

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504057
(P2004-504057A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C12N 15/09	C 12 N 15/00	4 B 02 4
A61K 35/76	A 61 K 35/76	4 B 06 5
A61K 38/00	A 61 K 39/12	4 C 07 6
A61K 39/12	A 61 K 47/02	4 C 08 4
A61K 47/02	A 61 K 48/00	4 C 08 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-513918 (P2002-513918)	(71) 出願人	397009934 グラクソ グループ リミテッド GLAXO GROUP LIMITED イギリス ミドルセックス ユービー6 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレー アベニュー グラクソ ウエルカム ハウス (番地なし) Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue Greenford, Middlesex UB6 0NN, Great Britain
(86) (22) 出願日	平成13年7月20日 (2001.7.20)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月21日 (2003.1.21)		
(86) 國際出願番号	PCT/GB2001/003290		
(87) 國際公開番号	W02002/008435		
(87) 國際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)		
(31) 優先権主張番号	0017990.3		
(32) 優先日	平成12年7月21日 (2000.7.21)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	0025802.0		
(32) 優先日	平成12年10月20日 (2000.10.20)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
		(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葵

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コドン最適化されたパピローマウイルス配列

(57) 【要約】

本発明は、ヒトパピローマウイルス感染およびそれに付随する徵候および疾患の治療および予防にて有用な方法および組成物に関する。さらには、本発明はヒトパピローマウイルス (HPV) アミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチド配列であつて、そのポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが高度に発現された哺乳動物遺伝子のものと類似しているポリヌクレオチド配列に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトパピローマウイルス(HPV)アミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチド配列であって、ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが高度に発現された哺乳動物遺伝子のものと類似しているポリヌクレオチド配列。

【請求項 2】

ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似しているところの、請求項1記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 3】

ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが高度に発現されたイー・コリ遺伝子のものとも類似しているところの、請求項1または請求項2記載のポリヌクレオチド配列。 10

【請求項 4】

DNA配列である、請求項1ないし3のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 5】

頸部癌、良性皮膚疣瘍または陰部疣瘍と関連するHPVタイプまたはサブタイプのHPVポリペプチドをエンコードする前記請求項のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列。
。

【請求項 6】

1-4、6、7、10、11、16、18、26-29、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59および68型のうちの一つのHPVポリペプチドをエンコードする、請求項5記載のポリヌクレオチド配列。 20

【請求項 7】

特に頸部癌または陰部疣瘍と関連するHPVタイプまたはサブタイプのHPVポリペプチドをエンコードする、請求項6記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 8】

6、11、16、18、33または45型の内の一つのHPVポリペプチド、あるいは1またはそれ以上の6、11、16、18、33または45型HPVウイルスの2またはそれ以上のポリペプチドの融合物をエンコードする、請求項7記載のポリヌクレオチド配列。
。

【請求項 9】

HPV11、6aまたは6bから選択されるHPVタイプまたはサブタイプのHPVポリペプチドをエンコードする、請求項8記載のポリヌクレオチド配列。 30

【請求項 10】

生物学的機能が低下した変異HPVポリペプチドをエンコードする、前記請求項のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 11】

1またはそれ以上の点突然変異を含み、それにより1またはそれ以上のポリペプチドの天然の生物学的機能が不活化される、変異HPVをエンコードする、請求項10記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 12】

エンコードされたHPVポリペプチドがHPV初期遺伝子産物の全体または一部を含むところの、前記請求項のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列。 40

【請求項 13】

エンコードされたHPVポリペプチドが、E1またはE2の全体または一部、あるいはE1またはE1の全体または一部ともう一つ別のHPVポリペプチドとの融合物を含むところの、請求項12記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 14】

0.3より大きいが、1より小さい高度に発現されたヒト遺伝子のコドン使用係数を有する前記請求項のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項 15】

50

0.4より大きいが、1より小さい高度に発現されたヒト遺伝子のコドン使用係数を有する請求項14記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項16】

0.5より大きいが、1より小さい高度に発現されたヒト遺伝子のコドン使用係数を有する請求項15記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項17】

0.6より大きい高度に発現されたイー・コリ遺伝子のコドン使用係数を有する前記請求項のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列。

【請求項18】

図5に示すポリヌクレオチド配列、またはそのコドン使用パターンを維持するフラグメントまたは類似体。 10

【請求項19】

図6に示すポリヌクレオチド配列、またはそのコドン使用パターンを維持するフラグメントまたは類似体。

【請求項20】

宿主細胞によるポリヌクレオチド配列の発現をさせることができる対照配列に操作可能に結合した前記請求項のいずれかに記載のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

【請求項21】

細菌、昆虫または哺乳動物細胞においてポリヌクレオチド配列の発現の指令能を有する、請求項20記載の発現ベクター。 20

【請求項22】

p7313PLcである請求項20または請求項21記載の発現ベクター。

【請求項23】

請求項1~19のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞。

【請求項24】

請求項20~22のいずれか一つに記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項25】

細菌、哺乳動物または昆虫細胞である、請求項23または請求項24記載の宿主細胞。

【請求項26】

請求項1~19のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド配列を含む医薬組成物。 30

【請求項27】

請求項20~22のいずれか一つに記載のベクターを含む医薬組成物。

【請求項28】

DNAでコートされた複数の粒子、好ましくは金粒子を含む、請求項26または請求項27記載の医薬組成物。

【請求項29】

医薬上許容される賦形剤およびDNAベクターを含む、請求項27記載の医薬組成物。

【請求項30】

さらにアジュバントを含む請求項26~29のいずれか一つに記載の医薬組成物。

【請求項31】

アジュバントがポリヌクレオチドによりエンコードされるHPVポリペプチドとの融合物としてエンコードされる、請求項30記載の医薬組成物。 40

【請求項32】

HPV感染の治療または予防における請求項1~19のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項33】

HPV感染の治療または予防における請求項20~22のいずれか一つに記載のベクターの使用。

【請求項34】

HPV感染の治療または予防における請求項26~31のいずれか一つに記載のワクチン 50

組成物の使用。

【請求項 3 5】

H P V 感染症が、H P V 6、11、16 または 18 型の感染症であるところの、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一つに記載の使用。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド、請求項 20 ~ 22 のいずれか一つに記載のベクターまたは請求項 26 ~ 31 のいずれか一つに記載の医薬組成物の、皮膚疣、陰部疣、有意性が未確認の異型扁平上皮細胞 (A S C U S)、頸部異形成、子宮頸管上皮内新生腫瘍 (C I N) または頸部癌の治療または予防における使用。

【請求項 3 7】

有効量の請求項 1 ~ 19 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチド、請求項 20 ~ 22 のいずれか一つに記載のベクターまたは請求項 26 または 31 のいずれか一つに記載の医薬組成物を投与することを含む、H P V 感染症またはそれに付随する任意の症状または疾患を治療または予防する方法。

【請求項 3 8】

請求項 26 ~ 30 のいずれか一つに記載の医薬組成物をプライム・ブースト投与計画にて請求項 1 ~ 19 のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含む組換えウイルスベクターまたは非ウイルスベースの系とともに投与することを含む、H P V 感染症またはこれに付随する任意の症状または疾患を治療または予防する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明はヒトパピローマウイルス感染症およびこれに付随する症状および疾患の治療および予防において有用な方法および組成物に関する。

【0 0 0 2】

(発明の背景)

パピローマウイルス感染症は、ヒツジ、イヌ、ウサギ、サル、ウシおよびヒトを含む様々な種において観察されている。ヒトパピローマウイルス (H P V) は 80 種以上に分類されている (Epidemiology and Biology of Cervical Cancer. Seminars in Surgical Oncology 1999 16 : 203 - 211)。新種は、L1 遺伝子がすでに同定された種からの L1 配列と 90 % 未満の同一性を示すものとして定義され、一方、サブタイプは 90 % から 98 % の間の L1 配列同一性を示し、変種は 98 % より大きな配列同一性を示す (プロトタイプ (親) 型に対して)。パピローマウイルスは一般に上皮に感染するが、異なる H P V 種は異なる疾患を引き起こす。例えば、1 - 4、7、10 および 26 ~ 29 型は良性皮膚疣を引き起こし、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 および 68 型は頸部癌 (cervical cancer) に関連し、タイプ 6 および 11 型は陰部疣 (生殖管の非悪性コンジローマ) に関与する。

【0 0 0 3】

陰部疣の大部分 (> 90 %) は H P V 遺伝子型 6 および 11 を含む。H P V - 6 が単一の感染症において同定される最も優勢な遺伝子型であり、H P V - 6 および H P V - 11 の両方が時折同じ病変にて発生する場合がある。疣は一般に感染した個体において複数の部位において生じ、パートナーがコンジローマ (陰部疣) にかかっている患者の 60 % 以上に病変が発現し、平均的潜伏期間は 3 ヶ月である。いくつかの治療オプションが現在利用可能である。しかしながら、これらは摘出または剥離および / または局所ゲルおよびクリームの使用によるものである。これらは痛みがないわけではなく、頻繁に病院で診察を受ける必要があり、効果は非常に多様である。疾患の再発は、この疾患の有効な管理にとって重大な問題である。

【0 0 0 4】

陰部疣は自然に退縮し、細胞性免疫が疣の退縮の原因となる一次事象と思われる。高

10

20

30

40

50

自発的退縮率は宿主細胞性免疫が疾患を散らすことができ、免疫療法介入を陰部疣贅の治療または予防のオプションとすることを示す。疾患管理の目的は、痛みがなく、最低限の診察しか必要とせず、高い疾患消散率を有し、再発を減少させる／最小限に抑えるウイルス特異性療法である。

H P V は組織培養において増殖させることができることが困難であることが示されており、旧来の生または減毒ウイルスワクチンはない。H P Vワクチンの開発も、ヒトウイルスを研究できる適当な動物モデルがないことにより遅れている。これは、ウイルスが高度に種特異性であり、従って、ワクチンを最初にヒトにおいて試す前に安全性試験のために必要とされる免疫適格動物がヒトパピローマウイルスに感染する可能性がないためである。

【0005】

10

パピローマウイルスは、E 1 ~ E 7、L 1 および L 2 で表される「初期 (e a r l y)」および「後期 (l a t e)」遺伝子をエンコードするDNAゲノムを有する。初期遺伝子配列は、ウイルスDNA複製および転写、宿主免疫の回避、および正常な宿主細胞周期および他のプロセスの変更に関連する機能を有することが示されている。例えば、E 1 蛋白は、ATP-依存性DNAヘリカーゼであり、ウイルスDNA複製プロセスの開始に関与し、一方、E 2 はウイルス遺伝子発現およびDNA複製の両方を制御する調節蛋白である。そのE 1 および複製のウイルス起源の両方を結合できることにより、E 2 は起点でE 1 の局所濃度を生じさせ、かくしてウイルスDNA複製の開始を刺激する。E 4 蛋白は、十分には規定されていない多くの機能を有するようであるが、これらのうちには宿主細胞骨格との結合があり、一方、E 5 はエンドソームの酸性化を遅らせ、その結果、細胞表面でのEGFレセプターの発現が増大し、E 6 およびE 7 はいずれもそれぞれ細胞蛋白p 53 およびp R B と結合することが知られている。E 6 およびE 7 蛋白は、頸部癌と関連するH P Vタイプを形成することが知られており、腫瘍遺伝子 (oncogene) とよばれる。L 1 およびL 2 は2つのウイルス構造 (カプシド) 蛋白をエンコードする。

20

【0006】

30

歴史的に、ワクチンは病原体による感染症を予防する一方法と見なされ、免疫系に前もって病原体を認識させ、万一感染が起こった場合にこれを中和する。ワクチンは、病原体から得られる1またはそれ以上の抗原、通常、全生物 (死滅または弱毒化形態のいずれか) 、あるいは生物から選択された抗原ペプチドを含む。免疫系が抗原に暴露された場合に、個体の一生の間その免疫学的「記憶」を保持する細胞が生じる。その後の同じ抗原への暴露 (例えば、病原体による感染に際して) は特定の免疫応答を刺激し、この結果、感染性物質が除去または不活化される。

【0007】

30

免疫応答に対して2つの手段：すなわち、体液性 (抗体) 応答および細胞媒介応答がある。細胞 (ウイルスおよびある種の細菌) 内で複製する病原体から由来の蛋白抗原は、その後、主要組織適合性クラスI (M H C I) 分子に関連した感染した細胞表面上で示される短鎖ペプチドを放出する、感染した宿主細胞内で処理される。このM C H I およびペプチドに関連する複合体を抗原特異性C D 8 + T 細胞と接触させると、T 細胞は活性化され、細胞毒性活性を獲得する。これらの細胞毒性T 細胞 (C T L) は感染した宿主細胞を溶解させることができ、従って感染病原体の複製および蔓延を制限する。免疫応答のもう一つの重要な手段は、C D 4 + T 細胞により制御される。病原体由来の抗原は細胞外環境中に放出される際に、分化抗原提示細胞 (A P C) により取り込まれ、M H C I I 分子と関連してこれらの細胞の表面上で提示される。この複合体における抗原の認識はC D 4 + T 細胞を刺激して、他のT 細胞のエフェクターメカニズムを調節する可溶ファクター (サイトカイン) を分泌させる。抗体はB 細胞により産生される。抗原を分泌された抗体と結合することにより、病原体の感染性が中和され、B 細胞の表面上の膜結合抗体と抗原との結合がB 細胞の分化を刺激し、したがってB 細胞応答を増幅する。一般に、抗体および細胞性免疫応答 (C D 8 + およびC D 4 +) の両方が病原体による感染を制御するために必要とされる。

40

【0008】

50

免疫系は、病原体に感染した後でさえも、病原体の不活化または除去により感染を制御または消散させるために利用できると考えられる。かかる免疫療法（「治療用」ワクチンまたは免疫治療薬ともいう）は理論的には細胞性応答が有効であることを必要とするが、体液性および細胞性免疫応答は両方とも惹起することができる。

マウスにリン酸カルシウム沈殿DNAを接種すると、該DNAによりエンコードされるペプチドが発現されることが示されている（Benvenisty, N and Resh a f, L. P N A S 8 3 9 5 5 1 - 9 5 5 5）。その後、沈殿されなかったプラスミドDNAをマウスに筋肉内注射すると、筋肉細胞中にそのDNAが取り込まれ、エンコードされた蛋白が発現されることが示された。DNAの発現の結果、自然感染におけるように、エンコードされた病原体蛋白が宿主細胞内で產生されるので、このメカニズムは、免疫療法または治療的ワクチン接種に必要とされる細胞性免疫応答を刺激することができ、従ってDNAベースの薬剤を予防用ワクチンまたは免疫療法として適用できる。DNAワクチンはWO90/11092（Vical, Inc.）において記載されている。

10

20

30

【0009】

DNA予防接種は、筋肉内注射以外の手段により送達することができる。例えば、皮膚中の送達は、免疫メカニズムが、感染に対して障壁である組織、例えば、皮膚および粘膜中において高度に活性であるという事実を利用する。皮膚中の送達は注射、ジェットインジェクター（液体を皮膚または筋肉を含む基底組織中に圧力下で押し込む）またはパーティクルボンバードメント（particle bombardment）（上皮を透過するために十分な密度の粒子上にDNAをコートすることができる）により行うことができる（米国特許第5371015）。例えば、ヌクレオチド配列を、金ビーズ上にコートされたプラスミド中に組み入れることができ、これをその後、高圧下で、例えば、Haynesら、J. Biotechnology 44: 37-42 (1996) に記載されているようにして表皮中に投与する。これらの粒子を皮膚中に発射することにより、表皮細胞および表皮ラングルハンス細胞の両方が直接感染する。ラングルハンス細胞はDNAを取り込み、エンコードされたペプチドを発現し、これらを細胞表面MHC蛋白上に提示するために処理する、抗原提示細胞（APC）である。トランスフェクトされたラングルハンス細胞はリンパ節に移動し、ここで提示された抗原フラグメントをリンパ細胞に与え、免疫応答を惹起する。粒子により媒介される皮膚中の送達による免疫応答を誘発するためには非常に少量のDNA（1μg未満、0.5μg未満であることが多い）しか必要でなく、これは直接筋肉内注射後に免疫応答を生じるために必要であることが知られているDNAの量（ミリグラム）とは対照的である。

40

50

【0010】

トランスフェクトされた哺乳動物細胞、例えば、HeLa、293、またはCHO細胞におけるHPV蛋白の発現および検出はしばしば困難であることが判明し、従って、蛋白の検出可能な発現または純粋な蛋白の量を必要とする生化学的および免疫学的研究については、イー・コリ、バクロウイルスまたは酵母蛋白発現系が用いられることが多い。これらの系において、蛋白の収量は機能分析および精製ならびにその後の生化学的および免疫学的研究を実施可能にするために適当である。しかしながら、直接蛋白検出法（例えば、ウエスタンプロッティング）は典型的にはCMVまたはSV40などの強力なプロモーターを有するベクターを使用する場合でさえもトランスフェクトされた哺乳動物細胞においてE1蛋白発現を検出できない。哺乳動物細胞においてE1蛋白発現を増大させるために設計された方法は、E1遺伝子の5'フランкиング配列をクローニングすること（Remmら、J. Virol 1999 73, 3062-3070）およびトランスフェクション後のトランスフェクトされたE1プラスミドベクターの増幅（Zouら、J. Virol 1998 72, 3436-3441）を含む。インプットベクタープラスミドのトランスフェクション後の複製による増幅は、細胞におけるE1遺伝子コピー数を増大させるネット効果を有し、従って、蛋白レベルを増大させ、蛋白の検出を促進する（ウエスタンプロッティングによる）。E1蛋白発現および検出は哺乳動物細胞において問題であるので、ウサギ網状赤血球系（Promega）を用いて³⁵S標識されたメチオニンを用

いてインビトロ転写・翻訳により蛋白の発現を検出するものもいた (Gopalakrishnanら、Virology 1999 256, 330-339; Safarilら、Virology 1995 211, 385-396)。しかしながら、これは無細胞系であり、ファージT7からのRNAポリメラーゼの結合配列を含む修飾されたプロモーターの使用を必要とする。

【0011】

E1蛋白発現はさらに、DNA複製のHPV起点を含むプラスミドのインビトロDNA複製の検出により間接的に検出されている。プラスミドを含むこの複製起点の検出は、E1(およびE2)蛋白発現の代理の働きをする (Gopalakrishnanら、Virology 1999 256, 330-339; Luら、J. Virol 1993 67, 7131-7139およびDel Vecchioら、J. Virol 1992 66, 5949-5958)。E1およびE2は両方ともHPV起点の複製に必要とされ、従って哺乳動物細胞を、E1およびE2遺伝子の両方をエンコードするプラスミド、およびDNA複製のHPV起点を有する第三のプラスミドでトランスフェクションすると、標準的蛋白検出法(ウェスタンプロットティング)により検出できない場合でも、E1蛋白(およびE2蛋白)の発現ができたならば、起点を有するプラスミドの複製だけが得られるであろう。

【0012】

DNAコードは4つの文字(A、T、CおよびG)を有し、生物の遺伝子においてエンコードされる蛋白のアミノ酸を表す3文字「コドン」を表すためにこれらを用いる。DNA分子に沿ったコドンの直線状配列をこれらの遺伝子によりエンコードされる蛋白におけるアミノ酸の直線状配列中に翻訳する。コードは高度に変性し、61個のコドンが20種の天然のアミノ酸をコードし、3個のコドンが「停止」シグナルを表す。従って、ほとんどのアミノ酸は1以上のコドンによりコードされ、実際、いくつかは4以上の異なるコドンによりコードされる。

所定のアミノ酸をコードするために1以上のコドンが利用可能である場合、生物のコドン使用パターンは高度に非ランダムであることが観察されている。異なる種はそのコドン選択において異なる傾向を示し、さらに、コドンの利用は単一の種において高レベルおよび低レベルで発現される遺伝子間で著しく異なる。この傾向はウイルス、植物、細菌および哺乳動物細胞において異なり、いくつかの種は他よりもランダムコドン選択から大きく離れた偏りを示す。例えば、ヒトおよび他の哺乳動物は、ある細菌またはウイルスほど強く偏向していない。これらの理由から、イー・コリにおいて発現される哺乳動物遺伝子または哺乳動物細胞において発現されるウイルス遺伝子は、有効な発現のコドンが不適当に分布している可能性が高い。しかしながら、イー・コリ発現に適したコドン使用パターンを有する遺伝子は、ヒトにおいても有効に発現される可能性が高い。ヘテロローガスなDNA配列において、発現が起こる宿主においてほとんど観察されないコドンのクラスターが存在することは、該宿主における低いヘテロローガスな発現の前兆となる。

【0013】

コドンを宿主において稀なものから宿主に好ましいものへ変更すること(「コドン最適化」)によりヘテロローガスな発現レベルが向上されるいくつかの例がある。例えば、BPV(ウシパピローマウイルス)後期遺伝子L1およびL2は哺乳動物コドン使用パターンに関して最適化され、これは哺乳動物(Cos-1)細胞培養において野生型HPV配列よりも増大した発現レベルを提供することが示されている (Zhouら、J. Virol 1999 73, 4972-4982)。この研究において、哺乳動物(使用率>2%)におけるよりもBPVにおいて2倍以上の頻度で起こる全てのBPVコドン、および使用率が1.5より大きいほとんどのコドンは、優先的に用いられる哺乳動物コドンにより保存的に置換された。WO97/31115、WO97/48370およびWO98/34640(Merck & Co., Inc.)において、HIV遺伝子またはそのセグメントのコドン最適化の結果、コドン最適化配列が、そのために最適化される宿主哺乳動物においてDNAワクチンとして用いられる場合に、蛋白発現が増大し、免疫原性が向上

されることが示されている。この研究において、配列は、各ウイルスコドンは意図される宿主の最適コドンと保存的に置換されるので、完全に最適化コドン（これが望ましくない制限サイト、イントロンスプライスサイトなどを導入する場合を除く）からなる。

【 0 0 1 4 】

第一の態様に従って、本発明は H P V アミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチド配列を提供し、該ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは高度に発現された哺乳動物遺伝子のものと類似している。好ましくは、ポリヌクレオチド配列は D N A 配列である。望ましくは、ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似している。理想的には、ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは、高度に発現されたイー・コリ遺伝子のものとも類似している。ポリヌクレオチド配列は D N A 配列、例えば二本鎖 D N A 配列である。好ましくは、ポリヌクレオチド配列は、頸部癌、良性皮膚疣瘍または陰部疣瘍に関連する H P V タイプまたはサブタイプ、例えば、1 - 4、6、7、10、11、16、18、26 - 29、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 および 68 型、好ましくは 6、11、16、18、33 または 45 型（特に頸部癌および陰部疣瘍と関連する）、最も好ましくは H P V 11、6 a または 6 b の H P V ポリペプチドをエンコードする。

10

【 0 0 1 5 】

従って、一緒になって H P V アミノ酸配列をエンコードする複数のコドンを含む合成遺伝子が提供され、アミノ酸配列をエンコードするために用いられる可能なコドンの選択は、合成遺伝子におけるコドン使用の頻度がパピローマウイルス遺伝子のものよりも高度に発現された哺乳動物遺伝子のものと密接に類似するように、最適哺乳動物コドン使用と類似するように変更されている。好ましくは、コドン使用パターンは高度に発現されたヒト遺伝子と実質的に同じである。

