 1-7 0)、
 配列番号 5 2 (HPV 1 6 E 7 アゴニストエンハンサーリンカー)、
 配列番号 4 0 (HPV 6 E 6 エピトープリンカー)、
 配列番号 5 2 (HPV 1 6 E 7 アゴニストエンハンサーリンカー)、および

/または、

配列番号 2 8 (HPV 6 E 2* 3 0 7-3 6 8)。

A A サブセット番号 5 :

配列番号 2 8 (HPV 6 E 2*)、
 配列番号 5 7 (可撓性リンカー)、
 配列番号 4 0 (HPV 6 E 6 エピトープリンカー)、
 配列番号 5 7 (可撓性リンカー)、
 配列番号 3 0 (HPV 6 E 4 エピトープ第 1)、
 配列番号 5 7 (可撓性リンカー)、
 配列番号 3 2 (HPV 6 E 4 エピトープ第 2)、
 配列番号 5 7 (可撓性リンカー)、
 配列番号 4 5 (HPV 1 1 E 7 エピトープリンカー)、
 配列番号 5 7 (可撓性リンカー)、
 配列番号 4 2 (HPV 1 1 E 6 エピトープリンカー)、
 配列番号 5 7 (可撓性リンカー)、

10

20

30

40

50

配列番号 48 (HPV16 E6 アゴニストエンハンサー第1)
 配列番号 57 (可撓性リンカー)、
 配列番号 50 (HPV16 E6 アゴニストエンハンサー第2)、
 配列番号 57 (可撓性リンカー)、および／または、
 配列番号 52 (HPV16 E7 アゴニストエンハンサー)。

E62. 下記のDNAサブセット番号1、DNAサブセット番号2、DNAサブセット番号3、DNAサブセット番号4、またはDNAサブセット番号5のうちの任意の2つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドであって、これらの配列を任意の順番か、または以下に示すような順番で含む、ポリヌクレオチド。

E63. 下記のDNAサブセット番号1、DNAサブセット番号2、DNAサブセット番号3、DNAサブセット番号4、またはDNAサブセット番号5の核酸配列を含む、ポリヌクレオチドであって、これらの配列を任意の順番か、または以下に示すような順番で含む、ポリヌクレオチド。

DNAサブセット番号1:

配列番号 2 (HPV6 E2*)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 4 (HPV6 E4 1-56)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 6 (HPV6 E7 70-98)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 8 (HPV6 E4 36-90)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 10 (HPV6 E7 1-58)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、および／または、

配列番号 12 (HPV6 E6*)。

DNAサブセット番号2

配列番号 2 (HPV6 E2*)、
 配列番号 46または47 (HPV11 E7エピトープリンカー)、
 配列番号 4 (HPV6 E4)、
 配列番号 43または44 (HPV11 E6 リンカー)、
 配列番号 6 (HPV6 E7)、
 配列番号 41 (HPV6 E6 リンカー)、
 配列番号 8 (HPV6 E4)、
 配列番号 43または44 (HPV11 E6 リンカー)、
 配列番号 10 (HPV6 E7 1-58)、
 配列番号 46または47 (HPV11 E7 エピトープリンカー)、および／

または、

配列番号 12 (HPV6 E6*)。

DNAサブセット番号3

配列番号 14 (HPV6 E2* 1-368 (Del 206-306))、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 43または44 (HPV11 E6 エピトープリンカー)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 16 (HPV6 E4 1-70 (Del 21-50))、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 46または47 (HPV11 E7 エピトープリンカー)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、
 配列番号 18または19 (HPV6 E4 51-70)、
 配列番号 35、36、37、38または39 (剛直性リンカー)、

配列番号 21 (HPV6 E6* 1-120 (Del C-term))、
配列番号 35、36、37、38 または 39 (剛直性リンカー)、および／または、

