

(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2004-525115

(P2004-525115A)

(43) 公表日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 35/14	A 6 1 K 35/14 Z	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/23	A 6 1 K 39/23	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 5
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 151 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-569178 (P2002-569178)	(71) 出願人	503107439
(86) (22) 出願日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		アカデミス ツィーケンホイス ライデン
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月6日 (2003.6.6)		オランダ国、エヌエル-2 3 3 3 ゼット
(86) 国際出願番号	PCT/NL2001/000893		アー ライデン、アルビヌスドレーフ 2
(87) 国際公開番号	W02002/070006	(74) 代理人	100088546
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		弁理士 谷川 英次郎
(31) 優先権主張番号	00204398.2	(72) 発明者	ヴァンデルバーク・ショエルド・ヘンドゥ
(32) 優先日	平成12年12月8日 (2000.12.8)		リクス
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		オランダ国 ワーディンクスヴェーン エ
(31) 優先権主張番号	01203298.3		ヌエル-2 7 4 2 ビーティー シュベル
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001.8.31)		トフ 1 5
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	オッテンホフ・トム・エイチ・エム
			オランダ国 オエグストギースト エヌエ
			ル-2 3 3 4 ケービー ハウトラン
			7エー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原特異的免疫応答を誘起及び／又は増強する、22～45アミノ酸残基からなる長いペプチド

(57) 【要約】

本発明は、ヒトパピローマウイルスから誘導されたエピトープ、及び最小のT細胞エピトープを含む約22～45アミノ酸残基のサイズを有するペプチドに関する。本発明はさらに、(マイコ)バクテリア及び／若しくはウイルスに感染した細胞又は癌細胞に対して被検者を免疫するための臨床的な手法を提供する。本発明は、22～35アミノ酸残基の長さを有するペプチド配列が、ペプチド特異的CD8+細胞溶解性細胞及びCD4+Tヘルパー細胞の両方を誘起することができることを示す。さらに、本発明は、22～35残基長のペプチドをワクチン接種することにより、最小のCTLエピトープそのものの長さを有するペプチドをワクチン接種する場合に比べて、より強いCD8+細胞溶解性T細胞応答がもたらされることを示す。本発明は、さらに、ある最小のCTLエピトープが、細胞溶解性エフェクター細胞を活性化するのではなくこれらの細胞溶解性細胞に寛容をもたらす本来的な能力を、22～35アミノ酸抗のペプチドを用いることにより克服できることを示す。本発明はさらに、HPVに対して、被検者をワクチン接種及び／又は処置するための臨床的な方法を提供する。本発明はまた、発達性病巣及び／又は子宮頸癌に罹患した被検者の処置に適した方法及び使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原特異的 T 細胞応答を誘起及び／又は増強する方法であって、前記抗原に特異的な T 細胞エピトープ含む、22～45 アミノ酸残基のペプチドを前記応答を示すことができる系に与えることを含む方法。

【請求項 2】

前記ペプチドが 22～40 のアミノ酸残基を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記ペプチドは、抗原提示細胞を活性化することができる配列を含む請求項 1 又は 2 記載の方法。

10

【請求項 4】

前記ペプチドは、T ヘルパー活性化配列を含む請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ペプチドを与えると、該ペプチドが抗原提示細胞によりプロセスされる請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ペプチドは、前記抗原の少なくとも 2 つの T 細胞エピトープを含む請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記エピトープの少なくとも 1 つは、前記抗原の T ヘルパー細胞エピトープ又は前記抗原の細胞障害性 T リンパ球 (CTL) エピトープを含む請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記ペプチドは、前記抗原の少なくとも 1 つの T ヘルパー細胞エピトープ及び前記抗原の少なくとも 1 つの細胞障害性 T リンパ球 (CTL) エピトープを含む請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗原は、ウイルスタンパク又はその免疫原性部分、誘導体及び／若しくは類似体を含む請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記抗原は、ヒトパピローマウイルス (HPV) タンパク又はその免疫原性部分、誘導体及び／若しくは類似体を含む請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記タンパクは、E 2、E 6 及び／又は E 7 を含む請求項 9 又は 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記抗原は、自己抗原、好ましくは腫瘍細胞特異的自己抗原又はその機能的部分、誘導体及び／若しくは類似体を含む請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗原は、ウイルス性又は (マイコ) バクテリア性抗原を含む請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記抗原は、Mycobacterium tuberculosis 及び Mycobacterium leprae hsp 65 369-412 を含む請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

21 個以下のアミノ酸を有するペプチドで免疫した場合には、前記系において抗原特異的 CTL の寛容及び／又は機能欠失が誘起される請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記系にアジュバントを与えることをさらに含む請求項 1 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記アジュバントは、エキソソーム (exosome)、樹状細胞、モノホスホリルリピッド A 及び／又は CpG 核酸を含む請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記系は、動物を含む請求項 1 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記系は、ヒトを含む請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記動物は、前記免疫応答を誘起及び／又は増強することにより少なくとも部分的に治療可能又は予防可能な疾患に罹患し又は罹患するリスクを有する請求項 18 又は 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記疾患は、(マイコ)バクテリア性疾患、ウイルス性疾患及び／又は癌である請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

抗原に特異的な T 細胞エピトープを含む、22～45 個のアミノ酸残基を有するペプチド。

【請求項 23】

22～40 個のアミノ酸残基を有する請求項 22 記載のペプチド。

【請求項 24】

前記抗原に特異的な少なくとも 2 つの T 細胞エピトープを含む請求項 23 又は 24 記載のペプチド。

【請求項 25】

前記ペプチドは CTL エピトープを含む請求項 22 ないし 24 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 26】

前記ペプチドは T ヘルパー細胞エピトープを含む請求項 22 ないし 25 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 27】

前記 CTL エピトープは、22 個未満のアミノ酸残基を有するペプチド上に存在すると、該エピトープに対する CTL 特異性の寛容又は機能欠失がもたらされる請求項 26 記載のペプチド。

【請求項 28】

22～35 個のアミノ酸残基を有する請求項 22 ないし 27 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 29】

32、33、34 又は 35 個のアミノ酸残基を有する請求項 28 記載のペプチド。

【請求項 30】

前記抗原に特異的な免疫応答を誘起及び／又は増強するための請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 31】

ワクチンの製造のための請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 32】

HPV 関連疾患の治療及び／又は予防のためのワクチンを調製するための請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 33】

医薬を調製するための請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

(マイコ) バクテリア性疾患、ウイルス性疾患及び／又は癌に罹患し又は罹患するリスクを有する個体を処置するための医薬を調製するための請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 35】

請求項 1 ないし 21 のいずれか 1 項に記載の方法により前記抗原に特異的な T 細胞応答を誘起及び／又は増強し、前記系から前記抗原特異的 T 細胞を回収することを含む、抗原特異的 T 細胞を得る方法。

【請求項 36】

請求項 35 記載の方法により得ることができる、単離された T 細胞。

【請求項 37】

医薬を調製するための、請求項 36 記載の T 細胞の使用。

【請求項 38】

請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含むワクチン。

【請求項 39】

請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチド及び／又は請求項 36 記載の T 細胞を含む医薬。

【請求項 40】

前記抗原に特異的なエピトープを含む前記ペプチドの、細胞集団が抗原特異的 T 細胞を含むかどうか決定するための請求項 22 ないし 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 41】

個体が前記抗原に対する免疫を有するかどうかを決定するための請求項 40 記載の使用。

【請求項 42】

前記 T 細胞の存在は、ELISA、ELISPOT、遅延型過敏症応答、細胞内サイトカイン染色及び／又は細胞外サイトカイン染色により決定される請求項 40 又は 41 記載の使用。

【請求項 43】

ヒトパピローマウイルス 16 E7 タンパクの中央部分から選ばれる免疫原性エピトープ。

【請求項 44】

前記中央部分は、ヒトパピローマウイルス 16 E7 タンパクのアミノ酸 35～77 に亘る領域を含む請求項 43 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 45】

前記中央部分は、前記 E7 タンパクのアミノ酸 35～50 に亘る領域を含む請求項 43 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 46】

前記中央部分は、前記 E7 タンパクのアミノ酸 50～62 に亘る領域を含む請求項 43 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 47】

前記中央部分は、前記 E7 タンパクのアミノ酸 43～77 に亘る領域を含む請求項 43 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 48】

ヒトパピローマウイルス 16 E6 タンパクの C 末端部分から選ばれる免疫原性エピトープ。

【請求項 49】

前記 C 末端部分は、ヒトパピローマウイルス 16 E6 タンパクの 81～158 アミノ酸に亘る領域を含む請求項 48 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 50】

前記 C 末端部分は、ヒトパピローマウイルス 16 E6 タンパクの 127～140 アミノ酸に亘る領域を含む請求項 48 記載の免疫原性エピトープ。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記 C 末端部分は、ヒトパピローマウイルス 1 6 E 6 タンパクの 1 2 1 ～ 1 4 2 アミノ酸に亘る領域を含む請求項 4 8 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 2】

ヒトパピローマウイルス 1 6 E 2 タンパクのアミノ酸 3 1 ～ 1 2 0、1 5 1 ～ 1 9 5 又は 2 7 1 ～ 3 6 5 に亘る領域から選ばれる免疫原性エピトープ。

【請求項 5 3】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 4 6 ～ 7 5 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 4】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 5 1 ～ 7 0 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 5】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 6 1 ～ 7 6 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 6】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 3 1 1 ～ 3 2 5 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 7】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 3 1 6 ～ 3 3 0 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 8】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 3 4 6 ～ 3 5 5 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 5 9】

前記領域は、前記 E 2 タンパクのアミノ酸 3 5 1 ～ 3 6 5 に亘る請求項 5 2 記載の免疫原性エピトープ。

【請求項 6 0】

請求項 4 3 ないし 5 9 のいずれか 1 項に記載の免疫原性エピトープを含むペプチド。

【請求項 6 1】

MHC クラス I I 分子と複合することができる請求項 6 0 記載のペプチド。

【請求項 6 2】

C I N I I I 及び／又は子宮頸癌であると診断された個体から誘導された P B M C による I F N γ 生産を誘起する能力について試験された請求項 6 0 記載のペプチド。

【請求項 6 3】

未利用の T 細胞の集団を、請求項 6 0 ないし 6 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドと接触させ、前記 T 細胞集団の少なくとも一部を培養することを含む、ヒトパピローマウイルス 1 6 特異的 T 細胞の生成方法。

【請求項 6 4】

ヒトパピローマウイルス 1 6 に感染した被検者の T 細胞集団を、請求項 6 0 ないし 6 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドと接触させ、前記 T 細胞集団の少なくとも一部を培養することを含む、ヒトパピローマウイルス 1 6 特異的記憶 T 細胞による I F N γ 生産を誘起する方法。

【請求項 6 5】

前記ヒトパピローマウイルス 1 6 特異的 T 細胞を分離することをさらに含む請求項 6 3 又は 6 4 記載の方法。

【請求項 6 6】

請求項 6 5 記載の方法により得ることができる、単離された T 細胞。

【請求項 6 7】

請求項 6 0 ないし 6 2 のいずれか 1 項に記載のペプチド及び／又は請求項 6 6 記載の T 細胞

10

20

30

40

50

胞を個体に投与することを含む、個体におけるH P V 1 6 E 7タンパク特異的、及び／又はH P V 1 6 E 6タンパク特異的、及び／又はH P V 1 6 E 2タンパク特異的免疫応答を誘起及び／又は増強する方法。

【請求項 6 8】

請求項 6 0 ないし 6 2 のいずれか 1 項に記載のペプチド及び適当な担体を含むワクチン。

【請求項 6 9】

請求項 6 6 記載の T 細胞の、免疫治療のための使用。

【請求項 7 0】

H P V 1 6 病巣を有する被検者の処置のための、請求項 6 8 記載のワクチン又は請求項 6 6 記載の T 細胞の使用。

【請求項 7 1】

T 細胞集団が、あるエピトープに特異的な記憶 T 細胞を含むかどうか決定するための方法であって、

- ・前記 T 細胞集団に、前記エピトープを含むペプチドを与え、
- ・ I F N γ 抗体の存在下において前記 T 細胞集団を培養し、そして
- ・結合されたあらゆる I F N γ を測定することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、一般的には医学の分野に関し、より詳細には、抗原に対する特異的なエピトープを含むペプチドを用いて、該抗原に対する T 細胞の応答を誘起及び／又は増強することに関する。

【0002】

本発明は、主として H P V に対する免疫をモデルとして用いて例示する。しかしながら、本発明は、H P V に限定されるものとして解釈してはならず、免疫に関連する又は関連可能な広範囲の疾患に関わるものであると解釈されるべきである。

【0003】

H P V 感染は、若くて性的に活力のある男女の間で大いに流行している。3 年間の追跡期間を伴う大規模な計画調査によると、男性パートナーからの H P V の感染が一般的で患者の 4 0 ～ 6 0 % に及ぶことが示された (K o u t s k y e t a l . , 1 9 9 7 , H o e t a l . , 1 9 9 8 , M a r r a z z o e t a l . , 2 0 0 0) 。従って、H P V はおそらく最も一般的な性感染症である。

【0004】

高リスクタイプのパピローマウイルス (例えば、H P V 1 6 , 1 8 , 3 1 , 3 3 及び 4 5) は、子宮頸癌の病因である (B o s c h e t a l . , 1 9 9 5 , Z u r H a u s e n , 1 9 9 6) 。基底上皮細胞の感染に続き、即時 H P V 初期遺伝子 E 1 , E 2 , E 5 , E 6 及び E 7 が発現される。E 1 及び E 2 遺伝子は、ウイルスの複製を制御する。さらに、E 2 タンパクは、E 6 及び E 7 腫瘍タンパクの発現を制御する。高リスク H P V 型の E 6 タンパクは、p 5 3 に特異的に結合し、ユビキチン経路を介するその迅速な分解を標的にする。p 5 3 は、アポトーシスの開始に関与し、このタンパクが失われるとアポトーシスが防止される (S c h e f f n e r e t a l . , 1 9 9 0) 。高リスク型の E 7 タンパクは、p R B に結合し、これは通常、細胞サイクルに入るために必要なタンパクである E 2 F を不活性化することにより、細胞が細胞サイクルに入ることを妨げる (D y s o n e t a l . 1 9 8 9) 。E 7 の発現は、感染細胞が細胞サイクルから離脱して分化することをできなくする。E 6 及び E 7 腫瘍タンパクの延長され高められた発現は、H P V 誘導異形成及び子宮頸癌へのトランスフォーメーションに深く関連している。ヒトの H P V 関連疾患及び H P V により誘起される癌に対する防御における免疫系の防御役割は、免疫抑制腎移植患者及び H I V 感染患者では、生殖 H P V 感染が健常対照に比べて 1 7 倍高いことにより示唆される (H o e t a l . , 1 9 9 4 , M a t o r r a s e t a l . 1 9 9 1 , H a l p e r t e t a l . 1 9 8 6) 。免疫抑制され

10

20

30

40

50

た個体のHPV感染に対する解消能力の減少は、感染初期における免疫系の防御役割を間接的に示している。初期抗原E2、E6及びE7に対する免疫を介するHPVに対する防御の証拠は、癌関連パピローマウイルスの主な動物モデルであるワタオウサギパピローマウイルスから来た。非構造タンパクE1及びE2でワクチン投与すると、ウイルスにより誘起されるパピローマの退縮が誘起され、ウイルス性腫瘍の成長が抑制される。さらに、E1、E2、E6及びE7遺伝子の組み合わせでワクチン投与されたウサギは、ウイルス攻撃に対して完全に守られた(Han et al., 1999, Selvakumar et al., 1995)。これらのデータは、E2、E6及びE7に対する免疫がパピローマウイルス感染の免疫予防及びHPVにより誘起される病変及び癌に対して治療的であることを示している。

