

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5996191号
(P5996191)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088	
A 61 K 31/711	(2006.01)	A 61 K 31/711	
A 61 K 38/00	(2006.01)	A 61 K 37/02	
A 61 K 39/00	(2006.01)	A 61 K 39/00	H

請求項の数 14 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-548155 (P2011-548155)
(86) (22) 出願日	平成22年1月22日 (2010.1.22)
(65) 公表番号	特表2012-515557 (P2012-515557A)
(43) 公表日	平成24年7月12日 (2012.7.12)
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/021869
(87) 國際公開番号	W02010/085697
(87) 國際公開日	平成22年7月29日 (2010.7.29)
審査請求日	平成25年1月22日 (2013.1.22)
審判番号	不服2015-14398 (P2015-14398/J1)
審判請求日	平成27年7月31日 (2015.7.31)
(31) 優先権主張番号	12/691, 588
(32) 優先日	平成22年1月21日 (2010.1.21)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	61/146, 942
(32) 優先日	平成21年1月23日 (2009.1.23)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバ シティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191 04-6283, フィラデルフィア, チエスナット ストリート 3160, スイート 200
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	ウェイナー, デイビッド ビー. アメリカ合衆国 ペンシルバニア 190 66, メリオン, ビーコン レーン 717

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒトパピローマウイルスの改良型ワクチンおよびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H P V に対する免疫反応を個体において誘導するための、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 2】

前記分子が D N A プラスミドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む医薬組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む注射可能な医薬組成物。

【請求項 5】

H P V に対する免疫反応を個体において誘導するための組成物であって、請求項 1 に記載の核酸分子を含む、組成物。

【請求項 6】

前記核酸分子が D N A 分子である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記核酸分子がプラスミドである、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が電気穿孔法により前記個体に導入されるものであることを特徴とする、請求項 5 に記載の組成物。

10

20

【請求項 9】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む組み換えワクチン。

【請求項 10】

前記組み換えワクチンが組み換えワクシニアワクチンである、請求項 9 に記載の組み換えワクチン。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む弱毒化生ワクチン。

【請求項 12】

H P V に対する免疫反応を個体において誘導するための、請求項 9 に記載の組み換えワクチン。 10

【請求項 13】

H P V に対する免疫反応を個体において誘導するための、請求項 11 に記載の弱毒化生ワクチン。

【請求項 14】

前記個体が H P V 感染を有すると診断された、請求項 5 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ヒトパピローマウイルス (H P V) の改良型ワクチン、 H P V に対する免疫反応を誘導するための改良法、ならびに H P V に対して予防的および / または治療的に個体を免疫化するための改良法に関する。 20

【背景技術】**【0002】**

本出願は、 2009 年 1 月 23 日に出願された米国特許仮出願第 61/146,942 号および 2010 年 1 月 21 日に出願された米国特許出願第 12/691,588 号に対する優先権を主張し、これらの開示は参照により各々が本明細書に組込まれる。

【0003】

パピローマウイルスは、最高で 7 つの初期遺伝子および 2 つの後期遺伝子を含む小さい D N A ウィルスである。一般に、パピローマウイルスの初期遺伝子は E 1 ~ E 7 と命名され、パピローマウイルスの後期遺伝子は L 1 および L 2 と命名される。いくつかの動物の種類に、パピローマウイルスファミリーの一員は感染することができる。 30

【0004】

ヒトパピローマウイルス (H P V) 感染は日常的であり、性的接觸によって伝染され得る。 H P V は、 D N A 配列相同性に基づいて 56 種類以上に分類された。上皮異形成および他の損傷を引き起こす H P V の 16 型および 18 型は、多くの場合、癌、特に、子宮頸部、膣、外陰部および肛門管の上皮内癌および湿潤性癌のリスクの増加と関連する。

【0005】

D N A ワクチンは、弱毒化生ウイルスワクチンおよび組み換えタンパク質に基づくワクチンなどの、より伝統的なワクチン接種法を上回る多くの概念的な利点を有する。 D N A ワクチンは、安全であり、安定であり、容易に産生され、かつヒトにおいて十分に耐容性を示し、前臨床試験はプラスミド組み込みの証拠を示さない (非特許文献 1 : 非特許文献 2) 。さらに、 D N A ワクチンの有効性が、ベクターに対する、以前から存在する抗体力価によって影響されないという事実により、 D N A ワクチンは反復投与に十分に適する (非特許文献 3) 。しかし、大型動物に移行した時、 D N A ワクチンの臨床導入に対する 1 つの重大な障害は、プラットフォームとなる免疫原性の減少であった (非特許文献 4) 。コドン最適化、 R N A 最適化および免疫グロブリンリーダー配列の付加などの、 D N A ワクチン免疫原の遺伝子工学処理における最近の技術的進歩により、 D N A ワクチンの発現および免疫原性が改良され (非特許文献 5 ; 非特許文献 6 ; 非特許文献 7 ; 非特許文献 8) 、かつ、近年、電気穿孔法などのプラスミド送達システムの技術が開発された (非特許文献 9 ; 非特許文献 10 ; 非特許文献 11) 。さらに、コンセンサス免疫原を使用するこ 40 50

とで、天然の抗原のみと比較して、細胞性免疫反応の幅を拡大させることができる可能性があることを複数の研究が示唆した（非特許文献12；非特許文献13）。

【0006】

HPV感染を予防および治療するための改良型ワクチンならびに方法に対するニーズが依然としてある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(5): p. 759-68 10

【非特許文献2】Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 772: p. 30-9

【非特許文献3】Chattergoon, M., J. Boyer, and D. B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J*, 1997. 11(10): p. 753-63

【非特許文献4】Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40 20

【非特許文献5】Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503

【非特許文献6】Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001 30

【非特許文献7】Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9

【非特許文献8】Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33 40

【非特許文献9】Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8

【非特許文献10】Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific 50

if ic immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007.81(10): p. 5257-69

【非特許文献11】Ahlen, G., et al., *In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells*. *J Immunol*, 2007.179(7): p. 4741-53

【非特許文献12】Yan., J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007.15(2): p. 411-21 10

【非特許文献13】Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007.81(16): p. 8507-14

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0008】

コンセンサスHPV18型(HPV 18)のE6およびE7のアミノ酸配列を含むタンパク質、ならびにかかるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。これらの核酸構築物およびこれらの核酸構築物がコードするタンパク質は、抗HPV免疫反応を起こすことができる改良型免疫原性標的物をもたらす。