20

ある例において、エンコードされたアミノ酸配列は野生型 H P V アミノ酸配列である。別の例において、エンコードされたアミノ酸配列は、ポリペプチドの 1 以上の天然の生物学的機能を減少または不活性化するために十分なアミノ酸の変化、例えば、アミノ酸点突然変異を有する野生型配列を含む変異 H P V アミノ酸配列である。変異アミノ酸配列は、望ましくは野生型ポリペプチドの免疫原性を保持する。

20

【 0 0 1 6 】

エンコードされた H P V ポリペプチドは、初期遺伝子産物、例えば、E 1、E 2 または E 7、またはそのフラグメント、類似体または融合物を含んでもよいし、あるいは後期遺伝子産物、例えば、L 1 または L 2、あるいはそのフラグメント、類似体または融合物であってもよい。本発明のポリヌクレオチドは、例えば、2 以上の H P V 初期遺伝子産物、H P V 初期遺伝子産物および H P V 後期遺伝子産物間、または 2 以上の H P V 後期遺伝子産物間、1 以上の H P V 遺伝子産物のフラグメント間、または H P V 遺伝子産物（またはそのフラグメント）および H P V 以外の供給源由来のポリペプチド、例えば、アジュバントまたは標的化ペプチド、あるいはポリペプチド、例えば、H B V コアペプチドの間の融合物をエンコードする。融合は、同一または異なるウイルスタイプまたはサブタイプ由来の H P V 遺伝子産物間であってもよい。かかる融合物は望ましくは融合ポリペプチド成分の免疫原性を保持する。好ましくは、エンコードされた H P V ポリペプチドは初期遺伝子産物の全体または一部を含み、最も好ましくは、E 1 または E 2 を含む。一例において、ポリヌクレオチド配列は、図 1 において示す H P V 6 b の野生型 E 1 ポリペプチド、あるいはそのフラグメントまたは類似体をエンコードする。もう一つの例において、ポリヌクレオチド配列は：図 2 に示す変異 H P V 6 b E 1 アミノ酸配列；H P V 1 1 または 6 a または 6 b の野生型 E 2 アミノ酸配列（図 3）；図 4 b の変異 H P V 6 b E 2 アミノ酸配列；および図 4 a の変異 H P V 1 1 E 2 配列またはそのフラグメント、類似体または融合物（エンコードされたポリペプチドが免疫原性を保持するもの）の 1 以上をエンコードすることができる。

30

【 0 0 1 7 】

本発明に従って、ポリヌクレオチドのコドン使用パターンは、好ましくは標的生物の高度

40

50

に発現された遺伝子において 0.2 未満の RSCU 値を有するコドンを排除する。相対的同義コドン使用 (RSCU) 値は、アミノ酸のすべてのコドンが等しく頻繁に用いられる場合に予想される数で観察されるコドン数を割ったものである。本発明のポリヌクレオチドは、高度に発現されたヒト遺伝子について一般に 0.3 以上、好ましくは 0.4 以上、最も好ましくは 0.5 以上であるが、1 未満のコドン使用係数 (以下に定義) を有する。好ましくは、ポリヌクレオチドは高度に発現されたイー・コリ遺伝子について 0.5 以上、好ましくは 0.6 以上、最も好ましくは 0.7 以上のコドン使用係数を有する。

【0018】

一例において、本発明は、図 5 または図 6 に示すポリヌクレオチド配列、またはそのコドン使用パターンを保持するそのフラグメントまたは類似体を提供する。さらにもう一つの例において、本発明は図 5 または図 6 において示す配列と相補的なポリヌクレオチド配列を提供する。

本発明の第二の態様に従って、本発明の第一の態様のポリヌクレオチド配列の発現を含み、発現を行うことができ、ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが高度に発現された哺乳動物遺伝子、好ましくは高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似した HPV アミノ酸配列をエンコードする発現ベクターが提供される。ベクターは細菌、昆虫または哺乳動物細胞、特にヒト細胞において、ヘテロローガスな DNA の発現を行うのに適している。一例において、発現ベクターは p7313PLc である (図 7)。

【0019】

本発明の第三の態様に従って、本発明の第一の態様のポリヌクレオチド配列、または第二の態様の発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。宿主細胞は、細菌、例えば、イー・コリ、哺乳動物、例えば、ヒトであってもよいし、あるいは昆虫細胞であってもよい。本発明のベクターを含む哺乳動物細胞は、インビトロでトランスフェクトされた培養細胞であってもよいし、あるいは哺乳動物にベクターを投与することによりインビボでトランスフェクトすることもできる。

第四の態様において、本発明は、本発明の第一の態様のポリヌクレオチド配列を含む医薬組成物を提供する。好ましくは、該組成物は本発明の第二の態様の DNA ベクターを含む。好ましい態様において、組成物は、HPV アミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチド配列をエンコードするベクターを含む DNA でコートされた複数の粒子、好ましくは金粒子を含み、該ポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンは、高度に発現された哺乳動物遺伝子、特にヒト遺伝子のものと類似している。もう一つの例において、組成物は医薬的に許容される賦形剤および本発明の第二の態様の DNA ベクターを含む。組成物はまたアジュバントを含んでもよい。

【0020】

さらにもう一つの態様において、本発明は、高度に発現された哺乳動物遺伝子のものと類似し、野生型 HPV アミノ酸配列をエンコードするコドン使用パターンを有する配列またはポリペプチドの 1 以上の天然の機能を不活性化するために十分なアミノ酸変化を有する野生型配列を含む変異 HPV アミノ酸配列を産生するために、野生型 HPV ヌクレオチド配列のコドン使用パターンを変更する工程、またはポリヌクレオチド配列を合成する工程を含む、医薬組成物の製造法を提供する。

さらに、第一の態様のポリヌクレオチド、または本発明の第二の態様のベクターの、HPV 感染症、好ましくは頸部癌、良性皮膚疣瘍または陰部疣瘍、例えば、1~4、6、7、10、11、16、18、26~29、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、および 68 型に関連する HPV タイプまたはサブタイプによる感染症の治療または予防における使用も提供される。ある態様において、本発明は、特に頸部癌および陰部疣瘍に関連する 6、11、16、18、33 または 45 型、最も好ましくは HPV 11、6a または 6b の HPV 感染症の治療または予防における、第一の態様のポリヌクレオチド、または本発明の第二の態様のベクターの使用を提供する。本発明はさらに、第一の態様のポリヌクレオチド、本発明の第二の態様のベクターまたは本発明の第四の態様の医薬組成物の、皮膚疣瘍、陰部疣瘍、有意性が未確認の異型扁平上皮細胞 (ASCUS)

10

20

30

40

50

S)、頸部異形成、子宮頸管上皮内新生腫瘍(CIN)または頸部癌の治療または予防における使用を提供する。従って、本発明はさらに、1~4、6、7、10、11、16、18、26~29、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、および68型の1以上のHPV感染症、またはこれに付随する任意の症状または疾患の治療または予防用医薬の製造における、第一の態様のポリヌクレオチド、または本発明の第二の態様のベクターの使用も提供する。

【0021】

本発明はまた、有効量の本発明の第一の態様のポリヌクレオチド、第二の態様のベクターまたは本発明の第四の態様の医薬組成物を投与することを含む、HPV感染症、特にHPV1~4、6、7、10、11、16、18、26~29、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、および68型の1以上による感染症、またはこれに付随する任意の症状または疾患を治療または予防する方法も提供する。医薬組成物の投与は、1またはそれ以上の個別の投与、例えば、「プライム・ブースト(prime boost)」治療ワクチンレジメの形態をとることができる。ある場合においては、「一次(prime)」予防接種は、本発明のポリヌクレオチド、好ましくはプラスミド由来のベクター中に組み入れられたものの粒子媒介DNA送達および同じポリヌクレオチド配列を含む組換えウイルスベクターの投与による「ブースト」によってもよい。

【0022】

本明細書および特許請求の範囲全体において、「comprise」および「include」なる用語及びその変化である「comprises」、「comprising」、「includes」および「including」なる言葉は、包括的に理解されるべきである。すなわち、これらの用語は、状況が許容する場合には、具体的に明記されていない他のものまたは数値も含むことを意図する。

「類似体」なる用語は、本発明のもう一つのポリヌクレオチドと同じアミノ酸配列をエンコードするが、同じコドン使用パターンを保持しながら、例えば同じコドン使用パターンまたは他のポリヌクレオチドの0.1以内、好ましくは0.05以内のコドン使用係数を有しながら、遺伝子コードの重複により異なるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを意味する。

【0023】

「コドン使用パターン(codon usage pattern)」なる用語は、検討しているヌクレオチド配列、遺伝子または遺伝子のクラス(例えば、高度に発現された哺乳動物遺伝子)におけるすべてのコドンの平均的出現頻度を意味する。ヒトを含む哺乳動物のコドン使用パターンは、文献において見出すことができる(例えば、Nakamuraら、Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215参照)。

本発明のポリヌクレオチドにおいて、コドン使用パターンはヒトパピローマウイルスに典型的なものから標的生物、例えばイー・コリまたは哺乳動物、特にヒトに偏向したコドンをより密接に表すものへ変更される。「コドン使用係数(codon usage coefficient)」は、所定のポリヌクレオチド配列のコドン使用パターンが標的種のものとどれほどよく類似しているかを示す尺度である。コドン出現頻度は、多くの種の高度に発現された遺伝子について文献から得ることができる(例えば、Nakamuraら、Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215参照)。それぞれ61のコドンについてのコドン出現頻度(選択されたクラスの遺伝子の1000コドンについての発生数として表される)は、それぞれ20の天然のアミノ酸について標準化され、従って各アミノ酸について最も頻繁に使用されるコドンの値を1とし、それほど一般的でないコドンについての頻度を0から1の間になるように評価する。従って、61コドンのそれぞれに標的種の高度に発現された遺伝子について1またはそれ以下の値が割り当てられる。該種の高度に発現された遺伝子に関連して、特定のポリヌクレオチドについてのコドン使用係数を計算するために、特定のポリヌクレオチドのそれぞれのコドンについての評価された値を記録し、これらの値のすべての幾何平均を得る(これら

10

20

30

40

50

の値の自然対数の合計をコドンの合計数で割り、真数をとる）。係数は0から1の間の値を有し、係数が高いほど、ポリヌクレオチドにおいてより多くのコドンが頻繁に用いられる。ポリヌクレオチド配列がコドン使用係数1を有するならば、コドンのすべては標的種の高度に発現された遺伝子について「最も頻度の高い」コドンである。

【0024】

さらに短いポリヌクレオチドは本発明の範囲内に含まれる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、HPV蛋白のフラグメントをエンコードすることができる。少なくとも8、例えば、8～10のアミノ酸または20、50、60、70、80、100、150または200までのアミノ酸の長さのフラグメントをエンコードするポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが高度に発現された哺乳動物遺伝子のものと類似したコドン使用パターンを有し、エンコードされたオリゴまたはポリペプチドがHPV抗原性を示す限り、本発明の範囲内にあると考えられる。特に、排他的ではないが、本発明のこの態様は、ポリヌクレオチドが完全HPV蛋白配列のフラグメントをエンコードし、該蛋白の1またはそれ以上の独立した蛋白を表す場合を包含する。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドはイー・コリおよび哺乳動物細胞において、同じアミノ酸配列をエンコードする対応する野生型配列よりも高い発現を示す。いずれかの理論により拘束されることを望むものではないが、これは少なくとも2つの理由のためと考えられる。まず、宿主細胞のものに近いコドン使用パターンを有すると、配列は細胞翻訳機構によりさらに容易に処理される。第二に、30%までのヌクレオチド配列（またはそれ以上）が野生型配列と異なる場合、転写または翻訳を妨害する部位（例えば、蛋白結合部位）は除去または変更される。

【0026】

いくつかの例において、本発明のポリヌクレオチドはイー・コリおよび哺乳動物（例えば、ヒト）遺伝子と類似したコドン使用パターンを示す。これは、配列が哺乳動物の予防接種およびイー・コリ細胞を用いたインビトロで有意な量の抗原蛋白の生成（例えば、哺乳動物またはヒト組織における発現のレベルを判断するためにイムノアッセイなどの分析において用いるために）において用いられる場合に特に有利である。

前記のように、本発明は本発明のヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。かかる発現ベクターは分子生物学の分野において日常的に構築され、例えば、プラスミドDNAおよび適当なイニシエーター、プロモーター、エンハンサーおよび他の要素、例えば、蛋白を発現させるために必要で、正しい方向に配置されたポリアデニル化シグナルの使用を含む。他の適当なベクターは当業者には明らかである。この点に関するさらなる例は、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. CSH Laboratory Press (1989) 参照。

【0027】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチド、またはベクターにおいて本発明において使用されるポリヌクレオチドは、宿主細胞によるコーディング配列の発現が可能な調節配列と操作可能に結合している。すなわち、ベクターは発現ベクターである。「操作可能に結合」なる用語は、記載された成分がその意図される方法で機能するような関係にあるところの、並列関係をいう。コーディング配列と「操作可能に結合」した調節配列、例えば、プロモーターは、コーディング配列の発現が調節配列と適合する条件下で達成されるような位置にある。

ベクターは、例えば、プラスミド、人工染色体（例えば、BAC、PAC、YAC）、ウイルスまたは複製の起点、所望によりポリヌクレオチドの発現のプロモーターまたは所望によりプロモーターのレギュレーターを備えたファージベクターであってもよい。ベクターは1以上の選択マーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドまたは真菌ベクターの耐性遺伝子の場合にはアンピシリンまたはカナマイシン耐性遺伝子を含んでもよい。ベクターは、例えばDNAまたはRNAの産生についてはインビトロで用いることができ、あるいは

10

20

30

40

50

例えばベクターによりエンコードされる蛋白の產生については、例えば哺乳動物宿主細胞などの宿主細胞をトランスフェクトまたは形質転換するために用いることができる。ベクターは、インビボで、例えば、DNA予防接種または遺伝子療法において用いることができる。

【0028】

プロモーターおよび他の発現調節シグナルは、発現がデザインされる宿主細胞と適合性であるように選択することができる。例えば、哺乳動物プロモーターはカドミウムなどの重金属に反応して誘発することができる金属結合蛋白プロモーター、および - アクチンプロモーターを含む。ウイルスプロモーター、例えば、SV40 ラージ T 抗原プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 即時型 (IE) プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTR プロモーター、アデノウイルスプロモーター、またはHPV プロモーター、特に HPV 上流調節領域 (URR) も用いることができる。これらのプロモーターはすべて十分に記載され、当該分野において容易に入手可能である。

適当なウイルスベクターの例としては、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアまたはアルファ - ウイルスベクターならびにレンチウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスを含むレトロウイルスが挙げられる。これらのウイルスを用いた遺伝子移入技術は当業者に公知である。例えば、レトロウイルスベクターを用いて、本発明のポリヌクレオチドを宿主ゲノム中に安定して組み込むことができるが、かかる組換えは好ましくない。対照的に複製欠損アデノウイルスベクターはエピソームのままであり、従って一次的な発現を許容する。例えばサブユニットワクチンとしてまたはイムノアッセイにおいて用いられる、本発明のポリヌクレオチドによりエンコードされるHPV蛋白を產生するため、昆虫細胞（例えばバクロウイルスベクター）、ヒト細胞または細菌において発現を行うことができるベクターを用いることができる。

【0029】

本発明のポリヌクレオチドは、エンコードされた蛋白の発現により產生において有用であり、該発現はインビトロ、インビボまたはエクスピボにおいて起こり得る。ヌクレオチドは従って、収率を増大させるために組換え蛋白合成に関与するか、またはDNA予防接種技術において用いられる治療薬としての用途を有する。本発明のポリヌクレオチドがインビトロまたはエクスピボでのエンコードされた蛋白の產生において用いられる場合、細胞、例えば細胞培養におけるものは、発現されるポリヌクレオチドを含むように修飾される。かかる細胞は、一時、または好ましくは安定な哺乳動物細胞系を含む。本発明のポリペプチドをエンコードするベクターの挿入により修飾される細胞の具体例としては、哺乳動物 HEK293T、CHO、HeLa、293 および COS 細胞が挙げられる。好ましくは、選択される細胞系は安定であるだけでなく、ポリペプチドの成熟グリコシル化および細胞表面発現を許容するものである。発現は、形質転換された卵母細胞において達成することができる。ポリペプチドは、本発明のポリヌクレオチドから、トランスジェニックなヒト以外の動物、例えば、マウスの細胞において発現することができる。本発明のポリヌクレオチドからポリペプチドを発現するトランスジェニックなヒト以外の動物は本発明の範囲内に含まれる。

【0030】

本発明のポリヌクレオチドが例えばDNA予防接種において治療薬として有用である場合、核酸が予防接種される哺乳動物、例えばヒトに投与されるであろう。核酸、例えば、RNA または DNA、好ましくは DNA はベクター、例えば前記のようなものの形態において提供され、これは哺乳動物の細胞において発現することができる。ポリヌクレオチドは任意の利用可能な技術により投与することができる。例えば、核酸を注射により、好ましくは皮内、皮下または筋肉内により導入することができる。別法として、核酸は核酸送達装置、例えば、粒子媒介DNAデリバリー (PMDD) を用いて皮膚中に直接送達することができる。この方法において、不活性粒子（例えば、金ビーズ）は核酸でコートされ、例えば発射装置から高圧下での発射により、これらが受容体の表面（例えば、皮膚）を透過するために十分な速度で加速される。（本発明の核酸分子でコートされた粒子は、か

10

20

30

40

50

かる粒子をロードされた送達装置と同様に、本発明の範囲に含まれる）。組成物は望ましくは、0.5～5 μm、好ましくは約2 μmの平均直径を有する金粒子を含む。好ましい例において、コートされた金ビーズは、カートリッジとしての働きをするために管中に装填され、各カートリッジは、0.1～5 μg、好ましくは約0.5 μg DNA / カートリッジでコートされた0.1～1 mg、好ましくは0.5 mgの金を含む。

【0031】

ネイクドポリヌクレオチドまたはベクターを患者に導入する適当な技術は、適当なビヒクルを用いた局所適用を包含する。核酸は皮膚、または粘膜表面に、例えば、鼻内、経口、膣内または直腸内投与により局所投与することができる。ネイクドポリヌクレオチドまたはベクターは医薬的に許容される賦形剤、例えばリン酸塩緩衝塩溶液 (PBS) と一緒に存在することができる。DNA 吸収は、ブピバカイン (bupivacaine) などの促進剤の使用により、別々にまたはDNA処方に含めるかのいずれかによりさらに促進することができる。核酸を受容者に直接投与する他の方法は、超音波、電気刺激、電気穿孔法および米国特許第5697901号に記載されているミクロシーディング (microseeding) を包含する。

核酸構築物の吸収は、いくつかの公知技術、例えば、トランスフェクション剤の使用を含むものにより向上させることができる。これらの試薬の例としては、カチオン試薬、例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストランおよびリポフェクタント、例えば、リポフェクタムおよびトランスフェクタムが挙げられる。投与される核酸の量は変更することができる。典型的には、核酸は1 pg～1 mgの範囲の量において投与され、好ましくは粒子媒介遺伝子送達については1 pg～10 μgの核酸および他の経路については10 μg～1 mgである。

【0032】

本発明の核酸配列はまた、遺伝子療法において有用な特別の送達ベクターにより投与することもできる。遺伝子療法は、例えば、Vermeil, Nature 1997, 389: 239-242により記載されている。ウイルスおよび非ウイルスベクター系の両方を用いることができる。ウイルスベースの系としては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、カナリア痘ウイルスおよびワクシニアウイルスに基づく系が挙げられる。非ウイルスベースの系としては、核酸の直接投与、微小球封入技術 (ポリ(ラクチド-コ-グリコシド) およびリポソームベースの系) が挙げられる。ウイルスおよび非ウイルス送達系は、初回接種後にブースター注射をすることが望ましい場合に、プラスミドなどの非ウイルスベクターを用いて、例えば、初期「プライム」DNA予防接種と、それに続くウイルスベクターまたは非ウイルスベースのシステムを用いた1以上の「ブースト」接種を組み合わせることができる。

【0033】

本発明の核酸配列はさらに、形質転換された細胞により投与することもできる。かかる細胞は、対象から収穫された細胞を包含する。本発明のネイクドポリヌクレオチドまたはベクターはインビトロでかかる細胞中に導入することができ、形質転換された細胞を後に対象に戻すことができる。本発明のポリヌクレオチドはホモローガスな組換え事象により、細胞中にすでに存在している核酸中に組み入れることができる。形質転換された細胞は、望ましいならば、インビトロで成長させ、結果として得られる細胞の1以上を本発明において用いることができる。細胞は、患者の適当な部位に公知の外科手術または顕微手術技術 (移植、顕微注射など) により提供することができる。

適当な細胞としては、抗原提示細胞 (APC)、例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球および有効なAPCにするために処理できる他の細胞が挙げられる。かかる細胞は、抗原を提示する能力を増大させるため、T細胞応答の活性化および/または維持を向上させるため、抗腫瘍、例えば、抗頸部癌効果を有するため、および/または免疫学的に受容体と適合性 (すなわち、適当したHLAハプロタイプ) とするために遺伝子的に修飾することができる。APCは一般に、腫瘍および腫瘍周辺組織を含む様々な生物学的液体および器官の任意のものから単離することができ、オートローガス、同種、同系または

10

20

30

40

50

異種細胞であってもよい。

【0034】

本発明のある好ましい例は、樹状細胞またはその原種を、インビトロで形質転換し、患者に戻すか、または例えば、粒子媒介DNA送達によりワクチンにおいて送達されるヌクレオチドのインビオ標的としてのいずれかで、抗原提示細胞として用いる。樹状細胞は、非常に有効なAPCであり(Banchereau and Steinmann, Nature 392: 245-251, 1998)、予防的または治療的抗腫瘍免疫を惹起するための生理学的アジュバントとして有効であることが証明されている(Timmerman and Levy, Ann. Rev. Med. 50: 507-529, 1999参照)。一般に、樹状細胞はその典型的な形状(自然位で星状、インビトロで見ることができる顕著な細胞質突起(樹状突起)を有する)、高い効率で抗原を取り込み、処理し、提示するその能力およびそのナイーブT細胞応答を活性化する能力に基づいて同定することができる。樹状細胞は、もちろんインビオまたはエクスピオで樹状細胞上に通常見られない特定の細胞表面レセプターまたはリガンド、例えば、本発明の構築物においてエンコードされる抗原を発現するために処理することができ、かかる修飾された樹状細胞は本発明に含まれる。樹状細胞の代替物として、分泌されたベシクル抗原をロードされた樹状細胞(エクソゾームと呼ばれる)をワクチン内において用いることができる(Zitvogelら、Nature Med. 4: 594-600, 1998参照)。