10

【0005】

HPV16に対する免疫応答に関与するエピトープを同定することは、これらをサブユニットとしてワクチンに組み込み、又はこれらのエピトープを用いてワクチンにより誘起された免疫性を生体内でモニターできる可能性があるので、かなり興味のあることである。ほとんどの上皮細胞はMHCクラスIを発現するがクラスIIを発現しないので、殺腫瘍性HPV特異的CD8+細胞障害性Tリンパ球に注意が集中的に向けられてきた(Melief et al., 2000; Rensing et al., 1995; Rensing et al., 2000; Rensing et al., 1996)。HPV特異的CD8+T細胞反応性は、子宮頸上皮内新生物グレードIII(CIN III)病巣又は子宮頸癌(Nimako et al., 1997; Rensing et al., 1996)患者の末梢血及び子宮頸癌患者から単離された腫瘍浸潤性T細胞集団(Evans et al., 1997)中で見つかっている。固形腫瘍のほとんどはMHCクラスIIを発現しないにもかかわらず、腫瘍特異的CD4+Tヘルパー(「Th」)免疫はまた、現在、固形腫瘍の根絶に中心的な役割を果たすものと考えられている(Melief et al., 2000; Pardoll and Topalian, 1998; Toes et al., 1999中でレビュー)。CD4+腫瘍特異性T細胞は、CD8+腫瘍特異性CTLの最適な誘起のためだけではなく、これらのCTLによる局所的エフェクター細胞の機能を最適に発現させるためにも必要であることを最近の証拠は示している(Ossendorp et al., 1998, Toes et al., 1999)。MHCクラスIに拘束された腫瘍特異的免疫を誘起することによって、プロフェッショナル抗原提示細胞により捕獲された抗原を交差提示(cross-presentation)することが主な役割を演じているものと思われる。交差初回免疫(cross-priming)により腫瘍特異的CTLを適切に誘起するためには、腫瘍特異的CD4+T細胞の助けが必要である(Toes et al., 1999, Schoenberger et al., 1998)。HPV特異的Th免疫の積極的な役割が、生殖イボ(genital warts)の退縮においてCD4+T細胞が最も多くなること(Coleman et al., 1994)及びCIN病巣の自発的な退縮を示した被検者の大部分において、HPV16 E7に対する遅延型過敏症応答が検出されることにより示唆される(Hopfl et al., 2000)。さらに、HPV16特異的CD4+T細胞が、HPV持続感染患者、高グレードCIN病巣又は子宮頸癌患者の血液中に検出されている(de Gruijl et al., 1998)。より流行していない腫瘍原性型であるHPV59及びHPV68については、HLA-DR4拘束Th細胞が、子宮頸癌病巣に浸潤したT細胞から単離されている(Hohn et al., 1999)。対照的に、進行性CIN病巣及び子宮頸癌の大部分においてHPV16が存在しているにもかかわらず、HLA拘束及びHPV16特異的Tヘルパー応答のエピトープ特異性については深い情報はない。

20

30

40

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

例えば(マイコ)バクテリア及び／又はウイルス感染細胞又は腫瘍細胞、並びに特にHPVに対して、被検者を免疫する、臨床に関するアプローチでは、特異的Tヘルパー細胞及

50

びCTLの両者が誘起されることが好ましい。我々は、最小のCTLエピトープで免疫することにより、いくつかのモデルでは腫瘍に対する防御がもたらされることを既に示した（Feltkamp et al. 1993, Kast et al. 1991）が、一方、他のモデルでは、本来、誘起されれば防御的に機能するウイルス特異的又は腫瘍特異的CTLの寛容又は機能欠失が導かれ得る（Toes et al. 1996ab）。寛容又は機能欠失は、ワクチン投与の有効性を有意に減じる。しかしながら、本発明以前には、この現象の解決方法はなかった。この効果に関与するエピトープは、従って、免疫化の目的のためには相応しくない。交差初回免疫及び他のメカニズムによってMHCクラスI分子による提示のための外部抗原のプロセッシングは、周知の内発的経路に次ぐ、MHCクラスIによる提示のためのプロセッシングの第2の経路として広く認識されている（Jondal et al. 1996, Reimann et al. 1997）。この経路を介する抗原プロセッシングの通常の結果は、CD4+T細胞によるAPC活性化が起きない限りCTL寛容である（Kurts et al., 1997）。さらに、マウスのウイルス感染を用いる数種類のの研究において、CTL前駆体の頻度と防御的免疫の間に正の相関が認められた（Sedlik et al. 2000, Fu et al., 1999）。CTLを最適に誘起するために、CTLエピトープの提示が、樹状細胞のようなプロフェッショナル抗原提示細胞（APCs）の表面において好ましく起きる（Mellman et al. 1998, Rodriguez et al. 1999）。最小のCTLエピトープ及びThエピトープが、プロフェッショナル抗原提示細胞によるプロセッシングなしでT細胞に提示され得るが、MHCクラスI及びMHCクラスII中のCTL及びThエピトープの最適な提示が起きるために、タンパクは取り込まれプロセッシングされる必要がある（Mancà et al. 1994）。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、抗原特異的免疫応答を改善するための手段及び方法に関する。この目的のために、本発明は、抗原特異的T細胞応答を誘起及び／又は増強する方法であって、前記抗原に特異的なT細胞エピトープ含む、22～45アミノ酸残基のペプチドを前記応答を示すことができる系に与えることを含む方法を提供する。これらのペプチドは効率的に合成することができるし、また、前記ペプチドをプロセッシングすることができる細胞によって効率的に取り込ませ、プロセスされたエピトープをMHC-I又はMHC-II内に提示させてもよい。好ましくは、前記ペプチドは、プロフェッショナル抗原提示細胞によりプロセスされる。抗原提示細胞、特に、樹状細胞のようなプロフェッショナル抗原提示細胞は、エピトープをプロセスして提示するのにきわめて効率的である。なぜなら、それらは、前記抗原特異的T細胞応答の改善された誘起及び／又は増強を究極的にもたらすT細胞との効率的な連絡を可能にするというさらなる機能を有しているからである。従って、本発明の方法の好ましい具体例では、前記ペプチドは、抗原提示細胞を活性化することができる配列を含む。抗原提示細胞を活性化することができる配列とは、抗原提示細胞、好ましくはプロフェッショナル抗原提示細胞を少なくとも部分的に活性化することができる配列を意味する。前記活性化は、好ましくは、前記ペプチドの少なくとも1つのエピトープを前記APCの表面に提示することをもたらす。特に好ましい具体例では、前記ペプチドは、前記抗原についての少なくとも2つのT細胞エピトープを含む。前記抗原についての2つのT細胞エピトープが存在することは、前記抗原特異的T細胞応答のより効率的な誘起及び／又は増強を可能にする。好ましくは、前記エピトープの少なくとも1つは、前記抗原についてのTヘルパー細胞エピトープ又は前記抗原についての細胞障害性Tリンパ球（CTL）エピトープを含む。ペプチド上に少なくとも1つの又は他のエピトープを有することが望ましい。効率的な誘起及び／又は増強は、前記ペプチドがTヘルパー活性化配列を含む場合に達成される。ここで、Tヘルパー活性化配列とは、Tヘルパー細胞を少なくとも部分的に活性化することができる配列を意味する。前記活性化は、好ましくは、前記抗原特異的T細胞応答の改善された誘起及び／又は増強をもたらす。1つの具体例では、前記ペプチドは、前記抗原についての少なくとも1つのTヘルパー細胞エピ

トープと、前記抗原についての少なくとも1つの細胞障害性Tリンパ球（CTL）エピトープを含む。驚くべきことに、このようなペプチドを用いると、前記ペプチド上のエピトープに対する（部分的）寛容の誘起の問題が起きず又はその程度が低く、一方、前記抗原に対する特異的T細胞応答の誘起及び／又は増強は非常に効率的であることが見出された。従って、本発明の特に好ましい具体例では、前記ペプチドは、前記抗原についての少なくとも1つのTヘルパー細胞エピトープと、前記抗原についての少なくとも1つの細胞障害性Tリンパ球（CTL）エピトープを含む。

【0008】

ある抗原についてのエピトープは、該抗原に特異的なT細胞レセプターと相互作用することができる。該T細胞レセプターは、前記エピトープを含む、抗原から誘導された又は誘導可能なエピトープを提示するMHC-I又はMHC-II分子に対して特異的である。前記T細胞レセプターは、前記抗原から誘導された又は誘導可能なペプチドと相互作用することができるが、前記エピトープは、広範囲の異なる化合物上に存在することができる。一般に、抗原のエピトープは、該抗原の免疫原性部分上に存在し、該部分は少なくとも9アミノ酸長で、MHC-I又はMHC-II分子により提示され得るのである。もっとも、現在の技術では、全く異なった方法により精製されたエピトープ又は異なるものを含むエピトープを提供することが可能である。例えば、前記抗原のある断片が1つのエピトープを含むことが一旦知られば、1又は2以上のアミノ酸部位で異なる複数のペプチドを精製することができる。その結果、前記エピトープの存在又は不存在は、例えば、前記エピトープに特異的なT細胞を用いたELISPOTアッセイにより容易に確かめることができる。抗原のエピトープは、ペプチド、就職ペプチド、ペプチド類似物のような、これらに限定されない種々の異なる分子上に存在し得る。

【0009】

本発明のペプチドは、いずれの特定の抗原のエピトープをも含むことができる。もっとも、好ましくは、前記抗原は、（マイコ）バクテリア及び／又はウイルスタンパク、又はその免疫原性部分、それらの誘導体及び／又は類似体を含む。本発明の1つの局面において、前記抗原は、マイコバクテリアタンパク又はその免疫原性部分、それらの誘導体及び／又は類似体を含む。本発明の好ましい具体例においては、前記抗原は、hsp65 369-412（Ottenhof et al., 1991; Charo et al., 2001）を含む。hsp65 369-412は、369-377部位に、細胞障害性T細胞により認識されるHLA-A*0201エピトープを含み、Tヘルパー細胞により認識されるDR5エピトープを390-412部位に含む。もう1つの好ましい具体例では、前記抗原は、ヒトパピローマウイルス（HPV）タンパク又はその免疫原性部分、それらの誘導体及び／又は類似体を含む。タンパク質の免疫原性部分、誘導体及び／又は類似体は、そのタンパク質自身と必ずしも同量ではないが同種の免疫原性能力を有する。このようなタンパク質の誘導体は、好ましくは保存的なアミノ酸置換により得ることができる。

【0010】

さらに好ましくは、前記タンパク質は、E2、E6及び／又はE7を含む。E2、E6及びE7配列中の最も免疫原性の高い領域が同定された。さらに、この領域における、多数の自然にプロセスされたThエピトープのマッピングが同定された。方法は、健常血液ドナーから誘導された短期間及び長期間PBMC培養物をそれぞれ含んでいた。PBMC培養物を、22-35アミノ酸残基長のペプチドで刺激した。並行して、IFN γ ELISPOTアッセイにより検出される、生体内で誘起されたE2、E6及びE7特異的免疫を、健常被検者及びHPV16+病巣を有すると診断された被検者において分析した。

【0011】

ウイルス感染及び腫瘍に対する自然の及びワクチン誘導免疫防御において、病原体及び腫瘍特異的Tヘルパー免疫が中心的な役割を果たすことが見いだされた。ヒトパピローマウイルス16型（HPV16）E2、E6及びE7タンパクに対する応答を詳細に調べた。HLA分類された健常ドナーからの短期間及び長期間のPBMC培養により、我々は、

E 2 タンパク中の 3 つの異なる領域 (E 2 31-120 ; E 2 151-195 ; E 2 271-365) 、HPV16 E 6 の C 末端領域 (E 6 81-158) 、及び HPV16 E 7 の中央領域 (E 7 31-77) を、これらの抗原における主な免疫原性領域であると同定した。さらに、我々は、これらのタンパク質中の 10 個の異なる T h エピトープをマッピングした (DR1/E 2 351-365, DR2/E 2 316-330, DR2/E 2 346-355, DR4/E 2 51-70, E 2 61-76, DQ6/E 2 311-325, DR15/E 7 50-62, DR3/E 7 43-77, DQ2/E 7 35-50, DR1/E 6 127-142) 。

【0012】

IFN γ ELISPOT 分析を採用することにより、我々は、健常人中の HPV16 E 2 及び HPV16 E 6 に対する記憶 T h 免疫を、CD45RO+T 細胞中に検出した。これは、以前の HPV 感染に対する E 2 及び E 6 に向けられた防御的免疫を示唆する。さらに、HPV16+病巣を有する被検者において、HPV16 E 7 に対する T h 免疫を検出した。これらの応答の数種類は、この研究で規定される 3 つの E 7 誘導 T h エピトープに合致する。他の多数の HPV16+被検者は、E 7 特異的 1 型サイトカイン産生 T 細胞免疫を示さなかった。これは、免疫応答できなかったことを意味している。

【0013】

我々は、CTL 及び T h - エピトープを含む長いペプチドが、抗原特異的 T h 細胞を誘起するだけでなく、抗原特異的 CTL も誘起することができることを示した。このようなペプチドはまた、抗原特異的 CTL 応答をも増強することができる。C57/B16 マウスを最小の E1A-誘導 CTL エピトープ (SGPSNTPEI) で免疫すると腫瘍の増殖が増強されるのとは対照的に、アデノウイルス E1A タンパク (RECNSSSTDSCDSGPSNTPEIHPVVRLCPICKP) のこの最小の CTL エピトープを含む、HPLC で精製された 32 アミノ酸長のペプチドで免疫すると、アデノウイルス E1A+RAS トランスフォーム腫瘍細胞による攻撃に対する防御がもたらされた。さらに、最小の 9 アミノ酸長の CTL エピトープ RAHYNIVTF を含む、35 アミノ酸残基長のペプチドで免疫すると、脾細胞の FACS 分析における H-2Db-RAHYNIVTF テトラマー陽性 CD8+T 細胞の存在により示されるように、HPV16 特異的 H-2Db 拘束 CTL が誘起された。注目すべきことに、直接比較において、35-mer のペプチドにより誘起される CTL 応答は、最小の CTL エピトープにより誘起される CTL 応答よりもはるかに強かった。そして、この差は、長いペプチド中のエピトープを最適に取り込み、プロセスし、エピトープを提示することができるプロフェッショナル抗原提示細胞の特異的活性化の後にはより顕著であった。さらに、本発明は、抗原提示細胞の存在下において、前記長いペプチドで CTL を刺激すると、小さな腫瘍結節が根絶された。対照的に、前記最小の CTL エピトープは、全てのマウスにおいて主要を完全に根絶することはできない。

【0014】

このように本発明の長いペプチドをワクチン投与することにより、最小の CTL エピトープペプチドを用いた場合のような寛容の誘起が回避される。本発明の長いペプチドは、より多量の CTL をもたらし、これは一般的により良好な防御を伴う。理論に拘束されないが、これは 2 つの独立したメカニズムの少なくとも 1 つにより説明される。1 つのメカニズムは、T-ヘルパーエピトープと CTL エピトープが 1 つのペプチド中で物理的に結合されることである。もう 1 つのメカニズムは、本発明の長いペプチド中に存在する少なくとも 1 つの CTL-及び/又は T-ヘルパーエピトープが、プロフェッショナル抗原提示細胞によって優先的に提示されることである。本発明のペプチドは、その大きさの故に MHC クラス I に直接結合することができず、外来性の抗原をプロセスして MHC クラス I 中にペプチドを提示することができるプロフェッショナル APC (例えば樹状細胞) によって取り込まれる必要がある。他の細胞は、エピトープをプロセスし、次いで提示する能力はるかに低い。従って、非プロフェッショナル APC によるバックグラウンドの提示は少なくとも部分的に妨げられる。本発明のペプチドが、優先的に APC を標的にする効果

は、本発明の長いペプチドを樹状細胞活性化剤とともに用いることによって高められ、これは好ましい具体例である。もう1つの好ましい具体例では、前記抗原は自己抗原、好ましくは腫瘍細胞特異的自己抗原又はその機能的部分、その誘導体及び／又は類似体を含む。「自己抗原」という語は、そのT細胞が属する動物種によってコードされる抗原を意味する。それはまた、前記動物のタンパク質の異常な発現、修飾、折りたたみ、及び／又は前記動物のタンパク質をコードする細胞のDNA若しくはRNAの配列の変異の結果生じ若しくは発現されるに至った抗原をも意味する。好ましい具体例では、前記自己抗原は、MAGE, CTA又はPSA抗原を包含する。特に好ましい具体例では、前記ペプチドは、前記系において抗原特異的CTL及び／又はTヘルパー細胞の寛容及び／又は機能欠失を誘起する、T細胞エピトープ特異的抗原を含む。