【0009】

かかるタンパク質をコードする構築物、かかるタンパク質を含むワクチン、かかるタンパク質をコードする核酸分子を含むワクチン、ならびに抗HPV免疫反応を誘導する方法も提供する。

【0010】

30

本発明の態様には、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子が含まれる：配列番号1；配列番号1の断片；配列番号1と少なくとも90%の相同性を有する配列；配列番号1と少なくとも90%の相同性を有する配列の断片；配列番号5；HPVコード配列を含む配列番号5の断片；配列番号5と少なくとも90%の相同性を有する配列；およびHPVコード配列を含む配列番号5と少なくとも90%の相同性を有する配列の断片；配列番号7；HPVコード配列を含む配列番号7の断片；配列番号7と少なくとも90%の相同性を有する配列；およびHPVコード配列を含む配列番号7と少なくとも90%の相同性を有する配列の断片。

【0011】

40

本発明は、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する：配列番号2をコードするヌクレオチド配列；配列番号2と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号2の断片をコードするヌクレオチド配列；配列番号2の断片と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号6をコードするヌクレオチド配列；HPV配列を含む配列番号6の断片をコードするヌクレオチド配列；HPV配列を含む配列番号6と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；HPV配列を含む配列番号6の断片と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列。

【0012】

本発明は、かかる核酸分子を含む医薬組成物、およびHPVに対する免疫反応を個体に

50

おいて誘導する方法におけるそれらの医薬組成物の使用をさらに提供し、これらの方法はかかる核酸分子を含む組成物を個体に投与するステップを含む。

【0013】

本発明は、かかる核酸分子を含む組み換えワクチン、およびHPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法におけるそれらの組み換えワクチンの使用をさらに提供し、これらの方法はかかる組み換えワクチンを個体に投与するステップを含む。

【0014】

本発明は、かかる核酸分子を含む弱毒化生病原体、およびHPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法におけるそれらの病原体の使用をさらに提供し、これらの方法はかかる弱毒化生病原体を個体に投与するステップを含む。

10

【0015】

本発明は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をさらに提供する：配列番号2；配列番号2と少なくとも90%の相同意を有する配列；配列番号2の断片；配列番号2と少なくとも90%の相同意を有する配列の断片；配列番号6；配列番号6と少なくとも90%の相同意を有する配列；配列番号6の断片；配列番号6と少なくとも90%の相同意を有する配列の断片。

【0016】

本発明は、かかるタンパク質を含む医薬組成物、およびHPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法におけるそれらの医薬組成物の使用をさらに提供し、これらの方法はかかるタンパク質を含む組成物を個体に投与するステップを含む。

20

【0017】

本発明は、かかるタンパク質を含む組み換えワクチン、およびHPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法におけるそれらの組み換えワクチンの使用をさらに提供し、これらの方法はかかる組み換えワクチンを個体に投与するステップを含む。

【0018】

本発明は、かかるタンパク質を含む弱毒化生病原体、およびHPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法におけるそれらの病原体の使用をさらに提供し、これらの方法はかかる弱毒化生病原体を個体に投与するステップを含む。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

30

以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子：

配列番号1；

配列番号1の断片；

配列番号1と少なくとも90%の相同意を有する配列；

配列番号1と少なくとも90%の相同意を有する配列の断片；

配列番号5；

HPVコード配列を含む配列番号5の断片；

配列番号5と少なくとも90%の相同意を有する配列；および

HPVコード配列を含む配列番号5と少なくとも90%の相同意を有する配列の断片。

(項目2)

40

配列番号1を含む、項目1に記載の核酸分子。

(項目3)

配列番号1と少なくとも95%の相同意を有する配列を含む、項目1に記載の核酸分子

。

(項目4)

配列番号1と少なくとも98%の相同意を有する配列を含む、項目1に記載の核酸分子

。

(項目5)

配列番号1からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも99%の相同意を有する配列を含む、項目1に記載の核酸分子。

50

(項目 6)

配列番号 5 を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 7)

配列番号 5 と少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 8)

配列番号 5 と少なくとも 9 8 % の相同性を有する配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 9)

配列番号 5 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 9 9 % の相同性を有する配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

10

(項目 10)

以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子：

配列番号 2 をコードするヌクレオチド配列；

配列番号 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

配列番号 2 をコードするヌクレオチド配列の断片；

配列番号 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片；

配列番号 6 をコードするヌクレオチド配列；

配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

20

H P V 配列を含む配列番号 6 をコードするヌクレオチド配列の断片；および

H P V 配列を含む配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の相同性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の断片。

(項目 11)

配列番号 2 をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 1 0 に記載の核酸分子。

(項目 12)

配列番号 6 をコードするヌクレオチド配列を含む、項目 1 0 に記載の核酸分子。

(項目 13)

30

前記分子がプラスミドである、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 14)

項目 1 に記載の核酸分子を含む医薬組成物。

(項目 15)

項目 1 に記載の核酸分子を含む注射可能な医薬組成物。

(項目 16)

H P V に対する免疫反応を個体において誘導する方法であつて、項目 1 に記載の核酸分子を含む組成物を、前記個体に投与するステップを含む方法。

(項目 17)

前記核酸分子がD N A 分子である、項目 1 6 に記載の方法。

40

(項目 18)

前記核酸分子がプラスミドである、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 19)

前記核酸分子が電気穿孔法により前記個体に導入される、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 0)

項目 1 に記載の核酸分子を含む組み換えワクチン。

(項目 2 1)

前記組み換えワクチンが組み換えワクシニアワクチンである、項目 2 0 に記載の組み換えワクチン。

(項目 2 2)

50

項目 1 に記載の核酸分子を含む弱毒化生ワクチン。

(項目 2 3)

以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質：

配列番号 2 ;

配列番号 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有する配列；

配列番号 2 の断片；

配列番号 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有する配列の断片；

配列番号 6 ;

配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の相同性を有する配列；

H P V 配列を含む配列番号 6 の断片；および

H P V 配列を含む配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の相同性を有する配列の断片。

10

(項目 2 4)

配列番号 2 を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 2 5)

配列番号 2 と少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 2 6)

配列番号 2 と少なくとも 9 8 % の相同性を有する配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

20

(項目 2 7)

配列番号 2 と少なくとも 9 9 % の相同性を有する配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 2 8)

配列番号 6 を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 2 9)

配列番号 6 と少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 3 0)

配列番号 6 と少なくとも 9 8 % の相同性を有する配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