10

【0035】

樹状細胞および原種は、末梢血、骨髄、腫瘍浸潤細胞、腫瘍周辺組織-浸潤細胞、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血または任意の他の適当な組織または液体から得ることができる。例えば、樹状細胞は、GM-CSF、IL-4、IL-13および/またはTNFなどのサイトカインの組み合わせを末梢血から収穫した単球の培養物に添加することによりエクスピオで分化させることができる。別法として、末梢血、臍帯血または骨髄から収穫されたCD34陽性細胞を、GM-CSF、IL-3、TNF、CD40リガンド、リポ多糖LPS、flt3リガンド(プロフェッショナル抗原提示細胞、特に樹状細胞の生成において重要なサイトカイン)および/または樹状細胞の分化、成熟および増殖を誘発する他の成分の組み合わせの培地に添加することにより樹状細胞に分化させることができる。APSは、本発明において予想されるように、一般に抗原HPVアミノ酸配列、例えばコドン最適化ポリヌクレオチドをエンコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトすることができる。かかるトランスフェクションは、エクスピオで起こり、かかるトランスフェクトされた細胞を含む組成物またはワクチンを次に本明細書に記載するような治療目的で用いることができる。別法として、樹状突起または他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達ビヒクルを患者に投与することができ、その結果インビオで起こるトランスフェクションが起こる。樹状細胞のインビオおよびエクスピオトランスフェクションは、例えば一般に当該分野において公知の任意の方法、例えば、WO97/24447に記載されている方法、またはMahviら、Immunology and cell Biology 75: 456-460, 1997により記載されている粒子媒介法を用いて行うことができる。

20

【0036】

ワクチンおよび医薬組成物は、密封されたアンプルまたはバイアルなどの単一または多剤容器に入れて提供することができる。かかる容器は、好ましくは使用まで処方の無菌状態を保つために密封される。一般に、処方は油状または水性ビヒクル中懸濁液、溶液または乳液として貯蔵することができる。別法として、ワクチンまたは医薬組成物は、使用直前に滅菌液体担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態において貯蔵することができる。粒子媒介送達による投与を意図されるヌクレオチド配列を含むワクチンは、圧縮気体送達装置を用いて使用に適したカートリッジとして提供することができ、この場合において、カートリッジは中空管からなり、その内部表面はワクチンヌクレオチドを有する粒子で、所望により他の医薬的に許容される成分の存在下でコートされる。

30

【0037】

40

50

本発明の医薬組成物は、アジュバント化合物、またはDNAによりエンコードされる蛋白により誘発される免疫応答を調節または増大させる働きをする他の物質を含んでもよい。これらは、抗原と別に、または抗原との融合物としてのいずれかとしてDNAによりエンコードすることができるか、または処方の非DNA要素として含めることができる。本発明の処方中に含めることができるアジュバントタイプの物質の例としては、ユビキチン、リソソーム関連膜蛋白(LAMP)、B型肝炎ウイルスコア抗原、f1t3-リガンドおよび他のサイトカイン、例えば、IFN-αおよびGM-CSFが挙げられる。

他の適当なアジュバントは商業的に入手可能であり、例えば、フロイントの不完全アジュバントおよび完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, MI);

10

イミクイモド(Imiquimod)(3M, St. Paul, MN);レスイミクイモド(Resiquimod)(3M, St. Paul, MN);メルクアジュバント65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ);AS-2(SmithKline Beecham, Philadelphia, PA);アルミニウム塩、例えば、水酸化アルミニウムゲル(alum)またはリン酸アルミニウム;カルシウム、鉄または亜鉛の塩;アシル化チロシンの不溶性懸濁液;アシル化糖;カチオンまたはアニオン誘導化多糖類;ポリホスファゼン;生物分解性微小球;モノホスホリルリピッドAおよびquail Aである。サイトカイン、例えば、GM-CSFまたはインターロイキン-2、-7または-12もアジュバントとして用いることができる。

20

【0038】

本発明の処方において、アジュバント組成物が主にTh1タイプの免疫応答を誘発することが好ましい。従って、アジュバントは主にTh2から主にTh1タイプ応答へDNA-エンコードされた抗原に応答して生じる免疫応答を調節する働きをする。高レベルのTh1-タイプサイトカイン(例えば、IFN-、TNF、IL-2およびIL-12)は投与された抗原に対する細胞性免疫応答の誘発に有利である傾向にある。応答が主にTh1-タイプである好ましい例において、Th1-タイプサイトカインのレベルはTh2-タイプのサイトカインのレベルよりも増大する。これらのサイトカインのレベルは、標準的分析法を用いて容易に評価することができる。一連のサイトカインの概要については、MosmannおよびCoffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989を参照のこと。

30

【0039】

従って、主にTh1-タイプ応答を惹起するのに用いられる適当なアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピッドA、好ましくは3-デ-0-アシル化モノホスホリルリピッドA(3D-MPL)のアルミニウム塩との組み合わせが挙げられる。主にTH1タイプ免疫応答を誘発する他の公知アジュバントは、CpG含有オリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドはCpGジヌクレオチドがメチル化されていないことを特徴とする。かかるオリゴヌクレオチドは周知であり、例えば、WO96/02555に記載されている。免疫刺激DNA配列も、例えば、Satoら、Science 273:352, 1996により記載されている。CpG-含有オリゴヌクレオチドは同じまたは異なるポリヌクレオチド構築物においてパピローマ抗原から別々にエンコードすることができるか、または例えばこれとの融合物として直接隣接していてもよい。別法として、CpG-含有オリゴヌクレオチドは別々に、すなわち、エンコードされた抗原を含む組成物の一部としてではなく、投与することができる。CpGオリゴヌクレオチドは単独または他のアジュバントとの組み合わせにおいて用いることができる。例えば、向上されたシステムは、CpG含有オリゴヌクレオチドおよびサボニン誘導体の組み合わせ、特にWO00/09159およびWO00/62800に記載されているようなCpGとQS21の組み合わせを含む。好ましくは、該処方はさらに水中油エマルジョンおよび/またはトコフェノールを含む。

40

【0040】

50

もう一つの好ましいアジュvantはサポニン、好ましくはQS21であり(Aquila Biopharmaceutical Inc., Framingham, MA)、これは単独または他のアジュvantとの組み合わせにおいて用いることができる。例えば、向上された系は、モノホスホリルリピッドAとサポニン誘導体の組み合わせ、例えば、WO94/00153に記載されているようなQS21と3D-MPLの組み合わせ、またはWO96/33739に記載されているようなQS21がコレステロールで消されている反応原性が低い組成物を含む。他の好ましい処方は、水中油エマルジョンおよびトコフェノールを含む。QS21、3D-MPLおよび水中油エマルジョン中トコフェロールを含む有効なアジュvant処方はWO95/17210に記載されている。

他の好ましいアジュvantとしては、モンタニド(Montanide)ISA720(Seppic, France)、SAF(Chiron, California, United States)、ISCOMS(CSL)、MF-59(Chiron)、デトックス(Detox)(Ribi, Hamilton, MT)、RC-529(Corixa, Hamilton, MT)および他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート(AGPs)が挙げられる。

【0041】

他の好ましいアジュvantは、一般式(I)：

式(I)：HO(CH₂CH₂O)_n-A-R

(式中、nは1~50であり、Aは結合または-C(O)-であり、RはC1~50アルキルまたはフェニルC1~50アルキルである)のアジュvant分子を含む。

本発明の一例は、一般式(I)(式中、nは1~50の間であり、好ましくは4~24であり、最も好ましくは9である;R成分はC1~50、好ましくはC4~C20アルキルであり、最も好ましくはC12アルキルであり、Aは結合である)のポリオキシエチレンエーテルを含む処方を含む。ポリオキシエチレンエーテルの濃度は、0.1~20%の範囲であり、好ましくは0.1~10%であり、最も好ましくは0.1~1%の範囲である。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、次の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-9-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン-8-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。ポリオキシエチレンエーテル、例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテルは、メルクインデックス(第12版：収録7717)に記載されている。これらのアジュvant分子は、WO99/52549に記載されている。前記一般式(I)のポリオキシエチレンエーテルは、所望により、もう一つ別のアジュvantと組み合わせができる。例えば、好ましいアジュvantの組み合わせは、好ましくは係属中の英国特許出願番号GB9820956.2に記載されているようなCpGとの組み合わせである。

【0042】

ワクチンがアジュvantを含む場合、ワクチン処方は、2回に分けて投与することができる。例えば、抗原をエンコードするヌクレオチド構築物を含有する処方の一部をまず、例えば皮下または筋肉内注射により投与するか、または皮内粒子媒介送達により投与することができ、その後、アジュvantを含む処方を続いて直ちにまたはワクチン分野において熟練した医師には明らかである適当な間隔をあいて投与することができる。これらの状況下で、アジュvantは、抗原性処方と同じ経路によるか、または別の経路により投与することができる。他の例において、処方のアジュvant部分は、抗原性部分の前に投与される。一例において、アジュvantは、粒子媒介送達の前または後にいずれかに、抗原をエンコードするヌクレオチド配列の粒子媒介送達の部位で皮膚に適用される局所処方として投与される。

【0043】

次の実施例は、添付の図面を参照して本発明をさらに説明するものである。図1は、ジンバンク(Genbank)から得たHPV11、6aおよび6b型からのE1の野生型アミノ酸配列のプロトタイプを示す。

10

20

30

40

50

図2は、図1からのHPV6bE1のプロトタイプ野生型アミノ酸配列(6b~e1)を、生物学的活性を除去するために点突然変異を含むHPV6bE1アミノ酸配列(6n~e1mut)と並べて示す。

図3は、ジンバンクから得たHPV11、6aおよび6b型からのE2のプロトタイプ野生型アミノ酸配列を示す。

図4aは、図3からのHPV11E2のプロトタイプ野生型アミノ酸配列(Hpv-11e2-wt)を、生物学的活性を除去するために点突然変異を含むHPV11E2アミノ酸配列(Hpv-11e2-mut)および図6のヌクレオチド配列によりエンコードされるアミノ酸配列(Hpv-11e2-cомуt)と並べて示す。

図4bは、図3からのHPV6bE2のプロトタイプ野生型アミノ酸配列(Hpv-6be2-wt)を、生物学的活性を除去するために点突然変異を含むHPV6bE2アミノ酸配列(Hpv-6be2-mut)と並べて示す。

図5は、図2からのHPV6bE1の変異アミノ酸配列をエンコードする、高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似したコドン使用パターンを有するヌクレオチド配列を示す。

図6は、図4からのHPV11E2の変異アミノ酸配列をエンコードする、高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似したコドン使用パターンを有するヌクレオチド配列を示す。

図7は、DNAベクターp7313-PLcを示す。

図8は、アクリルアミドゲル上にかけ、発現されたE1蛋白と結合する抗体を示すために染色された実施例4からの細胞溶解物サンプルを示す。

図9は、本発明のポリヌクレオチドでマウスを免疫化した後の抗原攻撃に対する細胞応答を示す(実施例6)。

図10は、アクリルアミドゲル上にかけ、発現されたE2蛋白と結合する蛋白を示すために染色された実施例7からの細胞溶解物サンプルを示す。

【0044】

実施例1 - HPV6bE1のコドン最適化

ジンバンクから得たHPV6bE1の野生型プロトタイプアミノ酸配列を図1に示す(下の配列)。この図は、11、6aおよび6b型のHPVウイルスプロトタイプ配列間のこの蛋白の高レベルの相同性を示す。同様に、図3は、HPV11、6aおよび6bのE2蛋白の野生型プロトタイプアミノ酸配列を示す。HPV6b配列を用いた免疫療法(治療的ワクチン)は、交差反応して、3つのウイルスタイプすべてに対して予防的または治療的免疫応答を提供することが予想される。

HPV6bE1配列のコドン使用を、高度に発現されたヒトおよびイー・コリ遺伝子と比較し、両種について低いコドン使用係数が見出された。生物は所定のアミノ酸についてその最も好ましいコドンを独占的に使用するものではないため、各アミノ酸残基について最も豊富なコドンを使用しただけでは、ひずんだコドン使用パターンが得られる。従って、高度に発現されたイー・コリおよびヒト遺伝子において自然に見出されるものに近いコドン出現頻度を有する合成遺伝子を得るために、コドンは統計的方法を用いて決めた。

【0045】

合成遺伝子におけるコドンは、Calgene(R.S. Hale and G.Thompsonにより作成)とよばれるVisual Basicプログラムを用いて決められる(Protein Expression and Purification Vol. 12 pp. 185-188 (1988))。もとの配列における各アミノ酸残基について、コドンは、高度に発現されたイー・コリにおいてこれが出現する可能性に基づいて決めた。マイクロソフトウインドウズ3.1で動作するプログラムの詳細はその作者から入手できる。プログラムはコドンを合成遺伝子に割り当てるために統計的方法を利用するので、結果として得られるコドンはすべてが標的生物において最も頻繁に用いられるわけではない。むしろ、標的生物の頻繁に用いられるコドンおよびあまり用いられないコドンの割合は、正しい割合においてコドンを割り当てるにより合成配列において反映される。しかしながら、特定のコドンを配列中の特定の位置に割り当てる厳重な規則がないので、これを実行するたびにプログラムは異なる合成遺伝子を生じるが、それぞれは同じコ

10

20

30

40

50

ドン使用パターンを有し、それぞれが同じアミノ酸配列をエンコードする。プログラムを所定のアミノ酸配列および所定の標的生物について数回実行するならば、いくつかの異なるヌクレオチド配列が生じ、これは制限部位の数、種類および位置、イントロンスプライスシグナルなどが異なり、そのいくつかは望ましいものではない。当業者らはこれらの特徴に基づいてポリペプチドの発現において用いられる適当な配列を選択することができる。

【0046】

さらに、コドンは統計に基づいてランダムに決められるので、標的生物において比較的まれに用いられる2以上のコドンがきわめて接近して密集する可能性がある（おそらくはありそうもないが）。かかるクラスターは翻訳の機構を混乱させ、その結果、発現率が特に低くなり、従って最適化された遺伝子におけるコドンを選択するためのアルゴリズムは、任意のまれなコドンクラスターが偶然選択されることを防止するために高度に発現された遺伝子について0.2未満のRSCU値を有するコドンを排除した。残存するコドンの分布を次に高度に発現されたイー・コリ遺伝子についての頻度に従って配分して、イー・コリ遺伝子のもの（係数=0.85）および高度に発現されたヒト遺伝子のもの（係数=0.50）と類似した合成遺伝子内の全体的な分布を得る。高度に発現されたヒト遺伝子のコドン出現頻度パターンに従ってコドンを配分するために、稀なコドンの排除を任意にするSyngene（Peter Ertl、未公開）（Colcogeneプログラムの最新版）を用いる以外は、HPV11E2のコドン最適化ヌクレオチド配列を得るために同様のプロセスを用いた。E1についてのコドン割り当てと異なり、稀なコドンは除外されない。同時に、以下に記載するように、K111Aアミノ酸変化をエンコードするためにオリゴヌクレオチドの一つについて変更を行った。

【0047】

コドン最適化E1およびE2遺伝子中に変異を導入して、E1（K83G、R84GおよびG483D）およびE2（K111A）アミノ酸配列において点突然変異を生じさせた。変異した遺伝子のアミノ酸配列を図2（HPV6bE1）および4（HPV6bE2およびHPV11E2）において示す（野生型プロトタイプ配列と並べる）。HPV6bE1のコドン最適化および変異ヌクレオチド配列を図5に示す。HPV6bE2のコドン最適化および変異ヌクレオチド配列を図6に示す。図4において、コドン最適化および変異HPV11E2遺伝子の発現により得られるポリペプチドのアミノ酸配列も、プロトタイプ野生型および変異野生型アミノ酸配列と並べて示して、ヌクレオチド配列のコドン最適化がエンコードされるアミノ酸配列（変異野生型配列と同一）を変更しないことを示す。

【0048】

実施例2 - コドン最適化HPV6bE1ポリヌクレオチド配列の構築

遺伝子設計：

前記の最適化ソフトウェアを用いて、重複40merオリゴヌクレオチドを最適化配列から計算した。制限部位を含む末端オリゴヌクレオチドは60merであった。オリゴヌクレオチドはLife Technologies Ltdから入手した（50ナノモル濃度、脱保護および非リン酸化）。

オリゴヌクレオチドアセンブリ：

各オリゴヌクレオチドを二重蒸留水中に溶解させて最終濃度100マイクロモル（ μ M）にし、すべての96オリゴヌクレオチドの同じ混合物を調製した（100 μ M）。合成は、Roche Boehringerから得たPwoポリメラーゼ（カタログ番号1644955）を用いて次のようにしてセットアップした。

二重蒸留水 86 μ l

Pwo 10X緩衝液 10 μ l

dNTPミックス 1 μ l (100mMdNTPの同等の混合物)

オリゴミックス 1 μ l (100 μ M oligoの同等の混合物)

Pwoポリメラーゼ 2 μ l

前記反応ミックスについて次の条件を用いてTrio Thermoblock（Bio 50

metra) でポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った：

1. 40 2 分
2. 72 10 秒
3. 94 15 秒
4. 40 30 秒
5. 72 20 秒 + 2 秒 / サイクル
6. 4

サイクルを工程 3 から 5 の間で 25 回繰り返した。

25 サイクル完了後、10 μl のアリコートを各試験管から除去し、0.8% トリスアセテート (TAE) アガロースゲル上に付し、長波 UV 光下で観察した。合成された E 1 10 DNA の予想されるサイズは約 2 kb である。

【0049】

遺伝子回収：

合成遺伝子を、合成 oligo の N 末端上に Not 1 制限部位および C 末端合成オリゴに Bam H 1 部位を含む 2 つの末端オリゴを用いてポリメラーゼを用いて PCR により回収した。

二重蒸留水	65 μl
Pwo 10X 緩衝液	10 μl
dNTP ミックス	1 μl (100 mM dNTP の同等の混合物)
アセンブリミックス	20 μl (前回の PCR から入手)
N 末端 oligo	1 μl (100 μM)
C 末端 oligo	1 μl (100 μM)
Pwo ポリメラーゼ	2 μl
1. 94	45 秒
2. 72	2 分 + 1 分 / 500 bp
3. 72	10 分
4. 4	

サイクルを工程 2 と 1 の間で 25 回繰り返した。

DNA を合計 50 μl のキット溶出緩衝液中に再懸濁させる前に、PCR 産物を次に QIAquick PCR 精製キット (Qiagen カタログ番号 28104) を用いて精製した。10 μl のアリコートを Not 1 および Bam H 1 制限酵素 (Life Time Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, Scotland) で 37 で 2 時間消化した。この消化物を 0.8% TAE アガロースゲル上でゲル精製し、2 kb DNA 産物を切除し、QIAquick ゲル抽出キット (Qiagen カタログ番号 28704) を用いて抽出した。最終消化精製 DNA フラグメントを合計 50 μl のキット溶出緩衝液中に溶出させた。

【0050】

この PCR フラグメントをベクター p7313PLc (図 7) (Powderject Vaccines Inc., さらなる詳細は以下を参照) 中にクローンし、能力 JM109 細胞 (Promega カタログ番号 P9751) 中に形質転換した。選択されたクローンからのプラスミド DNA は Nco 1 - Bam H 1 および Nco 1 - Eco RI での消化によりチェックされた制限酵素であった。2 kb フラグメント挿入物を有する 5 の正しいクローンを選択し、挿入 DNA を配列化させた。3 つの点突然変異だけを含む挿入物を有する 1 つのクローンをさらに使用するために選択した。3 つの点突然変異を他のクローンからのホモローガスな小フラグメントでのライゲーションスワップにより補正した。補正されたクローンを制限酵素消化により再チェックし、挿入 DNA を完全に配列化させた。このクローンを p6bE1c/o と称する。同時に、比較発現および免疫化の研究のために野生型 HPV-6b (EMBO J. 2 (12) 2314 - 2318 1983) および HPV-11 (Virology 151, 124 - 130 1986) のゲノム 50

クローンから P C R 増幅し、代表的フラグメントを N o t 1 - B a m H 1 消化ベクター p 7 3 1 3 P L c 中にクローンした。これらのクローンをそれぞれ p 6 b E 1 w / t および p 1 1 E 1 w / t と称する。

クローン p 6 b E 1 c / o および p 6 b E 1 w / t における E 1 遺伝子をさらに変異させて、アミノ酸変化 K 8 3 G、K 8 4 G および G 4 3 8 D を導入した。必要な変異を導入するために設計されたスクレオチド置換を有する配列化させた適合 3' および 5' オリゴスクレオチドプライマーを Q u i c k C h a n g e 部位指向性変異誘発キット (S t r a t a g e n e カタログ番号 2 0 0 5 1 8) において記載されている方法により他のキット試薬との P C R 反応において用いた。変異 p 6 b E 1 c / o および p 6 b E 1 w / t クローンはそれぞれ p 6 b E 1 c / o mut および p 6 b E 1 w / t mut と表した。 10

【 0 0 5 1 】

実施例 3 - コドン最適化 H P V 1 1 E 2 ポリスクレオチド配列の構築

E 2 コドン最適化遺伝子の設計、アセンブリおよび回収は E 1 についてすでに記載したとおりであるが、重複オリゴスクレオチドは長さが 4 0 ではなく 6 0 スクレオチドであり、1 8 n t の重複を有する。E 1 法におけるのと異なり、2 個の適当な野生型配列オリゴスクレオチドを 2 個の 6 0 m e r オリゴスクレオチド (K 1 1 1 A 变化を生じるために必要なスクレオチド置換を含む) と置換することにより、K 1 1 1 A アミノ酸変異を含むクローンがコドン最適化 E 2 遺伝子クローンと同時に生じた。の細胞毒性効果は複製老化のバイオマーカーと相關しない。 20

プラスミド p 7 3 1 3 - P L c の組成

p U C 1 9 の E a m 1 1 0 5 I - P s t 1 フラグメントを含むベータ - ラクタマーゼ遺伝子 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h U K L t d . , A m e r s h a m P l a c e , L i t t l e C h a l f o n t , B u c k s , H P 7 9 N A) を、カナマイシン耐性遺伝子と、それに続く両フラグメントの平滑末端を含む p U C 4 K の E c o R I フラグメント (A m e r s h a m - P h a r m a c i a) と T 4 D N A ポリメラーゼを用いて置換することにより、プラスミドを構築した。ヒトサイトメガロウイルス I E 1 プロモーター / エンハンサー、イントロン A は H a r r i e t R o b i n s o n 博士 (U n i v e r s i t y o f M a s s a c h u s e t t s) から入手したプラスミド J W 4 3 0 3 由来であり、 X h o l - S a l 1 フラグメントとして p U C 1 9 の S a l 1 サイト中に挿入し、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを組み入れる。プロモーターからの 5' S a l I - B a n I フラグメントの欠失は、ベクターにおいて用いられる最小のプロモーターを生じた (W O 0 0 / 2 3 5 9 2 - P o w d e r j e c t V a c c i n e s I n c .) 。 H B V 表面抗原 3' U T R は、ベクター p A M 6 中、B 型肝炎ウイルス、血清型 a d w 由来であった (M o r i a r t y ら、. , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 8 , 2 6 0 6 - 2 6 1 0 , 1 9 8 1) 。 p A M 6 (p B R 3 2 2 ベースのベクター) を A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (カタログ番号 A T C C 4 5 0 2 0) から入手した。 3' U T R は 1 . 4 k b B a m H I フラグメントとしてポリアデニル化シグナルに対して 5' に挿入し、 B a m H I サイトを除去するための挿入のために平滑末端にした。一連の工程において (B g l I I での消化、クレノウポリメラーゼ処理、 B s t X I での消化、 N c o I での消化、オーバーハングを除去するための緑豆スクレアーゼでの処理および B s t X I でのさらなる処理を含む) 、 H B V S 遺伝子および b G H p A シグナルの 3' 未翻訳エンハンサー領域と b G H p A シグナル間に修飾を行って、 X 遺伝子プロモーターおよび b G H p A シグナル間の 5 コドン以上のすべてのオープンリーディングフレームを除去する。この結果、 X 蛋白 (9 アミノ酸) および X 遺伝開始コドンの翻訳可能な部分をエンコードする配列が欠失する。しかしながら、この領域は C M V プロモーターからの H B s A g の発現を向上させることができるので、 X 遺伝子の弱いエンハンサー / プロモーター領域は保持されていた。ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルをウサギベータグロブリンポリアデニル化シグナルと置換した。 S 抗原の 5' 非コーディングおよびコーディング配列を切除し、オリゴスクレオチドリンクーと置換して、プラスミド p 7 3 1 3 - P L を 30 40 50