配列番号 23 (HPV6 E7 1-98 (Del 40-75))。

DNA サブセット番号 4

配列番号 25 (HPV6 E2* 1-205)、
配列番号 53、54、55、または 56 (HPV16 E7 アゴニストエンハンサーリンカー)、
配列番号 43 または 44 (HPV11 E6 エピトープリンカー)、
配列番号 53、54、55、または 56 (HPV16 E7 アゴニストエンハンサーリンカー)、
配列番号 27 (HPV6 E4 1-20)、
配列番号 49 (HPV16 E6 アゴニストエンハンサー第1リンカー)、
配列番号 46 または 47 (HPV11 E7 エピトープリンカー)、
配列番号 51 (HPV16 E6 アゴニストエンハンサー第2リンカー)、
配列番号 18 または 19 (HPV6 E4 51-70)、
配列番号 53、54、55、または 56 (HPV16 E7 アゴニストエンハンサーリンカー)、
配列番号 41 (HPV6 E6 エピトープリンカー)、
配列番号 53、54、55、または 56 (HPV16 E7 アゴニストエンハンサーリンカー)、および／または、
配列番号 29 (HPV6 E2* 307-368)。

DNA サブセット番号 5：

配列番号 29 (HPV6 E2*)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 41 (HPV6 E6 エピトープリンカー)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 31 (HPV6 E4 エピトープ第1)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 33 (HPV6 E4 エピトープ第2)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 46 または 47 (HPV11 E7 エピトープリンカー)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 43 または 44 (HPV11 E6 エピトープリンカー)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 49 (HPV16 E6 アゴニストエンハンサー第1)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、
配列番号 51 (HPV16 E6 アゴニストエンハンサー第2)、
配列番号 58、59、60、61、62、63、64 または 65 (可撓性リンカー)、および／または、
配列番号 53、54、55、または 56 (HPV16 E7 アゴニストエンハンサー)。

E64、E1～E16 および E26～E63 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド

をコードするベクター。

E 6 5 . ベクターが、プラスミド、ウイルスベクター、または非ウイルスベクターである、E 6 4 に記載のベクター。

E 6 6 . ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、E 6 5 に記載のベクター。

E 6 7 . アデノウイルスベクターが非ヒト霊長類ウイルスベクターである、E 6 6 に記載のベクター。

E 6 8 . 薬学的に許容される担体と、E 1 ~ E 1 6 および E 2 6 ~ E 6 3 に記載のいずれか1つのポリヌクレオチド、E 1 7 および E 2 6 ~ E 5 9 に記載のいずれか1つのポリペプチド、またはE 1 8 ~ E 2 1 および E 6 4 ~ E 6 7 に記載のいずれか1つのベクター、を含む組成物またはワクチン。

E 6 9 . E 1 ~ E 2 2 および E 2 6 ~ E 6 8 のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、組成物またはワクチンであって、前記ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、組成物またはワクチンが、抗HPV免疫応答を誘導することができる、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、組成物またはワクチン。

E 7 0 . HPV 関連疾患または障害の治療のための、E 6 9 に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、組成物またはワクチンの使用。

E 7 1 . E 7 0 に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、組成物またはワクチンの使用であって、疾患または障害が、HPV 6、HPV 1 1 またはHPV 1 6 関連疾患または障害である、使用。

E 7 2 . E 7 0 に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、組成物またはワクチンの使用であって、疾患または障害が再発性呼吸器乳頭腫症（RRP）である、使用。

【0250】

参考文献

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許および特許出願は、まさに個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に援用される。参照により援用された情報源で行われた開示が本出願の開示と矛盾する場合、本出願の開示がそのような情報源を管理し、優先するものとみなされるものとする。

Abbate, E. A., Berger, J. M., & Botchan, M. R. (2004). The X-ray structure of the papilloma virus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes & Development*, 18 (16), 1998-1996. doi:10.1101/gad.1220104.

Ahn, J., Peng, S., Hung, C. F., Roden, R., Wu, T. C., & Best, S. R. (2017). Immunologic responses to a novel DNA vaccine targeting human papillomavirus-11. *E6E7. The Laryngoscope*, 127 (12), 2713-2720. doi:10.1002/Lary.26737.

Anderson, Karen S., et al. (2015). Biologic predictors of serologic responses to HPV in oropharyngeal cancer: The HOTSPOT study. *Oral Oncology*, 51 (8): 751-758. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.05.007

Brokaw, J. L., Blanco, M., & McBride, A. A. (1996). Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *Journal of Virology*, 70 (1), 23-29.

Graham, S. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*, 131 (17), 2201–2221. doi:10.1042/CS20160786.