10

【0015】

抗原特異的免疫応答は、アジュバントと共に前記応答を示すことができる系により強化することができることはこの分野において広く知られている。アジュバントはまた、本発明において有用である。好ましい具体例では、前記アジュバントは、エキソソーム(exosome)、樹状細胞、MPL(モノホスホリルリピッドA)、ポリI:C、アンプリゲン(ポリI:ポリC₁₂U)及び／又はCpG核酸を包含する。

【0016】

本発明において、エピトープ結合の利点は、単一のAPCの表面上にMHCクラスI及びクラスII拘束エピトープの両方が同時に提示されるチャンスが増大し、それによって同族のT細胞の助けをCTL初回免疫に到達させることが容易になることである。プロフェッショナル抗原提示細胞による提示が好ましい。なぜなら、これらの細胞は、非プロフェッショナル抗原提示細胞に比較してより効率的に抗原を取り込むことができるからである。さらに、プロフェッショナル抗原提示細胞のみが、抗原の取り込みに応答してTヘルパー細胞を活性化することができる。この活性化は、最適の免疫応答にとって重要である。

20

【0017】

本発明において示されるように、CTL応答のレベルは、樹状細胞の活性化に依存している。我々の長いペプチドHPV16 E7ワクチンの高い有効性をもたらす1つのメカニズムの1つは、天然のHPV16 E7配列が、互いに物理的に結合されたTヘルパー及びCTLエピトープを含んでいることである。プロフェッショナル抗原提示細胞により好ましく提示される、Thエピトープ及びCTLエピトープを含む長いペプチドを得るために、2種又はそれ以上のTヘルパー及びCTLエピトープを結合し、天然には生じない配列を有するかなりの大きさのペプチドをもたらすことができる。これらのTヘルパー及びCTLエピトープは、2つの異なる抗原であって、好ましくは同一の腫瘍細胞又は病原体から誘導された抗原であるが、無関係の抗原であってもよい。本発明において、前記抗原とは無関係のThエピトープを含む本発明の長いペプチドによって、特定の抗原に対するT細胞応答を誘起又は増強することができる。APCは、一般的に前記無関係のThエピトープにより活性化されることができる。しかしながら、好ましくはThエピトープは、前記抗原と関連するものである。

30

【0018】

抗原に特異的なエピトープを含むペプチドを与えることによって抗原特異的応答を誘起及び／又は増強できる多くの系が利用可能である。例えば、末梢血単核細胞の生体外培養物である。他の多くの系が利用可能である。しかしながら、本発明の好ましい具体例では、前記系は動物を含む。より好ましくは、前記動物はヒトを含む。

40

【0019】

本発明の方法は、前記抗原に対する免疫を与えること及び／又は該免疫を高めることに非常に適している。本発明の方法は、他の免疫戦略が用いられるいずれの目的にも適している。免疫は、古くからワクチン投与のため、すなわち疾病の予防のために用いられている。しかしながら、本発明の方法は、疾病の予防に適しているだけではない。方法はまた、現に存する疾病の治療にも用いることができる。もちろん、該疾病は、抗原特異的T細胞

50

免疫を誘起及び／又は増強することにより治療可能なものに限定されるが。この特徴は、例えば、いくつかの癌のような、ウイルス感染に伴う疾病の治療に用いることができる。原則的に、免疫に関連する手法により治療可能ないずれの疾病も本発明の方法により利益を受けることができる。好ましい具体例では、前記動物は、前記免疫応答を誘起及び／又は増強することにより少なくとも部分的に治療可能又は予防可能な疾病を患っているか又は患う危険があるものである。好ましくは、前記疾病は、ウイルス性疾患及び／又は癌を包含する。もう1つの好ましい具体例では、前記疾病は、(マイコ)バクテリア感染を包含する。

【0020】

本発明の他の局面では、抗原に特異的なT細胞エピトープを含む、22～45アミノ酸残基のペプチドが提供される。好ましくは、前記ペプチドは、前記抗原に特異的な少なくとも2つのT細胞エピトープを含む。好ましくは、前記ペプチドは、前記抗原に対するCTLエピトープ又は前記抗原に対するTヘルパー細胞エピトープを含む。特に好ましい具体例では、前記ペプチドは、前記抗原に対するCTLエピトープと前記抗原に対するTヘルパー細胞エピトープを含む。好ましくは、前記抗原に対する前記CTL及び／又はTヘルパーエピトープは、21アミノ酸残基以下のペプチド中に存在する場合には、それぞれCTL及び／又はTヘルパー細胞の寛容又は機能欠失をもたらすものである。好ましい具体例では、前記ペプチドは、22～35アミノ酸残基を含む。さらに好ましくは、前記ペプチドは、32～35アミノ酸残基を含む。

【0021】

本発明はさらに、前記抗原に特異的な免疫応答を誘起及び／又は増強するための本発明のペプチドの用途を提供する。ワクチンの調製のためのペプチドの用途も提供される。好ましくは、HPV関連疾患及び／又は癌の治療及び／又は予防のためのワクチンの調製のためのものである。さらに、医薬の調製のための用途も提供される。好ましくは、ウイルス性疾患及び／又は癌に罹患している又は罹患するリスクがある個体の治療のための医薬である。もう1つの好ましい具体例では、前記個体は、(マイコ)バクテリア性疾患に罹患している又は罹患するリスクがある個体である。

【0022】

本発明のさらにもう1つの局面では、前記系からの抗原特異的T細胞を獲得することを含む方法が提供される。従って、本発明の方法により得ることが可能な単離されたT細胞も提供される。該T細胞は、もちろん、医薬の調製に用いることができる。本発明のペプチドを含むワクチンもまた提供される。本発明のペプチド又はT細胞を含む医薬も提供される。

【0023】

抗原のエピトープを含む本発明のペプチドはまた、細胞集団が抗原特異的T細胞を含むか否かを調べるために用いることもできる。例えば、ある個体が前記抗原に対する免疫を有するか否かを調べることができる。前記T細胞の存在は、好ましくはELISA、ELISPOT、遅延型過敏症応答、細胞内サイトカイン染色及び／又は細胞外サイトカイン染色により測定される。

【0024】

本発明の他の局面では、ヒトパピローマウイルス16型E2、E6及びE7タンパクの免疫原性領域から選択される免疫原性エピトープを含むペプチドが提供される。好ましくは、前記免疫原性領域は、ヒトパピローマウイルス16E2タンパクの、アミノ酸31～120、151～195及び271～365に亘る、E2タンパクの3つの分離した領域(E₂₃₁₋₁₂₀; E₂₁₅₁₋₁₉₅; E₂₂₇₁₋₃₆₅)、HPV16E6タンパクのアミノ酸81～158に亘るHPV16E6のC末端領域(E₆₈₁₋₁₅₈)及びヒトパピローマウイルス16E7タンパクのアミノ酸31～77に亘る、HPV16E7の中央領域(E₇₃₁₋₇₇)を包含する。

【0025】

より好ましくは、前記E2タンパク中の前記免疫原性領域は、アミノ酸46～75に亘る

領域、アミノ酸 51～70 に亘る領域、アミノ酸 61～76 に亘る領域、アミノ酸 316～330 に亘る領域、アミノ酸 311～325 に亘る領域、アミノ酸 346～355 に亘る領域及びアミノ酸 351～365 に亘る領域を包含する。さらに、前記 E6 タンパク中の前記免疫原性領域は、アミノ酸 121～142 に亘る領域及び 127～140 に亘る領域を包含する。さらに、前記 E7 タンパク中の前記免疫原性領域は、アミノ酸 35～50 に亘る領域、アミノ酸 50～62 に亘る領域及び／又はアミノ酸 43～77 に亘る領域を包含する。Tーヘルパー細胞応答は、上記免疫原性領域のいずれかを用いて非常によく誘起及び／又は増強することができる。注目すべきことに、これらの免疫原性領域は、異なる HLA クラス II 分子によって拘束される Tーヘルパー細胞応答を誘起／増強することができる。

10

【0026】

本発明の他の局面では、抗原の最小の T 細胞エピトープを含み、約 22～45 アミノ酸残基のサイズを有するペプチドと T 細胞とを接触させることを含む、抗原に対する T 細胞応答を誘起及び／又は増強する方法が提供される。好ましくは、本発明のペプチドは、約 22～40 アミノ酸残基のサイズを有する。前記最小の T 細胞エピトープは、約 22～40 アミノ酸残基のサイズを有するペプチドの形態で提示されることが好ましい。なぜなら、我々は、最小エピトープで免疫することにより起きる CTL の寛容又は機能欠失の問題は、CTL 及び／又は Tーヘルパー細胞を初回免疫 (prime) することができる長いペプチド (22～45、好ましくは 22～40 アミノ酸残基) を用いることにより回避できることを見出したからである。少なくとも 1 つの最小 T 細胞エピトープを含む前記長いペプチドは、T 細胞応答を誘起及び／又は増強することができる。最小 T 細胞エピトープを含む前記長いペプチドで免疫することにより、該最小エピトープが裸の形態で前記 CTL に投与された場合には、ウイルスー及び腫瘍特異的 CTL の寛容又は機能的欠失をもたらすものである場合であっても、防御がもたらされる。前記最小の T 細胞エピトープは、本発明の免疫原性領域から誘導することができる。従って、1 つの局面において、本発明は、前記最小エピトープが、裸の形態で CTL に投与された場合にウイルスー及び腫瘍特異的 CTL の寛容又は機能的欠失をもたらす最小エピトープである本発明の方法を提供する。

20

【0027】

本発明の他の局面では、抗原の最小の T 細胞エピトープを含み、約 22～45 アミノ酸残基のサイズを有するペプチドと T 細胞とを接触させることを含む、抗原に対する T 細胞応答を誘起及び／又は増強する方法が提供される。前記最小の T 細胞エピトープは、約 22～45、好ましくは約 22～40 アミノ酸残基のサイズを有するペプチドの形態で提示されることが好ましい。なぜなら、我々は、(ウイルスー及び腫瘍特異的) CTL の誘起が、前記長いペプチドでより効率的に誘起され、より多数の抗原特異的 CTL がもたらされることを見出したからである。前記長いペプチドの使用により、含まれる CTL 及び／又は Th エピトープの提示がより効率的に行われる。理論に拘束されないが、長いペプチドは、プロフェッショナル抗原提示細胞によってプロセスされ及び提示される必要があると考えられる。この理論を支持する証拠は、前記長いペプチド及びプロフェッショナル抗原提示細胞ー活性化剤をワクチン投与した後、より効率的な CTL 免疫が誘起されることである。

30

40

【0028】

本発明において、T 細胞をペプチドと接触させることは、好ましくは MHC クラス I 又は MHC クラス II 分子により行われる。該 MHC 分子は、ペプチドをプロセスした後、前記 T 細胞に提示することができる。本発明の抗原は、ウイルス、細菌又は関連する腫瘍細胞から誘導されたものであり得る。好ましくは、抗原は、ヒトパピローマウイルス (HPV) のタンパクを包含する。さらに好ましくは、前記 HPV は、HPV 16 を包含する。最も好ましい局面では、前記タンパクは、HPV 16 E2, E6 及び／又は E7 を包含する。前記長いペプチドは、CTL 及び／又は Tーヘルパー細胞を初回免疫することができる。従って、本発明の 1 つの局面において、前記 T 細胞は、CD8+ CTL を包

50

含する本発明の方法が提供される。あるいは、前記 T 細胞は、C D 4 + T 細胞を包含する。

【0029】

ここで、T 細胞応答を誘起するとは、ある抗原に対する T 細胞応答が誘導されることを意味する。該誘起前には、該 T 細胞応答は存在しなかったか、検出レベル未満であったか又は機能的でなかった。ここで、T 細胞応答を増強するとは、ある抗原に対する T 細胞の総合的な作用が、前記増強前の前記 T 細胞の総合的な作用に比較してより高められ及び／又はより効率化されることを意味する。例えば、前記増強後、前記抗原に対する T 細胞がより多数生成され得る。その結果、追加的に生成された T 細胞の作用が、前記抗原に対する総合的な作用を増大させる。あるいは、前記増強は、前記抗原に対する T 細胞の作用の増大を包含する。前記 T 細胞は、例えば、前記抗原とより強く及び／又はより迅速に反応し得る。もちろん、前記増強の結果は、追加的な T 細胞の生成と前記 T 細胞の作用の増大であってもよい。あるいは、前記増強は、追加的な T 細胞の生成及び前記 T 細胞の作用の増大のいずれかのみを包含し得る。

10

【0030】

ここで、最小の T 細胞エピトープとは、抗原に対する T 細胞応答を誘起することができる、抗原から誘導されるペプチドであると定義される。該最小の T 細胞エピトープは、主要組織適合性分子のクラス I 又は II により結合されるのに適している。典型的には、最小 C T L エピトープは、8 ~ 11 アミノ酸から成る。M H C クラス II 分子により結合される最小の T 細胞エピトープは、好ましくは少なくとも 11 アミノ酸から成る。本発明において、最小エピトープを裸の形態で投与するとは、前記エピトープを、該エピトープのサイズを有するペプチドとして投与するか、又はその一端若しくは両端に追加的な配列を結合して 22 個未満のアミノ酸残基を有するペプチドの形態で投与することを意味する。例えば、前記エピトープには、プロセッシング部位を結合することができる。

20

【0031】

本発明の教示に従い、本発明のペプチドを用いて抗原に対する T 細胞応答を誘起及び／又は増強することが可能である。もちろん、前記ペプチドの実施例はここに記載してある。すなわち、本発明の 1 つの具体例は、少なくとも 1 つの最小 T 細胞エピトープを含み、約 22 ~ 45、好ましくは約 22 ~ 40 のアミノ酸残基のサイズを有するペプチドを提供する。該ペプチドは、最小の C T L エピトープ及び／又は最小の T - ヘルパー細胞エピトープを含む。好ましくは、該ペプチドは、本発明の免疫原性エピトープを包含する。

30

【0032】

最小エピトープでの免疫により C T L の寛容又は機能欠失がもたらされる場合には、本発明のペプチドは、裸の形態の最小エピトープよりもワクチン投与の目的により適している。従って、1 つの局面において、本発明は、前記最小 C T L エピトープが、裸の形態で C T L に投与された場合にウィルスー及び腫瘍特異的 C T L の寛容又は機能的欠失をもたらす最小エピトープである本発明の方法を提供する。本発明のペプチドは、好ましくは約 22 ~ 45 アミノ酸残基のサイズを有する。好ましくは、本発明のペプチドは 22 ~ 35 アミノ酸残基のサイズを有する。さらに好ましくは、本発明のペプチドは 32 アミノ酸残基のサイズを有する。他の局面において、本発明のペプチドは、35 アミノ酸残基のサイズを有する。

40

【0033】

本発明のペプチドで免疫することにより C T L の数が増えるのであれば、本発明のペプチドは、裸の形態の最小エピトープよりもワクチン投与の目的により適している。これは、提示がプロフェッショナル抗原提示細胞により主として起きることを確保することにより達成することができる。従って、本発明の 1 つの局面において、前記ペプチドが、最小 C T L エピトープを投与した場合よりもウィルスー及び／又は腫瘍特異的 C T L の数が増加する本発明の方法を提供する。本発明のペプチドの他の局面では、(小さな) 腫瘍結節を根絶することができる活発な C T L 応答がもたらされる。現在、ペプチドを生成する多くの方法が知られている。生成されたペプチドが最小 T 細胞エピトープを含む限り、本発明