產生することが示されている複数のクローニング部位を得た。

【化1】

Hind --- NotI --- -EcoRV --NdeI-- --BamHI
 AGCTTGCAGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC . . .
 . . . ACGCCGGCGATCGCTATGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG
 --NheI-- --KpnI-- --Sall-- Δ NotI

David Hodgeson (Warwick University) からプラスミド pDAH212 からのサブクローニングから C o l E 1 c e r 配列を得、プライマーを用いて PCR により増幅して、EcoRI 制限部位を配列の両端に配置した。c e r 配列を次に p7313 - P L の EcoRI 制限部位中に挿入して、プラスミド p7313 - P L c を得た(図7)。増幅された c e r の配列をジンバンクエントリー M11411 に対して立証した。

【0052】

実施例4 - 哺乳動物293T細胞におけるE1の発現

哺乳動物293T細胞を6ウェルCorning Costar (Corning Science Products, 10 The Valley Centre, Gordon Road, High Wycombe, Bucks, UK) 細胞培養皿につき 2×10^5 細胞の最終濃度で、一夜37、5%CO₂ 中で対数期で増殖させた。次のトランスクレクションミックスを調製し、25分間合成した：

16 μ l の滅菌二重蒸留水中 2 μ g のプラスミドDNA (ベクター、p6bE1c/o、p6bE1w/t)

+

OPTI-mem (Gibco BRL, Paisley, Scotland)

8 μ l

リポフェクタミン (Gibco BRL) 6 μ l

【0053】

各細胞単層を注意深くOPTI-memで2回洗浄した。800 μ l のOPTI-memを各ウェルに添加した。200 μ l のOPTI-memを各トランスクレクションミックスに添加し、混合し、静かに細胞単層に添加した。プレートを5時間37で5%CO₂ 中インキュベートし、その後、トランスクレクションミックスおよびOPTI-memを捨てた。細胞単層を静かに細胞成長培地で2回洗浄し、最終的にトランスクレクションされた細胞を、10%ウシ胎仔血清および29.2 mg/ml のL-グルタミンを含むダルベッコの修飾イーグル培地で、37で5%CO₂ 中24時間インキュベートした。細胞をマイクロチューブ中に掻き落とし、PBSで2回洗浄し、スピンドラウンし、細胞ペレットをSDS Page Laemmli 色素中に再懸濁させた。細胞ペレットを沸騰させ、10%SDS Page ゲル上にロードし、1 x TrisグリシンSDS緩衝液中電気泳動にかけた。電気泳動後、ゲルをニトロセルロース膜 (Amersham) 上にプロットし、ウェスタンプロットした。ニトロセルロース膜を、PBS中5%Marvel (Premier Beverages, Knighton, Adbaston, Stafford, UK) で30分間室温でブロックし、PBSおよび0.1%Tween20で2回洗浄した。ウサギにおいてHPV6bE1のC末端蛋白配列(蛋白配列: C S S S L D I Q D S E D E D G S N S Q A F R)に対して生じさせたポリクローナル抗体を、PBS中5%Marvel中に希釈し、ニトロセルロース膜に添加した。これを室温で1時間静かに攪拌しながらインキュベートした。希釈された抗体を除去し、膜をPBS中および0.1%Tween20で2回洗浄した。二次接合体、ブタ抗ウサギホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) (DAKO) をPBSおよび0.1%Tween20中1:20000に希釈した。これを洗浄された膜に添加し、静かに攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。膜を次にPBSおよび0.1%Tween20でよく洗浄した。化

10

20

30

40

50

学発光H R Pキット (A m e r s h a m) を用いて、膜上に移された蛋白を検出した。

【0054】

結果：

E 1 の翻訳された蛋白の予想されるサイズは 6 8 k D a - 7 2 k D a である。結果 (図 8) は、コドン最適化 H P V 6 b E 1 (レーン 4) を含む p 7 3 1 3 - P L c により発現される正確な蛋白のサイズを示す。野生型 E 1 を含むベクターはレーン 3 にあり、これは、野生型ヌクレオチド配列からのヒト細胞において E 1 の検出可能な発現がないことを示す。同様に、レーン 2 (エンプティーベクター) およびレーン 1 (未トランスフェクト細胞) において E 1 は検出されない。レーン 1 ~ 4 の約 6 0 k D バンドは抗 E 1 抗体と交差反応する未同定細胞蛋白である。バンドはレーン全体にわたってほぼ一定の強度のものであり、これはサンプルのローディングが一貫していることを示す。

【0055】

実施例 5 - H P V E 1 および H P V E 2 蛋白を発現する組換えワクシニアウイルスの構築

H P V - 6 b E 1 蛋白を発現するワクシニアウイルスが G l a x o W e l l c o m e , S t e v e n a g e , U K で生じた。H P V - 1 1 E 1 および H P V - 1 1 E 2 を発現するワクシニアウイルスは、J e f f E n g l e r , U n i v e r s i t y o f A l a b a m a a t B i r m i n g h a m , U S から贈られた。

簡単に言うと、p 6 b E 1 w / t からの E 1 遺伝子を、ワクシニアウイルスベクター p T M 3 中にクローンし、次に制限酵素チェックし、D N A 配列化された組換えベクターをトランスフェクトされた H T k - 細胞に対して用いた。組換えワクシニアウイルスを単離し、ブラーク精製した。E 1 蛋白発現を、任意の細胞の H P V - 6 b E 1 を発現する組換えウイルスおよびバクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼを発現する第二のワクシニアウイルス (v T F 7 - 3) の両方での感染後、ペプチド抗血清を用いてウェスタンブロッティングによりチェックした。細胞のワクシニアウイルス v F T 7 - 3 での同時感染も、H P V - 1 1 E 1 および E 2 組換えワクシニアウイルスから E 1 および E 2 蛋白の直接発現を行うために必要である。ワクシニアウイルス W R 株を負の対照実験において用いた。ベクター p T M 3 およびウイルス v T F 7 - 3 は N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h , M a r y l a n d , U S から得た。

【0056】

実施例 6 - 免疫学 - H P V 抗原に対する細胞応答の検出

すべての試薬は特に記載がなければ G i b c o B R L , P a i s e l y , S c o t l a n d または S i g m a , P o o l e , D o r s e t から入手した。

A . 免疫化プロトコル

メス C 5 7 B L / 6 マウスを 1 . 0 ~ 2 . 0 μ g D N A (p 6 b E 1 c / o 、 p 6 b E 1 w / t 、 p 6 b E 1 c / o 、 p 6 b E 1 w / t mut またはエンプティープラスミド p 7 3 1 3 P L c のいずれか) で P M D D により免疫化し、1 4 日後に同じ用量で追加抗原投与した。頸部を脱臼させることにより動物を屠殺し、H P V 抗原に対する細胞応答を調べるために脾臓を摘出した。

B . 脾臓細胞の単一細胞懸濁液の調製

脾臓を磨りガラススライド (B D H) 間で「つぶし」、赤血球を溶解させ (1 5 5 m M N H ₄ C l 、 1 0 m M K H C O ₃ 、 0 . 1 m M E D T A) 、細胞を完全 R P M I 中に再懸濁させた。(1 0 % ウシ胎仔血清 (F C S) 、 2 m M グルタミン、 1 0 0 単位 / m l ペニシリン、 1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシンおよび $5 \times 1 0^{-5}$ M の 2 - メルカプトエタノールで補足した R P M I - 1 6 4 0 培地)。

【0057】

C . M C 5 7 標的細胞の感染

H P V 抗原由来の免疫優性エピトープは従って規定されていない今まで、インビトロでの抗原特異性応答の検出は、全蛋白をエンコードする c D N A でトランスフェクトされた標的細胞内で生じた全抗原の自然のプロセッシングによる。M C 5 7 細胞 (K ^b 陽性) を、

10

20

30

40

50

5 の感染の多重度を用いて 1 時間 37 で H P V - 6 b E 1 、 H P V - 11 E 2 または H P V - 11 E 1 を発現する組換えワクシニアウイルスで感染させた。過剰のウイルスを洗浄して除去し、 50 ng / ml の組換えヒト I L - 2 (G l a x o W e l l c o m e , G e n e v a) を含む完全 R P M I 中に細胞を再懸濁させた。

【 0058 】

D . E L I S P O T

実験群から入手した 4×10^5 脾臓細胞を添加する前に、 E L I S P O T プレート (96 ウェル、 M i l l i p o r e M A I P S 4510) をラット抗マウス I F N ガンマ (P h a r m i n g e n 18181D) で P B S 中 $15 \mu g / ml$ で一夜 (4) でコートした。 1×10^4 組換えワクシニア感染 M C 57 細胞の添加により抗原を提示した。野生型ワクシニア W R 株を負の対照として用いた。分析を一夜 37 (5 % C O₂) でインキュベートした。

分析の 2 日に、ビオチニル化ラット抗マウス I F N ガンマ (P h a r m i g e n 18112D) を $1 \mu g / ml$ で用い、続いてストレプトアビジンアルカリホスファターゼ接合体 (T C S b i o l o g i c a l s S A 1008) を P B S 中 $1 / 1000$ の希釈度で用いて、スポット形成細胞を検出した。アルカリホスファターゼ基質キット (B i o r a d 170-6432) を用いてこれを可視化し、イメージ分析により定量化した。結果を図 9 に示す。

【 0059 】

図 9 からわかるように、ワクシニアベクター (v a c c . E 1 (11) または v a c c . E 1 (6 b)) 中の E 1 で攻撃された場合に、 H P V - 6 b コドン最適化 E 1 配列をエンコードするプラスミドで予防接種された 3 匹のマウスすべてから強力な細胞応答が見られた。これらのマウスが野生型ワクシニア (v a c c . W T) 、または H P V - 11 E 2 (v a c c . E 2 (11)) を発現するワクシニアで攻撃された場合に応答は見られない。対照的に、野生型 E 1 配列をエンコードするプラスミドでのマウスの予防接種の結果、 T 細胞応答は得られない。これらのマウスからの脾臓細胞は、 E 1 遺伝子を有するワクシニアによる攻撃に対しても、任意の他の攻撃に対しても反応しない (データは省略) 。 E 1 遺伝子の変異は、マウスにおける細胞応答を変更しない。さらに、 p 6 b E 1 c / o および p 6 b E 1 c / o mut で免疫化されたマウスは H P V - 11 から得られる E 1 蛋白を発現するワクシニアウイルスで感染した標的細胞に対して強力な細胞性免疫応答を生じたので、 H P V - 6 b E 1 および H P V - 11 E 1 間に高レベルの免疫原性交差反応性が存在することを仮定することができる。空の p 7313 - P L c ベクターで予防接種されたマウスは任意の攻撃に対して応答を示さない。

【 0060 】

実施例 7 - 哺乳動物 293 T 細胞における H P V 6 b E 2 の発現

24 ウェルプレート中 293 % 細胞単層 (80 % コンフルエント) を、標準的プロトコル (前記実施例 4 参照) に従ってトランスフェクションにより $2.5 \mu l$ のリポフェクタミン 2000 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いて $1 \mu g$ の各プラスミド (p 6 b w / t 、 p 6 b c / o 、 p 6 b w / t mut 、 p 6 b c / o mut) でトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後、細胞を収穫し、リン酸塩緩衝塩溶液中リンスし、 S D S - P A G E および H P V - 6 b N - 末端アミノ酸配列 M E A I A K R L D A C Q E Q L L E L Y E E C (図 10) に対して生じさせた抗 E 2 ペプチド抗血清 (# 1100) を用いてウェスタンプロットにより調べた。

結果

結果は、トラック 3 (コドン最適化 E 2) およびトラック 5 (コドン最適化および変異 E 2) において予想されるサイズ (40 k d ~ 45 k D) の主蛋白バンドを示す。同じサイズの副バンドもトラック 4 に出現し、変異野生型 E 2 プラスミドからの非常に低レベルの発現を示すが、トラック 1 (負の対照) 、またはトラック 2 (野生型 E 2 蛋白) においては出現しない。 ~ 25 k d の交差反応蛋白バンドがすべてのトラックにおいて出現し、このことは蛋白溶解物の等しいローディングを示す。 E 2 の変異はコドン最適化により著し

く向上される E 2 蛋白発現を損なわぬようである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】ジンバンクから得た H P V 1 1、6 a および 6 b 型からの E 1 の野生型アミノ酸配列のプロトタイプを示す。

【図 2】図 1 からの H P V 6 b E 1 のプロトタイプ野生型アミノ酸配列 (6 b - e 1) を、生物学的活性を除去するために点突然変異を含む H P V 6 b E 1 アミノ酸配列 (6 n - e 1 m u t) と並べて示す。

【図 3】ジンバンクから得た H P V 1 1、6 a および 6 b 型からの E 2 のプロトタイプ野生型アミノ酸配列を示す。

【図 4 a】図 3 からの H P V 1 1 E 2 のプロトタイプ野生型アミノ酸配列 (H p v - 1 1 e 2 - w t) を、生物学的活性を除去するために点突然変異を含む H P V 1 1 E 2 アミノ酸配列 (H p v - 1 1 e 2 - m u t) および図 6 のヌクレオチド配列によりエンコードされるアミノ酸配列 (H p v - 1 1 e 2 - c o m u t) と並べて示す。 10

【図 4 b】図 3 からの H P V 6 b E 2 のプロトタイプ野生型アミノ酸配列 (H p v - 6 b e 2 - w t) を、生物学的活性を除去するために点突然変異を含む H P V 6 b E 2 アミノ酸配列 (H p v - 6 b e 2 - m u t) と並べて示す。

【図 5】図 2 からの H P V 6 b E 1 の変異アミノ酸配列をエンコードする、高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似したコドン使用パターンを有するヌクレオチド配列を示す。

【図 6】図 4 からの H P V 1 1 E 2 の変異アミノ酸配列をエンコードする、高度に発現されたヒト遺伝子のものと類似したコドン使用パターンを有するヌクレオチド配列を示す。 20

【図 7】D N A ベクター p 7 3 1 3 - P L c を示す。

【図 8】アクリルアミドゲル上にかけ、発現された E 1 蛋白と結合する抗体を示すために染色された実施例 4 からの細胞溶解物サンプルを示す。

【図 9】本発明のポリヌクレオチドでマウスを免疫化した後の抗原攻撃に対する細胞応答を示す（実施例 6）。

【図 10】アクリルアミドゲル上にかけ、発現された E 2 蛋白と結合する蛋白を示すために染色された実施例 7 からの細胞溶解物サンプルを示す。

【 図 7 】

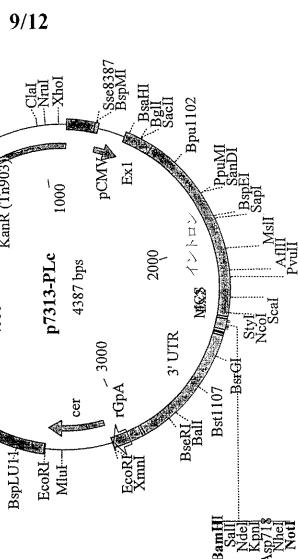
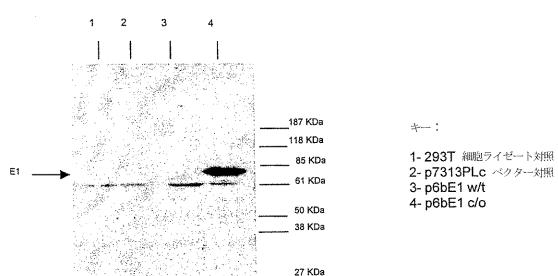


Figure 7: WRG7313plc

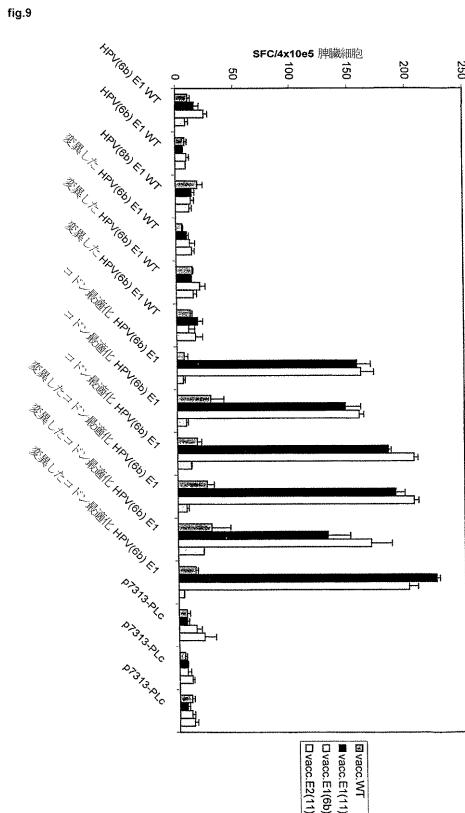
【 図 8 】



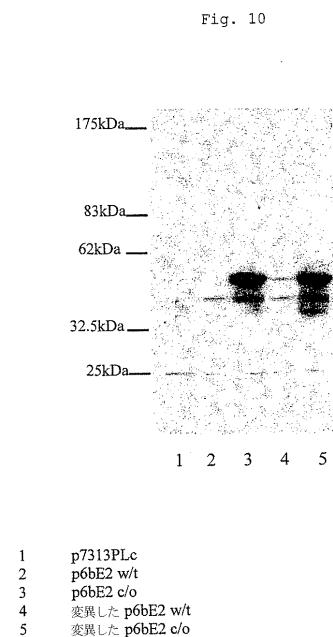
六

- 1- 293T 細胞ライゼート対照
- 2- p7313PLc ベクター対照
- 3- p6bE1 w/t
- 4- p6bE1 c/o

【 図 9 】



【 図 1 0 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08435 A1

(51) International Patent Classification: C12N 15/86. (74) Agent: WALKER, Ralph, Francis, Corporate Intellectual Property, GlaxoSmithKline Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/03290

(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0017990.3 21 July 2000 (21.07.2000) GB
0025802.0 20 October 2000 (20.10.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/08435 A1

(54) Title: CODON-OPTIMIZED PAPILLOMA VIRUS SEQUENCES

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions useful in the treatment and prevention of human papilloma virus infections and the symptoms and diseases associated therewith. More particularly, the invention relates to polynucleotide sequences which encode human papilloma virus (HPV) amino acid amino acid sequences, wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequences resemble those of highly expressed mammalian genes.

CODON-OPTIMIZED PAPILLOMA VIRUS SEQUENCES

5 The present invention relates to methods and compositions useful in the treatment and prevention of human papilloma virus infections and the symptoms and diseases associated therewith.

10 Papilloma virus infections have been observed in a variety of species, including sheep, dogs, rabbits, monkeys, cattle and humans. Human papilloma viruses (HPV) have been classified into more than 80 types (Epidemiology and Biology of Cervical Cancer. Seminars in Surgical Oncology 1999 16:203-211). New (novel) types are defined as those where the L1 gene displays less than 90% sequence identity to L1 sequences from previously identified types, whilst a subtype displays between 90% and 98% L1 sequence identity, and a variant more than 98% sequence identity (to the prototypical (parent) type). Papilloma viruses generally infect epithelia, but the different HPV types cause distinct diseases.

15 For example, types 1-4, 7, 10 and 26-29 cause benign cutaneous warts, types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68 are associated with cervical cancers and types 6 and 11 are implicated in genital warts (non-malignant condylomata of the genital tract).

20 The majority of genital warts (>90%) contain HPV genotypes 6 and 11. Whilst HPV-6 is the most prevalent genotype identified in single infections, both HPV-6 and HPV-11 may occasionally occur in the same lesion. Warts generally occur in several sites in infected individuals and more than 60% of patients with partners having condyloma (genital warts) develop lesions, with an average incubation time of 3 months. A range of treatment options are currently available. However, they rely upon excision or ablation and/or the use of topical gels and creams. They are not pain free, they may require frequent clinic visits, and efficacy is highly variable. Disease recurrence remains a significant problem for the effective management of this disease.

25 30 35 Genital warts may regress spontaneously and cell mediated immunity appears to be the primary event responsible for wart regression. The high spontaneous regression rates indicate that host cellular immunity can resolve clinical disease and make immune-therapy intervention an option for treatment or prevention of

genital warts. The goals for disease management are for a virus-specific therapy that is pain free, requires a minimum of clinic visits, has high disease resolution rates and which reduces/minimises disease recurrence.

5 HPV has proven difficult to grow in tissue culture, so there is no traditional live or attenuated viral vaccine. Development of an HPV vaccine has also been slowed by the lack of a suitable animal model in which the human virus can be studied. This is because the viruses are highly species specific, so it is not possible to infect an immunocompetent animal with a human papilloma virus, as would be required for safety testing before a vaccine was first tried in humans.

10 Papilloma viruses have a DNA genome which encodes "early" and "late" genes designated E1 to E7, L1 and L2. The early gene sequences have been shown to have functions relating to viral DNA replication and transcription, evasion of host immunity, and alteration of the normal host cell cycle and other processes. For example the E1 protein is an ATP-dependent DNA helicase and is involved in initiation of the viral DNA replication process whilst E2 is a regulatory protein controlling both viral gene expression and DNA replication. Through its ability to bind to both E1 and the viral origin of replication, E2 brings about a local 15 concentration of E1 at the origin, thus stimulating the initiation of viral DNA replication. The E4 protein appears to have a number of poorly defined functions but amongst these may be binding to the host cell cytoskeleton, whilst E5 appears to delay acidification of endosomes resulting in increased expression of EGF receptor at the cell surface and both E6 and E7 are known to bind cell proteins p53 and pRB respectively. The E6 and E7 proteins form HPV types associated with cervical cancer are known oncogenes. L1 and L2 encode 20 the two viral structural (capsid) proteins.

25 Historically, vaccines have been seen as a way to prevent infection by a pathogen, priming the immune system to recognise the pathogen and neutralise it should an infection occur. The vaccine includes one or more antigens from the pathogen, commonly the entire organism, either killed or in a weakened (attenuated) form, or selected antigenic peptides from the organism. When the 30 immune system is exposed to the antigen(s), cells are generated which retain an immunological "memory" of it for the lifetime of the individual. Subsequent 35

exposure to the same antigen (e.g. upon infection by the pathogen) stimulates a specific immune response which results in elimination or inactivation of the infectious agent.