Holm, A., Nagaeva, O., Nagaev, I., Loizou, C., Laurell, G., Mincheva-Nilsson, L., Olofsson, K. (2017). Lymphocyte profile and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with recurrent respiratory papillomatosis suggest dysregulated cytokine mRNA response and impaired cytotoxic capacity. *Immunity, Inflammation and Disease*, 5 (4), 541–550. doi:10.1002/iid3.188.

Oh, ST, Longworth, MS, Laimins, LA. (2004) Role of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *Journal of Virology*, 78 (5), 2620–2626. doi:10.1128/jvi.78.5.2620–2626.2004.

Seedat, R., Combrinck, C., Bester, P., Lee, J., & Burt, F. (2016). Determination of the complete Genome and functional analysis of HPV6 isolate VBD19/10 from a patient with aggressive recurrent respiratory papillomavirus. *Epidemiology and Infection*, 144 (10), 2128–2135. doi:10.1017/S0950268816000388.

Shin, T. H., Pankhong, P., Yan, J., Khan, A. S., Sardesai, N. Y., & Weiner, D. B. (2012). Induction of robust cellular immunity against HPV6 and HPV11 in mice by DNA vaccine encoding for E6/E7 antigen. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8 (4), 470–478. doi:10.4161/hv.19180.

Trimble, C. L., Morrow, M. P., Kraynyak, K. A., Shen, X., Dallas, M., Yan, J., Bagarazzi, M. L. (2015). Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet (London, England)*, 386 (10008), 2078–2088. doi:10.1016/S0140-6736(15)00239-1.

Wang, Y., Coulombe, R., Cameron, DR., Thauvette, L., Massariol, M., Amon, LM., Fink, D., Titolo, S., Welchner, E., Yoakim, C., Arachambault, J. & White, P. W. (2004). Crystal structure of

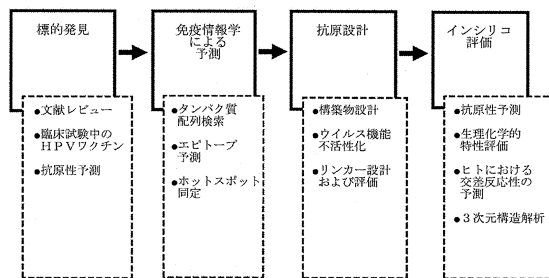
the E2 domain of human papillomavirus type 11 bound to a protein interaction inhibitor. Journal of Biological Chemistry. 279 (8), 6976-6985. doi:10.1074/jbc.M311376200.

Yiu, Y., Fayson, S., Smith, H., & Matrka, L. (2019). Implementation of Routine HPV Vaccination in the Management of Recurrent Respiratory Papillomatosis. Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology, 128 (4), 309-315.

【図面】

【図1】

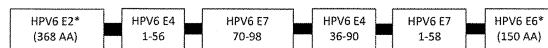
図1: HPV6/11抗原設計ワークフロー



【図2A-C】

図2: A-C 設計1のHPV6/11抗原概略図および3次元モデル

2A) 設計1

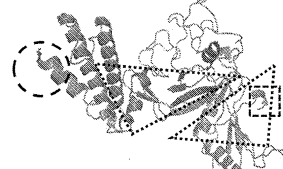


剛直性リンカー (i, ii, iii, iv, v) = ■

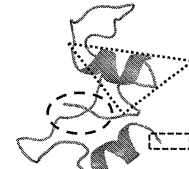
- i) EAAAKEAAAK
- ii) EAAAKEAAAK
- iii) EAAAKEAAAK
- iv) EAAAKEAAAK
- v) EAAAKEAAAK

設計1での各サブユニットの相関性モデル

2B)



2C)