50

は、生成されたペプチドのいずれの形態にも限定されない。例えば、本発明のペプチドは、生体外での合成により、又は例えばこれをコードする核酸を介して細胞により合成されたE2、E6又はE7タンパクから得ることができる。本発明のペプチドは、単一のペプチドとして、又は融合タンパクに組み込まれた形態で存在することができる。1つの具体例では、前記ペプチドにプロセッシング部位を結合して、細胞の表面上のMHC分子への輸送及び／又は取り込みを行わせる。好ましい具体例では、本発明のペプチドは、プロセッシング後、MHCクラスII分子と複合化することができる。腫瘍細胞はしばしばMHCクラスII分子を発現していないが、MHCクラスII拘束T細胞免疫は、現在、例えば腫瘍細胞の根絶に重要であると考えられている。本発明のペプチドは、MHCクラスI及びMHCクラスII依存性T細胞の両者を誘導し、結城氏及び／又は刺激するのに特に適している。従って、本発明の1つの局面では、抗原に対するT細胞応答を誘起及び／又は増強する本発明のペプチドの用途が提供される。本発明のペプチドを個体に投与することを含む、個体中の免疫応答を誘起及び／又は増強する方法もまた提供される。他の局面において、本発明は、本発明のペプチドのワクチン調製のための用途を提供する。好ましくは、前記ワクチンは、少なくとも部分的に、HPV関連疾患の予防のためのワクチンを包含する。

【0034】

例えば、HPV E2及びE6タンパクに対する反応性T細胞は、健常個体中に見出されている。このことは、HPV16 E2及びE6タンパク中の同定された免疫原性領域が、ワクチン投与及び／又は養子免疫治療的手法に基づく予防的抗癌処置に関連するエピトープを包含することを示している。さらに、HPV E7及びHPV E6タンパクに対する反応性T細胞が、CIN III病巣を有する及び子宮頸癌を有する被検者中に見出されている。このことは、HPV16 E7及びHPV E6タンパクの同定された免疫原性領域が、ワクチン投与及び／又は養子免疫治療的手法に基づく抗癌治療に関連するエピトープを包含することを示している。本発明のペプチドは、HPV特異的T細胞の生成及び／又は誘起に適している。従って、本発明の1つの局面において、未利用(naive)のT細胞集団を本発明のペプチドと接触させ、該T細胞集団の少なくとも一部を培養することを含む、ヒトパピローマウイルス16特異的T細胞の生成方法が提供される。本発明の他の局面において、ヒトパピローマウイルス16に感染した被検者のT細胞集団を本発明のペプチドと接触させ、該T細胞集団の少なくとも一部を培養することを含む、ヒトパピローマウイルス16特異的記憶T細胞による、抗原特異的サイトカイン(例えばIL-2やIFN γ のような)産生を誘起する方法が提供される。これらの局面の好ましい具体例においては、前記ヒトパピローマウイルス16特異的T細胞は単離される。

【0035】

さらにもう1つの局面において、本発明の方法によりT細胞を誘起及び／又は増強し、抗原に対する形成されたT細胞を回収することを含む、抗原に対するT細胞を得ることをさらに含む本発明の方法が提供される。もちろん、本発明の方法により得ることができる単離されたT細胞もここに提供される。該T細胞は多くの方法で使用することができ、例えば、診断アッセイにおいて本発明のエピトープを検出するために用いることができる。もっとも、好ましくは、前記T細胞は、免疫治療的手法に用いられる。このような手法は、HPV-16により誘起された子宮頸癌又は病巣を患う被検者に該T細胞を注入する手法を包含するがこれに限定されるものではない。このように、本発明の1つの局面において、HPV関連疾患の少なくとも部分的な治療のための本発明のT細胞の用途を提供する。このような手法において、前記T細胞と前記被検者は組織適合していることが好ましい。もっとも、これは必ずしも正しくないかもしれない。ある場合には、組織適合性が不一致の場合に、該被検者中での前記T細胞の機能が増強されることさえある。宿主対移植片疾患の発達は、該被検者に投与された移植片中に、本発明のエピトープに拘束されないT細胞が存在しないことを確保することによりしばしば制限することができる。もちろん、注入された本発明のT細胞を排除する結果となる宿主対移植片応答は起き得る。このような応答を制限するために、組織適合していることが好ましい。もっとも、腫瘍細胞の根絶が

極めて迅速な場合には、宿主を介する移植細胞の除去は、免疫治療の更なる安全特徴として利点であり得る。従って、1つの具体例では、本発明は、個体に本発明のペプチド又は本発明のT細胞を投与することを含む、個体におけるHPV16 E2, E6及び／又はE7タンパク特異的免疫応答を誘起及び／又は増強する方法を提供する。本発明のペプチドは、個体中でHPV16特異的免疫応答を誘起するために特に適している。これらの免疫応答は、HPV16による感染に対する防御を被検者に与えるのに十分に強い。もっとも、本発明のペプチド又はT細胞は、被検者中に既に存在する感染症との闘いを助けるために用いることもできる。従って、本発明のもう1つの具体例は、本発明のペプチド又はT細胞の、医薬の製造のための用途を提供する。好ましくは、前記医薬はHPV関連疾患のための医薬を包含する。もちろん、本発明のペプチドを含むワクチン及び／又は医薬もまたここに提供される。前記ワクチンは、HPV関連疾患の予防に特に適している。従って、本発明はまた、本発明のワクチンを個体に投与することを含む、少なくとも部分的にHPV関連疾患を予防するための方法をも提供する。本発明の医薬はもちろん、HPV関連疾患の治療のために特に適している。従って、本発明の医薬を個体に投与することを含む、HPV関連疾患を少なくとも部分的に治療する方法もここに提供される。もう1つの本発明の局面において、エピトープを含む本発明のペプチドをT細胞の集団に与え、抗原特異的サイトカイン（例えばIL-2やIFN γ のような）に特異的な抗体の存在下で前記T細胞集団を培養し、あらゆる結合された抗原特異的サイトカインを検出することを含む、T細胞集団中に前記エピトープに特異的な記憶T細胞が含まれるか否かを決定する方法が提供される。1つの具体例では、前記抗体は固相、好ましくは固相表面に結合される。この方法は、個体が、ある抗原、例えばHPVタンパクに対するT細胞応答を有するか否かを決定するためにきわめて有用である。該方法は、HPV感染の診断に用いることができる。あるいは、前記方法は、個体にワクチン投与した後に、T細胞応答が誘起されたか否かを決定するために適している。好ましくは、前記個体は、本発明のワクチンを与えられる。このように本発明の1つの具体例は、抗原に対するT細胞の存在を調べるための、本発明のペプチドの用途を提供する。1つの具体例において、前記T細胞の前記存在は、試料中で調べられる。例えば、個体からの血液試料を得ることができる。その後、本発明のペプチドを用いた免疫測定により、特定の抗原に対するT細胞の存在を調べることができる。例えば、前記した方法を用いることができる。この方法では、結合された抗原特異的サイトカイン（例えばIL-2やIFN γ のような）が検出されれば、前記T細胞の存在が示されている。もちろん、当業者は、本発明のペプチドを用いてある抗原に対するT細胞を検出するための多くの技術を考えることができる。例えば、ELISA、ELISPOT、遅延型過敏症（DTH）応答、細胞内サイトカイン染色及び細胞外サイトカイン染色又は前記ペプチドを含むテトラメリックMHCクラスII分子の使用は、当業者によって知られる重要な技術である。

【0036】

本発明を、以下の例示的实施例を用いてさらに説明する。

【0037】

【実施例】

実施例 1

材料及び方法

被検者及び対照

臍帯血単核細胞（CBC）を、インフルエンザマトリックス特異的応答のための免疫学的に未利用の対照として用いた。インフォームドコンセント後に得られた、HLA型分類され、匿名の健常人血液銀行ドナー（D）からのPBMCを、HPV16 E7及びインフルエンザマトリックス特異的応答の対照PBMCとして用いた。これらのドナーは、匿名であるので、追加的なデータは入手できない。しかしながら、異常なパピローマウイルス塗沫（pap-smear）を包含する、最近の感染履歴が知られているドナーは、通常の規制の一部として、献血を思いとどまらされる。CIN又は子宮頸癌を有する被検者（S, 表1）の研究は、この論文において、HPV16感染子宮頸癌病巣に対する細胞性免

10

20

30

40

50

疫を研究した「サークル研究 (C I R C L E s t u d y)」に記載されている。ライデン大学医学センター (L U M C) の婦人科において、組織学的に照明された C I N I I I 又は子宮頸癌を呈している婦人を、インフォームド Consent 後、この研究に利用させてもらった。研究計画は、L U M C の倫理委員会で承認された。治療の日に採血した。C I N I I I を有する被検者を、L E E P 又は冷ナイフ円錐切除で処置した。I B - I I A の段階にある場合には、根治的な子宮摘出を行った。十分な P B M C が得られた全ての個体について、H L A M H C クラス I I の分類を行った (N a i p a l e t a l . , 1984)。バイオプシー又は外科的切除標本のパラフィン埋め込み切片から単離された DNA 上で H P V 16 特異的プライマーを用いて H P V 16 の分類を行った (C l a a s e t a l . , 1989)。H P V 特異的 T - ヘルパー応答は、進行性疾患を患っている被検者中に検出されると予測されたので (d e G r u i j l e t a l . , 1998)、我々は、C I N I I I を呈する 3 名の被検者、子宮頸癌の段階 I B を呈する 4 名の被検者及び再発性子宮頸癌を呈する 4 名の被検者を選んだ。

【0038】

抗原

第 1 番目と最後のアミノ酸で示される、E 7 タンパク上に亘る、9 個の重複する 22 - m e r のペプチド (1 - 22 , 11 - 32 , 21 - 42 , 31 - 52 , 41 - 62 , 51 - 72 , 61 - 82 , 71 - 92 及び 77 - 98) 又はアミノ酸 1 - 35 , 22 - 56 , 43 - 77 及び 64 - 98 で規定される 4 個の長いペプチドを用いた。E L I S P O T アッセイにおいて対照ペプチドとして用いた、インフルエンザマトリックス 1 タンパク A / P R / 8 / 43 上に亘るペプチドは、15 アミノ酸重なる 16 個の 30 - m e r ペプチドであった。ペプチドは、以前に記載した (v a n d e r B u r g e t a l . , 1999) 通りに合成し、溶解した。

【0039】

組換え H P V 16 - E 7 タンパク、H P V 16 - E 6 タンパク及び H I V - 1 R T タンパク (後二者のタンパクは、増殖アッセイにおける対照タンパクとして用いた) は、P e t - 19 b - H P V 16 - E 7 , P e t - 19 b - H P V 16 - E 6 (D e B r u i j n e t a l . , 1998) で形質転換された組換え大腸菌中で生産されたタンパク、又は P e t - 19 b - H I V - 1 逆転写酵素 (R T) であり、以前に記載したとおりに精製した (v a n d e r B u r g e t a l . , 1999)。

【0040】

記憶応答混合物 (M R M) : 破傷風トキソイド (1 L F / m l ; N a t i o n a l I n s t i t u t e o f P u b l i c H e a l t h a n d t h e E n v i r o n m e n t , オランダ国 B i l t h o v e n) 及び M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s の超音波破碎物 (2.5 μ g / m l ; オランダ国 R o y a l T r o p i c a l I n s t i t u t e の P . K l a t s e r 博士が気前よく分与) を、典型的な普遍的 (r e c a l l) 抗原に応答して P B M C が増殖する能力を制御するために用いた。

【0041】

H L A - D R 抗原結合アッセイ

ペプチドの結合は、以前に報告したとおりに測定した (v a n d e r B u r g e t a l . , 1999)。短く述べると、H L A - D R 分子の供給源として、H L A - D R がホモ接合である、B - リンパ芽球性セルラインを用いた : L G 2.1 (D R B * 0101 , D R 1) , I W B (D R B 1 * 0201 , D R 2) , H A R (D R B * 0301 , D R 3) , B S M (D R B * 0401 , D R 4) 及び P i t o u t (D R B 1 * 0701 , D R 7)。D R 分子は、アフィニティクロマトグラフィーで精製し、純度は S D S - P A G E で確認した。精製 H L R - D R 分子へのペプチドの結合の解析は、N 末端を蛍光標識した標準ペプチドを用いて行った。結合アッセイにおける標準蛍光ペプチドとして、H A 308 - 319 (P K Y V K Q N T L K L A T , D R 1 及び D R 2) , h s p 65 3 - 13 (K T I A Y D E E A R R , D R 3) , H A 308 - 319 Y ? F (P K F V K Q N T L K L A T , D R 4) 又は I i 80 - 103 (L P K P

PKPVSKMRMATPLLMQA LPM, DR7)を用いた。

【0042】

免疫原性アッセイ

HPV16-E7から誘導されたペプチドにより誘起される、健常ドナーから得られた血液から単離されたPBMCの増殖を以前に記載した通りに測定した(vander Burg et al., 1999)。短く述べると、96ウェルU底プレート(Costar, マサチューセッツ州Cambridge)に収容した、10%自己血清が添加され、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の前記22-merのE7ペプチドを含む又は含まない $200\mu\text{L}$ のISO-COVEの培地(Gibco)中にPBMCを 1.5×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。陽性コントロールとして、記憶応答混合物の存在下でPBMCを培養した。ペプチド特異的増殖は、トリチウム-チミジン取り込みにより第6日に測定した。8つの試験ウェルの>25%において、培地対照ウェルの平均増殖+2x標準偏差を超える場合に、そのペプチドが免疫原性を有する、すなわち、T細胞を刺激することができると記録した。

10

【0043】

増殖アッセイ

培養物を、ウェル当たり $0.5\mu\text{Ci}$ [^3H]チミジン($5\text{Ci}/\text{mM}$, 英国Amersham)で18時間パルス(pulse)した。プレートを、Microcell Harvester(Skatron, ノルウェー国)で回収した。 10mL のシンチレーション液を含むプラスチックバッグにフィルターを入れ、次いで1205 Betaplateカウンター(Wallac, Turku, フィンランド国)でカウントした。MHCクラスIIブロッキング実験は、抗HLA-DQSPV.L3, 抗HLA-DRB8.11.2及び抗HLA-DPB7/21マウスモノクローナル抗体を用いて以前に記載したとおりに行った(vander Burg et al., 1999)。抗体は、タンパク-APCインキュベーションの1時間前にAPCに添加した。

20

【0044】

HPV16-E7特異的Tヘルパー細胞の単離及び増殖

E7 22-mer又はE7 35-merペプチドを用いて、以前に記載した通り(vander Burg et al., 1999)にペプチド特異的T細胞バルク培養物を生成した。特異的増殖は、50,000個の応答物(responders)を等量の放射(30Gy)APC(特に断りがない限り自己PBMC)及び上記ペプチド又はタンパクと共にインキュベートすることにより測定した。E7-ペプチド及びタンパク特異的バルクT細胞は、以前に記載したとおりに(vander Burg et al., 1999)限界希釈によりクローニングした。

30

【0045】

サイトカインアッセイ

サイトカインの特異的排出を測定するために、50,000個のT細胞を、等量のAPC(30Gy)と $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の上記ペプチド、対照ペプチド、E7タンパク質又は対照タンパクと共にインキュベートすることによりT細胞クローンを刺激した。インキュベーション24時間後、上清を回収し、レプリケートウェルをプールした。サイトカインの産生は、以前に記載したとおりに(vander Burg et al., 1999)酵素結合免疫測定法(ELISA)により測定した。

40

【0046】

ELISPOTによる抗原特異的T細胞の解析

24ウェルプレート(Costar, マサチューセッツ州Cambridge)に収容した、10%FCSが添加され、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のE7から誘導された前記22-merのペプチドを含む又は含まない 1ml のISO-COVEの培地(Gibco)中にPBMC又は臍帯血細胞(CBC)を 2×10^6 細胞/ウェルの密度で播種した。陽性対照として、各プール中、4つの重なる30アミノ酸長のペプチドから成る、インフルエンザA/P R/8/34 M1タンパクの上記プールの存在下でPBMCを培養した。我々の観察に