5 There are two arms to the immune response: a humoral (antibody) response and a cell-mediated response. Protein antigens derived from pathogens that replicate intracellularly (viruses and some bacteria) are processed within the infected host cell releasing short peptides which are subsequently displayed on the infected cell surface in association with class I major histocompatibility (MHC I) molecules. When this associated complex of MHC I and peptide is contacted by antigen-specific CD8+ T-cells the T-cell is activated, acquiring cytotoxic activity. These cytotoxic T-cells (CTLs) can lyse infected host cells, so limiting the replication and spread of the infecting pathogen. Another important arm of the immune response is controlled by CD4+ T-cells. When antigen derived from 10 pathogens is released into the extracellular milieu they may be taken up by specialised antigen-presenting cells (APCs) and displayed upon the surface of these cells in association with MHC II molecules. Recognition of antigen in this complex stimulates CD4+ T-cells to secrete soluble factors (cytokines) which regulate the effector mechanisms of other T-cells. Antibody is produced by B-cells. Binding of antigen to secreted antibody may neutralise the infectivity of a pathogen and binding of antigen to membrane-bound antibody on the surface of B-cells stimulates division of the B-cell so amplifying the B-cell response. In 15 general, both antibody and cell-mediated immune responses (CD8+ and CD4+) are required to control infections by pathogens.

15

20

25 It is believed that it may be possible to harness the immune system, even after infection by a pathogen, to control or resolve the infection by inactivation or elimination of the pathogen. Such immune therapies (also known as "therapeutic" vaccines or immunotherapeutics) would ideally require a cell-mediated response to be effective, although both humoral and cell-mediated immune responses may be evoked.

30

35 It has been demonstrated (Benvenisty, N and Reshaf, L. PNAS 83 9551-9555) that inoculation of mice with calcium phosphate precipitated DNA results in expression of the peptides encoded by the DNA. Subsequently, intramuscular

injection into mice of plasmid DNA which had not been precipitated was shown to result in uptake of the DNA into the muscle cells and expression of the encoded protein. Because expression of the DNA results in production of the encoded pathogen proteins within the host's cells, as in a natural infection, this 5 mechanism can stimulate the cell-mediated immune response required for immune therapies or therapeutic vaccination, so a DNA-based drug could be applied as a prophylactic vaccine or as an immune therapy. DNA vaccines are described in WO90/11092 (Vical, Inc.).

10 DNA vaccination may be delivered by mechanisms other than intra-muscular injection. For example, delivery into the skin takes advantage of the fact that immune mechanisms are highly active in tissues that are barriers to infection such as skin and mucous membranes. Delivery into skin could be via injection, via jet injector (which forces a liquid into the skin, or underlying tissues including 15 muscles, under pressure) or via particle bombardment, in which the DNA may be coated onto particles of sufficient density to penetrate the epithelium (US Patent No. 5371015). For example, the nucleotide sequences may be incorporated into a plasmid which is coated on to gold beads which are then administered under high pressure into the epidermis, such as, for example, as 20 described in Haynes *et al* J. Biotechnology 44: 37-42 (1996). Projection of these particles into the skin results in direct transfection of both epidermal cells and epidermal Langerhan cells. Langerhan cells are antigen presenting cells (APC) which take up the DNA, express the encoded peptides, and process these for 25 display on cell surface MHC proteins. Transfected Langerhan cells migrate to the lymph nodes where they present the displayed antigen fragments to lymphocytes, evoking an immune response. Very small amounts of DNA (less than 1 μ g, often less than 0.5 μ g) are required to induce an immune response via particle mediated delivery into skin and this contrasts with the milligram quantities of DNA known to be required to generate immune responses 30 subsequent to direct intramuscular injection.

The expression and detection of HPV proteins in transfected mammalian cells such as HeLa, 293, or CHO cells has often proved difficult and so for biochemical and immunological studies requiring detectable expression of proteins, or quantities of pure proteins the E.coli, Baculovirus or Yeast protein

expression systems are often used. In these systems the yields of protein are adequate making functional analysis and purification and subsequent biochemical and immunological studies practicable. However, direct protein detection methods (e.g. Western blotting) typically fail to detect E1 protein expression in transfected mammalian cells even when vectors with strong promoters such as CMV or SV40 are used. Methods designed to increase E1 protein expression in mammalian cells include cloning the 5' flanking sequences alongside the E1 gene (Remm et al. J.Viro 1999 **73**, 3062-3070) and amplification of the transfected E1 plasmid vector after transfection (Zou et al. J.Viro 1998 **72**, 3436-3441). Amplification of the input vector plasmid by replication after transfection has the net effect of increasing the E1 gene copy number in the cell, hence boosting protein levels and so facilitating detection of protein (by Western blotting). Because E1 protein expression and detection is problematic in mammalian cells, several authors have resorted to detecting expression of the protein by in vitro transcription-translation with ^{35}S -labelled methionine using the rabbit reticulocyte system (Promega), (Gopalakrishnan et al. Virology 1999 **256**, 330-339., Safari et al. Virology 1995 **211**, 385-396). However, this is a cell-free system and it requires the use of a modified promoter which contains the binding sequence for the RNA polymerase from phage T7.

20 E1 protein expression has additionally been detected indirectly, via detection of the in vitro DNA replication of a plasmid containing an HPV origin of DNA replication. Detection of this replicated origin containing plasmid acts as a surrogate for E1 (and E2) protein expression (Gopalakrishnan et al, Virology 1999 **256**, 330-339., Lu et al J.Viro 1993 **67**, 7131-7139 and Del Vecchio et al 25 J.Viro 1992 **66**, 5949-5958). Both E1 and E2 are required for replication of the HPV origin, so transfection of mammalian cells with plasmids encoding both the E1 and E2 genes, plus a third plasmid carrying an HPV origin of DNA replication, will only result in replication of the origin carrying plasmid if expression of the E1 protein (and E2 protein) has been successful, albeit undetectable by the 30 standard protein detection method (Western blotting).

The DNA code has 4 letters (A, T, C and G) and uses these to spell three letter "codons" which represent the amino acids of the proteins encoded in an organism's genes. The linear sequence of codons along the DNA molecule is

translated into the linear sequence of amino acids in the protein(s) encoded by those genes. The code is highly degenerate, with 61 codons coding for the 20 natural amino acids and 3 codons representing "stop" signals. Thus, most amino acids are coded for by more than one codon - in fact several are coded for by 5 four or more different codons.

Where more than one codon is available to code for a given amino acid, it has been observed that the codon usage patterns of organisms are highly non-random. Different species show a different bias in their codon selection and, 10 furthermore, utilization of codons may be markedly different in a single species between genes which are expressed at high and low levels. This bias is different in viruses, plants, bacteria and mammalian cells, and some species show a stronger bias away from a random codon selection than others. For example, humans and other mammals are less strongly biased than certain bacteria or 15 viruses. For these reasons, there is a significant probability that a mammalian gene expressed in E.coli or a viral gene expressed in mammalian cells will have an inappropriate distribution of codons for efficient expression. However, a gene with a codon usage pattern suitable for E.coli expression may also be efficiently expressed in humans. It is believed that the presence in a heterologous DNA 20 sequence of clusters of codons which are rarely observed in the host in which expression is to occur, is predictive of low heterologous expression levels in that host.

25 There are several examples where changing codons from those which are rare in the host to those which are host-preferred ("codon optimisation") has enhanced heterologous expression levels, for example the BPV (bovine papilloma virus) late genes L1 and L2 have been codon optimised for mammalian codon usage patterns and this has been shown to give increased expression levels over the wild-type HPV sequences in mammalian (Cos-1) cell 30 culture (Zhou et. al. J. Virol 1999. 73, 4972-4982). In this work, every BPV codon which occurred more than twice as frequently in BPV than in mammals (ratio of usage >2), and most codons with a usage ratio of >1.5 were conservatively replaced by the preferentially used mammalian codon. In 35 WO97/31115, WO97/48370 and WO98/34640 (Merck & Co., Inc.) codon optimisation of HIV genes or segments thereof has been shown to result in

increased protein expression and improved immunogenicity when the codon optimised sequences are used as DNA vaccines in the host mammal for which the optimisation was tailored. In this work, the sequences consist entirely of optimised codons (except where this would introduce an undesired restriction site, intron splice site etc.) because each viral codon is conservatively replaced with the optimal codon for the intended host.

According to a first aspect, the present invention provides a polynucleotide sequence which encodes an HPV amino acid sequence, wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequence resembles that of highly expressed mammalian genes. Preferably the polynucleotide sequence is a DNA sequence. Desirably the codon usage pattern of the polynucleotide sequence resembles that of highly expressed human genes. Ideally, the codon usage pattern of the polynucleotide sequence also resembles that of highly expressed *E.coli* genes. The polynucleotide sequence may be a DNA sequence, for example a double stranded DNA sequence. Preferably the polynucleotide sequence encodes a HPV polypeptide of an HPV type or sub-type associated with cervical cancer, benign cutaneous warts or genital warts, for example types, 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68, preferably types 6, 11, 16, 18, 33 or 45, which are associated particularly with cervical cancer and genital warts, most preferably HPV 11, 6a or 6b.

Accordingly, there is provided a synthetic gene comprising a plurality of codons together encoding an HPV amino acid sequence, wherein the selection of the possible codons used for encoding the amino acid sequence has been changed to resemble the optimal mammalian codon usage such that the frequency of codon usage in the synthetic gene are closely resembles that of highly expressed mammalian genes than that of papilloma virus genes. Preferably the codon usage pattern is substantially the same as that for highly expressed human genes.

In certain embodiments, the encoded amino acid sequence is a wild-type HPV amino acid sequence. In alternative embodiments, the encoded amino acid sequence is a mutated HPV amino acid sequence comprising the wild-type sequence with amino acid changes, for example amino acid point mutations,

sufficient to reduce or inactivate one or more of the natural biological functions of the polypeptide. The mutated amino acid sequence will desirably retain the immunogenicity of the wild-type polypeptide.

5 The encoded HPV polypeptide may comprise an early gene product such as E1, E2 or E7, or a fragment, analogue or fusion thereof, or may be a late gene product such as L1 or L2, or a fragment, analogue or fusion thereof. A polynucleotide of the invention may for example encode a fusion between two or more HPV early gene products, an HPV early gene product and an HPV late
10 gene product, or between two or more HPV late gene products, between one or more fragments of HPV gene products, or between an HPV gene product (or a fragment thereof) and a polypeptide derived from a source other than HPV, for example an adjuvant or targeting peptide, or polypeptide, such as an HBV core peptide. Fusions may be between HPV gene products derived from the same or
15 different viral types or sub-types. Such fusions will desirably retain the immunogenicity of the fused polypeptide components. Preferably, the encoded HPV polypeptide comprises the whole or a part of an early gene product, most preferably E1 or E2. In one particular embodiment, the polynucleotide sequence encodes the wild-type E1 polypeptide of HPV 6b as set out in Fig. 1, or a
20 fragment or analogue thereof. In alternative embodiments, the polynucleotide sequence may encode one or more of: the mutated HPV6b E1 amino acid sequence set out in Fig. 2; the wild-type E2 amino acid sequence (Fig. 3) of HPV 11 or of 6a or 6b; the mutated HPV6b E2 amino acid sequence of Fig. 4b; and the mutated HPV11 E2 sequence of Fig. 4a, or fragments, analogues or fusions
25 thereof in which the encoded polypeptides retain immunogenicity.

According to the present invention, the codon usage pattern of the polynucleotide will preferably exclude codons with an RSCU value of less than 0.2 in highly expressed genes of the target organism. A relative synonymous codon usage (RSCU) value is the observed number of codons divided by the number expected if all codons for that amino acid were used equally frequently. A polynucleotide of the present invention will generally have a codon usage coefficient (as defined below) for highly expressed human genes of greater than 0.3, preferably greater than 0.4, most preferably greater than 0.5 but less than 1. Desirably the polynucleotide will also have a codon usage coefficient for highly
30
35

expressed E.coli genes of greater than 0.5, preferably greater than 0.6, most preferably greater than 0.7.

5 In one embodiment, the present invention provides a polynucleotide sequence as set out in Fig. 5 or Fig. 6, or a fragment or analogue thereof which maintains the codon usage pattern thereof. In a further embodiment, the present invention provides a polynucleotide sequence complementary to the sequence set out in Fig. 5 or Fig. 6.

10 According to a second aspect of the invention, an expression vector is provided which comprises and is capable of directing the expression of a polynucleotide sequence according to the first aspect of the invention, encoding an HPV amino acid sequence wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequence resembles that of highly expressed mammalian genes, preferably highly 15 expressed human genes. The vector may be suitable for driving expression of heterologous DNA in bacterial insect or mammalian cells, particularly human cells. In one embodiment, the expression vector is p7313PLc (Fig.7).

20 According to a third aspect of the invention, a host cell comprising a polynucleotide sequence according to the first aspect of the invention, or an expression vector according the second aspect, is provided. The host cell may be bacterial, e.g. E.coli, mammalian, e.g. human, or may be an insect cell. Mammalian cells comprising a vector according to the present invention may be cultured cells transfected in vitro or may be transfected in vivo by administration 25 of the vector to the mammal.

30 In a fourth aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising a polynucleotide sequence according to the first aspect of the invention. Preferably the composition comprises a DNA vector according to the second aspect of the present invention. In preferred embodiments the composition comprises a plurality of particles, preferably gold particles, coated with DNA comprising a vector encoding a polynucleotide sequence which encodes an HPV amino acid sequence, wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequence resembles that of highly expressed mammalian genes, particularly human genes. In alternative embodiments, the composition 35

comprises a pharmaceutically acceptable excipient and a DNA vector according to the second aspect of the present invention. The composition may also include an adjuvant.

5 In a further aspect, the present invention provides a method of making a pharmaceutical composition including the step of altering the codon usage pattern of a wild-type HPV nucleotide sequence, or creating a polynucleotide sequence synthetically, to produce a sequence having a codon usage pattern resembling that of highly expressed mammalian genes and encoding a wild-type
10 HPV amino acid sequence or a mutated HPV amino acid sequence comprising the wild-type sequence with amino acid changes sufficient to inactivate one or more of the natural functions of the polypeptide.

15 Also provided are the use of a polynucleotide according to the first aspect, or of a vector according to a second aspect of the invention, in the treatment or prophylaxis of an HPV infection, preferably an infection by an HPV type or sub-type associated with cervical cancer, benign cutaneous warts or genital warts, for example types, 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68. In certain embodiments, the invention provides the use of a
20 polynucleotide according to the first aspect, or of a vector according to a second aspect of the invention, in the treatment or prophylaxis of an HPV infection of type 6, 11, 16, 18, 33 or 45, which are associated particularly with cervical cancer and genital warts, most preferably HPV 11, 6a or 6b. The invention also provides the use of a polynucleotide according to the first aspect, a vector according to the second aspect of the invention or a pharmaceutical composition according to the fourth aspect of the invention, in the treatment or prophylaxis of cutaneous (skin) warts, genital warts, atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), cervical dysplasia, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or cervical cancer. Accordingly, the present invention also provides the use of a
25 polynucleotide according to the first aspect, or of a vector according to the second aspect of the invention in making a medicament for the treatment or prophylaxis of an HPV infection of any one or more of types 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68, or any symptoms or disease associated therewith.

The present invention also provides methods of treating or preventing HPV infections, particularly infections by any one or more of HPV types 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68, or any symptoms or diseases associated therewith, comprising administering an effective amount of a polynucleotide according to the first aspect, a vector according to the second aspect or a pharmaceutical composition according to the fourth aspect of the invention. Administration of a pharmaceutical composition may take the form of one or more individual doses, for example in a "prime-boost" therapeutic vaccination regime. In certain cases the "prime" vaccination may be via particle mediated DNA delivery of a polynucleotide according to the present invention, preferably incorporated into a plasmid-derived vector and the "boost" by administration of a recombinant viral vector comprising the same polynucleotide sequence.

Throughout the present specification and the accompanying claims the words "comprise" and "include" and variations such as "comprises", "comprising", "includes" and "including" are to be interpreted inclusively. That is, these words are intended to convey the possible inclusion of other elements or integers not specifically recited, where the context allows.

The term "analogue" refers to a polynucleotide which encodes the same amino acid sequence as another polynucleotide of the present invention but which, through the redundancy of the genetic code, has a different nucleotide sequence whilst maintaining the same codon usage pattern, for example having the same codon usage coefficient or a codon usage coefficient within 0.1, preferably within 0.05 of that of the other polynucleotide.

The term "codon usage pattern" refers to the average frequencies for all codons in the nucleotide sequence, gene or class of genes under discussion (e.g. highly expressed mammalian genes). Codon usage patterns for mammals, including humans can be found in the literature (see e.g. Nakamura et.al. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215).

In the polynucleotides of the present invention, the codon usage pattern is altered from that typical of human papilloma viruses to more closely represent the codon bias of the target organism, e.g. E.coli or a mammal, especially a human. The "codon usage coefficient" is a measure of how closely the codon 5 usage pattern of a given polynucleotide sequence resembles that of a target species. Codon frequencies can be derived from literature sources for the highly expressed genes of many species (see e.g. Nakamura et.al. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215). The codon frequencies for each of the 61 codons (expressed as the number of occurrences occurrence per 1000 codons of the 10 selected class of genes) are normalised for each of the twenty natural amino acids, so that the value for the most frequently used codon for each amino acid is set to 1 and the frequencies for the less common codons are scaled to lie between zero and 1. Thus each of the 61 codons is assigned a value of 1 or 15 lower for the highly expressed genes of the target species. In order to calculate a codon usage coefficient for a specific polynucleotide, relative to the highly expressed genes of that species, the scaled value for each codon of the specific 20 polynucleotide are noted and the geometric mean of all these values is taken (by dividing the sum of the natural logs of these values by the total number of codons and take the anti-log). The coefficient will have a value between zero and 1 and the higher the coefficient the more codons in the polynucleotide are frequently used codons. If a polynucleotide sequence has a codon usage coefficient of 1, all of the codons are "most frequent" codons for highly expressed genes of the target species.

25 Shorter polynucleotide sequences are within the scope of the invention. For example, a polynucleotide of the invention may encode a fragment of a HPV protein. A polynucleotide which encodes a fragment of at least 8, for example 8-10 amino acids or up to 20, 50, 60, 70, 80, 100, 150 or 200 amino acids in length is considered to fall within the scope of the invention as long as the 30 polynucleotide has a codon usage pattern which resembles that of a highly expressed mammalian gene and the encoded oligo or polypeptide demonstrates

HPV antigenicity. In particular, but not exclusively, this aspect of the invention encompasses the situation when the polynucleotide encodes a fragment of a complete HPV protein sequence and may represent one or more discrete epitopes of that protein.

5

The polynucleotides of the present invention show higher expression in E.coli and mammalian cells than corresponding wild-type sequences encoding the same amino acid sequences. Whilst not wishing to be bound by any theory, this is believed to be for at least two reasons. Firstly, having a codon usage pattern closer to that of the host cell, the sequences are more easily processed by the cell translation machinery. Secondly, as up to 30% of the nucleotide sequence (or more) is different from the wild-type sequence, sites which interfere with transcription or translation (such as protein binding sites) will have been removed or altered.

10

In some embodiments, polynucleotides according to the present invention show codon usage patterns which resemble those of E.coli and mammalian (e.g. human) genes. This is particularly advantageous where a sequence is to be used in vaccination of a mammal and in generation of significant amounts of the antigen protein in vitro using E.coli cells (e.g. for use in assays, such as immunoassays to judge the levels of expression in mammalian or human tissues).

15

As discussed above, the present invention includes expression vectors that comprise the nucleotide sequences of the invention. Such expression vectors are routinely constructed in the art of molecular biology and may for example involve the use of plasmid DNA and appropriate initiators, promoters, enhancers and other elements, such as for example polyadenylation signals which may be necessary, and which are positioned in the correct orientation, in order to allow for protein expression. Other suitable vectors would be apparent to persons skilled in the art. By way of further example in this regard we refer to Sambrook

20

25

30

et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. CSH Laboratory Press. (1989).

Preferably, a polynucleotide of the invention, or for use in the invention in a vector, is operably linked to a control sequence which is capable of providing for the expression of the coding sequence by the host cell, i.e. the vector is an expression vector. The term "operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A regulatory sequence, such as a promoter, "operably linked" to a coding sequence is positioned in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the regulatory sequence.

The vectors may be, for example, plasmids, artificial chromosomes (e.g. BAC, PAC, YAC), virus or phage vectors provided with a origin of replication, optionally a promoter for the expression of the polynucleotide and optionally a regulator of the promoter. The vectors may contain one or more selectable marker genes, for example an ampicillin or kanamycin resistance gene in the case of a bacterial plasmid or a resistance gene for a fungal vector. Vectors may be used *in vitro*, for example for the production of DNA or RNA or used to transfect or transform a host cell, for example, a mammalian host cell e.g. for the production of protein encoded by the vector. The vectors may also be adapted to be used *in vivo*, for example in a method of DNA vaccination or of gene therapy.

Promoters and other expression regulation signals may be selected to be compatible with the host cell for which expression is designed. For example, mammalian promoters include the metallothionein promoter, which can be induced in response to heavy metals such as cadmium, and the β -actin promoter. Viral promoters such as the SV40 large T antigen promoter, human cytomegalovirus (CMV) immediate early (IE) promoter, rous sarcoma virus LTR

promoter, adenovirus promoter, or a HPV promoter, particularly the HPV upstream regulatory region (URR) may also be used. All these promoters are well described and readily available in the art.

5 Examples of suitable viral vectors include herpes simplex viral vectors, vaccinia or alpha-virus vectors and retroviruses, including lentiviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses. Gene transfer techniques using these viruses are known to those skilled in the art. Retrovirus vectors for example may be used to stably integrate the polynucleotide of the invention into the host genome,
10 although such recombination is not preferred. Replication-defective adenovirus vectors by contrast remain episomal and therefore allow transient expression. Vectors capable of driving expression in insect cells (for example baculovirus vectors), in human cells or in bacteria may be employed in order to produce quantities of the HPV protein encoded by the polynucleotides of the present
15 invention, for example for use as subunit vaccines or in immunoassays.

The polynucleotides according to the invention have utility in the production by expression of the encoded proteins, which expression may take place *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*. The nucleotides may therefore be involved in recombinant
20 protein synthesis, for example to increase yields, or indeed may find use as therapeutic agents in their own right, utilised in DNA vaccination techniques. Where the polynucleotides of the present invention are used in the production of the encoded proteins *in vitro* or *ex vivo*, cells, for example in cell culture, will be modified to include the polynucleotide to be expressed. Such cells include
25 transient, or preferably stable mammalian cell lines. Particular examples of cells which may be modified by insertion of vectors encoding for a polypeptide according to the invention include mammalian HEK293T, CHO, HeLa, 293 and COS cells. Preferably the cell line selected will be one which is not only stable, but also allows for mature glycosylation and cell surface expression of a
30 polypeptide. Expression may be achieved in transformed oocytes. A polypeptide may be expressed from a polynucleotide of the present invention, in

cells of a transgenic non-human animal, preferably a mouse. A transgenic non-human animal expressing a polypeptide from a polynucleotide of the invention is included within the scope of the invention.