HPV6 E2の突然変異1-368

* C-末端はエピトープ領域の一部である



= 予測されるエピトープ; 点線の三角形



= N-末端; 破線の円



= C-末端; 破線の枠

10

20

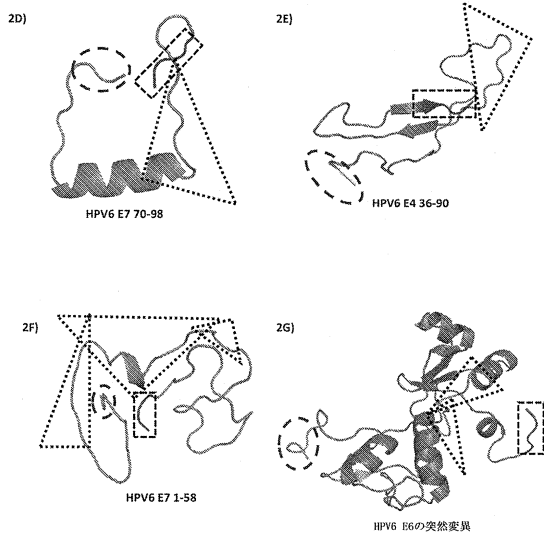
30

40

50

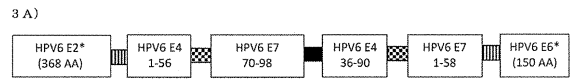
【図 2 D - G】

図 2 : D-G 設計 1 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図および 3 次元モデル



【図 3 A - B】

図 3 : A-B 設計 2 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図



ーサブユニットの相同性モデルは設計 1 と同一である

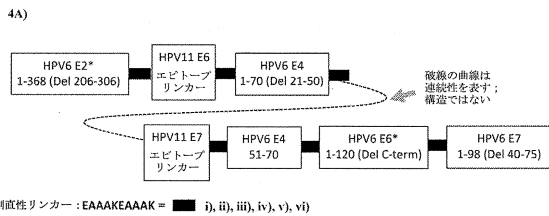
3 B) 設計 2 リンカー

- i) HCYEQLEDSSSEVD =  HPV11 E7 エピトープリンカー
- ii) TAEIYAYAYKNLKV =  HPV11 E6 エピトープリンカー
- iii) TAEIYAYAYKNLKV =  HPV6 E6 エピトープリンカー
- iv) TAEIYAYAYKNLKV =  HPV11 E6 エピトープリンカー
- v) HCYEQLEDSSSEVD =  HPV11 E7 エピトープリンカー

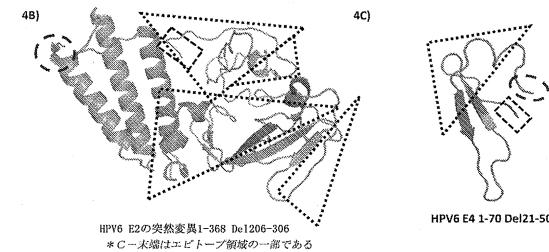
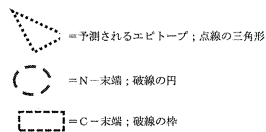
10