30

(項目 3 1)

配列番号 6 と少なくとも 9 9 % の相同性を有する配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 3 2)

項目 2 3 に記載のタンパク質を含む医薬組成物。

(項目 3 3)

項目 2 3 に記載のタンパク質を含む注射可能な医薬組成物。

(項目 3 4)

項目 2 3 に記載のタンパク質を含む組み換えワクチン。

(項目 3 5)

前記組み換えワクチンが組み換えワクシニアワクチンである、項目 3 4 に記載の組み換えワクチン。

40

(項目 3 6)

項目 2 3 に記載のタンパク質を含む弱毒化生ワクチン。

(項目 3 7)

H P V に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、項目 2 3 に記載のタンパク質を含む組成物を前記個体に投与するステップを含む方法。

(項目 3 8)

H P V に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、項目 2 0 に記載の組み換えワクチンを前記個体に投与するステップを含む方法。

50

(項目39)

H P Vに対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、項目22に記載の弱毒化生ワクチンを前記個体に投与するステップを含む方法。

(項目40)

前記個体がH P V感染を有すると診断された、項目16に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】プラスミド構築物を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本明細書で使用される「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジエントな条件」という語句は、1つの核酸分子が別の核酸分子とハイブリダイズするが、他の配列とはハイブリダイズしない条件を表す。ストリンジエントな条件は配列依存的であり、異なる環境において様々である。より長い配列は、より高温で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジエントな条件は、規定のイオン強度およびp Hにおける特異的配列の熱融解点(T_m)より約5℃低く選択される。 T_m は、標的配列と相補的なプローブの50%が、平衡状態でこの標的配列とハイブリダイズする(規定のイオン強度、p Hおよび核酸濃度の下での)温度である。一般に、これらの標的配列は T_m において過剰に存在するので、これらのプローブの50%が平衡状態で占有する。典型的には、ストリンジエントな条件は、p H 7.0 ~ 8.3において、塩濃度が約1.0 M未満のナトリウムイオン、典型的に約0.01 ~ 1.0 Mのナトリウムイオン(または他の塩)であり、温度が、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10 ~ 50ヌクレオチド)に対して少なくとも約30℃であり、長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドに対して少なくとも約60℃である条件であろう。ストリンジエントな条件は、ホルムアミドなどの不安定剤の付加によっても達成され得る。

10

【0021】

ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列相同意を、FASTA、BLASTおよびGapped BLAST(Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる)ならびにPAUP*4.0b10ソフトウェア(D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)を用いて測定してもよい。「類似度のパーセンテージ」を、PAUP*4.0b10ソフトウェア(D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)を用いて計算する。コンセンサス配列の平均類似度を、系統樹の全配列と比較して計算する。

20

【0022】

簡潔に述べると、Basic Local Alignment Search Toolを表すBLASTアルゴリズムは、配列類似度の決定に適している(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる)。BLAST解析を行うソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センター(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公表されている。このアルゴリズムは、データベース配列中の同一の長さのワードと整列させた時に、ある正の値の域値スコア(positive-valued threshold score)Tと一致するかまたはそれを満足させる問い合わせ配列中の長さWの短いワードを同定することによって、ハイスコアな配列の対(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア域値(neighborhood word score threshold)と称される(Altschul et al., 前出)。これらの最初の近隣ワードヒットは、それらを含むHSPを見出す検索を開始するための種として機能する。このワードヒットは、累積のアライメントスコアが増加することができる限り、各配列に沿って両方向に拡大される。各方向のワードヒットの拡大は、以下の場合に停止される: 1) 累積のアライメントスコア

30

40

50

が、その最大達成値からX量低下する場合；2) 1つ以上の負のスコア残基アラインメント（negative-scoring residue alignments）の蓄積により、累積スコアが0以下になる場合；または3) いずれかの配列の末端に到達する場合。BlastアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、アライメントの感度および速度を決定する。このBlastプログラムでは、初期設定として、ワード長（W）が11、BLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919参照、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる）アライメント（B）が50、期待値（E）が10、M=5、N=4、および両鎖の比較が使用される。このBLASTアルゴリズム（Karin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる）およびGapped BLASTは、2つの配列間の類似度の統計解析を行う。このBLASTアルゴリズムによって提供される類似度の1つの測定は、2つのヌクレオチド配列間の一致が偶然に生じる確立の指標を与える最小合計確立（smallest sum probability（P(N））である。例えば、試験核酸と他の核酸の比較における最小合計確立が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、および最も好ましくは約0.001未満である場合、核酸は別の核酸と類似するとみなされる。10

【0023】

本明細書で使用される「遺伝子構築物」という用語は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNAまたはRNA分子を表す。コード配列は、核酸分子が投与される個体の細胞において発現を指示することができる、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む調節要素と作動可能に連結される開始シグナルおよび終止シグナルを含む。20

【0024】

本明細書で使用される「発現できる形態」という用語は、個体の細胞に存在する時に、コード配列が発現するように、タンパク質をコードするコード配列と作動可能に連結される必須の調節配列を含む遺伝子構築物を表す。

【0025】

免疫原によって誘導される細胞性免疫反応を高めるための多面的戦略から生じる改良型ワクチンを開示する。変更したコンセンサス配列を作製した。コドン最適化、RNA最適化、および高効率な免疫グロブリンリーダー配列の付加を含む遺伝子変更も開示する。この新規の構築物を、対応するコドン最適化免疫原よりも強力で、広範な細胞性免疫反応を引き起こすように設計した。30

【0026】

改良型HPVワクチンは、抗HPVを誘導することができる免疫原として改良型ワクチンを特に効果的にさせるエピトープを有するタンパク質、およびそのようなエピトープを有するタンパク質をコードする遺伝子構築物に基づく。したがって、ワクチンは治療的または予防的に免疫反応を誘導し得る。いくつかの実施形態において、この免疫原を送達する手段には、DNAワクチン、組み換えワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む組成物、弱毒化ワクチンまたは不活化ワクチンがある。いくつかの実施形態において、このワクチンは、以下からなる群から選択される組み合わせを含む：1つ以上のDNAワクチン、1つ以上の組み換えワクチン、1つ以上のタンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む1つ以上の組成物、1つ以上の弱毒化ワクチンおよび1つ以上の不活化ワクチン。40