5 Where the polynucleotides of the present invention find use as therapeutic agents, e.g. in DNA vaccination, the nucleic acid will be administered to the mammal e.g. human to be vaccinated. The nucleic acid, such as RNA or DNA, preferably DNA, is provided in the form of a vector, such as those described above, which may be expressed in the cells of the mammal. The polynucleotides
10 may be administered by any available technique. For example, the nucleic acid may be introduced by needle injection, preferably intradermally, subcutaneously or intramuscularly. Alternatively, the nucleic acid may be delivered directly into the skin using a nucleic acid delivery device such as particle-mediated DNA delivery (PMDD). In this method, inert particles (such as gold beads) are coated
15 with a nucleic acid, and are accelerated at speeds sufficient to enable them to penetrate a surface of a recipient (e.g. skin), for example by means of discharge under high pressure from a projecting device. (Particles coated with a nucleic acid molecule of the present invention are within the scope of the present invention, as are delivery devices loaded with such particles). The composition
20 desirably comprises gold particles having an average diameter of 0.5-5 μ m, preferably about 2 μ m. In preferred embodiments, the coated gold beads are loaded into tubing to serve as cartridges such that each cartridge contains 0.1-1 mg, preferably 0.5mg gold coated with 0.1-5 μ g, preferably about 0.5 μ g DNA/cartridge.
25
30 Suitable techniques for introducing the naked polynucleotide or vector into a patient include topical application with an appropriate vehicle. The nucleic acid may be administered topically to the skin, or to mucosal surfaces for example by intranasal, oral, intravaginal or intrarectal administration. The naked polynucleotide or vector may be present together with a pharmaceutically acceptable excipient, such as phosphate buffered saline (PBS). DNA uptake

may be further facilitated by use of facilitating agents such as bupivacaine, either separately or included in the DNA formulation. Other methods of administering the nucleic acid directly to a recipient include ultrasound, electrical stimulation, electroporation and microseeding which is described in US-5,697,901.

5 Uptake of nucleic acid constructs may be enhanced by several known transfection techniques, for example those including the use of transfection agents. Examples of these agents includes cationic agents, for example, calcium phosphate and DEAE-Dextran and lipofectants, for example, lipofectam 10 and transfectam. The dosage of the nucleic acid to be administered can be altered. Typically the nucleic acid is administered in an amount in the range of 1pg to 1mg, preferably 1pg to 10 μ g nucleic acid for particle mediated gene delivery and 10 μ g to 1mg for other routes.

15 A nucleic acid sequence of the present invention may also be administered by means of specialised delivery vectors useful in gene therapy. Gene therapy approaches are discussed for example by Verme *et al*, Nature 1997, 389:239-242. Both viral and non-viral vector systems can be used. Viral based systems include retroviral, lentiviral, adenoviral, adeno-associated viral, herpes viral, 20 Canarypox and vaccinia-viral based systems. Non-viral based systems include direct administration of nucleic acids, microsphere encapsulation technology (poly(lactide-co-glycolide) and, liposome-based systems. Viral and non-viral delivery systems may be combined where it is desirable to provide booster injections after an initial vaccination, for example an initial "prime" DNA 25 vaccination using a non-viral vector such as a plasmid followed by one or more "boost" vaccinations using a viral vector or non-viral based system.

A nucleic acid sequence of the present invention may also be administered by means of transformed cells. Such cells include cells harvested from a subject.

30 The naked polynucleotide or vector of the present invention can be introduced into such cells *in vitro* and the transformed cells can later be returned to the

subject. The polynucleotide of the invention may integrate into nucleic acid already present in a cell by homologous recombination events. A transformed cell may, if desired, be grown up *in vitro* and one or more of the resultant cells may be used in the present invention. Cells can be provided at an appropriate 5 site in a patient by known surgical or microsurgical techniques (e.g. grafting, micro-injection, etc.)

Suitable cells include antigen-presenting cells (APCs), such as dendritic cells, 10 macrophages, B cells, monocytes and other cells that may be engineered to be efficient APCs. Such cells may, but need not, be genetically modified to increase the capacity for presenting the antigen, to improve activation and/or maintenance of the T cell response, to have anti-tumour, e.g. anti-cervical carcinoma effects *per se* and/or to be immunologically compatible with the receiver (*i.e.*, matched HLA haplotype). APCs may generally be isolated from 15 any of a variety of biological fluids and organs, including tumour and peritumoural tissues, and may be autologous, allogeneic, syngeneic or xenogeneic cells.

Certain preferred embodiments of the present invention use dendritic cells or 20 progenitors thereof as antigen-presenting cells, either for transformation *in vitro* and return to the patient or as the *in vivo* target of nucleotides delivered in the vaccine, for example by particle mediated DNA delivery. Dendritic cells are highly potent APCs (*Banchereau and Steinman, Nature* 392:245-251, 1998) and have been shown to be effective as a physiological adjuvant for eliciting 25 prophylactic or therapeutic antitumour immunity (see Timmerman and Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). In general, dendritic cells may be identified based on their typical shape (*stellate in situ*, with marked cytoplasmic processes (dendrites) visible *in vitro*), their ability to take up, process and present antigens 30 with high efficiency and their ability to activate naïve T cell responses. Dendritic cells may, of course, be engineered to express specific cell-surface receptors or ligands that are not commonly found on dendritic cells *in vivo* or *ex vivo*, for

example the antigen(s) encoded in the constructs of the invention, and such modified dendritic cells are contemplated by the present invention. As an alternative to dendritic cells, secreted vesicles antigen-loaded dendritic cells (called exosomes) may be used within a vaccine (see Zitvogel et al., *Nature Med.* 4:594-600, 1998).

Dendritic cells and progenitors may be obtained from peripheral blood, bone marrow, tumour-infiltrating cells, peritumoral tissues-infiltrating cells, lymph nodes, spleen, skin, umbilical cord blood or any other suitable tissue or fluid.

10 For example, dendritic cells may be differentiated *ex vivo* by adding a combination of cytokines such as GM-CSF, IL-4, IL-13 and/or TNF to cultures of monocytes harvested from peripheral blood. Alternatively, CD34 positive cells harvested from peripheral blood, umbilical cord blood or bone marrow may be differentiated into dendritic cells by adding to the culture medium combinations

15 of GM-CSF, IL-3, TNF, CD40 ligand, lipopolysaccharide LPS, flt3 ligand (a cytokine important in the generation of professional antigen presenting cells, particularly dendritic cells) and/or other compound(s) that induce differentiation, maturation and proliferation of dendritic cells.

20 APCs may generally be transfected with a polynucleotide encoding an antigenic HPV amino acid sequence, such as a codon-optimised polynucleotide as envisaged in the present invention. Such transfection may take place *ex vivo*, and a composition or vaccine comprising such transfected cells may then be used for therapeutic purposes, as described herein. Alternatively, a gene

25 delivery vehicle that targets a dendritic or other antigen presenting cell may be administered to a patient, resulting in transfection that occurs *in vivo*. *In vivo* and *ex vivo* transfection of dendritic cells, for example, may generally be performed using any methods known in the art, such as those described in WO 97/24447, or the particle mediated approach described by Mahvi et al.,

30 *Immunology and cell Biology* 75:456-460, 1997.

Vaccines and pharmaceutical compositions may be presented in unit-dose or multi-dose containers, such as sealed ampoules or vials. Such containers are preferably hermetically sealed to preserve sterility of the formulation until use. In general, formulations may be stored as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles. Alternatively, a vaccine or pharmaceutical composition may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier immediately prior to use. Vaccines comprising nucleotide sequences intended for administration via particle mediated delivery may be presented as cartridges suitable for use with a compressed gas delivery instrument, in which case the cartridges may consist of hollow tubes the inner surface of which is coated with particles bearing the vaccine nucleotide sequence, optionally in the presence of other pharmaceutically acceptable ingredients.

5 The pharmaceutical compositions of the present invention may include adjuvant compounds, or other substances which may serve to modulate or increase the immune response induced by the protein which is encoded by the DNA. These may be encoded by the DNA, either separately from or as a fusion with the antigen, or may be included as non-DNA elements of the formulation. Examples 10 of adjuvant-type substances which may be included in the formulations of the present invention include ubiquitin, lysosomal associated membrane protein (LAMP), hepatitis B virus core antigen, f1t3-ligand and other cytokines such as IFN- γ and GMCSF.

15 Other suitable adjuvants are commercially available such as, for example, Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI); Imiquimod (3M, St. Paul, MN); Resiquimod (3M, St. Paul, MN); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); aluminium salts such as aluminium hydroxide gel 20 (alum) or aluminium phosphate; salts of calcium, iron or zinc; an insoluble suspension of acylated tyrosine; acylated sugars; cationically or anionically 25

30

derivatized polysaccharides; polyphosphazenes; biodegradable microspheres; monophosphoryl lipid A and quill A. Cytokines, such as GM-CSF or interleukin-2, -7, or -12, may also be used as adjuvants.

5 In the formulations of the invention it is preferred that the adjuvant composition induces an immune response predominantly of the Th1 type. Thus the adjuvant may serve to modulate the immune response generated in response to the DNA-encoded antigens from a predominantly Th2 to a predominantly Th1 type response. High levels of Th1-type cytokines (e.g., IFN-, TNF, IL-2 and IL-12)
10 tend to favour the induction of cell mediated immune responses to an administered antigen. Within a preferred embodiment, in which a response is predominantly Th1-type, the level of Th1-type cytokines will increase to a greater extent than the level of Th2-type cytokines. The levels of these cytokines may be readily assessed using standard assays. For a review of the families of
15 cytokines, see Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Accordingly, suitable adjuvants for use in eliciting a predominantly Th1-type response include, for example, a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) together with an 20 aluminium salt. Other known adjuvants which preferentially induce a TH1 type immune response include CpG containing oligonucleotides. The oligonucleotides are characterised in that the CpG dinucleotide is unmethylated. Such oligonucleotides are well known and are described in, for example WO96/02555. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for 25 example, by Sato et al., *Science* 273:352, 1996. CpG-containing oligonucleotides may be encoded separately from the papilloma antigen(s) in the same or a different polynucleotide construct, or may be immediately adjacent thereto, e.g. as a fusion therewith. Alternatively the CpG-containing oligonucleotides may be administered separately i.e. not as part of the 30 composition which includes the encoded antigen. CpG oligonucleotides may be used alone or in combination with other adjuvants. For example, an enhanced

system involves the combination of a CpG-containing oligonucleotide and a saponin derivative particularly the combination of CpG and QS21 as disclosed in WO 00/09159 and WO 00/62800. Preferably the formulation additionally comprises an oil in water emulsion and/or tocopherol.

5

Another preferred adjuvant is a saponin, preferably QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), which may be used alone or in combination with other adjuvants. For example, an enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and saponin derivative, such as the 10 combination of QS21 and 3D-MPL as described in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol, as described in WO 96/33739. Other preferred formulations comprise an oil-in-water emulsion and tocopherol. A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil-in-water emulsion is described 15 in WO 95/17210.

Other preferred adjuvants include Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox (Ribi, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) and other aminoalkyl 20 glucosaminide 4-phosphates (AGPs).

Other preferred adjuvants include adjuvant molecules of the general formula (I)

25

Formula (I): $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{A-R}$

wherein, n is 1-50, A is a bond or $-\text{C}(\text{O})-$, R is C1-50 alkyl or Phenyl C1-50 alkyl.

30

One embodiment of the present invention consists of a formulation comprising a polyoxyethylene ether of general formula (I), wherein n is between 1 and 50, preferably 4-24, most preferably 9; the R component is C1-50, preferably C4-C20 alkyl and most preferably C12 alkyl, and A is a bond. The concentration of

the polyoxyethylene ethers should be in the range 0.1-20%, preferably from 0.1-10%, and most preferably in the range 0.1-1%. Preferred polyoxyethylene ethers are selected from the following group: polyoxyethylene-9-lauryl ether, polyoxyethylene-9-stearyl ether, polyoxyethylene-8-stearyl ether, 5 polyoxyethylene-4-lauryl ether, polyoxyethylene-35-lauryl ether, and polyoxyethylene-23-lauryl ether. Polyoxyethylene ethers such as polyoxyethylene lauryl ether are described in the Merck index (12th edition: entry 7717). These adjuvant molecules are described in WO 99/52549. The polyoxyethylene ether according to the general formula (I) above may, if desired, 10 be combined with another adjuvant. For example, a preferred adjuvant combination is preferably with CpG as described in the pending UK patent application GB 9820956.2.

15 Where the vaccine includes an adjuvant, the vaccine formulation may be administered in two parts. For example, the part of the formulation containing the nucleotide construct which encodes the antigen may be administered first, e.g. by subcutaneous or intramuscular injection, or by intradermal particle-mediated delivery, then the part of the formulation containing the adjuvant may be administered subsequently, either immediately or after a suitable time period 20 which will be apparent to the physician skilled in the vaccines arts. Under these circumstances the adjuvant may be administered by the same route as the antigenic formulation or by an alternate route. In other embodiments the adjuvant part of the formulation will be administered before the antigenic part. In one embodiment, the adjuvant is administered as a topical formulation, applied 25 to the skin at the site of particle mediated delivery of the nucleotide sequences which encode the antigen(s), either before or after the particle mediated delivery thereof.

30 The following Examples serve to further illustrate the invention, with reference to the accompanying drawings, in which:

Figure 1 shows the prototype wild-type amino acid sequences of E1 from HPV types 11, 6a and 6b, derived from Genbank;

Figure 2 shows the prototype wild-type amino acid sequence of HPV6b E1 from Fig. 1 (6b-e1) aligned with the HPV6b E1 amino acid sequence including point mutations to remove biological activity (6b-e1 mut);

Figure 3 shows the prototype wild-type amino acid sequences of E2 from HPV types 11, 6a and 6b, derived from Genbank;

Figure 4a shows the prototype wild-type amino acid sequence of HPV11 E2 from Fig. 3 (Hpv-11e2-wt) aligned with the HPV11 E2 amino acid sequence including a point mutation to remove biological activity (Hpv-11e2-mut) and with the amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence of Fig. 6 (Hpv-11e2-comut);

Figure 4b shows the prototype wild-type amino acid sequence of HPV6b E2 from Fig. 3 (Hpv-6be2-wt) aligned with the HPV6b E2 amino acid sequence including a point mutation to remove biological activity (Hpv-6be2-mut);

Figure 5 shows a nucleotide sequence, having a codon usage pattern resembling that of a highly expressed human gene, encoding the mutated amino acid sequence of HPV6b E1 from Fig. 2;

Figure 6 shows a nucleotide sequence, having a codon usage pattern resembling that of a highly expressed human gene, encoding the mutated amino acid sequence of HPV11 E2 from Fig. 4;

Figure 7 shows DNA vector p7313-PLc;

Figure 8 shows cell lysate samples from Example 4 run on an acrylamide gel and stained to show antibody binding to expressed E1 protein;

Figure 9 shows cellular responses to antigen challenge after immunisation of mice with a polynucleotide according to the invention (Example 6); and

Figure 10 shows cell lysate samples from Example 7 run on an acrylamide gel and stained to show antibody binding to expressed E2 protein.

Example 1 - Codon Optimisation of HPV6bE1

5 The wild-type prototype amino acid sequence of HPV6b E1, obtained from Genbank, is set out in Fig.1 (bottom sequence). This figure shows the high level of homology for this protein between the HPV virus prototype sequences of types 11, 6a and 6b. Similarly, Figure 3 sets out the wild-type prototype amino acid sequences for the E2 protein of HPV11, 6a and 6b. It is expected that an immune therapy (therapeutic vaccine) using HPV6b sequences will cross-react to provide a prophylactic or therapeutic immune response against all three viral 10 types.

15 The codon usage of the HPV6b E1 sequence was compared to that of highly expressed human and E.coli genes and found to have a low codon usage coefficient for both species. Simply using the most abundant codon for each amino acid residue would also result in a skewed codon usage pattern, as no organism uses exclusively its most preferred codon for a given amino acid. Consequently, the codons were assigned using a statistical method to give a synthetic gene having a codon frequency closer to that found naturally in highly expressed E.coli and human genes.

20 The codons in the synthetic gene were assigned using a Visual Basic program called Calcgene, written by R. S. Hale and G Thompson (Protein Expression and Purification Vol. 12 pp.185-188 (1998)). For each amino acid residue in the original sequence, a codon was assigned based on the probability of it appearing in highly expressed E.coli genes. Details of the program, which works under Microsoft Windows 3.1, can be obtained from the authors. Because the 25 program applies a statistical method to assign codons to the synthetic gene, not all resulting codons are the most frequently used in the target organism. Rather, the proportion of frequently and infrequently used codons of the target organism is reflected in the synthetic sequence by assigning codons in the correct proportions. However, as there is no hard-and-fast rule assigning a particular codon to a particular position in the sequence, each time it is run the program 30 will produce a different synthetic gene - although each will have the same codon usage pattern and each will encode the same amino acid sequence. If the program is run several times for a given amino acid sequence and a given target 35

organism, several different nucleotide sequences will be produced which may differ in the number, type and position of restriction sites, intron splice signals etc., some of which may be undesirable. The skilled artisan will be able to select an appropriate sequence for use in expression of the polypeptide on the basis of these features.

Furthermore, since the codons are randomly assigned on a statistical basis, it is possible (although perhaps unlikely) that two or more codons which are relatively rarely used in the target organism might be clustered in close proximity. It is believed that such clusters may upset the machinery of translation and result in particularly low expression rates, so the algorithm for choosing the codons in the optimized gene excluded any codons with an RSCU value of less than 0.2 for highly expressed genes in order to prevent any rare codon clusters being fortuitously selected. The distribution of the remaining codons was then allocated according to the frequencies for highly expressed *E.coli* genes to give an overall distribution within the synthetic gene that resembled that of the *E.coli* genes (coefficient = 0.85) and also that of highly expressed human genes (coefficient = 0.50). A similar process was used to obtain a codon optimised nucleotide sequence for HPV11 E2, except that Syngene (Peter Ertl, unpublished), an updated version of the Calcgene program, allowing exclusion of rare codons to be optional, was used to allocate codons according to the codon frequency pattern of highly expressed human genes. Unlike the codon assignment for E1, rare codons were not excluded. At the same time, an alteration was made to one of the oligonucleotides to encode a K111A amino acid change, as described below.

Mutations were introduced into the codon optimised E1 and E2 genes to give rise to point mutations in the E1 (K83G, R84G and G483D) and E2 (K111A) amino acid sequences. The amino acid sequences of the mutated genes are shown (aligned with the wild-type prototype sequence) in Figs. 2 (HPV6bE1) and 4 (HPV6bE2 and HPV11E2). The codon optimised and mutated nucleotide sequence for HPV6b E1 is shown in Fig. 5. The codon optimised and mutated nucleotide sequence for HPV11 E2 is shown in Fig. 6. In Figure 4, the amino acid sequence of the polypeptide obtained by expression of the codon optimised and mutated HPV11E2 gene is also given, in alignment with the prototype wild-

type and the mutated wild-type sequences, to show that codon optimisation of the nucleotide sequence does not alter the amino acid sequence encoded (which is identical to the mutated wild-type sequence).

5 Example 2 - Construction of the Codon Optimised HPV6b E1 Polynucleotide Sequence

Gene Design:

10 Using the optimisation software discussed above, overlapping 40mer oligonucleotides were calculated from the optimised sequence. The terminal oligonucleotides containing the restriction sites were 60mers. The oligonucleotides were ordered from Life Technologies Ltd at 50nmole concentration, deprotected and non-phosphorylated.

15 Oligonucleotide assembly:

Each oligonucleotide was dissolved in double distilled water to a final concentration of 100 micromolar (μ M) and an equal mixture was prepared of all 96 oligonucleotides at 100 μ M. The synthesis was set up as follows using Pwo polymerase from Roche Boehringer (Cat No. 1 644 955).

20	Double distilled water	86 μ l
	Pwo 10X buffer	10 μ l
	dNTP mix	1 μ l (equal mix of 100mM dNTPs)
	oligo mix	1 μ l (equal mix of 100 μ M oligos)
25	Pwo polymerase	2 μ l.

A Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out on the above reaction mix on a Trio Thermoblock (Biometra)using the following conditions:

1. 40°C 2 min
2. 72°C 10 sec
3. 94°C 15 sec
4. 40°C 30 sec
5. 72°C 20 sec + 2secs per cycle
6. 4°C ∞

35 Cycle repeated 25 times between steps 3 and 5.

After completion of 25 cycles, a 10 μ l aliquot was removed from each tube and run on a 0.8% Tris Acetate (TAE) agarose gel and observed under long wave UV light. The expected size of the synthesised E1 DNA should be approx. 2kb.

5

Gene Recovery:

The synthetic gene was recovered by PCR using polymerase using the two terminal oligos which contained a Not 1 restriction site on the N terminal of the synthetic oligo and a Bam H1 site at the C terminal synthetic oligo.

10

Double distilled water	65 μ l
Pwo 10X buffer	10 μ l
dNTP mix	1 μ l (equal mix of 100mM dNTPs)
assembly mix	20 μ l (from previous PCR)
15 N terminal oligo	1 μ l (100 μ M)
C terminal oligo	1 μ l (100 μ M)
Pwo polymerase	2 μ l.

20

1. 94°C 45 sec
2. 72°C 2 min + 1 min per 500bp
3. 72°C 10 min
4. 4°C ∞

Cycle repeated 25 times between steps 2 and 1.

25

The PCR product was then purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen Cat No. 28104) before the DNA was resuspended in a total of 50 μ l of kit elution buffer. A 10 μ l aliquot was digested with Not 1 and BamH1 restriction enzymes (from Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, Scotland) for 2 hours at 37°C. This digest was gel purified on 0.8% TAE agarose gel and the 2kb DNA product excised and extracted using a QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen Cat No. 28704). The final digested pure DNA fragment was eluted in a total of 50 μ l of kit elution buffer.

30

This PCR fragment was cloned into vector p7313PLc (Fig. 7), (Powderject Vaccines Inc., see further details below) and transformed into competent JM109 cells (Promega cat no: P9751). Plasmid DNA from selected clones were restriction enzyme checked by digestion with Nco1-BamH1 and Nco1-EcoR1.

5 Five correct clones with 2kb fragment inserts were selected and the insert DNA's sequenced. One clone with an insert containing just three point mutations was selected for further use. The three point mutations were corrected by ligation swap with homologous small fragments from other clones.

10 The corrected clone was re-checked by restriction enzyme digestion and the insert DNA fully sequenced. This cloned was designated p6bE1c/o. At the same time and for comparative expression and immunisation studies the wild type HPV-6b E1 gene, and the wild type HPV-11 E1 gene were PCR amplified from genomic clones of HPV-6b, (EMBO J. 2 (12) 2314-2318 1983) and HPV-11 (Virology 151, 124-130 1986), and the respective fragments cloned into Not 1 - BamH1 digested vector p7313PLc. These clones were designated p6bE1w/t and p11E1w/t respectively.

15 The E1 genes in clones p6bE1c/o and p6bE1w/t were further mutated to introduce amino acid changes K83G, R84G and G438D. Sequenced matched 3' and 5' oligonucleotide primers with nucleotide substitutions designed to introduce the required mutations were used in PCR reactions with other kit reagents by methods described in QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Cat No. 200518). Mutated p6bE1c/o and p6bE1w/t clones were designated p6bE1c/o mut and, p6bE1w/t mut respectively.

20

25

Example 3 - Construction of the Codon Optimised HPV11 E2 Polynucleotide Sequence

30 The design, assembly and recovery of the E2 codon optimised gene was as described above for E1, but the overlapping oligonucleotides were 60 nucleotides in length rather than 40, with an 18nt overlap. Unlike in the E1 procedure a clone containing the K111A amino acid mutation was generated at the same time as the codon optimised E2 gene clone by substituting the two appropriate wild type sequence oligonucleotides with two 60mer oligonucleotides

35

which together comprise the nucleotide substitution required to generate the K111A change.