【図 4 A - C】

図 4 : A-C 設計 3 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図および 3 次元モデル

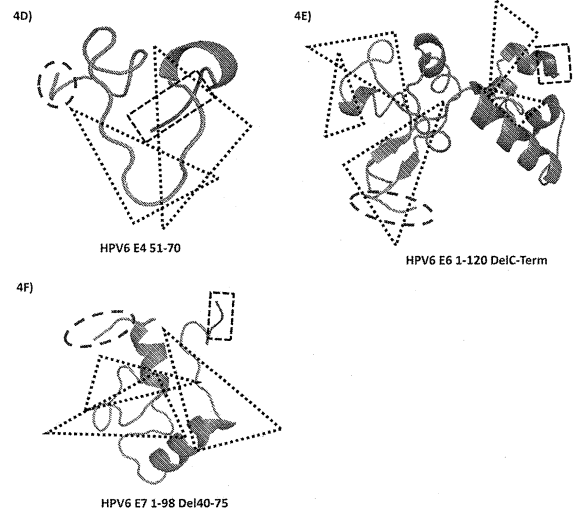


設計 3 での各サブユニットの相同性モデル



【図 4 D - F】

図 4 : D-F 設計 3 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図および 3 次元モデル



20

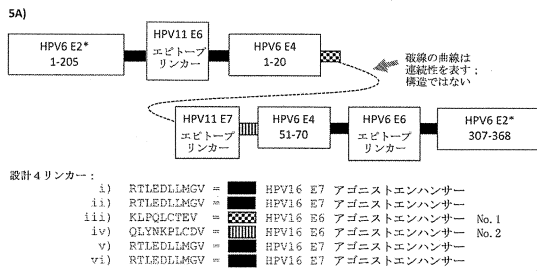
30

40

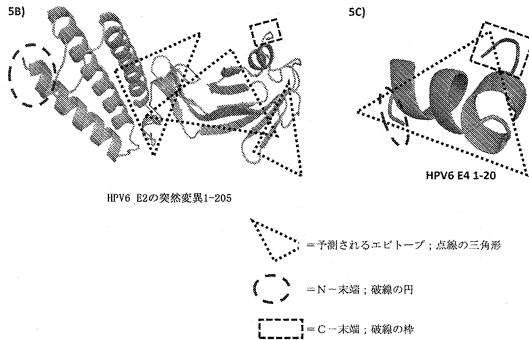
50

【図 5 A - C】

図 5 : A - C 設計 3 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図および 3 次元モデル

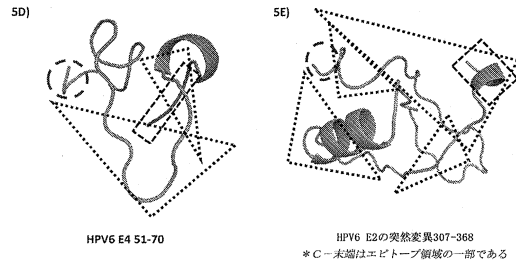


設計 4 での各サブユニットの相溶性モデル



【図 5 D - E】

図 5 : D - E 設計 4 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図および 3 次元モデル



10

20

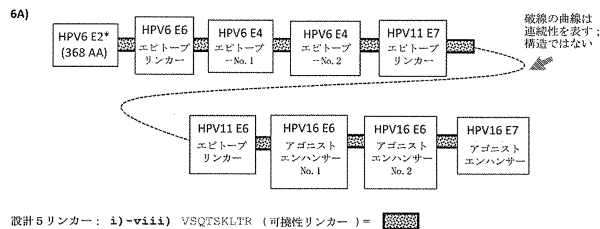
30

40

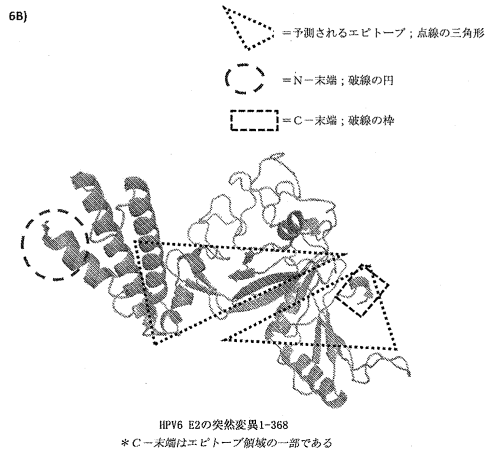
50

【図 6 A - B】

図 6 : A - B 設計 5 の HPV 6 / 1 1 抗原概略図および 3 次元モデル



設計 5 での各サブユニットの相溶性モデル



【配列表】

2023550480000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/60605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61P 31/12; A61K 47/42; C12N 15/861; A61K 39/12; C12N 7/00 (2021.01)

CPC - A61K 39/12; C07K 14/005; C12N 15/861; A61K 47/42; A61K 2039/70; C12N 2710/20034; C12N 2710/20022; C12N 7/00; C12N 2710/10343; A61P 31/12

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	WO 2019/173465 A1 (INTREXON CORPORATION) 12 September 2019; Paragraphs [0002], [0006], [0007], [0093], [0095]-[0098], [0269]; claim 1	1, 2, 4, 11-13, 20-26 — 3, 5, 6, 27 — 8, 9, 10, 14, 16
Y	WO 2003/019143 A2 (MERCK & CO., INC.) 06 March 2003; Column 1, lines 16-17; column 5, lines 7-12; column 25, lines 9-13 and lines 16-18; Figure 10; Claims: 4, 7	5, /
Y	PALEFSKY. "Characterization of In Vivo Expression of the Human Papillomavirus Type 16 E4 Protein in Cervical Biopsy Tissues" 2132, 2133. The American Society for Clinical Investigation, Inc. Web. 22 January 1991; Page 2133, first column, second paragraph	3
Y	US 2012/0053509 A1 (WEINER DAVID B) 01 March 2012; Paragraphs: [0004], [0082], [0094]	6, 7, 27
A	SZARKA. "Intratypic variation of low risk human papillomavirus genotypes" 1-4. NCBI Blast. Web. 03 July 2019; Entire Document	8, 14
A	OLIVEIRA. "Characterization of high and low-risk human papillomavirus complete genomes isolated from cervical specimens in southern Brazil" 1-4. NCBI Blast. Web. 18 May 2017; Entire Document	8
A	JELEN. "Global genomic diversity of human papillomavirus type 6 (HPV6) based on 724 isolates and 190 complete genome sequences" 1-5. NCBI Blast. Web. 14 May 2014; Entire Document	8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2022 (28.03.2022)