【0027】

いくつかの実施形態によると、ワクチンが個体に送達され、この個体の免疫システムの活性を調節し、それによって、HPVに対する免疫反応が高まる。このタンパク質をコードする核酸分子がこの個体の細胞に取り込まれると、このヌクレオチド配列がこれらの細胞において発現し、それによって、このタンパク質がこの個体に送達される。プラスミドなどの核酸分子上のこのタンパク質のコード配列を、組み換えワクチンの一部としておよ50

び弱毒化ワクチンの一部として、単離したタンパク質またはベクターのタンパク質部分として送達する方法を提供する。

【0028】

HPVに対して予防的および/または治療的に個体を免疫化する組成物ならびに方法を提供する。

【0029】

この免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を送達するための組成物を、調節要素と作動可能に連結する。組成物には、この免疫原をコードするプラスミド、この免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む組み換えワクチン、本発明のタンパク質をコードするおよび/もしくは本発明のタンパク質を含む弱毒化生病原体；本発明のタンパク質を含む不活化病原体；または本発明のタンパク質を含むリポソームもしくはサブユニットワクチンなどの組成物が含まれてもよい。本発明は、さらに、組成物を含む注射可能な医薬組成物に関する。

10

【0030】

配列番号1は、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む。配列番号5は配列番号1を含み、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原をコードするヌクレオチド配列と連結されるIgEリーダー配列をさらに含む。配列番号2は、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列を含む。配列番号6は配列番号2を含み、コンセンサス免疫原配列と連結されるIgEリーダー配列をさらに含む。このIgEリーダー配列は配列番号4であり、配列番号3によってコードされ得る。配列番号7はプラスミドpGX302の核酸配列であり、配列番号5が発現するようにその中に取り込まれている。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号2または配列番号2をコードする核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号2をコードする核酸分子として配列番号1を含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、好ましくは、配列番号6または配列番号6をコードする核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、好ましくは、配列番号6をコードする核酸分子として配列番号5を含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、好ましくは、配列番号7を含む。

30

【0032】

配列番号1の断片は、90以上のヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態において、配列番号1の断片は、180以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、270以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、360以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、450以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、540以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、630以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、720以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、770以上のヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される断片などの配列番号1の断片は、IgEリーダー配列のコード配列をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態において、配列番号1の断片は、IgEリーダー配列のコード配列を含まない。配列番号1の断片は、180未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、270未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、360未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、450未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、540未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、630未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、720未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、770未満のヌクレオチドを含んでもよい。

40

【0033】

配列番号2の断片は、30以上のアミノ酸を含んでもよい。いくつかの実施形態において、配列番号2の断片は、60以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、90以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、120以上のアミノ酸を、いくつかの実

50

施形態において、150以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、180以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、210以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、240以上のアミノ酸を含んでもよい。配列番号2の断片は、90未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、120未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、150未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、180未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、210未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、240未満のアミノ酸を含んでもよい。

【0034】

配列番号5の全ての断片は、HPV配列をコードするコード配列を含む。すなわち配列番号5の断片は、IgEリーダーペプチドをコードする配列に加えて、配列を含まねばならない。いくつかの実施形態において、配列番号5の断片は、90以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、配列番号5の断片は、180以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、270以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、360以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、450以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、540以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、630以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、720以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、810以上のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、830以上のヌクレオチドを含んでもよい。配列番号5の断片は、180未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、270未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、360未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、450未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、540未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、630未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、690未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、720未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、780未満のヌクレオチドを、いくつかの実施形態において、840未満のヌクレオチドを含んでもよい。

【0035】

配列番号6の断片は、HPV配列を含む30以上のアミノ酸を含んでもよい。いくつかの実施形態において、配列番号6の断片は、HPV配列を含む60以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む90以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む120以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む150以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む180以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む210以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む240以上のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む270以上のアミノ酸を含んでもよい。配列番号6の断片は、HPV配列を含む90未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む120未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む150未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む180未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む210未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む240未満のアミノ酸を、いくつかの実施形態において、HPV配列を含む270未満のアミノ酸を含んでもよい。

【0036】

いくつかの実施形態によると、免疫原に対する免疫反応を個体において誘導する方法は、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列、またはその機能的断片、またはその発現できるコード配列をこの個体に投与するステップを含む。いくつかの実施形態は、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列またはその断片をコードする単離した核酸分子を含む。いくつかの実施形態は、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列またはその断片をコードする組み換えワクチンを含む。いくつかの実施形態は、HPV18のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列またはその断片を含むサ

10

20

30

40

50

ブユニットワクチンを含む。いくつかの実施形態は、H P V 1 8 の E 6 および E 7 タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列を含む弱毒化生ワクチンおよび / または不活化ワクチンを含む。

【 0 0 3 7 】

改良型ワクチンは、抗 H P V 免疫反応を誘導することができる免疫原として改良型ワクチンを特に効果的にさせるエピトープを有するタンパク質、およびそのようなエピトープを有するタンパク質をコードする遺伝子構築物を含む。したがって、治療的または予防的に免疫反応を誘導するために、ワクチンを提供することができる。いくつかの実施形態において、この免疫原を送達する手段には、D N A ワクチン、組み換えワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む組成物、弱毒化ワクチンまたは不活化ワクチンがある。いくつかの実施形態において、このワクチンは、以下からなる群から選択される組み合わせを含む：1 つ以上のD N A ワクチン、1 つ以上の組み換えワクチン、1 つ以上のタンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む 1 つ以上の組成物、1 つ以上の弱毒化ワクチン、1 つ以上の不活化ワクチン。

10

【 0 0 3 8 】

本発明の態様は、プラスミドなどの核酸分子上のタンパク質コード配列を、組み換えワクチンの一部として、弱毒化ワクチンの一部として、単離したタンパク質またはベクターのタンパク質部分として送達する方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明のいくつかの態様によると、予防的におよび / または治療的に個体を免疫化する組成物ならびに方法が提供される。

20

【 0 0 4 0 】

D N A ワクチンは、米国特許第 5 , 5 9 3 , 9 7 2 号、同第 5 , 7 3 9 , 1 1 8 号、同第 5 , 8 1 7 , 6 3 7 号、同第 5 , 8 3 0 , 8 7 6 号、同第 5 , 9 6 2 , 4 2 8 号、同第 5 , 9 8 1 , 5 0 5 号、同第 5 , 5 8 0 , 8 5 9 号、同第 5 , 7 0 3 , 0 5 5 号、同第 5 , 6 7 6 , 5 9 4 号、および本明細書で引用する優先出願に記載されており、これらは参考により各々が本明細書に組み込まれる。それらの出願に記載される送達プロトコールに加えて、D N A を送達する代替方法は、米国特許第 4 , 9 4 5 , 0 5 0 号および同第 5 , 0 3 6 , 0 0 6 号に記載されており、これらは両方とも参考により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 0 4 1 】