Composition of plasmid p7313-PLc

5

The plasmid was constructed by replacing the beta-lactamase gene containing Eam1105I - PstI fragment of pUC19 (available from Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, HP7 9NA) with an EcoRI fragment of pUC4K (Amersham-Pharmacia) containing the Kanamycin resistance gene, following blunt ending of both fragments using T4 DNA polymerase. The human Cytomegalovirus IE1 promoter /enhancer, Intron A, was derived from plasmid JW4303 obtained from Dr Harriet Robinson, University of Massachusetts, and inserted into the SalI site of pUC19 as a Xhol -SalI fragment, incorporating the bovine growth hormone polyadenylation signal. Deletion of the 5' SalI-BanI fragment from the promoter generated the minimal promoter used in the vector (WO00/23592 - Powderject Vaccines Inc.). HBV Surface antigen 3'UTR was derived from Hepatitis B Virus, serotype adw, in the vector pAM6 (Moriarty et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78, 2606-2610, 1981). pAM6 (pBR322 based vector) was obtained from the American Type Culture Collection, catalogue number ATCC 45020. The 3'UTR was inserted 5' to the polyadenylation signal as a 1.4kb BamHI fragment, blunt ended for insertion to remove the BamHI sites. In a series of steps (including digestion with *Bgl* II, Klenow polymerase treatment, digestion with *Bst*X I, digestion with *Nco* I, treatment with mung bean nuclease to remove overhang and further digestion with *Bst*X I), modifications were made to the region between the 3'untranslated enhancer region of the HBV S gene and bGHpA signal to remove all open reading frames of greater than 5 codons between the X gene promoter and the bGHpA signal. This resulted in deletion of sequence encoding the translatable portion of the X protein (9 amino acids) and the X gene start codon. However, the weak enhancer/promoter region of the X gene was retained because this region was found to enhance expression of HBsAg from the CMV promoter. The bovine growth hormone polyadenylation signal was substituted with the rabbit beta globin polyadenylation signal. The 5'non-coding and coding sequences of the S antigen were excised and replaced with an oligonucleotide linker to provide multiple cloning sites as shown to produce plasmid p7313-PL.

10

15

20

25

30

35

Hind -- Not I -- -EcoRV --NdeI-- --BamHI
AGCTTGC GGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC . . .
5 . . .ACGCCGGCGATCGCTATAGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG
--NheI-- --KpnI-- -- Sall -- ΔNotI

The ColE1 cer sequence was obtained from a subclone from plasmid pDAH212 from David Hodgeson (Warwick University) and amplified by PCR using primers 10 to place EcoRI restriction sites at the ends of the sequence. The cer sequence was then inserted into the EcoRI site of p7313-PL to produce plasmid p7313-PLc (Fig. 7). The sequence of the amplified cer was verified against the Genbank entry M11411.

15 Example 4 - Expression of E1 in mammalian 293T cells

Mammalian 293T cells were grown at log phase at a final concentration of 2 X10⁵ cells per 6 well Corning Costar™ (Corning Science Products, 10 The ValleyCentre, Gordon Road, High Wycombe, Bucks, UK) tissue culture plate 20 overnight at 37°C in 5%CO₂. The following transfection mix was prepared and complexed for 25 minutes:

25 2μg of plasmid DNA (vector, p6bE1c/o, p6bE1w/t) in 16μl sterile double distilled water

plus:

OPTI-mem™ (Gibco BRL, Paisley, Scotland) 8μl
Lipofectamine™ (GibcoBRL) 6μl.

30 Each cell monolayer was washed carefully twice with OPTI-mem™. 800μl of OPTI-mem™ was added to each well. 200μl of OPTI-mem™ was added to each transfection mix, mixed and added gently to a cell monolayer. The plate was incubated for 5 hours at 37°C in 5% CO₂ after which the transfection mix and OPTI-mem™ were discarded. The cell monolayers were washed gently with cell 35 growth medium twice and finally transfected cells were incubated for 24 hours in

Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% foetal calf serum and 29.2mg/ml of L-glutamine at 37°C in 5% CO₂. The cells were scraped off into microtubes, washed twice with PBS, spun down and the cell pellet was resuspended in SDS Page Laemmli dye. The cell pellets were boiled and loaded onto a 10% SDS Page gel and electrophoresed in 1X Tris Glycine SDS buffer. After electrophoresis, the gel was blotted onto Nitrocellulose membrane (Amersham) and Western Blotted. The nitrocellulose membrane was blocked with 5% Marvel™ (Premier Beverages, Knighton, Adbaston, Stafford, UK) in PBS for 30 min at room temperature and washed twice with PBS and 0.1% Tween 20. A polyclonal antibody raised against the C terminal protein sequence of HPV6bE1 (protein sequence: CSSSLDIQDSEEDGSNSQAFR) in rabbits, was diluted in 5% Marvel™ in PBS and added to the nitrocellulose membrane. This was incubated at room temperature for 1 hour with gentle agitation. The diluted antibody was removed and the membrane washed three times with PBS and 0.1% Tween 20. A secondary conjugate, Swine anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) (DAKO), was diluted 1:20000 in PBS and 0.1% Tween 20. This was added to the washed membrane and incubated with gentle agitation at room temperature for 1 hour. The membrane was then washed thoroughly with PBS and 0.1% Tween20. A Chemiluminescent HRP kit (Amersham) was used to detect the transferred proteins on the membrane.

Results:

The predicted size of a translated protein for E1 is 68kDa - 72kDa. The results (Fig. 8) show a correct protein size expressed by p7313-PLc containing the codon optimised HPV6bE1 (lane 4). Vector containing wild-type E1 is in lane 3, which shows that there was no detectable expression of E1 in human cells from the wild-type nucleotide sequence. Similarly no E1 is detected in lane 2 (empty vector) and lane 1 (untransfected cells). The approx. 60kD band in lanes 1-4 is an unidentified cellular protein which cross-reacts with the anti-E1 antibody. The band is of roughly constant intensity across the lanes, showing that the loading of the samples was consistent.

Example 5 - Construction of recombinant Vaccinia Virus Expressing HPV E1 and HPV E2 proteins.

Vaccinia virus expressing HPV-6b E1 protein was generated at Glaxo Wellcome, Stevenage, UK. Vaccinia virus expressing HPV-11 E1 and HPV-11 E2 were a kind gift from Jeff Engler, University of Alabama at Birmingham, US.

5 Briefly, the E1 gene from p6bE1w/t was cloned into Vaccinia virus vector pTM3 and then the restriction enzyme checked and DNA sequenced recombinant vector used to transfected HTK⁺ cells. Recombinant Vaccinia virus was isolated and plaque purified. E1 protein expression was checked by Western blotting using peptide antisera after infection of permissive cells with both the recombinant virus expressing HPV-6b E1 and, a second Vaccinia virus (vTF7-3) expressing bacteriophage T7 RNA polymerase. Co-infection of cells with Vaccinia virus vTF7-3 is also necessary in order to direct expression of E1 and E2 protein from the HPV-11 E1 and E2 recombinant Vaccinia viruses. Vaccinia virus strain WR was used in negative control experiments. Vector pTM3 and virus vTF7-3 were from National Institute of Health, Maryland, US.

10

15

Example 6 - Immunology - detection of cellular responses to HPV antigens

20 All reagents were obtained from Gibco BRL, Paisley, Scotland or Sigma, Poole, Dorset unless otherwise stated.

25

A. Immunisation protocol.

Female C57BL/6 mice were immunised with 1.0-2.0 µg DNA (either p6bE1c/o, p6bE1w/t, p6bE1c/o mut, p6bE1w/t mut or empty plasmid p7313PLc) by PMDD and boosted with an identical dose 14 days later. Animals were sacrificed by cervical dislocation and spleens removed for investigation of the cellular responses to HPV antigens.

30

B. Preparation of single cell suspension of splenocytes.

Spleens were "mashed" between ground glass slides (BDH), red blood cells lysed (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) and cells resuspended in complete RPMI. (RPMI-1640 medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 2mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 5 x 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol).

35

C. Infection of MC57 target cells.

5 Immunodominant epitopes derived from HPV antigens remain undefined therefore the detection of antigen specific responses *in vitro* relies on natural processing of whole antigen generated within target cells that have been transfected with cDNA encoding the whole protein(s). MC57 cells (K^b positive) were infected with recombinant vaccinia virus expressing HPV-6b E1, HPV-11 E2 or HPV-11 E1 using a multiplicity of infection of 5 for 1 hour at 37°C. Excess virus was washed off and cells resuspended in complete RPMI containing 50 10 ng/ml recombinant human IL-2 (Glaxo Wellcome, Geneva).

D. ELISPOT.

15 ELISPOT plates (96 well, Millipore MAIP S 45 1 0) were coated with rat anti-mouse IFN gamma (Pharmingen 18181D) at 15 µg/ml in PBS overnight (4°C) prior to the addition of 4 x 10e5 splenocytes obtained from experimental groups. Antigen was presented by the addition of 1 x 10e4 recombinant vaccinia infected 20 MC57 cells. Wild-type vaccinia strain WR was used as a negative control. The assay was incubated overnight at 37°C(5% CO₂).

25 On day 2 of the assay, spot forming cells were detected using biotinylated rat anti-mouse IFN gamma (Pharmingen 18112D) at 1 µg /ml followed by streptavidin alkaline phosphatase conjugate (TCS biologicals SA 1008) at 1/1000 dilution in PBS. This was visualised using an alkaline phosphatase substrate kit (Biorad 170-6432) and quantified by image analysis. The results are shown in Fig. 9.

30 As can be seen from Fig. 9, a strong cellular response was seen from all three mice vaccinated with plasmid encoding HPV-6b codon optimised E1 sequence, when challenged with E1 carried in the vaccinia vector (vacc.E1(11) or 35 vacc.E1(6b)). No response was seen when these mice were challenged with wild-type vaccinia (vacc.WT), or with vaccinia expressing HPV-11 E2 (vacc.E2(11)). By contrast, vaccination of mice with plasmid encoding the wild type E1 sequence does not result in a T-cell response. Splenocytes from these mice do not react to challenge by vaccinia carrying the E1 gene, nor to any other challenge (data not shown). Mutation of the E1 gene does not alter the cellular

response in mice. Also, since mice immunised with p6bE1 c/o and p6bE1c/o mut raised strong cellular immune responses against target cells infected with a Vaccinia virus expressing E1 protein from HPV-11, we can assume that there is a high level of immunologic cross reactivity between HPV-6b E1 and HPV-11 E1.

5 Mice vaccinated with empty p7313-PLc vector showed no response to any challenge.

Example 7 - Expression of HPV 6b E2 in mammalian 293T cells

10 293T cell monolayers (80% confluent) in 24 well plates were transfected with 1 μ g of each plasmid (p6bw/t, p6bc/o, p6bw/t mut, p6bc/o mut) using 2.5 μ l of Lipofectamine 2000 (Life Technologies) per transfection following the standard protocol (see Example 4 above). 24hrs after transfection the cells were harvested, rinsed in phosphate buffered saline and examined by SDS-PAGE

15 and Western blot using an anti-E2 peptide antiserum (#1100) raised against HPV-6b N-terminal amino acid sequence MEAIAKRLDACQEQLLEYEC (Fig. 10).

Results

20 The results show a major protein band of the expected size (40kd - 45 kD) in track 3 (codon optimised E2) and track 5 (codon optimised and mutated E2). A minor band of the same size also appears in track 4 indicating some very low level expression from the mutated wild type E2 plasmid, but not in track 1 (negative control), or in track 2 (wild type E2 protein). A cross reacting protein band of ~25kd appears in all tracks indicating equal loading of protein lysates.

25 Mutation of E2 does not appear to compromise E2 protein expression which is significant improved by codon-optimisation.

Claims

1. A polynucleotide sequence which encodes a human papilloma virus (HPV) amino acid sequence, wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequence resembles that of highly expressed mammalian genes.
5
2. A polynucleotide sequence according to claim 1 in which the codon usage pattern of the polynucleotide sequence resembles that of highly expressed human genes.
10
3. A polynucleotide sequence according to claim 1 or claim 2 in which the codon usage pattern of the polynucleotide sequence also resembles that of highly expressed E.coli genes.
15
4. A polynucleotide sequence according to any one of claims 1 to 3 which is a DNA sequence.
20
5. A polynucleotide sequence according to any preceding claim which encodes a HPV polypeptide of an HPV type or sub-type associated with cervical cancer, benign cutaneous warts or genital warts.
25
6. A polynucleotide sequence according to claim 5 which encodes a HPV polypeptide of one of types 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68.
30
7. A polynucleotide sequence according to claim 6 which encodes a HPV polypeptide of an HPV type or sub-type which is associated particularly with cervical cancer or genital warts.
35
8. A polynucleotide sequence according to claim 7 which encodes a HPV polypeptide of one of types 6, 11, 16, 18, 33 or 45, or a fusion of two or more polypeptides of one or more of HPV virus types 6, 11, 16, 18, 33 or 45.

9. A polynucleotide sequence according to claim 8 which encodes a HPV polypeptide of a HPV type or sub-type selected from HPV 11, 6a or 6b.
- 5 10. A polynucleotide sequence according to any preceding claim which encodes a mutated HPV polypeptide having reduced biological function.
- 10 11. A polynucleotide sequence according to claim 10 which encodes a mutated HPV polypeptide comprising one or more point mutations by which one or more of the polypeptide's natural biological functions is inactivated.
- 15 12. A polynucleotide sequence according to any preceding claim in which the encoded HPV polypeptide comprises the whole or a part of a HPV early gene product.
- 20 13. A polynucleotide sequence according to claim 12 in which the encoded HPV polypeptide comprises the whole or a part of E1 or E2, or a fusion of the whole or a part of E1 or E2 with another HPV polypeptide.
- 25 14. A polynucleotide sequence according to any preceding claim having a codon usage coefficient for highly expressed human genes of greater than 0.3 but less than 1.
15. A polynucleotide sequence according to claim 14 having a codon usage coefficient for highly expressed human genes of greater than 0.4 but less than 1.
- 30 16. A polynucleotide sequence according to claim 15 having a codon usage coefficient for highly expressed human genes of greater than 0.5 but less than 1.
17. A polynucleotide sequence according to any preceding claim having a codon usage coefficient for highly expressed E.coli genes of greater than 0.6.

18. A polynucleotide sequence as set out in Fig. 5, or a fragment or analogue thereof which maintains the codon usage pattern thereof.
- 5 19. A polynucleotide sequence as set out in Fig. 6, or a fragment or analogue thereof which maintains the codon usage pattern thereof.
20. An expression vector comprising a polynucleotide sequence according to any preceding claim operably linked to a control sequence which is capable of providing for the expression of the polynucleotide sequence by a host cell.
- 10 21. An expression vector according to claim 20 which is capable of directing the expression of the polynucleotide sequence in bacterial, insect or mammalian cells.
- 15 22. An expression vector according to claim 20 or claim 21 which is p7313PLc.
- 20 23. A host cell comprising a polynucleotide sequence according to any one of claims 1-19.
24. A host cell comprising an expression vector according to any one of claims 20-22.
- 25 25. A host cell according to claim 23 or claim 24 which is a bacterial, mammalian, or insect cell.
26. A pharmaceutical composition comprising a polynucleotide sequence according to any one of claims 1-19.
- 30 27. A pharmaceutical composition comprising a vector according to any one of claims 20-22.

28. A pharmaceutical composition according to claim 26 or claim 27 comprising a plurality of particles, preferably gold particles, coated with DNA.
- 5 29. A pharmaceutical composition according to claim 27 comprising a pharmaceutically acceptable excipient and the DNA vector.
30. A pharmaceutical composition according to any one of claims 26-29 further comprising an adjuvant,
- 10 31. A pharmaceutical composition according to claim 30 in which the adjuvant is encoded as a fusion with the HPV polypeptide encoded by the polynucleotide.
- 15 32. The use of a polynucleotide according to any one of claims 1-19 in the treatment or prophylaxis of an HPV infection.
33. The use of a vector according to any one of claims 20-22 in the treatment or prophylaxis of an HPV infection.
- 20 34. The use of a vaccine composition according to any one of claims 26-31 in the treatment or prophylaxis of an HPV infection.
- 25 35. The use according to any one of claims 32-34 in which the HPV infection is an infection of HPV type 6, 11, 16 or 18.
- 30 36. The use of a polynucleotide according to any one of claims 1-19, a vector according to any one of claims 20-22 or a pharmaceutical composition according to any one of claims 26-31 in the treatment or prophylaxis of cutaneous (skin) warts, genital warts, atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), cervical dysplasia, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or cervical cancer.
- 35 37. A method of treating or preventing HPV infections or any symptoms or diseases associated therewith, comprising administering an effective

amount of a polynucleotide according to any one of claims 1-19, a vector according to any one of claims 20-22 or a pharmaceutical composition according to any one of claims 26-31.

5 38. A method of treating or preventing HPV infections or any symptoms or diseases associated therewith, comprising administering a pharmaceutical composition according to any one of claims 26-30 in a prime-boost dosage regime with a recombinant viral vector or non-viral based system comprising a polynucleotide according to any one of
10 claims 1-19.

1/12

Fig. 1

Hpv11-e1	1	60
Hpv6a-e1	MADDGSGTENEGSGCTGWFVMEAIVEHTTGTOQISEDEEEEVEDSGYDMVDFIDDRHITQNS	
6b-e1	MADDGSGTENEGSGCTGWFVMEAIVQHPTGTQISDDEDEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
Hpv11-e1	61	120
Hpv6a-e1	MADDGSGTENEGSGCTGWFVMEAIVQHPTGTQISDDEDEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
6b-e1	LEAQALFNRQEADAHYATVQDLKRKYLGSFYVSPISNVANAVESEISPRLDIAKLTRQPK	
Hpv11-e1	121	180
Hpv6a-e1	KVKRRLFETRELTDSGYGYSEVEA.., ATQVEKHGDOPENGGDGQERDTGRDIEGEGVEHRE	
6b-e1	KVKRRLFQTRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGPENGGDGQEKDTGRDIEG.., EEEHTE	
KVKRRLFQTRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGPENGGDGQEKDTGRDIEG.., EEEHTE		
Hpv11-e1	181	240
Hpv6a-e1	AEAVDDSTREHADTSGILELLKCKDIRSTLHGKFKDCFGLSFVDLIRPFKSDRTTCA DWV	
6b-e1	AEAPTNNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDRTTCA DWV	
Hpv11-e1	241	300
Hpv6a-e1	VAGFGIHHSIAAFQKLIEPLSLYAHIQWLTNNAWGMVLLVLIRFKVNKSCTVARTLGL	
6b-e1	VAGFGIHHSISSEAFQKLIEPLSLYAHIQWLTNNAWGMVLLVLVRFKVNKSRTVARTLATL	
VAGFGIHHSISSEAFQKLIEPLSLYAHIQWLTNNAWGMVLLVLRFKVNKSRTVARTLATL		
Hpv11-e1	301	360
Hpv6a-e1	LNIPENHMLIEPPKIQSGVRALYWFRTGINSASTVIGEAPENITRQTVIEHSLADSOFKL	
6b-e1	LNIPDNQMLIEPPKIQSGVRALYWFRTGINSASTVIGEAPENITRQTVIEHGLADSOFKL	
LNIPENHMLIEPPKIQSGVRALYWFRTGINSASTVIGEAPENITRQTVIEHGLADSOFKL		
Hpv11-e1	361	420
Hpv6a-e1	TEMVQWAYDNDCIEESEIAFEYAQRGDFDSNARFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
6b-e1	TEMVQWAYDNDCIEESEIAFEYAQRGDFDSNARFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
TEMVQWAYDNDCIEESEIAFEYAQRGDFDSNARFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM		
Hpv11-e1	421	480
Hpv6a-e1	KKMSIKQWIKYRGTKVDSVGNWKPVQFLRHQNIEFIPFLSKLKWLHGTPKKNCIAIVG	
6b-e1	KKMSIKQWIKHGRSKIEGTGNWKPVQFLRHQNIEFIPFLSKFKLWLHGTPKKNCIAIVG	
KKMSIKQWIKHGRSKIEGTGNWKPVQFLRHQNIEFIPFLTKFKLWLHGTPKKNCIAIVG		
Hpv11-e1	481	540
Hpv6a-e1	PPDTGKSCFCMSLISKFLGGTVISYVNNSCSHFWLQPLTDAKVALLDDATQPCWYMDTYMR	
6b-e1	PPDTGKSYFCMSLISFLCGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDDATQPCWYMDTYMR	
PPDTGKSYFCMSLISFLCGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDDATQPCWYMDTYMR		
Hpv11-e1	541	600
Hpv6a-e1	NLLDGNPMSIDRKHKRALTLIKCPPLVTSNIDISKEEKYKYLHSRVTTFPFPNPFDRN	
6b-e1	NLLDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLVTSNIDITKEEKYKYLHTRVTTFEPNPFDRN	
NLLDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLVTSNIDITKEEKYKYLHTRVTTFEPNPFDRN		
Hpv11-e1	601	651
Hpv6a-e1	GNAYEELSANWKCFERLSSLDIEDSEDEEDGSNSQAFRCVPGSVVRTL	
6b-e1	GNAYEELSANWKCFERLSSLDIQQSEDEEDGSNSQAFRCVPGTVVRTL	
GNAYEELSNTWKCFERLSSLDIQQSEDEEDGSNSQAFRCVPGTVVRTL		

2/12

Fig. 2

6b-e1	1	60						
6b-e1 mut	MADDSGTENEGSGCTGWFMV	EAIVQHPTGTQISDDEEVEDSGYDMVDF	IIDDSSNITHNS					
6b-e1	61	120						
6b-e1 mut	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLK	DKRKYLGSPYVSPINTIAEAVESEISPRLD	AIKLTRQPK					
6b-e1	121	180						
6b-e1 mut	KVKRRLFQ	TRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGV	PENGGDGQEKDTGRDIEGEEHTEAE					
6b-e1	181	240						
6b-e1 mut	APTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRA	LLGKFKECFG	LSFIDLIRPFKSDKTC	LDWVVA				
6b-e1	241	300						
6b-e1 mut	GPGIHHHSISEAFQK	LIEPLSLYAHIQWL	TNAWMVLLVLLRFKVNKSRSTVARTLATLLN					
6b-e1	301	360						
6b-e1 mut	IPENQMLIEPPPKI	QS	GV	ALYWFRTG	ISNASTVIGEAPEWITRQTVIE	GLAD	SQFKL	TB
6b-e1	361	420						
6b-e1 mut	MVQWAYDNDICEESEIAF	FEYAQRGDFDSNAR	RAFLNSNMQAKV	KDCATMCRHYKHAEMRK				
6b-e1	421	480						
6b-e1 mut	MSIKQWIKHRGSKIEGTGN	WPKIVQFLRHQNIE	EFIPFLTKFLNLH	GTPKNCIAIVGPP				
6b-e1	481	540						
6b-e1 mut	DYGKSYFCMSLISFLGGTVISHVN	SSHF	WLQPLVDAKVAL	DDATQPCWIYMDTYMRNL				
6b-e1	541	600						
6b-e1 mut	LDGNPMSIDRKHKALT	LIKCPPLL	VTSNID	ITKEDKYKYLH	TRVTTFTFPNPF	PD	RNGN	
6b-e1	601	649						
6b-e1 mut	AVYELSN	TNW	WKCFFERLSSLDI	QDSEDEEDG	GSNSQAFRCV	PGTV	VRTL	