Date of mailing of the international search report

APR 12 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/60605

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(a).

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:

-***Please See Supplemental Page-***

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 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.:
Group I+, Claims 1-27, HPV6 E2, HPV6 E4, HPV6 E6, HPV6 E7, HPV11 E6, HPV11 E7 (set of HPV epitopes), SEQ ID NO: 45 (linker sequence), SEQ ID NO: 69 (polynucleotide), SEQ ID NO: 68 (polypeptide)

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.

International application No.
PCT/US21/60605

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHWARZ. "NP_040299.1" 1-2. NCBI Blast. Web. 13 August 2018; Entire Document	9, 10, 14
A	KOCJAN. "CBY85434.1" 1-2. NCBI Blast. . 06 October 2011; Entire Document	9, 10

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/60605

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking.-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-27, HPV6 E2, HPV6 E4, HPV6 E6, HPV6 E7, HPV11 E6, HPV11 E7 (set of HPV epitopes), SEQ ID NO: 45 (linker sequence), SEQ ID NO: 69 (polynucleotide), SEQ ID NO: 68 (polypeptide), are directed to polynucleotides and polypeptides derived from Human Papilloma Viruses, as well as vectors, methods, compositions, vaccines, and uses related to them.

The polynucleotides, polypeptides, vectors, methods, compositions, vaccines, and uses of Claims 1-4, 5-10 (each in-part), 11-13, 14 (in-part), 16 (in-part), and 20-27 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise sets of epitopes, linkers, polynucleotides, and polypeptides encompassing HPV6 E2, HPV6 E4, HPV6 E6, HPV6 E7, HPV11 E6, HPV11 E7 (first exemplary set of HPV epitopes), SEQ ID NO: 45 (first exemplary linker sequence), SEQ ID NO: 69 (first exemplary polynucleotide), SEQ ID NO: 68 (first exemplary polypeptide).

Applicant is invited to elect additional sets of epitopes, linker sequences, polynucleotide sequences, and polypeptide sequences to be searched. Additional epitopes, linkers, and sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be HPV6 E2, HPV6 E4, HPV6 E6, HPV11 E6, HPV11 E7, HPV16 E6, HPV16 E7 (set of HPV epitopes).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the linker, polynucleotide, and polypeptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a polynucleotide encoding a non-naturally occurring polypeptide comprising at least one epitope derived from human papilloma virus 6 (HPV6) and at least one epitope derived from human papilloma virus 11 (HPV11); a polypeptide encoded by said polynucleotide; a vector comprising said polynucleotide; a composition or vaccine comprising a pharmaceutically acceptable carrier and said polynucleotide; use of said composition or vaccine to treat an HPV-associated disease or disorder; a polynucleotide encoding a non-naturally occurring polypeptide, wherein the non-naturally occurring polypeptide comprises HPV epitopes; a method of generating an HPV6 and HPV11 composition, vaccine or polynucleotide encoding a non-naturally occurring polypeptide for use in a composition or vaccine, the method comprising engineering HPV polynucleotide sequences to encode derivatives of naturally occurring HPV polypeptides, wherein at least one of the viral polypeptides has oncogenic biologic activity or an essential viral replication function, wherein a combination of one or more amino acid sequence substitutions, deletions, insertions, separations, or rearrangements are expressed via the composition, vaccine or encoded by the polynucleotide to generate derivative viral polypeptides, wherein HPV oncogenic biologic activity or essential HPV replication function is eliminated from the derivative viral polypeptides, but wherein host immune-responsiveness and/or immunogenic activity against the derivative viral polypeptides is retained or enhanced compared to the corresponding naturally occurring viral polypeptides; these shared technical features are previously disclosed by WO 2019/173465 A1 to INTREXON CORPORATION, et al. (hereinafter "Intrexon").