本発明は、改良型弱毒化生ワクチン、改良型不活化ワクチン、および抗原をコードする外来遺伝子を送達するために組み換えベクターを使用する改良型ワクチン、さらにサブユニットワクチンおよび糖タンパク質ワクチンに関する。弱毒化生ワクチン、組み換えベクターを使用して外来抗原を送達するワクチン、サブユニットワクチンおよび糖タンパク質ワクチンの例は、米国特許第 4 , 5 1 0 , 2 4 5 号、同第 4 , 7 9 7 , 3 6 8 号、同第 4 , 7 2 2 , 8 4 8 号、同第 4 , 7 9 0 , 9 8 7 号、同第 4 , 9 2 0 , 2 0 9 号、同第 5 , 0 1 7 , 4 8 7 号、同第 5 , 0 7 7 , 0 4 4 号、同第 5 , 1 1 0 , 5 8 7 号、同第 5 , 1 1 2 , 7 4 9 号、同第 5 , 1 7 4 , 9 9 3 号、同第 5 , 2 2 3 , 4 2 4 号、同第 5 , 2 2 5 , 3 3 6 号、同第 5 , 2 4 0 , 7 0 3 号、同第 5 , 2 4 2 , 8 2 9 号、同第 5 , 2 9 4 , 4 4 1 号、同第 5 , 2 9 4 , 5 4 8 号、同第 5 , 3 1 0 , 6 6 8 号、同第 5 , 3 8 7 , 7 4 4 号、同第 5 , 3 8 9 , 3 6 8 号、同第 5 , 4 2 4 , 0 6 5 号、同第 5 , 4 5 1 , 4 9 9 号、同第 5 , 4 5 3 , 3 6 4 号、同第 5 , 4 6 2 , 7 3 4 号、同第 5 , 4 7 0 , 7 3 4 号、同第 5 , 4 7 4 , 9 3 5 号、同第 5 , 4 8 2 , 7 1 3 号、同第 5 , 5 9 1 , 4 3 9 号、同第 5 , 6 4 3 , 5 7 9 号、同第 5 , 6 5 0 , 3 0 9 号、同第 5 , 6 9 8 , 2 0 2 号、同第 5 , 9 5 5 , 0 8 8 号、同第 6 , 0 3 4 , 2 9 8 号、同第 6 , 0 4 2 , 8 3 6 号、同第 6 , 1 5 6 , 3 1 9 号および同第 6 , 5 8 9 , 5 2 9 号に記載されており、これらは参考により各々が本明細書に組み込まれる。

40

【 0 0 4 2 】

細胞に取り込まれると、この遺伝子構築物（複数可）は、機能している染色体外分子と

50

してこの細胞内に存在したままであってもよく、かつ／またはこの細胞の染色体DNAに組み込まれてもよい。DNAは細胞内に導入されてもよく、そこで、1つまたは複数のプラスミドの形態の別々の遺伝物質として留まる。あるいは、染色体に組み込むことができる直鎖DNAを、この細胞に導入してもよい。この細胞にDNAを導入する場合、染色体へのDNA組み込みを促進する薬剤を加えてもよい。組み込みを促進するのに有用なDNA配列が、このDNA分子に含まれてもよい。あるいは、RNAをこの細胞に投与してもよい。セントロメア、テロメアおよび複製開始点を含む直鎖ミニ染色体としてこの遺伝子構築物を提供することも考えられる。遺伝子構築物は、細胞内で生存する弱毒化された生の微生物または組み換え微生物ベクターの遺伝物質の一部のままであってもよい。遺伝子構築物は、組み換えウイルスワクチンのゲノムの一部であってもよく、ここで、この遺伝物質はこの細胞の染色体に組み込まれるかまたは染色体外に留まるかのいずれかである。遺伝子構築物は、核酸分子の遺伝子発現に必要な調節要素を含む。これらの要素には、プロモーター、開始コドン、終止コドン、およびポリアデニル化シグナルが含まれる。さらに、大抵、エンハンサーは、標的タンパク質または免疫調節タンパク質をコードする配列の遺伝子発現に必要とされる。これらの要素は、所望のタンパク質をコードする配列に作動可能に連結されること、およびこれらの調節要素は、これらが投与される個体において作動可能であることが必要である。

【0043】

開始コドンおよび終止コドンは、一般に、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部であると考えられる。しかし、これらの要素は、この遺伝子構築物が投与される個体において機能的であることが必要である。開始および終止コドンはコード配列と共にフレームの中になければならない。

【0044】

使用されるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルは、個体の細胞内で機能的でなければならない。

【0045】

本発明を実行するのに有用な、特にヒトの遺伝子ワクチンの產生において有用なプロモーターの例として、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、マウス乳ガンウイルス(MMTV)プロモーター、BIV末端反復配列LTR)プロモーターなどのヒト免疫不全ウイルス(HIV)プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、ALVプロモーター、CMV最初期プロモーターなどのサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、エプスタイン・バーウイルス(EBV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターならびにヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチニンおよびヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子由来のプロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。

【0046】

本発明を実行するのに有用な、特にヒトの遺伝子ワクチンの產生において有用なポリアデニル化シグナルの例として、SV40ポリアデニル化シグナルおよびLTRポリアデニル化シグナルが挙げられるが、それらに限定されない。特に、プラスミドpCEP4(Invitrogen, San Diego CA)内に存在し、SV40ポリアデニル化シグナルと称されるSV40ポリアデニル化シグナルを使用する。

【0047】

DNA発現に必要な調節要素に加えて、他の要素もこのDNA分子の中に含まれてもよい。かかる追加の要素はエンハンサーを含む。このエンハンサーは、以下を含む群から選択されてもよいがそれらに限定されない：ヒトアクチンエンハンサー、ヒトミオシンエンハンサー、ヒトヘモグロビンエンハンサー、ヒト筋肉クレアチニンエンハンサーならびにCMV、RSVおよびEBVのエンハンサーなどのウイルスエンハンサー。