50

基づき、我々は、PBMCをELISPOTプレートに移す前に4日間の刺激を行った。これにより、T細胞のCD45RO+（記憶）サブセット中での、インフルエンザM1誘導ペプチドに対する明確なIFN γ の産生がもたらされたが、成人PBMCから得られた未利用のT細胞中では産生されなかった（発行していない観察）。37℃で4日間インキュベートした後、PBMCを回収し、洗浄し、IFN γ 捕獲抗体（Mabtech AB, スウェーデン国Nacha）を被覆したMultiscreen 96-ウェルプレート（Millipore, オランダ国Etten-Leur）に 10^5 細胞/ウェルの密度で、6個のレプリケートを構成するように播種した。ELISPOTを、製造者（Mabtech）の指示に従ってさらに行った。スポットの数は、コンピューター制御の完全自動化ビデオイメージング分析システム（Carl Zeiss Vision）を用いて分析した。特異的スポットは、試験ウェルの平均スポット数から、培地のみの対照のスポット数+2x標準偏差を差し引くことにより算出した。抗原特異的T細胞頻度は、T細胞頻度が $>1/10$, 000 PBMCである場合に非応答物に比較して増加したと考えた。

10

【0047】

結果

HPV16 E7中の免疫原性配列の同定

我々は、MHCクラスII内で主要な免疫原性決定基として機能する、HPV16 E7タンパク中の配列を同定することに取り掛かった。HPV16 E7から誘導された、重なるペプチドの定量的ペプチド/MHC結合アッセイ（Geluk et al., 1995）におけるHLA-DR 1, 2, 3, 4及び7に対する結合性を試験した。これらのHLA-DR分子は合計で白人、東洋人及び黒人の少なくとも50~60%をカバーする（Baur et al., 1984）。4つのペプチドE7₁₋₂₂, E7₄₁₋₆₂, E7₅₁₋₇₂及びE7₇₇₋₉₈は、3種以上の異なるHLA-DR分子に結合した（表2）。ペプチドE7₁₋₂₂は、HLA DR 2, 3, 4及び7に結合し、ペプチドE7₄₁₋₆₂は、DR 1, 2, 3及び4に結合したが、ペプチドE7₅₁₋₇₂はDR 1, 3及び7に結合し、ペプチドE7₇₇₋₉₈はDR 1, 2及びDR 7に結合した。これは、MHCクラスII分子に対するペプチドの結合拘束性は、MHCクラスIIに対するほど厳格ではないという事実（Rammensee et al., 1995）に符合する。注目すべきことに、これらのペプチドは、試験した1又は2以上の他のDR分子に結合できなかった。これは、それらの結合が、かなり普遍的ではあるが特異的であることを示している。

20

30

【0048】

我々の次の実験は、複数のHLA-DR分子に結合する4つのペプチドに焦点を合わせた。なぜなら、これらが最も天然に提示されたTヘルパー（Th）エピトープ（Geluk et al., 1998）を含んでいそうであるからである。我々は、13名のHLA分類した健常人ドナーからのPBMCにこれらのペプチドを加えることにより、T細胞を刺激して増殖させることができるか否かを調べた。このアッセイでは、記憶T細胞と未利用の生体外で初回免疫されたT細胞の反応性を識別することができないが、免疫原性ペプチドの同定に容易に用いることができる（van der Burg et al., 1999）。4つのペプチドのいずれも、複数のドナーからのPBMCにおいて増殖的応答を刺激することができた（表2）。ほとんどのPBMC培養物は、ペプチドE7₄₁₋₆₂及びE7₅₁₋₇₂と反応した。このことは、E7タンパクの中央領域に最も免疫原性の高い配列が存在し、この部分がHPV16感染個体中での免疫系により標的にされやすいことを示している。

40

【0049】

【表1】

表 1 被検者特性

患者番号	年齢	HPV 型	MHC クラスII 型	疾患の段階
1	38	16	HLA DR4, 11(5); DQ3	CIN III
2	41	16	HLA DR15(2), 3; DQ6(1), 2	CIN III
3	32	16	HLA DR15(2), 4; DQ3, 6	CIN III
4	67	16	HLA DR15(2), 4; DQ6(1), 8(3)	FIGO IB
5	59	16	HLA DR11(5); DQ3	FIGO IB
6	36	16	Non-Available	FIGO IB
7	28	16	HLA DR1, 7; DQ5(1), 2	FIGO IB
8	48	16	HLA DR15(2), 7; DQ6(1)	再発子宮頸癌
9	46	16	HLA DR15(2), 7; DQ6(1), 2	再発子宮頸癌
10	47	16	HLA DR6, 7; DQ1, 2	再発子宮頸癌
11	46	16	HLA DR3, DQ2	再発子宮頸癌

【 0 0 5 0 】

【 表 2 】

表 2 HPV16-E7誘導 ペプチドの結合能及び免疫原性

E7 アミノ酸	結 合					免疫原性												
	DR1	DR2	DR3	DR4	DR7	D #1 DR1,3 DQ1,2	D #2 DR1,4 DQ5,8	D #3 DR2,4 DQ6,8	D #4 DR3,6 DQ6,2	D #5 DR2,3 DQ1,2	D #6 DR2,3 DQ6,2	D #7 DR1,3 DQ5,2	D #8 DR2,13 DQ6	D #9 DR4,7 DQ3	D #10 DR1,3 DQ5,2	D #11 DR7 DQ2	D #12 DR3,13 DQ6,2	D #13 DR7,13 DQ6,3
1-22 ^a	>70 ^b	10	0.8	30	7	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
11-32	>70	>70	50	>70	>70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-42	>70	12	>70	>70	>70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31-52	>70	>70	>70	>70	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-62	7.4	50	55	38	>70	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
51-72	70	>70	50	>70	11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
61-82	>70	15	65	>70	>70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71-92	12	2	>70	>70	>70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
77-98	46	22	>70	>70	0.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
記憶応答混合物																		

- a HPV16-E7タンパクから誘導された、22-merの重なっているペプチドの第1番目及び最後のアミノ酸番号
- b 各ペプチドの結合能は、IC50値で表す。これは、標準蛍光標識ペプチドの最大の結合能の50%が阻害される被検ペプチドの濃度(μM)を示す。>70は検出できない結合を示す。
- c HLA-DR及び-DQ型の健康血液ドナー(D)からの新鮮なPBMCを、≥3の異なるHLA-精製DR分子に結合したペプチドで刺激した。ドナーは、培地のみを含むコントロールの平均+2x標準偏差を超えるウェルが、試験した全ウェルの>25%であった場合にペプチドと特異的に反応したと考えた。記憶応答混合物で刺激した全てのウェルのうち85%を超えるものが陽性であることがわかった。

【 0 0 5 1 】

【 表 3 】

表3 IFN γ ELISPOT による HPV16 E7-特異的細胞応答の評価

	CBC #1	CBC #2	CBC #3	D #20	D #21	D #22	D #23	D #24	D #25	D #26	S #1	S #2	S #3	S #4	S #5	S #6	S #7	S #8	S #9	S #10	S #11
HLA-DR	NA	NA	NA	3 ^b	15 (2)	1	2	4	1	11 (5)	4	15 (2)	15 (2)	15 (2)	11 (5)	NA	1	15 (2)	15 (2)	6	3
HLA-DQ	NA	NA	NA	13 (6)	13 (6)	4		8		7	11 (6)	3	4	4			7	13 (6)	7	7	
E7				1, 2	6 (1)	3, 5	1	4, 8	5	NA	3	6 (1), 2	6 (1), 3	6 (1), 3	3	NA	5 (1), 2	6 (1)	6 (1), 2	1, 2	2
1-22 ^a				<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1	<1	<1	<1	<1	<1
11-32				<1	1	<1	15	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	8
21-42				<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	1	<1	<1	2
31-52				<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	8	<1	<1	<1	<1	<1	23	<1	<1	14
41-62				<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	14	<1	<1	<1	<1	<1	19	<1	<1	5
51-72				<1	<1	4	<1	<1	<1	1	32	76	<1	<1	98	<1	<1	<1	<1	<1	<1
61-82				<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	13
71-92				<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
77-98				<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	12	<1	<1	6	<1	<1	6
M1																					
プール1	<1 ^c	<1	<1	8	9	46	<1	7	5	13	<1	<1	27	<1	<1	1	113	<1	<1	<1	15
プール2	<1	<1	<1	12	36	41	<1	28	<1	65	8	<1	29	47	2	8	66	11	<1	<1	19
プール3	<1	<1	<1	<1	47	42	<1	<1	9	17	92	6	<1	59	100	<1	41	39	<1	<1	20
プール4	<1	<1	<1	<1	47	38	27	<1	15	2	<1	22	15	<1	10	<1	34	17	<1	<1	28

a 臍帯血液細胞 (CBC)、ドナー (D) からの PBMC 又は HPV16+ 被検者 (S) からの PBMC の T 細胞を刺激するために用いた HPV16-E7 タンパクから誘導された、22 アミノ酸長の第 1 番目及び最後の アミノ酸番号。インフルエンザ M1 タンパクの場合には、プールの番号のみを示す。各プールは、15 個重なる、4 つの 30 アミノ酸長のペプチドから成る。

b 個人の HLA クラス II 型判別。NA は利用不可。

c 臍帯血液細胞又は PBMC 100,000 細胞当りの抗原特異細胞の数。頻度 $\geq 1/10,000$ のものは、太字で示す。下線を引いたものは、図 1、2、3 にも記載した Th クローンの特異性に匹敵するものを示す。

【0052】

HPV16 E7 中の、自然にプロセスされた T-ヘルパーエピトープのマッピング
 HPV16 E7 中の Th エピトープを同定する次の段階として、E7 の中央領域をカバーする数種類の長いペプチドで、HLA 分類した健常血液ドナーからの PBMC を繰り返し刺激することにより、ペプチド特異的バルク T 細胞培養物を生成した。応答 T 細胞は、

次いで、ペプチド又は全E7タンパクでパルス (pulse) した抗原提示細胞 (APC) を認識するかどうかについて試験した。後者のセッティングでは、関連するペプチドエピトープの提示には、抗原の取り込み及びプロセッシングが必要である。生成したTh細胞培養物の約30%が、それらの誘導に用いたペプチドに対して特異的に応答した。これらのうち、3つの培養物はまた、E7タンパクでパルスしたAPCに対してわずかだが特異的な活性を示した。このことは、自然にプロセスされた抗原に対して応答する能力を有するTh細胞の存在を示している (図1a, 2a及び3a)。図1bは、ペプチドE7₄₁₋₆₂ 10 に対して誘導された、HLA-DR15, 4及びDQ6, 7陽性PBMCから単離されたThクローンの反応性を示す。これらのTh細胞は、ペプチドE7₄₁₋₆₂、ペプチドE7₄₃₋₇₇ 又はE7タンパクでパルスされたAPCに特異的に応答した。このThクローンによる応答の特異性は、このThクローンが単離されたポリクローナル培養物の特異性を超えており (図1aと比較して)、このことは、限界希釈により我々が目的のT細胞を単離することに成功したことを示している。HLA-DR, -DQ 又は-DP (図1b) に対するMHCクラスIIブロッキング抗体及び部分的MHCクラスII合致APCを用いたさらなる研究により、該ThクローンがHLA-DR15に拘束されたことが分った (図1c)。詳細なエピトープのマッピングにより、認識されたコア配列は、E7₅₀₋₆₂であった。さらに、このThクローンは、1型ThサイトカインIFN γ を産生した (図1d)。同様に、HPV16 E7特異的Thクローンは、ペプチドE7₂₂₋₅₆で刺激したHLA-DR3, DQ2陽性PBMCから得られた (図2a)。また、このThクローンは、ペプチドE7₂₂₋₅₆ 及びE7タンパクでパルス 20 したAPCでトリガー (trigger) することによりIFN γ を分泌した。さらなる分析により、ペプチドE7₃₀₋₅₀ 及びE7₃₅₋₅₅ の両方が、HLA-DQ2拘束的に認識されたことから示されるように、このThクローンは、コア配列E7₃₅₋₅₀を認識した (図2c)。明確な特異性を有する第3の1型サイトカイン産生Thクローンは、ペプチドE7₄₃₋₇₇で刺激されたHLA-DR1, 3及びDQ2陽性PBMC培養物から誘導された (図3ab)。このクローンは、HLA-DR3拘束性 (図3cd) で、ペプチド及びタンパクでパルスされたAPCの両者を認識するとIFN γ を産生した (図3e)。ペプチドE7₄₃₋₇₇は認識されたが、より小さなペプチドE7₄₁₋₆₂は認識されなかった。このことは、E7₄₃₋₇₇のC末端領域がコアエピトープを有していることを示している。結論的に、確立されたThクローンを用いて、我々は、H 30 PV16 E7中の自然にプロセスされた3つのエピトープをマップした。関連するMHCクラスII分子を生体内で発現するHPV16+の個体は、これらのペプチドに対するTh免疫を誘導したものである。

【0053】

HPV16+ CIN III病巣又は子宮頸癌を有する被検者中の記憶Tヘルパー応答健常人のPBMC培養物を用いたThエピトープのマッピングと並行した手法として、HPV16+病巣を有する被検者中のHPV16 E7に対する応答も解析した (被検者の特徴については表1参照)。本来、生体外では、新生児又は成人からの未利用のT細胞の刺激は、IL-2の生産及びT細胞の増殖をもたらし得る。しかしながら、この段階では、このようなT細胞は、IFN γ を分泌できない。IFN γ の生産は、再び抗原に出会った後に続く (Early and Reen, 1999; Pittet et al., 1999; Salusto et al., 1999)。この特徴に基づき、我々は、生体外での初回免疫と、ELISPOTによる記憶T細胞応答との区別をすることができた。種々のHLAのほとんどのドナーのPBMC中に容易に検出可能な (表3及び我々の発行していない観察)、インフルエンザAマトリックス (M1) タンパクに対するTh応答は、アッセイにおける記憶T細胞免疫性の検出のための陽性対照として並行して測定した。MACS-分離CD45RA+ (未利用) T細胞及びCD45RO+ (記憶) T細胞のM1ペプチドによる刺激は、CD45RO+サブセット中においてのみIFN γ の生産をもたらした。このことにより、我々のELISPOTセットアップが記憶応答を特異的に検出することが確認された (図4)。さらに、臍帯血細胞 (CBC) は、その未利用の 50

形質に従い、インフルエンザM1誘導ペプチドで生体外で刺激した際に、IFN γ の分泌による応答を示さなかった。全ての健常ドナーからのPBMCに加え、9/11のHPV16+被検者からのPBMCもM1ペプチドの1又は2以上のプールと反応した(表3)。

【0054】

HPV16 E7免疫の解析により、CIN IIIと診断された被検者の2/3、子宮頸癌の被検者の3/8では、1又は2以上のペプチドに応答することが明らかになった。さらに、試験した7人のドナーの1人は、ペプチドに対する免疫性を示した。E7₃₁₋₅₂、E7₄₁₋₆₂及びE7₅₁₋₇₂によってカバーされるHPV16 E7の中央領域は、全ての5名のHPV16+個体の免疫系に標的にされていた(表3)。このことにより、この領域が非常に免疫原性が高い(表2)ということが確認されただけではなく、HPV16に対する天然の免疫応答によって標的にされるエピトープをこの領域が有するということも示された。興味深いことに、3名のHPV16+被検者において検出されたIFN γ の特異性は、それらのHLA型と組み合わせ、我々が特異性及びHLA拘束性を詳細に調べた、確立されたThクローンの特異性と合致していた(図1~3)。特に(表3、下線を引いた頻度)、被検者2は2つのHLA-DRに拘束された特異性に合致する、有意に増大された免疫性及びHLA-DQ2/E7₃₅₋₅₀クローンに合致する弱い免疫性を示した。被検者8は、DR15/E7₅₀₋₆₂クローンに合致する応答を示し、被検者11はHLA-DQ2/E7₃₅₋₅₀に合致する反応性を示した。なお、関連するMHCクラスIIを発現する他の被検者では、このような応答は検出されなかった(被検者3、4、7及び10)。