Intrexon discloses a polynucleotide encoding a non-naturally occurring polypeptide (a non-naturally occurring polynucleotide encoding an engineered HPV polypeptide; paragraph [0002], [0006]) comprising at least one epitope derived from a first strain of human papilloma virus and at least one epitope derived from a second strain of human papilloma virus (said HPV polypeptides comprise one or more HPV-16 epitopes and one or more HPV-18 epitopes; paragraph [0007]); a polypeptide encoded by said polynucleotide (a non-naturally occurring polynucleotide encoding an engineered polypeptide; paragraph [0002], [0006]); a vector comprising said polynucleotide (vector comprising any of the polynucleotides provided herein; paragraph [0009]); a composition or vaccine comprising a pharmaceutically acceptable carrier and said polynucleotide (a composition comprising the vaccine vector described herein, which comprises said polynucleotide; paragraphs [0009], [0136], [0227]); use of said composition or vaccine to treat an HPV-associated disease or disorder (the nucleic acid sequence may be used to prophylactically treat a mammal for a disease by administering as a vaccine against HPV-associated cancers; paragraphs [0004], [0136]); a polynucleotide encoding a non-naturally occurring polypeptide (a non-naturally occurring polynucleotide encoding an engineered polypeptide; paragraph [0002], [0006]), wherein the non-naturally occurring polypeptide comprises HPV epitopes (said engineered HPV polypeptides comprise one or more HPV-16 epitopes and one or more HPV-18 epitopes; paragraphs [0006], [0007]); a method of generating an HPV composition, vaccine or polynucleotide encoding a non-naturally occurring polypeptide for use in a composition or vaccine (engineering an HPV recombinant vaccine; paragraph [0095]), the method comprising engineering HPV polynucleotide sequences to encode derivatives of naturally occurring HPV polypeptides (engineering recombinant HPV vaccine using derivatives of HPV protein sequences, encoded in a vector; paragraphs [0095]-[0098]), wherein at least one of the viral polypeptides has oncogenic biologic activity or an essential viral replication function (E6 and E7 peptide sequences associated with oncogenicity; paragraph [0269]), wherein a combination of one or more amino acid sequence substitutions, deletions, insertions, separations, or rearrangements are expressed via the composition, vaccine or encoded by the polynucleotide to generate derivative viral polypeptides, wherein HPV oncogenic biologic activity or essential HPV replication function is eliminated from the derivative viral polypeptides (inactivating mutations for HPV16 and HPV18 were introduced into E6 and E7 peptide sequences in order to prevent oncogenicity; paragraph [0269]), but wherein host immune-responsiveness and/or immunogenic activity against the derivative viral polypeptides is retained or enhanced compared to the corresponding naturally occurring viral polypeptides (design of HPV16 and HPV18 peptides to elicit better immune response; paragraphs [0274]-[0275]). In a separate embodiment, Intrexon discloses human papilloma virus 6 and human papilloma virus 11 (HPV6 and HPV 11 cause genital warts which causes significant morbidity; paragraph [0093]). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the disclosure of Intrexon to incorporate polypeptides derived from HPV6 and HPV11 in order to provide a vaccine to prevent the infection of viruses that cause genital warts.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Intrexon reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/861 (2006.01)**C 1 2 N 15/861****Z****C 0 7 K 19/00 (2006.01)****C 0 7 K 19/00****A 6 1 K 39/12 (2006.01)****A 6 1 K 39/12****A 6 1 P 31/20 (2006.01)****A 6 1 P 31/20**

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヤン, チー

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 6, ジャーマンタウン, セネカ メドウズ パークウェイ
 2 0 3 5 8

(72)発明者 ワン, チェン

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 6, ジャーマンタウン, セネカ メドウズ パークウェイ
 2 0 3 5 8

F ターム (参考)

4B064 AG32 CA19 CC24 DA01**4C085 AA03 BA51 BB23 CC08****4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01**