【0048】

遺伝子構築物は、染色体外にこの遺伝子構築物を維持し、細胞内でこの構築物の複数のコピーを產生するために、哺乳類複製開始点が供給され得る。インビトロジェン(San

10

20

30

40

50

Diego, CA) のプラスミド pVAX1、pCEP4 および pREP4 は、組み込まれることなく、高コピーのエピソーム複製を行うエプスタイン・バーウイルス複製開始点および核抗原 EBNA-1 コード領域を含む。

【0049】

免疫化の適用に関連するいくつかの好ましい実施形態において、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および追加として、かかる標的タンパク質に対する免疫反応をさらに高めるタンパク質の遺伝子を含む核酸分子(複数可)を送達する。かかる遺伝子の例として、-インターフェロン、-インターフェロン、血小板由来増殖因子(PDG F)、TNF_α、TNF_β、GM-CSF、上皮細胞増殖因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MHC、CD80、CD86 およびシグナル配列が除去され、任意で IgE のシグナルペプチドを含む IL-15 を含む IL-15 などの他のサイトカインならびにリンホカインをコードする遺伝子が挙げられる。有用であり得る他の遺伝子には、以下をコードする遺伝子が含まれる: MCP-1、MIP-1_α、MIP-1_β、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18 の突然変異型、CD40、CD40L、血管増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼIC-E、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65 Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IκB、不活性NIK、SAP-K、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFκB、Bax、TRAIL、TRAIL_{rec}、TRAIL_{rec}DR5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKリガンド、OX40、OX40リガンド、NKG2D、MICHA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2 およびそれらの機能的断片。

【0050】

何らかの理由で、この遺伝子構築物を受け取る細胞を除去することが望ましい場合、細胞破壊の標的として機能を果たす追加の要素を加えてよい。発現できる形態のヘルペスチミジンキナーゼ(tk)遺伝子を、この遺伝子構築物に含めることができる。薬剤ガンシクロビルはこの個体に投与され得、かつこの薬剤は tk を産生する全細胞を選択的に死滅させるため、この遺伝子構築物を有する細胞の選択的破壊のための手段をもたらす。

【0051】

タンパク質産生を最大限するために、この構築物が投与される細胞における遺伝子発現に十分に適した調節配列を選択してもよい。さらに、細胞内で最も効率的に転写されるコドンを選択してもよい。当業者は、細胞内で機能的なDNA構築物を作製することができる。

【0052】

いくつかの実施形態において、本明細書記載のタンパク質のコード配列が IgE シグナルペプチドと連結される遺伝子構築物を提供し得る。いくつかの実施形態において、本明細書記載のタンパク質は、IgE シグナルペプチドと連結される。

【0053】

タンパク質が用いられるいくつかの実施形態において、例えば、当業者は、周知の技術を用いて、本発明のタンパク質を产生および単離することができる。タンパク質が用いられるいくつかの実施形態において、例えば、当業者は、周知の技術を用いて、本発明のタンパク質をコードするDNA分子を、周知の発現系で使用するための市販の発現ベクターに挿入することができる。例えば、市販のプラスミド pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) を大腸菌 (E. coli) におけるタンパク質

產生のために使用してもよい。例えば、市販のプラスミド pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) を、酵母のサッカロマイセス・セレヴィシエ (*S. cerevisiae*) 株における (タンパク質) 產生のために使用してもよい。例えば、市販の MAXBAC (商標) 完全バキュロウイルス発現系 (Invitrogen, San Diego, Calif.) を昆虫細胞における (タンパク質) 產生のために使用してもよい。例えば、市販のプラスミド p cDNA I または p cDNA 3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) を、チャイニーズハムスター卵巣細胞などの哺乳類細胞における (タンパク質) 產生のために使用してもよい。当業者は、これらの市販の発現ベクターおよび発現系または他のものを使用して、通例の技術およびすぐに入手できる出発物質によりタンパク質を產生することができる (例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989) 参照、これは参考により本明細書に組み込まれる)。従って、所望のタンパク質を原核細胞系および真核細胞系の両方において調製することができ、このタンパク質の一連のプロセシング型をもたらすことができる。

【0054】

当業者は、他の市販の発現ベクターおよび発現系を使用してもよく、または周知の方法およびすぐに入手できる出発物質を用いてベクターを產生してもよい。プロモーターおよびポリアデニル化シグナル、ならびに好ましくはエンハンサーなどの必須の制御配列を含む、様々な種類の宿主に対する発現系は、すぐに入手でき、当業で知られている。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989) 参照。遺伝子構築物は、この構築物がトランスフェクトされる細胞株において機能的であるプロモーターと作動可能に連結されるタンパク質コード配列を含む。構成的プロモーターの例として、サイトメガロウイルスまたは SV40 のプロモーターが挙げられる。誘導できるプロモーターの例として、マウス乳腺白血病ウイルスまたはメタロチオネインプロモーターが挙げられる。当業者は、すぐに入手できる出発物質から、本発明のタンパク質をコードする DNA で細胞をトランスフェクトするのに有用な遺伝子構築物を容易に作製することができる。このタンパク質をコードする DNA を含む発現ベクターを用いて、適合性宿主を形質転換し、その後、外来 DNA の発現が起こる条件下で培養し、維持する。

【0055】

産生させたタンパク質を、必要に応じて、かつ当業者に知られるように、これらの細胞を溶解するまたは培地から回収することによって、培養物から回収した。当業者は、周知の方法を用いて、かかる発現系を用いて產生されるタンパク質を単離することができる。上記の特異的タンパク質と特異的に結合する抗体を用いて天然源からタンパク質を精製する方法を、組み換え DNA 法によって產生されるタンパク質の精製に同様に適用してもよい。

【0056】

組み換え技術によるタンパク質產生に加えて、自動化ペプチド合成機も使用して、本質的には純粋な単離されるタンパク質を產生してもよい。かかる技術は当業者に周知であり、置換を有する誘導体が DNA にコードされるタンパク質產生において供給されない場合に有用である。

【0057】

DNA 注射 (DNA ワクチン接種とも称される)、組み換えアデノウイルス、組み換えアデノウイルス関連ウイルスおよび組み換えワクシニアなどの組み換えベクターを含むいくつかの周知の技術のいずれかを用いて、これらの核酸分子を送達してもよい。

【0058】

投与経路には、筋肉内経路、鼻腔内経路、腹腔内経路、皮内経路、皮下経路、静脈内経路、動脈内経路、眼球内経路、および経口経路、ならびに粘膜組織への吸入剤もしくは坐

薬による、例えば、膣、直腸、尿道、頬および舌下の組織への洗浄による局所的経路、経皮的経路が含まれるが、それらに限定されない。好ましい投与経路には、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射および皮下注射が含まれる。遺伝子構築物は、電気穿孔の方法および装置、従来の注射器、無針注射器具、または「微粒子衝撃遺伝子銃」を含むがそれらに限定されない手段により投与されてもよい。