10

20

【0055】

実施例2

材料及び方法

リンパ球

HLA型分類され匿名の健常人からの末梢血単核細胞(PBMC)及び血清を、インフォームドコンセント後に得た。これらのドナーは、匿名であるので、医学的な履歴に関するデータは入手できない。しかしながら、異常なパピロウイルス塗沫(pap smear)を包含する、最近の感染履歴が知られているドナーは、通常の規制の一部として、献血を思いとどまらされる。

30

【0056】

抗原

全HPV16 E2タンパクに亘る、23種類の重なり合うペプチドのセットを用いた。これらのうち22種類の長さは30アミノ酸であり、1種類(E2₃₃₁₋₃₆₅)のもの長さは35アミノ酸であった。これらのペプチドは、15アミノ酸の重複を共有する。HPV16-E2特異的Thクローンの詳細なエピトープマッピング及び交差反応性の測定のために、15及び20アミノ酸長のペプチドを用いた。ELISPOTアッセイにおける対照ペプチドとして用いたインフルエンザマトリックス1タンパクであるA/PR/8/34に亘るペプチドは、15アミノ酸ずつ重複する、16種類の30-merのアミノ酸であった。ペプチドは、自動マルチプルペプチド合成機(Abimed AMS 422, ドイツ国Langenfeld)を用いて固相上で合成し、逆相HPLCにより分析した。凍結乾燥したペプチドを50 μ LのDMSOに溶解し、PBSで2.5 mg/mlの終濃度に希釈した。HPV16 E2C末端(E2₂₈₀₋₃₆₅)タンパク及びHPV16 E7タンパクは、以前に記載した方法(Franken et al., 2000)により生産した。

40

【0057】

破傷風トキソイド(終濃度0.75 LF/ml; National Institute of Public Health and the Environment, オランダ国Bilthoven)、Mycobacterium tuberculosisの超音波破碎物(2.5 μ g/ml; オランダ国Amsterdam, Royal Trop

50

ical Institute の P. Klatser 博士が気前よく分与) 及び *Candida albicans* (0.005%, HAL Allergenen Lab, オランダ国 Haarlem) から成る記憶応答混合物 (MRM) を、典型的な普遍的 (recall) 抗原に应答して PBMC が増殖し、サイトカインを産生する能力を確認するために用いた。

【0058】

HLA-DR-ペプチド結合アッセイ

ペプチドの HLA-DR への結合は、以前に報告したとおりに測定した (van der Burg et al., 1999)。短く述べると、DR 分子の供給源として、DR がホモ接合である、B-LCL を用いた: LG2.1 (DRB*0101, DR1), 10
IWB (DRB1*0201, DR2), HAR (DRB*0301, DR3),
及び BSM (DRB*0401, DR4)。DR 分子は、アフィニティクロマトグラフィーで精製し、純度は SDS-PAGE で確認した。精製 DR 分子へのペプチドの結合の解析は、N 末端を蛍光標識した標準ペプチドを用いて行った。結合アッセイにおける標準ペプチドとして、HA₃₀₈₋₃₁₉ (PKYVKQNTLKLAT, DR1 及び DR2)、hsp65₃₋₁₃ (KTIA YDEEAR, DR3) 又は HA₃₀₈₋₃₁₉ Y→F (PKFVKQNTLKLAT) を用いた。

【0059】

短期間 T 細胞増殖アッセイ

個々の HPV16 E2 ペプチドの免疫原性を、先に記載した方法 (van der Burg et al., 1999) に従い、HPV16 E2 ペプチドを用いた健常ドナー PBMC の短期間増殖アッセイにより調べた。短く述べると、96 ウェル U 底プレート (Costar, マサチューセッツ州 Cambridge) に収容した、10% 自己血清 (CBC 培養物には 10% FCS を用いた) が添加された 200 µL の IMDM (Iscove の修飾ダルベッコ培地、Bio Whittaker, ベルギー国 Verviers) に、新しく単離された PBMC を 1.5×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。HPV16-E2 ペプチドを 10 µg/ml の濃度で添加した。培地のみを陰性対照とした。フィトヘマグルチニン (PHA, 0.5 µg/ml) を陽性対照として用いた。各ペプチドについて、8つのマイクロ培養を並行して開始した。各ドナーについて2回ずつ試験を行った。ペプチド特異的増殖は、³H-チミジン取込により、第6日に測定した。30
両方の試験において、>50%の試験ウェルにおける増殖が、対照ウェルにおける平均増殖 + 3 x SD を超えており、全ての試験ウェルにおいて、培地対照のウェルに対する刺激指数 (stimulation index) (SI) が3よりも高い場合に、そのペプチドが陽性であると記録した。

【0060】

長期間 HPV16-E2 特異的 Th 培養物の生成及び解析

長期培養 HPV16 E2 特異的 T 細胞培養物及び Th クローンを、先に記載した方法 (van der Burg et al., 1999) により確立した。短く述べると、HLA 型分類した健常ドナーからの PBMC を、次の HPV16 E2 ペプチドで生体外で刺激した E2₂₇₁₋₃₀₀ + E2₂₈₆₋₃₁₅; E2₃₀₁₋₃₃₀ + E2₃₁₆₋₃₄₅; E2₃₃₁₋₃₆₅。25 cm² の培養フラスコ (Nalge Nunc, 米国) に収容された、10% 自己血清を添加した 6 ml の IMDM に 1.5×10^6 PBMC を播種した。ペプチドを 5 µg/ml の濃度に添加した。第7日に、 1.5×10^6 個の PBMC を、新鮮な培地及びペプチドと共に加えた。第14日及び第21日に、生きた T 細胞を培養物から回収し、計数し、同量の照射された (irradiated) 自己 PBMC 及びペプチド (5 µg/ml) で再刺激した。最終再刺激の2日後に、T 細胞増殖因子 (Biotech, ドイツ国 Dreieich) を 10% の終濃度で添加した。第28日に、増殖アッセイにより、T 細胞培養物のペプチド認識について試験した。ペプチド特異的 T 細胞培養物は、限界希釈によりクローニングし、次いで T 細胞クローンの、E2 ペプチド及びタンパクでパルスされた APC の認識について試験した。Th クローンは、先に 40
50

記載したように解析した (Van der Burg et al., 1999)。注目すべきことに、Th クローンのタンパク認識について試験した増殖アッセイにおいて、自己単球を APC として用いた。増殖の測定のために、培養物を、ウェル当り $0.5 \text{ Ci } [^3\text{H}] \text{ チミジン } (5 \mu\text{Ci}/\text{mM}, \text{ 英国 } \text{Amersham})$ で 18 時間パルス (pulse) した。プレートは、Micro cell Harvester (Skatron、ノルウェー国) で回収した。10 mL のシンチレーション液を含むプラスチックバッグにフィルターを入れ、次いで 1205 Betaplate カウンター (Wallac、フィンランド国 Turku) でカウントした。HLA クラス II ブロッキング実験は、抗-DRB 1.1.2 及び抗-DP B7/21 マウスモノクローナル抗体を用いて行った。増殖アッセイの上清は、インキュベーションの 24 時間後に回収し、ELISA により IFN- γ の存在を調べた (van der Burg et al., 1999)。

【0061】

ELISPOT による記憶 Th 細胞の検出

CD45RO マイクロビーズ (カタログ番号 460-01, Miltenyi Biotec, ドイツ国) と共にインキュベーションした後の MACS によりバフィーコートから記憶細胞 (CD45RO^+) を新たに単離した。得られた CD45RO^+ 分画の純度は、 CD45RO 及び CD45RA (CD45RA-FITC , カatalog番号 347723、 CD45RO-PE , カatalog番号 347967, Becton Dickinson Biosciences, 米国) に対して表面染色を行った後のフローサイトメトリーにより測定したところ $>95\%$ であった。24 ウェルプレート (Costar) 中に収容され、 $10\% \text{ FCS}$ が添加された 1 ml の IMDM 中に、 CD45RO^+ 細胞を 10^6 細胞/ウェルの密度で播種した。 10^6 個の照射された自己細胞を APC として各ウェルに加えた。応答細胞を、培地単独、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ / ペプチドの HPV16 E2 ペプチドのプール、MRM の 1:50 希釈物又はインフルエンザマトリックスペプチド (陽性対照) と共にインキュベートし、抗原特異細胞の検出を改善するために 11 日間培養した (McCutcheon et al., 1997)。次いで、細胞を回収し、洗浄し、IFN- γ 捕捉抗体で被覆した Multiscreen 96 ウェルプレート (Millipore, オランダ国 Etten-Leur) に、 5×10^4 細胞/ウェルの密度で、同じものを 4 つずつ、ウェルに播種した。1 ウェル当り、 10^5 個の照射した自己 PBMC を APC として、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドと共に加えた。ELISPOT 分析を、製造者の指示に従ってさらに行った (Mabtech AB, スウェーデン国 Natcha)。スポットの数は、コンピューター制御の完全自動化ビデオイメージング分析システム (Carl Zeiss Vision) を用いて分析した。

【0062】

記憶 T 細胞の細胞内サイトカイン染色 (ICS)

X-vivo 15 培地 (Bio Whittaker, ベルギー国 Verviers) 中で 37°C で 2 時間培養して 48 ウェル平底プレートに接着させることにより自己単球を単離し、次いで APC として用いた。 CD45RO^+ 細胞を、ペプチドで 11 日間刺激した後、回収し、洗浄し、 $0.1\% \text{ BSA}$ 含有 IMDM 中に 1.5×10^6 細胞/ml の濃度で浮遊させた。 $200 \mu\text{L}$ の細胞浮遊液を、単球 + $200 \mu\text{L}$ の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ HPV16-E2 ペプチド (刺激された) 又は $200 \mu\text{L}$ の培地 (非刺激対照) に加えた。 37°C で 1 時間インキュベートした後、 $800 \mu\text{L}$ の $\text{IMDM} + 10\% \text{ FCS} + 12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (Sigma) を加え、細胞をさらに 5 時間インキュベートした。次いで細胞を回収し、V 底 96 ウェルプレートに移し、氷冷 PBS で 2 回洗浄し、 $50 \mu\text{L}$ の $4\% \text{ パラホルムアルデヒド}$ で氷上で 4 分間固定した。固定後、細胞を冷 PBS で 1 回、 $\text{PBS}/0.2\% \text{ NaAz}/0.5\% \text{ BSA}/0.1\% \text{ サポニン}$ で 1 回洗浄した。次いで、 $50 \mu\text{L}$ の $\text{PBS}/0.2\% \text{ NaAz}/0.5\% \text{ BSA}/0.1\% \text{ サポニン}/10\% \text{ FCS}$ 中で氷上で 10 分間インキュベートした。細胞を $\text{PBS}/0.2\% \text{ NaAz}/0.5\% \text{ BSA}/0.1\% \text{ サポニン}$ で 2 回洗浄し、上清を

除去し、 $1\mu\text{L}$ のFITC-標識マウス抗ヒトIFN- γ (0.5 g/ml , BD Pharmingen, カタログ番号554551)、 $2\mu\text{L}$ のPE-標識抗CD4 (BD Bioscience, カタログ番号345769)、及び $2\mu\text{L}$ のPerCP-標識抗CD8 (BD Bioscience, カタログ番号347314)を含む、 $25\mu\text{L}$ のPBS/0.2% NaAz / 0.5% BSA / 0.1% サポニンを添加した。 4°C で30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、 $100\mu\text{L}$ のパラホルムアルデヒド中に浮遊させ、フローサイトメトリーで分析した。

【0063】

タンパクデータベース上での相同性検索

標準的なBasic Local Alignment Tool (BLAST: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)を用いて、タンパクデータベース (SwissProt) 上で、重複するHPV16 E2ペプチドの配列の相同性検索を行った。統計学的有意閾値 (EXPECT) は10であった (Altshuler et al., 1997)。HPV16 E2ペプチドと $>60\%$ のアミノ酸相同性があると報告されたものを含めた。

【0064】

結果

HPV16 E2-誘導ペプチドに対する健常ドナーPBMCの高い反応性

我々は、E2配列の全体をカバーする、重なり合う30-merのペプチドのアレイを用いて、HPV16 E2タンパクに対する健常ドナーのPBMCの増殖的応答を調べた。8名のHLA型を分類したドナーからの新たに単離したPBMCを、23種類のE2-誘導30-merペプチドのそれぞれとインキュベートすると、8名のドナーのうちの4名では、2又はそれ以上のペプチドと反応した。E2特異的増殖応答は非常に強かった (表4)。全てのケースにおいて、75%を超える並行的なマイクロ培養物は、刺激ペプチドに反応した。例えば、2つの独立した実験において、E2₃₁₋₆₀, E2₄₆₋₇₅, E2₉₁₋₁₂₀, E2₁₅₁₋₁₈₀, E2₂₇₁₋₃₀₀ 及び E2₂₈₆₋₃₁₅ ペプチドに対するドナー番号8のペプチド特異的増殖は、試験した全ての8つの並行的マイクロ培養物の75~94%においてバックグラウンドの増殖を超えたことを我々は見出した。このことは、PBMC単離物中に、E2-特異的T細胞が極めて高い頻度で存在することを示している。特に、ドナー番号3、5及び8からのPBMCは、広い特異性で強い応答を示した。30-merペプチドは、隣り合うペプチドと15アミノ酸だけ重なり合っていることに注目して頂きたい。従って、隣り合うペプチド (例えば、ドナー番号3、E2₃₁₋₆₀ 及び E2₄₆₋₇₅) は、同一のエピトープを含んでいる可能性が高く、隣接しないペプチドに対する応答は、異なるエピトープに対するものである。

【0065】

応答培養物の頻度だけではなく、増殖応答の大きさも非常に高かった。ドナー番号3、5及び8からのいくつかの培養物におけるペプチド特異的増殖は、9.2~16.5の範囲にある平均刺激指数を有するバックグラウンドを超え、このような応答は、ドナーの数人における破傷風トキソイドに対する応答 (番号3、4、5及び7、SIは13.3~25; 表4参照) に比肩するものであった。これらの刺激指数は、記憶T細胞応答の検出に通常用いられる閾値 ($SI \geq 3$) (Bernas et al., 1997) を明確に超えるものであった。他のドナーのあるものにおいて、破傷風トキソイドに対する応答は、さらにより高かった (ドナー番号3及び6における $SI \geq 100$)。しかしこれらの強い値は、単一の30-mer E2ペプチドに対するのではなく、全抗原に含まれる複数のエピトープに対する極めて広い応答を示している可能性が高い。総合すると、我々のデータは、健常人のT細胞レパートリーが、HPV16 E2抗原に特異的なT細胞を特に高い頻度で含むことができ、それによって、活発な増殖応答がもたらされることを示しており、これらの応答がT細胞記憶を反映しているかもしれないことを示唆している。

【0066】

【表4】

表4 HPV16 E2 誘導ペプチドの免疫原性

	D1 ¹	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
E2 ₁₋₃₀ ²								
E2 ₁₆₋₄₅								
E2 ₈₁₋₉₀			81% (8,8) ³					88% (8,6)
E2 ₄₈₋₇₅			88% (5,5)		81% (6,8)			94% (6,5)
E2 ₆₁₋₉₀								
E2 ₇₆₋₁₀₅								
E2 ₉₁₋₁₂₀					94% (4,8)			75% (4,0)
E2 ₁₀₆₋₁₃₅								
E2 ₁₂₁₋₁₅₀								
E2 ₁₃₆₋₁₆₅								
E2 ₁₅₁₋₁₈₀			81% (6,4)					81% (4,1)
E2 ₁₆₆₋₁₉₅			94% (16,5)		81% (10,6)			
E2 ₁₈₁₋₂₁₀								
E2 ₁₉₆₋₂₂₅								
E2 ₂₁₁₋₂₄₀								
E2 ₂₂₆₋₂₅₅								
E2 ₂₄₁₋₂₇₀								
E2 ₂₅₆₋₂₈₅								
E2 ₂₇₁₋₃₀₀								88% (4,8)
E2 ₂₈₆₋₃₁₅			88% (16,2)					94% (9,2)
E2 ₃₀₁₋₃₃₀								
E2 ₃₁₆₋₃₄₅							94% (4,7)	
E2 ₃₃₁₋₃₆₅			100% (11,4)				75% (4,1)	
TT	100% (29,1)	100% (56,5)	100% (25)	100% (16,4)	100% (23,5)	100% (139)	100% (13,3)	100% (59)