Fig. 3

Hpv-11e2	1	60
	MEAIAKRLDACQDOLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2	61	120
	PLTVSETKGHNAIEMQMHLLESLAKTQYGVEPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFKKQGNTVEVK	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2	121	180
	FDGCEDNVMEVVWTHIYLQDNDSWVKVTTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAKYGS	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2	181	240
	FDGCANNTMDYVVTDVYVQDTSWVKVHSMVDAKGIYYTCGQFKTYVNFVKEAKYGS	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2	241	300
	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTTREVSIREFTTYTPAQTTARTVSACTTEDGVSPPPRK	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2	301	360
	ARGPSTN..NTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKC	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2		
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		
Hpv-11e2	361	369
	VGFMSLHLL	
Hpv6a-e2		
Hpv6b-e2		

4/12

Fig. 4a

1	60
Hpv-11e2-comut	MEAIAKRLDACQDQLLEYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGHLHIGLQVVP
Hpv-11e2-mut	MEAIAKRLDACQDQLLEYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGHLHIGLQVVP
Hpv-11e2-wt	MEAIAKRLDACQDQLLEYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGHLHIGLQVVP
61	120
Hpv-11e2-comut	PLTVSETKGHNIAEMQMHLLESLAKTQYGVEPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFAKQGNTVEVK
Hpv-11e2-mut	PLTVSETKGHNIAEMQMHLLESLAKTQYGVEPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFAKQGNTVEVK
Hpv-11e2-wt	PLTVSETKGHNIAEMQMHLLESLAKTQYGVEPWTLQDTSYEMWLTPPKRCFKQGNTVEVK
121	180
Hpv-11e2-comut	FDGCEDNVMEYVVVTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKGIYYTCGQPKTYYVNFNKEAQKYGS
Hpv-11e2-mut	FDGCEDNVMEYVVVTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKGIYYTCGQPKTYYVNFNKEAQKYGS
Hpv-11e2-wt	FDGCEDNVMEYVVVTHIYLQDNDSWVKVTSSVDAKGIYYTCGQPKTYYVNFNKEAQKYGS
181	240
Hpv-11e2-comut	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQT'TAPTVSACTTEDGVSAFPKR
Hpv-11e2-mut	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQT'TAPTVSACTTEDGVSAFPKR
Hpv-11e2-wt	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQT'TAPTVSACTTEDGVSAFPKR
241	300
Hpv-11e2-comut	ARGPSTNNTLCVANIRSDVSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR
Hpv-11e2-mut	ARGPSTNNTLCVANIRSDVSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR
Hpv-11e2-wt	ARGPSTNNTLCVANIRSDVSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR
301	360
Hpv-11e2-comut	YRLNDKYKHLFELASSTWWASPEAPHKNAIVTLYTSSSEQRQQFLNSVKIPTIRHKVG
Hpv-11e2-mut	YRLNDKYKHLFELASSTWWASPEAPHKNAIVTLYTSSSEQRQQFLNSVKIPTIRHKVG
Hpv-11e2-wt	YRLNDKYKHLFELASSTWWASPEAPHKNAIVTLYTSSSEQRQQFLNSVKIPTIRHKVG
361	367
Hpv-11e2-comut	FMSLHLL
Hpv-11e2-mut	FMSLHLL
Hpv-11e2-wt	FMSLHLL

Fig. 4b

1	60
Hpv-6be2-wt	MEAIAKRLDACQEQLLEYEENSTDHLKVLHWWKCMRHESVLLYKAKQMGHLHIGMQVVP
Hpv-6be2-mut	MEAIAKRLDACQEQLLEYEENSTDHLKVLHWWKCMRHESVLLYKAKQMGHLHIGMQVVP
61	120
Hpv-6be2-wt	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLLESLLRTEYSMEPWTIQLETSYEMWLTPPKRCFKRKGKTVEVK
Hpv-6be2-mut	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLLESLLRTEYSMEPWTIQLETSYEMWLTPPKRCFAKRGKTVEVK
121	180
Hpv-6be2-wt	FDGCANNMTDYYVQDNNTDWWVKVHSMDAKGIYYTCGQFKTYYVNFVKEAEKYGS
Hpv-6be2-mut	FDGCANNMTDYYVQDNNTDWWVKVHSMDAKGIYYTCGQFKTYYVNFVKEAEKYGS
181	240
Hpv-6be2-wt	TRHWEVCYGSTVICSPASVSSTQEVSIPESTTYTPAQTSTL.VSSSTKEDAVQTPPKR
Hpv-6be2-mut	TRHWEVCYGSTVICSPASVSSTQEVSIPESTTYTPAQTSTL.VSSSTKEDAVQTPPKR
241	300
Hpv-6be2-wt	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHNLITNNHDHQRRNNNSSATPIVQFOGESNCLKC
Hpv-6be2-mut	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHNLITNNHDHQRRNNNSSATPIVQFOGESNCLKC

WO 02/08435

PCT/GB01/03290

5/12

Fig. 4 Cont..

301	360
Hpv-6be2-wt	FRYRLNDRHRHLFLDISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPTTISHK
Hpv-6be2-mut	FRYRLNDRHRHLFLDISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPTTISHK
361	369
Hpv-6be2-wt	LGTMSSHL
	Q
	W
	W

WO 02/08435

PCT/GB01/03290

6/12

Fig. 5

HPV6bel-comut	1	60
	GCGCCGCCATGGCAGACGATTCCGGTACTGAGAACGAAAGGTTCTGGTTGACCGTTGG	
HPV6bel-comut	61	120
	TTCATGGTTGAAGCAATCGTTAGCAGCATCCGACTGGTACCCAGATCTCGATGAGGAAGC	
HPV6bel-comut	121	180
	GAAGAAGTTGAAGATTCTGGTTACGACATGGTTGACTTCATCGATGACTCCACATCACT	
HPV6bel-comut	181	240
	CATAACTCTCTGGAAAGCACAGGCTCTGTTAACGCCAGGAAGCTGATACCCATTACGCT	
HPV6bel-comut	241	300
	ACTGTTCAAGGACCTGGGAGGCCAATATCTGGGCTCTCCGTACGTTCCCCGATCAACACT	
HPV6bel-comut	301	360
	ATCGCAGAACGAGCTTGAGTCTGAAATCTCCCGCGCTGGACGCTATCAAACGTACTCGT	
HPV6bel-comut	361	420
	CAGCGAAGAACGTTAACGTCGTCGTTCCAGACTCGTGAACGTGACCGACTCCGGTTAC	
HPV6bel-comut	421	480
	GCTTATAGCGAGAGTTGAGGCTGGCACCGGCACCCAGGTTGAAAAACACGGGTGACCGGA	
HPV6bel-comut	481	540
	AAACGGCGGCGACGGTCAGGAAAGGACACCGGCCGACATCGAGGGTGAGGAACACACCC	
HPV6bel-comut	541	600
	GAAGCTGAAGCTCCGACTAACCTCTGCTGAACACGCAAGGTACTGCGGGTATCCIGGAA	
HPV6bel-comut	601	660
	CTGCTGAAATGCAAAAGACCTGCGCGGGCTCTGCTGGCAAATTCAAGAAATGCTTCGGC	
HPV6bel-comut	661	720
	CTGCTTTCAATTGACCTGATCCGTCGTTAACGCTGACAAAACACCTGCTGGACTGG	
HPV6bel-comut	721	780
	GTTGTAGCAGGCTTCGGCATCCACCACTCTATCTCTGAAGCATTCCAGAAACTGATCGAG	
HPV6bel-comut	781	840
	CCGCTGCTCTGTCAGCGCACATCCAGTGGCTGACTAACGCTGGGTATGGTCTGCTG	
HPV6bel-comut	841	900
	GTAATGCTGCCCTTAAAGTAAACAAATCTGTTCCACTGTTGCTGTAACCTGGCTACC	
HPV6bel-comut	901	960
	CTGCTGAAACATCCCGGAGAACAGATGCTGATCGAACCGCCGAAATCCAGTGGTGT	
HPV6bel-comut	961	1020
	GCTGCACTGTAACGGTTCTGACTGGCATCTAACGCTAGCACTGTTATCGGTGAGCA	
HPV6bel-comut	1021	1080
	CCGGAATGGATCACTCGTCAGACCGTTATCGAACACGGCTGGCAGATTCTCAGTTCAA	
HPV6bel-comut	1081	1140
	CTGACTGAAATGGTTCACTGGGATACGACAACGACRCTGCGAGGAATCTGAAATTGGC	

WO 02/08435

PCT/GB01/03290

7/12

Fig. 5 Cont..

1141	1200
HPV6bel-comut	TTCGAATACGCTCAGCGTGGCGACTTCGACTCCAACGCTCGTGCTTCCCTGAACAGCAAC
1201	1260
HPV6bel-comut	ATGCAGGCTAATACGTAAAAGACTGCGCTACCATGTGCCGTCACTACAAACACGCGGA
1261	1320
HPV6bel-comut	ATGCGTAAAATGCTATCAAACAGTGGATCAAGCACCGCGGTTCTAAAATCGAAGGTAC
1321	1380
HPV6bel-comut	GGTAACTGGAAACCGATCGTTCAAGTCCCTGCCATCAGAACATCGAATTCTATCCCGTC
1381	1440
HPV6bel-comut	CTGACCAAATTCAAGCTGTGGCTCACGGTACCCGAAAAAAACTGCATCGCTATCGTA
1441	1500
HPV6bel-comut	GTCACCGGACACTGACBAGTCTTACTTCTGTATGCCCTGATCTTCCCTGGCGC
1501	1560
HPV6bel-comut	ACTGTAATCTCTCACGTTAACTCTCCCTCCATTCTGGCTGCAGCCACTGGTAGACGCG
1561	1620
HPV6bel-comut	AAAGTAGCTCTGGACGACGCCAGCCGTGGATCTACATGGATACTTACATG
1621	1680
HPV6bel-comut	CCCAACCTGCTGGACGGTAACCCGATGTCTATGACCGTAAACACAAAGCGCTGACTCTG
1681	1740
HPV6bel-comut	ATCAAGTGCCCCGGCTGCTGGTAACCTCTAACATCGACATCACCAAGGAAGATAATAC
1741	1800
HPV6bel-comut	AAAGTACCTGCATAACCGTGTACTACCTTACTTCCGAACCCGTTCCGTTGATCGT
1801	1860
HPV6bel-comut	AACGGTAACGCTGTTACGAACATGCTCAACACTAACTGGAAATGCTCTCGAGCGCTG
1861	1920
HPV6bel-comut	TCTTCCTCCCTGGACATCCAGGACTCTGAAGATGAACAAGATGGTTCTAACTCTCAGGCT
1921	1968
HPV6bel-comut	TTCCGTTGTGTTCCGGTACTGTTGTCGACTCTGTGAGGATCC''.

WO 02/08435

PCT/GB01/03290

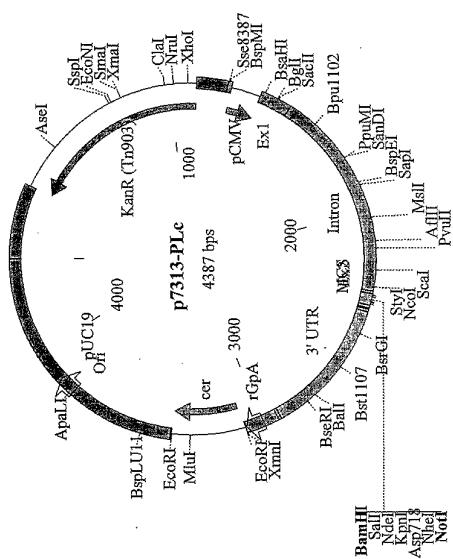
8/12

Fig. 6

1 'GCGGCCGCCATGGAAGCCATCGCGAAGAGGCTCGACCCCTGCCAGGCCAGCTGCTCG
 60
 Hpvlle2-comut AGCTGTACGAGGAGAACAGCATTGACATCCATAAAGCACATCATGCACCTGGAGATGCA
 61 120
 Hpvlle2-comut AGGTGGTCCCCCTCTGACCGTGTCAAGAGACAAAGGCCATAACGCAATCGAGATGCA
 121 180
 Hpvlle2-comut GCTGGAGAGCGTGTGCTGCAAAAGCCAAGCAGATGGGCCTGCCCCACATAGGCC
 181 240
 Hpvlle2-comut AGGTGGTCCCCCTCTGACCGTGTCAAGAGACAAAGGCCATAACGCAATCGAGATGCA
 241 300
 Hpvlle2-comut TGCACCTCGAGTCGCTGGCGAAAACACAGTACGGCGTGGAGCCATGGACCCCTGCAG
 301 360
 Hpvlle2-comut CCTCGTACGAATGTGGCTGACCCCACCTAACCGATGCTCGCCAAACAGGCCAACACAG
 361 420
 Hpvlle2-comut TGGAGGTGAAGTTCGACGGCTGTGAGGATAACGTTATGGAGTATGTCGTGGACGCA
 421 480
 Hpvlle2-comut TCTATCTGCAGGACAACGACAGTTGGTGAAGGTGACCGCTCCGTGGACGCCAGGG
 481 540
 Hpvlle2-comut TCTACTATACCTGTGGCAGTTAACCTACTATGTGAACCTAACAAAGAGGCC
 541 600
 Hpvlle2-comut AGTATGGCTCCAACCACACTGGGAGGTCTGCTATGGGAGCACGGTATTTGCTCTCC
 601 660
 Hpvlle2-comut CCAGCGTGTCTAGCACTGTGCGCGAGGTGAGCATTGCCAGCCACGTACACCC
 661 720
 Hpvlle2-comut CCCAGACGACCGCTCCGACCGTGTCTTGACTACCGAGGACGGCGTGA
 721 780
 Hpvlle2-comut CCAGGAAGCGTGCAGGGGCCAACGACCAACACCCCTCTGTGTGGCAACATTGCG
 781 840
 Hpvlle2-comut GCGTCGACAGTACCATCAATAACATCGTACGGATAACTATAACAGCACCAGGG
 841 900
 Hpvlle2-comut ACAACTGTCACTCTGGCAACCCCATCGTCAGCTCAGGGAGACACCAATTGCG
 901 960
 Hpvlle2-comut ACTGCTTCCGCTATCGCTCAACGACAAGTACAAGCACCTCTTGAGCTCGC
 961 1020
 Hpvlle2-comut CGTGGCACTGGGCTCACCGAGGCACCTCACAGARCGCCATCGTCACTCTCA
 1021 1080
 Hpvlle2-comut CCAGTGAGGAGCAGACAGCAGTTCTGAACAGCGTGAAGATCCCACCGACGATCC
 1081 1123
 Hpvlle2-comut ATAAGGTGGCTCATGTCAGTCATCTCCTGTGAGGATTC

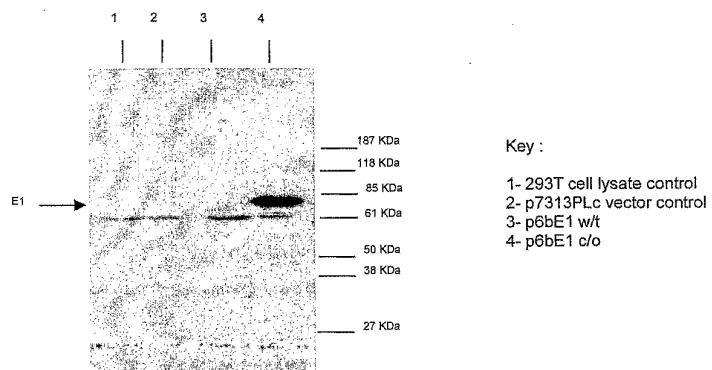
9/12

Figure 7: WRG7313plc



10/12

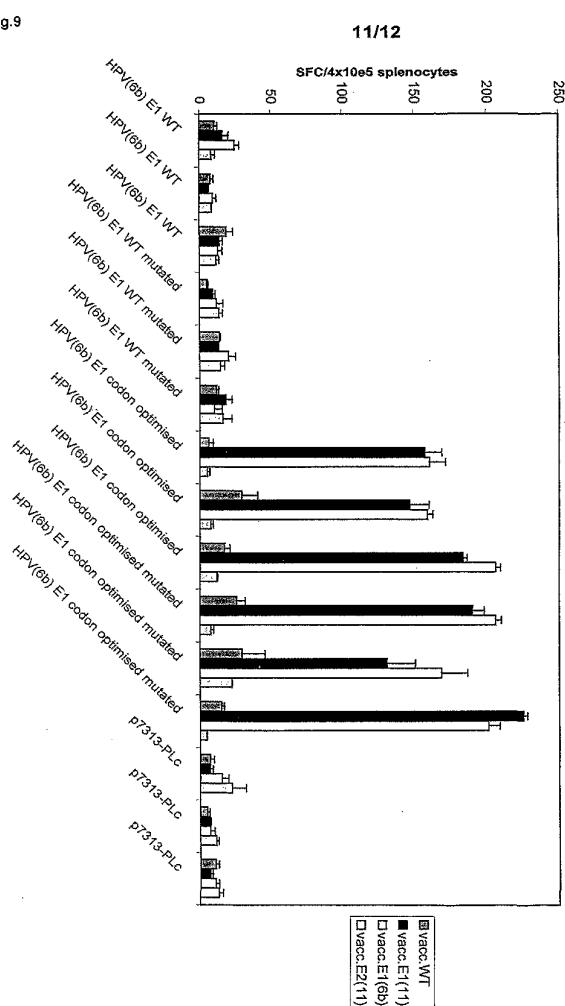
Fig. 8



WO 02/08435

PCT/GB01/03290

fig.9

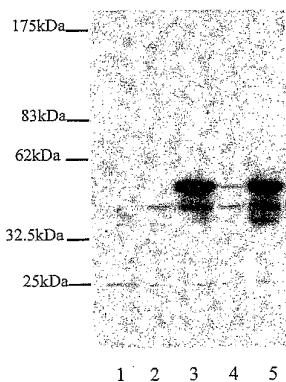


WO 02/08435

PCT/GB01/03290

12/12

Fig. 10



1	p7313PLc
2	p6bE2 w/t
3	p6bE2 c/o
4	p6bE2 w/t mutated
5	p6bE2 c/o mutated

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08435 A1(51) International Patent Classification⁵: C12N 15/86, S/10, 1/21, C07K 14/025, A61K 39/12

(21) International Application Number: PCT/GB01/03290

(22) International Filing Date: 20 July 2001 (20.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0017990.3 21 July 2000 (21.07.2000) GB
0025802.0 20 October 2000 (20.10.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB)

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ERTL, Peter, Franz [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). GOUGH, Gerald, Wayne [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). PARMAR, Vanta [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire, SG1 2NY (GB). RING, Christopher, Jeffrey, Alan [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). WALCOTT, Sarah, Marina [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agent: WALKER, Ralph, Francis; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

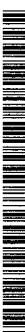
(48) Date of publication of this corrected version:

4 April 2002

(15) Information about Correction:

see PCT Gazette No. 14/2002 of 4 April 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/08435 A1

(54) Title: CODON-OPTIMIZED PAPILLOMA VIRUS SEQUENCES

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions useful in the treatment and prevention of human papilloma virus infections and the symptoms and diseases associated therewith. More particularly, the invention relates to polynucleotide sequences which encode human papilloma virus (HPV) amino acid amino acid sequences, wherein the codon usage pattern of the polynucleotide sequences resemble those of highly expressed mammalian genes.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/GB 01/03290
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/86 C12N5/10 C12N1/21 C07K14/025 A61K39/12		
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) IPC 7 C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01 14416 A (CHEN LING ;MERCK & CO INC (US); SCHULTZ LOREN D (US); WANG XIN MIN) 1 March 2001 (2001-03-01) the whole document In particular Fig. 7	1-38
Y	EP 0 523 395 A (BEHRINGERWERKE AG) 20 January 1993 (1993-01-20) the whole document	1-38
-/-		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document 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 a oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
8 November 2001	19/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gallii, I	

Form PCT/ISA/610 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l. Appl. No. PCT/GB 01/03290
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHOU JIAN ET AL: "Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 4972-4982, XP002164427 ISSN: 0022-538X the whole document	1-38
X	DARTMANN K ET AL: "The nucleotide sequence and genome organization of Human Papilloma virus type 11" VIROLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 151, 1986, pages 124-130, XP002170550 ISSN: 0042-6822 the whole document	18-21, 23-25
X	SCHWARZ E ET AL: "DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b" EMBO JOURNAL, IRL PRESS, EYNSHAM, GB, vol. 2, no. 12, 1983, pages 2341-2348, XP002101771 ISSN: 0261-4189 the whole document	18-21, 23-25
A	WO 92 11290 A (CETUS CORP ;UNIV CALIFORNIA (US)) 9 July 1992 (1992-07-09) the whole document	1-38
A	GOUY M ET AL: "CODON USAGE IN BACTERIA: CORRELATION WITH GENE EXPRESSIVITY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, IRL PRESS LTD., OXFORD, GB, vol. 10, no. 22, 1982, pages 7055-7074, XP002911021 ISSN: 0305-1048 the whole document	3,17
A	HALE R S ET AL: "CODON OPTIMIZATION OF THE GENE ENCODING A DOMAIN FROM HUMAN TYPE 1 NEUROFIBROMIN PROTEIN RESULTS IN A THREEFOLD IMPROVEMENT IN EXPRESSION LEVEL IN ESCHERICHIA COLI" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US, vol. 12, March 1998 (1998-03), pages 185-188, XP001030791 ISSN: 1046-5923 cited in the application the whole document	1-38

Form PCT/ISA/212 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
SEARCHED OR PARTIALLY SEARCHED			
		Int'l Application No. PCT/GB 01/03290	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0114416	A 01-03-2001	AU 7063900 A WO 0114416 A2	19-03-2001 01-03-2001
EP 0523395	A 20-01-1993	DE 4123760 A1 AT 206434 T AU 668094 B2 AU 2042992 A CA 2074153 A1 DE 59209921 D1 EP 1136500 A2 EP 0523395 A2 JP 8067696 A US 5601973 A US 6221577 B1 US 2001034021 A1	21-01-1993 15-10-2001 26-04-1996 21-01-1993 19-01-1993 08-11-2001 26-09-2001 20-01-1993 12-03-1996 11-02-1997 24-04-2001 25-10-2001
WO 9211290	A 09-07-1992	US 5464936 A AU 9173191 A CA 2098926 A1 EP 0563307 A1 JP 7503230 T WO 9211290 A1 US 5925516 A	07-11-1995 22-07-1992 22-06-1992 06-10-1993 06-04-1995 09-07-1992 20-07-1999

Form PCT/GB/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 31/12	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/12	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100086405

弁理士 河宮 治

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(72)発明者 ピーター・フランツ・アートル

イギリス、エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソスミスクライン

(72)発明者 ジェラルド・ウェイン・ゴー

イギリス、エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソスミスクライン

(72)発明者 バニタ・パーマー

イギリス、エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソスミスクライン

(72)発明者 クリストファー・ジェフリー・アラン・リング

イギリス、エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソスミスクライン

(72)発明者 サラ・マリーナ・ウォルコット

イギリス、エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA32 CA03 DA02 EA02 GA11 HA17

4B065 AA26X AA90X AA93X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45

4C076 BB31 CC35 DD21A FF02

4C084 AA02 AA07 AA13 BA22 CA01 DC50 MA63 NA10 ZB331

4C085 AA03 BB11 CC08 CC22 DD86

4C087 BC83 CA12 MA63 NA10 ZB33