【0059】

これらのDNAワクチンの送達を促進するのに好ましい電気穿孔装置および電気穿孔法の例には、D r a g h i a - A k l i らによる米国特許第7,245,963号、S m i t h らにより出願された米国特許公開第2005/0052630号（これらの内容は、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる）に記載される例が含まれる。35 U S C 119(e)条の下、2006年10月17日に出願された米国特許仮出願第60/852,149号および2007年10月10日に出願された米国特許仮出願第60/978,982号の利益を主張する、2007年10月17日に出願された同時係属で共同所有の米国特許出願第11/874072号（これらの全ては、この全体が本明細書に組み込まれる）に提供されるDNAワクチンの送達を促進する電気穿孔装置および電気穿孔法も好ましい。

10

【0060】

以下は、電気穿孔技術を用いた実施形態の例であり、上記で論じた特許参考文献の中で詳細に論じられる：電気穿孔装置は、使用者により事前に設定された電流入力と同じような定電流を生み出すエネルギーのパルスを、哺乳類の所望の組織へ送達するように配置され得る。この電気穿孔装置は、電気穿孔構成要素および電極集合体またはハンドル集合体を含む。この電気穿孔構成要素は、制御装置、電流波形発生器、インピーダンス試験器、波形自動記録装置、入力要素、状況報告要素、伝達ポート、記録構成要素、電源、および電源スイッチを含む電気穿孔装置の1つ以上の様々な要素を含み、かつ組み込むことができる。この電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の1つの要素として機能することができ、他の要素は、この電気穿孔構成要素と連通する別々の要素（または構成要素）である。いくつかの実施形態において、この電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の2つ以上の要素として機能することができ、それは、この電気穿孔構成要素から分離する電気穿孔装置のさらに他の要素と連通することができる。これらの要素は1つの装置として、または互いに連通する別々の要素として機能することができるので、改良型H P Vワクチンを送達するためにこの電気穿孔技術を用いることは、1つの電気機械装置または機械装置の一部として存在する電気穿孔装置の要素に限定されない。この電気穿孔構成要素は、所望の組織に定電流を生み出すエネルギーパルスを送達することができ、フィードバック機構を含む。電極集合体は、空間的配置に複数の電極を有する電極アレイを含み、ここで、この電極集合体は、この電気穿孔構成要素からエネルギーパルスを受け取り、電極を通して所望の組織にエネルギーパルス送る。複数の電極の少なくとも1つは、エネルギーパルスの送達の間は中性であり、所望の組織のインピーダンスを測定し、この電気穿孔構成要素へインピーダンスを伝える。このフィードバック機構は、測定されるインピーダンスを受け取ることができ、この電気穿孔構成要素によって送達されるエネルギーパルスを調節し、定電流を維持することができる。

20

【0061】

いくつかの実施形態において、複数の電極は、分散的パターンでエネルギーパルスを送達することができる。いくつかの実施形態において、複数の電極は、プログラムされた順番の下で、電極制御を介して分散的パターンでエネルギーパルスを送達することができ、使用者が、プログラムされた順番を電気穿孔構成要素に入力する。いくつかの実施形態において、プログラムされた順番は、順に送達される複数のパルスを含み、複数のパルスの各パルスは、インピーダンスを測定する1つの中性極と共に少なくとも2つの活性電極によって送達され、複数のパルスの次のパルスは、インピーダンスを測定する1つの中性極と共に少なくとも2つの活性電極の別の1つによって送達される。

30

【0062】

40

50

いくつかの実施形態において、このフィードバック機構は、ハードウェアまたはソフトウェアのいずれかによって実行される。好ましくは、このフィードバック機構は、アナログ閉ループ回路によって行われる。好ましくは、このフィードバックは、毎 $50\text{ }\mu\text{ s}$ 、 $20\text{ }\mu\text{ s}$ 、 $10\text{ }\mu\text{ s}$ または $1\text{ }\mu\text{ s}$ で生じるが、好ましくはリアルタイムなフィードバックつまり瞬間的（すなわち、反応時間を決定するために利用できる技術によって決定されるような事実上瞬間的）である。いくつかの実施形態において、中性電極は、所望の組織においてインピーダンスを測定し、インピーダンスをこのフィードバック機構へ伝達し、このフィードバック機構はインピーダンスに応答し、事前設定電流と同じような値で定電流を維持するためにエネルギーパルスを調節する。いくつかの実施形態において、このフィードバック機構は、エネルギーパルス送達の間、連続的にかつ瞬間的に定電流を維持する。

10

【0063】

いくつかの実施形態において、この核酸分子を、ポリヌクレオチド機能エンハンサーまたは遺伝子ワクチン促進剤の投与と併用して、これらの細胞に送達する。ポリヌクレオチド機能エンハンサーは、米国特許第 5,593,972 号、同第 5,962,428 号および 1994 年 1 月 26 日に出願された国際出願第 PCT/US94/00899 号に記載されており、これらは参考により各自が本明細書に組み込まれる。遺伝子ワクチン促進剤は、1994 年 4 月 1 日に提出された米国特許第 021,579 号に記載されており、これは参考により本明細書に組み込まれる。核酸分子と併用して投与する助剤を、核酸分子の投与前後に、この核酸分子との混合物として投与するか、または別々に、同時に投与してもよい。さらに、トランスフェクション剤および / または複製剤および / または炎症性薬剤として機能し得、かつ GVF と一緒に投与され得る他の薬剤には、- インターフェロン、- インターフェロン、GM-CSF、血小板由来増殖因子 (PDGF)、TNF、上皮細胞増殖因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12 および IL-15 などの増殖因子、サイトカインおよびリンホカイン、ならびに線維芽細胞増殖因子、免疫刺激複合体 (ISCOMS) などの表面活性剤、フロイント不完全アジュバンド、モノホスホリルリピド A (WL) を含む LPS 類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体およびスクアレンスクアレンなどの小胞が含まれ、かつヒアルロン酸も、この遺伝子構築物と併用して投与に使用してもよい。いくつかの実施形態において、免疫調節タンパク質を、GVF として使用してもよい。いくつかの実施形態において、この核酸分子は PLG と関連して提供され、送達および取り込みを高める。