10

20

【0067】

¹ D：ドナー、8名の異なる健常血液ドナーを試験した。

² HPV16 E2は、第1番目及び最後のアミノ酸で示す。TTは一般的な普遍性抗原である破傷風トキソイドである。

³ 両方のアッセイにおいて、>50%の試験ウェルにおける増殖が、対照ウェルにおける平均増殖+3xSDを超えており、全ての試験ウェルにおいて、培地対照のウェルに対する刺激指数（SI）が3よりも高い場合に、そのペプチドが陽性であると記録した。両方のアッセイにおいて、培地対照+3xSDを超えたウェルの平均百分率として、陽性スコアのみを記載した。括弧の間には、両方のアッセイの全てのウェルの平均刺激指数を示す。

30

【0068】

HPV16 E2特異的Th培養物は自然にプロセスされたエピトープを認識する増殖データは、HPV16 E2中に複数の免疫原性Thエピトープが存在することを示した。我々は、このような応答の性質及び特異性についてより詳細な分析を行い、それによって、我々のデータ（表4）が、高度に免疫原性の数個のペプチドを含むことを明らかにしたN末端及びC末端領域に焦点を合わせた。このC末端領域に含まれる、重なり合うペプチド（E2₂₇₁₋₃₀₀；E2₂₈₆₋₃₁₅；E2₃₀₁₋₃₃₀；E2₃₁₆₋₃₄₅；E2₃₃₁₋₃₆₅）の、HLA-DR分子に結合する能力を試験した。5個のペプチドのそれぞれは、試験した一般的なHLA-DR分子の2種又はそれ以上に対して中程度から強度の結合性を示した（表5）。このことは、これらのペプチドが本当にクラスII MHC-拘束Thエピトープを表しているという見解を支持している。

40

【0069】

【表5】

表5 異なるHLA-DR型に対するHPV16-E2誘導ペプチドの結合親和性

アミノ酸配列	HPV16-E2	DR1	DR2	DR3	DR4
FNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKGDANTLKC	271-300	22	65	37	>70
TPIVHLKGDANTLKCLRYRFKKHCTLYTAV	286-315	8	68	20	>70
LRYRFKKHCTLYTAVSSTWHWTGHNVKHKS	301-330	6	8	>70	10
SSTWHWTGHNVKHKSIAIVTLTYDSEWQRDQ	316-345	6	55	30	>70
AIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTTITVSTGFMSI	331-365	8	20	10	15

【0070】

各ペプチドの結合親和性は、 IC_{50} 値により表す。これは、標準蛍光標識ペプチドの結合が、その最大値の50%に減少する時のペプチド濃度 (μM) である。>70は、検出できない結合を表す。

【0071】

次に、HLA型分類した健常血液ドナーからのPBMCを、1週間間隔で、ペプチドE2₂₇₁₋₃₀₀とE2₂₈₆₋₃₁₅、ペプチドE2₃₀₁₋₃₃₀とE2₃₁₆₋₃₄₅、ペプチドE2₃₃₁₋₃₆₅又はペプチドE2₄₆₋₇₅で刺激することにより、長期間E2-特異的Th培養物を生成した。2名のドナーからのPBMCが、1又はそれ以上の刺激ペプチドに対して強いペプチド特異的増殖応答を示した(データ示さず)。これらの培養物の限界希釈によるクローニングにより、我々は、均一にCD4⁺CD8⁻表現型を表す、6個の異なるペプチドエピトープに対する安定なT細胞クローンを単離することに成功した。これらのThクローンのうちの2つは、E2₃₀₁₋₃₃₀とE2₃₁₆₋₃₄₅で刺激した、HLA-DR15(2)-, -DQ6(1)-PBMCから確立された。これらのThクローンの特異性を詳しく分析したところ、これらは、異なるクラスIIHLA分子により拘束される、重なり合うが異なる配列を認識することが明らかになった。クローンの1つは、HLA-DR15(2)内のペプチドE2₃₁₆₋₃₃₀を認識し、他のクローンは、HLA-DQ6(1)内のペプチドE2₃₁₁₋₃₂₅に特異的であった(図5、6)。他の2つのThクローンも同様に関連していた。すなわち、1つは、DR15(2)内のペプチドE2₃₄₆₋₃₅₅を認識し、他のクローンはDR1拘束的にE2₃₅₁₋₃₆₅と反応した(図7、8)。注目すべきことに、これらのDR15(2)及びDR1-拘束エピトープのより長い変異体は、拘束するHLA分子に本当に結合することが見出された(HLA-DQ6については利用できない結合アッセイ)点で、これらのデータは、表5に示すペプチド結合データと符合している。さらに、2つのクローンは、ペプチドE2₄₆₋₇₅と反応することがわかった。1つは、HLA-DR4拘束的にペプチドE2₅₁₋₇₀と反応し、他のクローンはペプチドE2₆₁₋₇₅と反応した(図15)。

【0072】

同定された4つのE2ペプチドが、生理学的に関連するThエピトープを表すさらなる証拠は、E2特異的ThクローンがペプチドをロードしたAPCに対して応答するだけではなく、E2タンパクでパルスしたAPCとも特異的に反応する(図5~8)という事実により与えられる。後者の場合には、ペプチドエピトープの提示は、E2抗原の取込み及びプロセッシングに依存し、APC細胞表面にクラスII分子が単に外来的にロードされたものではないので、これらのデータは、我々のThクローンにより認識された4つのE2ペプチドは、自然にプロセスされたエピトープに対応していることの決定的な証拠を与える。最後に、全ての4つのThクローンは、抗原で刺激するとIFN- γ を生産した。これは、Th-1型サイトカインプロファイルを示している。総合すると、我々のデータは、健常人のT細胞レパートリーは、IFN- γ -分泌E2特異的CD4⁺Th細胞を有していることを示している(図5~8)。

【0073】

健常人中のHPV16-E2特異的記憶Th細胞の検出
第1段落に記載したような、健常人におけるHPV16-E2特異的Th免疫性の著しく

頻繁な検出は、基礎となるT細胞レパートリーが、以前に抗原に遭遇したことによる免疫学的記憶を表しているのか、この抗原に特異的な、特に多数の未利用のT細胞前駆体から主として成るのかをさらに分析することに我々を駆り立てた。若い性的に活発な個体における一般的に一過性の生殖HPV感染の高い出現率(Karlsson et al., 1995; Koutsky et al., 1997; Ho et al., 1998)及びHPV感染中の顕著なE2の発現に鑑み、健常被検者中にE2に対するT細胞記憶が見出されるのではないかとと思われる。我々は、抗原を経験したT細胞を含むが、未利用のT細胞を含まない、健常ドナーPBMCのCD45RO⁺分画(Young et al., 1997)のE2特異的反応性の分析により、我々により検出されたHPV16 E2特異的免疫の本質を試験した。我々は、健常ドナーのレパートリーが、IFN γ - 産生Th細胞を含むことを見出したので(図5~8)、我々はIFN γ ELISPOTにより抗原特異的T細胞応答を測定した。我々はまず、我々の以前の実験(表4)に基づいて、HPV16 E2のほとんどの免疫原性領域中に位置すると思われるE2ペプチドの選択に我々の注意を集中しつつ、2名の健常ドナーのCD45RO⁺ T細胞の反応性を分析した。興味深いことに、これらのCD45RO⁺ PBMCは、複数のE2ペプチドに応答することがわかった(図9a, b)。このことは、健常被検者がHPV16 E2特異的T細胞記憶を表し得るという概念を支持している。我々は、測定手法としてELISPOTに代えてIFN γ 細胞内サイトカイン染色を採用することにより、応答IFN γ 産生細胞がCD4⁺ Th細胞サブセットに属することを確認した(示さず)。さらなる8名の健常ドナーからのCD45RO⁺ PBMCを用いた、ペプチドの全アレイに対するE2特異的反応性のより広範なサーベイにより、これらのPBMC単離物のうちの4つは、1又はそれ以上のHPV16 E2ペプチドと反応することが明らかになった(図9c-f、及び示さず)。総合すると、我々のデータにより、試験した健常ドナーの約半数中に、HPV16 E2ペプチドに対する、CD45RO⁺ 記憶型の、IFN γ 分泌性Th細胞が存在することが明らかになった。注目すべきことに、これらの応答が検出される頻度が、全PBMC中に見出される増殖性応答の最強のサブセットの頻度と非常に近い(表4)。このことは、これらの応答もまた、おそらく生体外で初回免疫された未利用のT細胞によるのではなく、記憶T細胞による反応性を表していることを示唆している。

【0074】

HPV16 E2特異的Thクローンの、他のHPV型の配列を有するペプチドとの交差反応性 30

HPV感染は普遍的な性質を持っているので、人類の大部分は、おそらく複数のHPV型に遭遇している(Thomas et al., 2000; Koutsky et al., 1997)。さらに、ウイルス遺伝子産物のタンパク配列は、HPV型同士の間でかなりの程度保存されている。従って、ある方のHPVと以前に遭遇することにより誘起されるT細胞レパートリーの少なくともある分画が、他のHPV型に次に感染した際に交差反応し、従って防御していることがあり得る。HPV16 E2タンパクの配列を、種々の他のHPV型の配列と並べることにより、それは他の高リスク型の配列と顕著に保存されていることが明らかになった。この保存は、HPV16 E2配列を、低リスク又は一般的な方の配列と比較した場合ほどは顕著ではないが、全てのケースにおいて、最大の保存が、E2配列のある領域内に閉じ込められていることが明らかである。具体的には、HPV16 E2の3つの領域が、他の型のHPVと相同性を共有している。3つの領域とは、N末端部分であるE2₃₁₋₁₂₀、E2₁₅₁₋₁₉₅及びC末端領域であるE2₂₇₁₋₃₆₅である。これらの領域は、E2の主な機能的ドメインと同じ位置にある。すなわち、N末端ドメインは、このタンパクの転写活性化機能を有しており、C末端部分は、その配列特異的DNA結合性を媒介する。210~270番目の残基に亘る中間配列は、2つのキーとなる機能的ドメインを連結する、いわゆるヒンジ領域を構成し、この部分はHPV型間であまり保存されていない。興味深いことに、短期間増殖アッセイにおけるE2特異的応答の我々の解析により、最も免疫原的なペプチドは、HPV16 E2配列の2つの保存ドメイン中に集中している(表4参照)。これらの考えに鑑み、HPV16 40

E 2 配列の C 末端部分から誘導されたエピトープに対して育成された、我々の確立された T h クローン（図 5 ～ 8 ）が、この特定の E 2 配列に関して H P V 1 6 と最大の相同性を共有する、多数の他の型の H P V の E 2 ペプチドと交差反応することができかどうかを試験した。本当に、D Q 6 - 拘束 E 2 _{3 1 1 - 3 2 5} 特異的 T h クローンは、H P V 2 6 , 3 1 , 3 5 及び 4 5 型の対応するペプチドを強く認識した（示さず）。このエピトープ内のアミノ酸相同性は、7 3 ～ 8 7 % である（同一又は類似の理化学的性質を有するアミノ酸）。我々の他の T h クローンは、高度に相同的な他の H P V 型の E 2 ペプチドに対して考慮すべき交差反応性を示さなかった（示さず）。これらのデータは、我々のアッセイで検出された H P V 1 6 E 2 反応性 T h 記憶の一部は、H P V 1 6 以外の型のエピトープとの遭遇に関連しているかもしれないことを示しており、また、この免疫レパートリーの大部分は、おそらく H P V 1 6 自身との遭遇を介して確立されたものであることを示唆している。

【0075】

実施例 3

材料及び方法

被検者及び対照

匿名の健常血液銀行ドナー（D）の P B M C を得た。これらのドナーは、匿名であるので、追加的なデータは入手できない。しかしながら、異常なパピローマウイルス塗沫を包含する、最近の感染履歴が知られているドナーは、通常の規制の一部として、献血を思いとどまらされる。

【0076】

C I N 又は子宮頸癌を有する被検者（S，表 2）の研究は、この論文において、H P V 1 6 感染子宮頸癌病巣に対する細胞性免疫を研究した「サークル研究（C I R C L E s t u d y）」に記載されている。ライデン大学医学センター（L U M C）の婦人科において、組織学的に照明された C I N I I I 又は子宮頸癌を呈している婦人を、インフォームドコンセント後、この研究に利用させてもらった。研究計画は、L U M C の倫理委員会で承認された。治療の日に採血した。C I N I I I を有する被検者を、L E E P 又は冷ナイフ円錐切除で処置した。I B - I I A の段階にある場合には、根治的な子宮摘出を行った。バイオプシー又は外科的切除標本のパラフィン埋め込み切片から単離された DNA 上で H P V 1 6 特異的プライマーを用いて H P V 1 6 の分類を行った（C l a a s e t a l . , 1 9 8 9）。H P V 特異的 T - ヘルパー応答は、進行性疾患を患っている被検者中に検出されると予測されたので（d e G r u i j l e t a l . , 1 9 9 8）、我々は、I B 段階の子宮頸癌を有する被検者を分析することを選んだ。

【0077】

抗原

E 6 タンパク上に亘る、用いた 1 5 個の重複する 2 2 - m e r のペプチド（例えば、1 - 2 2 , 1 1 - 3 2 , 2 1 - 4 2 , 3 1 - 5 2 , 4 1 - 6 2 , 5 1 - 7 2 , 6 1 - 8 2 , 7 1 - 9 2 など、最後のペプチドがアミノ酸 1 3 7 - 1 5 8 から成る）は、タンパク中の第 1 番目と最後のアミノ酸で示される。ペプチドは先に記載したように合成し、溶解した（v a n d e r B u r g e t a l . , 1 9 9 9）。

【0078】

記憶応答混合物（MRM）：破傷風トキソイド（1 L F / m l ; N a t i o n a l I n s t i t u t e o f P u b l i c H e a l t h a n d t h e E n v i r o n m e n t , オランダ国 B i l t h o v e n）及び M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s の超音波破碎物（2 . 5 μ g / m l ; オランダ国 R o y a l T r o p i c a l I n s t i t u t e の P . K l a t s e r 博士が気前よく分与）を、典型的な普遍的（r e c a l l）抗原に応答して P B M C が増殖する能力を制御するために用いた。

【0079】

E L I S P O T による抗原特異的 T 細胞の解析

2 4 ウェルプレート（C o s t a r , マサチューセッツ州 C a m b r i d g e）に収容

した、10% FCSが添加され、5 μ g/mlのE6から誘導された前記22-merのペプチドを含む又は含まない1mlのISOCOVEの培地(Gibco)中にPBMCを 2×10^6 細胞/ウェルの密度で播種した。陽性対照として、各プール中、4つの重なる30アミノ酸長のペプチドから成る、インフルエンザA/PR/8/34 M1タンパクの上記プールの存在下でPBMCを培養した。

【0080】

CD45RO⁺細胞を用いた場合には、10% FCS及び記載した単一のペプチド又はペプチドのプールを10 μ g/ml/ペプチドの濃度で添加した、24ウェルプレート(Costar)に収容された1mlのIMDM中に、CD45RO⁺細胞を 10^6 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃で4日間インキュベートした後、PBMCを回収し、洗浄し、IFN γ 捕獲抗体(Mabtech AB, スウェーデン国Nachha)を被覆したMultiscreen 96-ウェルプレート(Millipore, オランダ国Etten-Leur)に 10^5 細胞/ウェルの密度で、4~6個のレプリケートを構成するように播種した。ELISPOTを、製造者(Mabtech)の指示に従ってさらに行った。スポットの数は、コンピューター制御の完全自動化ビデオイメージング分析システム(Carl Zeiss Vision)を用いて分析した。特異的スポットは、試験ウェルの平均スポット数から、培地のみの対照のスポット数+2x標準偏差を差し引くことにより算出した。抗原特異的T細胞頻度は、T細胞頻度が $>1/10$, 000 PBMCである場合に非応答物に比較して増加したと考えた。