20

【0064】

本発明による医薬組成物は、約 1 ng ~ 約 $2000\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。いくつかの好ましい実施形態において、本発明による医薬組成物は、約 5 ng ~ 約 $1000\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約 10 ng ~ 約 $800\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約 0.1 ~ 約 $500\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約 1 ~ 約 $350\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約 25 ~ 約 $250\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約 100 ~ 約 $200\text{ }\mu\text{ g}$ の DNA を含む。

30

【0065】

本発明による医薬組成物を、使用する投与方法に従って処方する。医薬組成物が注射可能な医薬組成物である場合において、注射可能な医薬組成物は無菌であり、発熱物質も粒子も含まない。好ましくは、等張製剤を使用する。一般に、等張にするための添加剤には、塩化ナトリウム、D型グルコース、マンニトール、ソルビトールおよび乳糖が含まれ得る。場合によっては、リン酸緩衝食塩水などの等張液が好ましい。安定剤には、ゼラチンおよびアルブミンが含まれる。いくつかの実施形態において、血管収縮剤をこの製剤に加える。

40

【0066】

本発明のいくつかの実施形態によると、免疫反応を誘導する方法が提供される。このワ

50

クチンは、タンパク質に基づく、弱毒化生ワクチン、細胞ワクチン、組み換えワクチンまたは核酸もしくはDNAワクチンであってもよい。いくつかの実施形態において、粘膜免疫反応を誘導する方法を含む、免疫原に対する免疫反応を個体において誘導する方法は、CTACKタンパク質、TECKタンパク質、MECタンパク質およびそれらの機能的断片またはそれらの発現できるコード配列のうちの1つ以上を、本発明のタンパク質をコードする単離した核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換えワクチン、および/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または弱毒化生ワクチンおよび/または不活化ワクチンと組み合わせて、この個体に投与するステップを含む。CTACKタンパク質、TECKタンパク質、MECタンパク質およびそれらの機能的断片のうちの1つ以上を、免疫原をコードする単離した核酸分子；および/もしくは免疫原をコードする組み換えワクチンおよび/もしくは免疫原を含むサブユニットワクチンおよび/もしくは弱毒化生ワクチンおよび/もしくは不活化ワクチンの投与前に、それらの投与と同時に、またはそれらの投与の後に投与してもよい。いくつかの実施形態において、CTACK、TECK、MECおよびそれらの機能的断片からなる群から選択される1つ以上のタンパク質をコードする単離した核酸分子を、この個体に投与する。

【0067】

本発明を、以下の実施例においてさらに説明する。この実施例は本発明の実施形態を示すが、単なる説明の目的で与えられるということが理解されるべきである。上記の説明およびこの実施例から、当業者は本発明の本質的特徴を突き止めることができ、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な使用および条件に本発明を適用するために、本発明の様々な変更および改良を行うことができる。したがって、本明細書に示され、記載される改良に加えて、本発明の様々な改良は、先の記載から当業者に明らかになるであろう。かかる改良は、添付の特許請求の範囲に入ることも意図される。

【0068】

米国特許、米国特許出願、および本開示の全体を通して引用される参考文献の各々は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0069】

ヒトパピローマウイルス(HPV)のウイルスタンパク質18のE6およびE7の最適化コンセンサス配列を準備した。この配列を、高レベルの発現用に設計する。この配列は、発明者らの遺伝子による免疫技術に有用である。コンセンサス配列を用いて実施される実験結果は陽性であった。図1は、プラスミドpGX3002(配列番号7)の中にコンセンサスHPV18-6および18-7の核酸配列を含むプラスミド構築物を示す図である。プラスミドpGX3002の中に組み込まれるコンセンサスHPV18-6および18-7の核酸配列は、コンセンサスHPV18-6および18-7のコード配列と連結されるIgEリーダーペプチドのコード配列を含む。

【0070】

プラスミドpGX3002は、カナマイシン耐性遺伝子(Kan)およびプラスミド複製開始点(pUCori)を含むpVAX骨格を用いて、ウシ成長ホルモンの3'末端およびポリアデニル化シグナル(bGHpolyA)を有し、CMVプロモーター(pCMV)によって促進される、最適化ヒトパピローマウイルス18-6および18-7抗原(HPV18のE6およびE7)を発現する。

【0071】

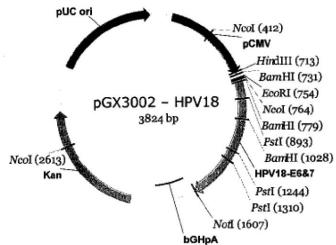
【表1】

エレメント:	塩基対
CMVプロモーター:	137-724
HPV18-6および18-7のコード配列:	754-1606
bGH PolyA:	1649-1879
Kan耐性:	2052-2846
pUC Ori:	3145-3818

【図1】

図1
 V G X 3 0 0 0 0 (一部) - P G X 3 0 0 2 - H P V 1 8 - 6 および 1 8 - 7 をコードするベクターの内部。
 ワンペースメントホルミングの末端およびポリアデノリ化シグナル (bGHPA) を有し、CMVプロモーター (pCMV) によって促進される、ヒトバビローマウイルス18-6および18-7抗原 (HPV 18のE6およびE7) を発現するプラスミド; pVAX骨格は、カナマイシン耐性 (Kan) およびプラスミド複製開始点 (pUC ori) を含む。

エレメント: 塩基対
 CMVプロモーター: 137-724
 HPV18-6および18-7のコード配列: 1-1046
 bGHPA: 1649-1879
 Kan耐性: 2052-2846
 pUC Ori: 3145-3818



【配列表】

0005996191000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
C 0 7 K 14/025 (2006.01)	C 0 7 K 14/025

(72)発明者 ヤン, チアン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19083, ハーバータウン, クラマー アベニュー 2
13

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 山崎 利直

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 特表2001-527091 (JP, A)

特表2001-513986 (JP, A)

国際公開第2008/014521 (WO, A1)

国際公開第2007/121894 (WO, A1)

Vaccine, 2008年, Vol. 26, pp. 5210-5215

Vaccine, 2008年, Vol. 27, pp. 431-440

Vaccine, 2008年, Vol. 26, pp. 440-448

Vaccine, 2008年, Vol. 26, pp. 3112-3120

JOURNAL OF VIROLOGY, 2007年, Vol. 81, No. 10, pp. 5257-5269

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00-15/90

PubMed