10

【0081】

PBMCのCD45RO⁺記憶分画の単離

CD45ROマイクロビーズ(カタログ番号460-01, Miltenyi Biotec, ドイツ国)と共にインキュベーションした後のMACSによりバフィーコートから記憶細胞(CD45RO⁺)を新たに単離した。得られたCD45RO⁺分画の純度は、CD45RO及びCD45RA(CD45RA-FITC, カタログ番号347723、CD45RO-PE, カタログ番号347967, Becton Dickinson Biosciences, 米国)に対して表面染色を行った後のフローサイトメトリーにより測定したところ $>95\%$ であった。

20

【0082】

結果

若い性的に活発な個体における一般的に一過性の生殖HPV感染の高い出現率(Karlsson et al., 1995; Koutsky et al., 1997; Ho et al., 1998)及び試験した健常被検者の約半数に見られた、HPV16 E2特異的免疫の顕著な発現(実施例2参照)に鑑み、我々は、4日間IFN γ -ELISPOTアッセイにより、ヒト集団中の自然な、生体内で誘起された、HPV16 E6-特異的応答を調べた。このアッセイは、刺激するとIFN γ を分泌するTヘルパー細胞のみを検出し、未利用のTヘルパー細胞は刺激してもIFN γ を分泌しない(実施例1及び2並びにその中で引用した文献参照)。18名の健常血液ドナーからのPBMC中に存在するペプチドの完全なアレイに対するE6特異的反応性のサーベイにより、これらの18名のうちの11名($>60\%$)のPBMC単離物が、1又はそれ以上のHPV16 E6ペプチドに応答した(表6a)。応答の大部分は、E6のC末端(E6₈₁₋₁₅₈)において認められた。さらに、全ての健常ドナーは、一般的な普遍性抗原であるインフルエンザマトリックス1タンパクに反応した。インフルエンザM1及びHPV16 E6特異的Tヘルパー細胞の頻度は同程度であった。興味深いことに、HPV16+患者について同様なサーベイを行ったところ、わずか3/12(25%)のみがHPV16 E6ペプチドと反応した。このことは、健常被検者中に見出されるE6応答が、この疾病に対して防御的であることを示している。

30

40

【0083】

【表6】

表6 健常人ドナーPBMC中のHPV16 E6-特異的T-ヘルパー反応性の検出

ドナー ¹	1-22 ²	11-32	21-42	31-52	41-62	51-72	61-82	71-92	81-102	91-112	101-122	111-132	121-142	131-152	137-158	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4
1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1	<1
2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	2	26	12	7
3	<1	4	<1	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	8	18	4	30	7	19	<1
4	<1	<1	<1	10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	22	15	14	10
5	<1	5	1	1	2	9	5	7	6	10	2	8	5	8	1	7	10	12	37
6	3	34	<1	9	<1	<1	2	<1	11	14	6	12	10	<1	6	<1	33	41	5
7	<1	2	1	<1	<1	<1	<1	<1	2	14	<1	<1	1	3	14	6	21	57	28
8	4	4	<1	<1	9	<1	<1	<1	12	14	3	6	7	3	<1	27	38	34	16
9	2	<1	7	3	<1	<1	4	<1	<1	3	<1	<1	3	<1	<1	22	10	14	4
10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	7	<1	<1	13	23	19	11
11	2	<1	<1	2	<1	<1	<1	7	3	4	2	15	10	27	17	33	28	24	52
12	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	14	15	<1	5	10	12	<1
13	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	1	21
14	5	5	<1	10	5	<1	2	20	12	5	28	18	37	40	2	12	42	28	45
15	18	16	4	15	2	1	<1	3	12	21	8	11	8	<1	<1	52	68	64	5
16	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	39	66	49	48
17	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	3	<1	66
18	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	<1	2	<1	<1	11	1	1	<1	<1	1	10	<1

10

【0084】

¹ 18名の異なる健常血液ドナーを試験した。

20

² HPV16 E6から誘導されたペプチドの第1番目及び最後のアミノ酸番号を示す。M1P1-M1P4は、インフルエンザAマトリックス1タンパク (inf A/PR/8/34) から誘導された、15残基重なり合う、4つの30アミノ酸長ペプチドの4つの異なるプールである。

³ 示したものは、100,000個のPBMC当りの特異的スポットの数である。特異的スポットは、ペプチドで刺激した後のスポットの平均数から、培地対照の平均スポット数+2xSDを差し引くことにより算出される。太字の数字は、T細胞頻度 $\geq 1/10$, 000を示す。

【0085】

【表7】

30

表6b HPV16+患者におけるHPV16 E6-特異的T-ヘルパー反応性の検出

患者	1-22	11-32	21-42	31-52	41-62	51-72	61-82	71-92	81-102	91-112	101-122	111-132	121-142	131-152	137-158	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4
C40	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3
C41	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	10	<1
C43	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1
C47	<1	<1	<1	28	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	13	<1	<1	<1	<1	<1
C57	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	22	<1	<1	2	62	30
C58	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C63	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1
C66	<1	<1	<1	<1	<1	11	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	31	<1	13	<1
C73	<1	<1	<1	<1	2	1	<1	3	4	5	<1	8	7	7	5	5	2	4	2
C75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1
C80	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	1	2	<1	1	1	<1	2	<1	7	2	7	1
C91	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	2	<1	<1

40

【0086】

HPV16特異的記憶T細胞が、ヒト集団の大きな分画中に存在するという我々の観察を確認するために、我々はHPV16 E6ペプチドで刺激する前の、特異的CD45RO⁺の、PBMCの記憶分画を単離した。4日間の刺激後、HPV16 E6に対する明確な応答を検出することができた。総合すると、我々のデータにより、試験した健常ドナーの約半数中に、HPV16 E6ペプチドに対する、CD45RO⁺記憶型の、IFN γ 分泌性Tヘルパー細胞が存在することが明らかになった。

50

【0087】

さらに、2名の異なるHLA-DR1陽性血液ドナーのPBMCを、協働してE6 109-158をカバーする、2個の長い35-merのプールで刺激した。これらのドナーのPBMCは、ペプチドE6 121-142及びペプチドE6 127-158並びにE6タンパクに対して特異的に増殖した。これらのバルクの1つから誘導したCD4+Tヘルパークローンをさらに解析した。このクローンは、HPV16 E6ペプチド及びHPV16 E6タンパクで刺激すると、HLA-DR1拘束的に、特異的に増殖し、IFN γ を産生した(図16)。

【0088】

結論

HPV16 E6抗原に対する、健常被検者からのPBMC培養物中のIFN γ 応答の解析を通じて、我々は、このタンパクが、これらのドナーの約半数において強いT細胞反応性が検出される高度に免疫原性のペプチド配列を含んでいることを示した。次いで健常ドナーPBMCのCD45RO⁺記憶分画の試験により、これらのHPV16 E6-特異的IFN γ -分泌CD4⁺T細胞がPBMCのT細胞記憶分画中に存在し、従って、HPVに遭遇することにより生体内で初回免疫されていたことを明らかにした。同様なサーベイにより、HPV16 E6特異的IFN γ 分泌T細胞は、HPV16+患者中にはほとんど存在しないことが示された。総合すると、我々のデータは、健常被検者の大部分のT細胞レパートリーは、HPV16 E6抗原に対して反応性を有する、記憶1型サイトカイン産生Tヘルパー細胞を高い頻度で含み、これらが疾病に対して防御的であることを示している。

【0089】

重要なことに、健常個体中にE2及びE6又は他のいずれかの非構造HPV16タンパクに対する記憶T細胞応答が存在することに関する報告を我々は見つけていない。実際、多くの例で健常個体は、用いた培養条件についての陰性対照として用いられていた。今、我々は、2つの独立した研究(実施例2及び実施例3)において、健常ドナーから誘導されたPBMCがHPV16特異的Tヘルパー細胞を含むことを示した。Tヘルパー応答の大部分は、E2及びE6の特定の領域に対するものである。これらの記憶型Tヘルパー細胞の存在は、これらの個体がHPV16感染に遭遇したことがあり、免疫系の細胞性T細胞アームを介してその感染を排除したことを示している。このことは、これらの抗原に対するT細胞応答が、HPV感染に対する防御的応答の一部であることを暗示している。したがって、これらの型の応答を誘起又は追加免疫することは、HPVにより誘起される疾病に対する防御のための有力な道具になり得る。

【0090】

実施例4

材料及び方法

雄C57/B16マウス(1群当りn=8)に、10 μ gのE1A-誘導CTLエピトープ(SGPSNTTPPEI)そのもの又は該CTLエピトープを含む、HPLCで精製した、30 μ gの32アミノ酸長のペプチドRECNSSTDSCDSGPSNTTPPEI HPVVRLCPIKPをワクチン投与した。ペプチドはPBS中に溶解し、IFAと1:1の比率で混合した。マウスには、第1日に200 μ Lの体積でペプチドを皮下投与した。14日後、マウスを0.5 x 10⁶個のAR5腫瘍細胞(E1A+Rasトランスフォームドマウス胎児細胞)で攻撃した。100日間にわたり、マウスの生存を監視した。

【0091】

結果

細胞障害性Tリンパ球(CTL)エピトープを表す合成ペプチドをワクチン投与することにより、腫瘍又はウイルスに対して防御的CTL媒介免疫がもたらされ得る。ヒトアデノウイルス早期領域1(Ad5E1)によりトランスフォームされたB6腫瘍細胞は、Ad5E1A及びAd5E1BによりコードされるCTLエピトープを免疫系に提示する。こ

10

20

30

40

50

これらのエピトープのどちらかに対するCTLクローンは、確立されたAd5E1-誘起腫瘍を根絶することができる。このことは、これらのCTLエピトープが、腫瘍の縮退を媒介することができるCTLの標的であることを示している。Ad5E1-発現腫瘍細胞に対する防御的免疫は、Ad5E1によりトランスフォームされた細胞及びAd5E1領域を含むアデノウイルスベクターで免疫することにより確立することができる。いずれの場合も、防御的免疫は、特異的CTL記憶を伴う。しかしながら、E1A誘導CTLエピトープの最小のペプチドエピトープ配列又はE1B誘導CTLエピトープの最小のペプチドエピトープ配列をワクチン投与した場合には、Ad5A1発現腫瘍に対する防御は失われた。

【0092】

ヒトアデノウイルス5型E1A領域(Ad5E1A234-243)から誘導されたCTLエピトープをワクチン投与すると、Ad5E1A発現腫瘍の成長が阻害されるのではなく促進された。ペプチドワクチンとは対照的に、Ad5E1Aを発現するアデノウイルスをワクチン投与すると、Ad5E1A特異的免疫が誘起され、Ad5E1A発現腫瘍の増殖が妨げられた。これらの結果は、合成ペプチドでの免疫が、抗腫瘍CTL応答を排除し得ることを示している(Toes et al., 1996a)。さらに、少ない投与量のAd5E1Bペプチドを皮下投与することによりワクチン接種すると、同様にこの有害反応が見られる。Ad5E1BによりコードされたCTLエピトープに対するCTL応答は、Ad5E1でトランスフォームされた細胞によるワクチン接種後のB6マウスにおける抗腫瘍応答に最も寄与するので、Ad5E1Bペプチドを選択した。Ad5E1Bペプチドをワクチン投与されたマウスは、Ad5E1発現腫瘍細胞の増殖に対して防御されず、しかしその代わりに、ワクチン接種されていないマウスにより排除される腫瘍接種物を排除することがもはやできなかった。さらに、Ad5E1B発現腫瘍に対する腫瘍細胞のワクチン接種により誘起された防御は、腫瘍攻撃の数日前にAd5E1BによりコードされるCTLエピトープを注射することにより失われた。これは、Ad5E1B特異的CTL活性のペプチド誘起寛容を伴う(Toes et al., 1996b)。

【0093】

結論として、CTLエピトープ長そのものの合成ペプチドで免疫すると、腫瘍排除能力の欠如を伴うCTL寛容がもたらされ得る。最小のエピトープで免疫することによるCTLの寛容又は機能欠失の問題は、長いペプチド(22~35アミノ酸残基)を用いることにより回避される。このことを証明するために、我々は、10アミノ酸長のE1A誘導CTLエピトープを含む、32アミノ酸の長いE1A誘導ペプチドをC57/B16マウスにワクチン接種した。前記10アミノ酸長のペプチドエピトープは、そのまま接種すると腫瘍に対する防御が失われるものである。図10に示すように、ペプチドエピトープSGPSNTPEIそのものをワクチン接種した対照マウス(n=8)は、腫瘍による攻撃後50日以内に全て死亡した。対照的に、32アミノ酸長のペプチドをワクチン接種した群のマウスは、第50日には全て生きており、100日間の追跡期間中にわずか1匹のみが死亡した。

【0094】

結論

ウイルス感染した細胞又は腫瘍細胞に対して被検者を免疫することに臨床的に関連する手法では、特異的T細胞及びCTLの両者が誘起されるべきである。我々は既に、いくつかのモデルでは、最小のCTLエピトープで免疫することにより、腫瘍に対する防御がもたらされる(Kast et al., 1991, Feltkamp et al., 1993)が、これはまた、誘導されると本来は防御的である(Toes et al., 1996a b)、ウイルス又は腫瘍特異的CTLの寛容又は機能欠失をもたらし得ることを示した。交差初回免疫及び他のメカニズムによる、MHCクラスI分子による提示のための外来性抗原のプロセッシングは、現在、周知の内発性経路に次ぐ、MHCクラスIによる提示のためのプロセッシングの第2経路として広く認識されている(Jondal et al., 1996, Reimann et al., 1997)。ペプチドエピトープそのも

10

20

30

40

50

のをマウスにワクチン接種する場合とは対照的に、CTLエピトープを含む長いペプチド配列をワクチン接種すると、腫瘍に対してマウスを防御することに関わるCTLの喪失がもたらされず、その代わりに次なる腫瘍攻撃に対してマウスを防御する、CTL媒介免疫応答がもたらされることを今、我々は示した。

【0095】

実施例 5

マウス及びセルライン。 C57BL/6 (B6, H-2^b) マウスは、IFFA Credo (フランス国Paris) から得た。MHCクラスII^{-/-} B6マウスは、Taconic (米国) から購入し、CD40^{-/-} B6マウスはThe Jackson Laboratory (米国Maine) から得た。腫瘍セルラインTC-1は、C57BL/6 起源のマウス胎児細胞(MEC)を、HPV16 E6/E7及びc-Her-13.2は、H-2D^b E1AエピトープがHPV16 E7⁴⁹⁻⁵⁷ CTLエピトープで置換された、アデノウイルス5型誘導E1タンパクでトランスフォームされたMEC (B6) から誘導された。D1細胞は、C57BL/6 マウスから誘導された、長期増殖因子依存性の未熟脾臓樹状細胞(DC)である。

【0096】

ペプチド。 HPV16 E7 誘導ペプチドE7₄₉₋₅₇: RAHYNIVTF及びE7₄₃₋₇₇: GQAE PDRAHYNIVTFCKCDSTLR LCVQSTHVDIRは、自動複数ペプチド合成機(Abimed AMS 422, ドイツ国Langenfeld) 上で固相法により合成した。ペプチドは、逆相HPLCで混入物を分析し、-20℃で保存した。

【0097】

テトラマー及び抗体。 PE 標識H-2D^b エピトープE7⁴⁹⁻⁵⁷ (RAHYNIVTF) 含有テトラマーを構築し、ペプチド特異的CTL免疫の解析に用いた。FITC 標識抗CD8b.2 Ab (Ly-3.2) (クローン53-5.8), APC 標識抗CD4 Ab (L3T4) (クローンRM4-5) 及びPE 標識抗IFN-γ Ab (クローンXMG1.2) (BD Pharmingen, 米国San Diego) を種々のFACS法に用いた。

【0098】

アジュバント。 IFA (フロインドの不完全アジュバント) は、Difco Laboratories (米国Michigan) から得た。Montanide ISA 51は、SEPPIC (フランス国Paris) から購入した。CpG-オリゴデオキシヌクレオチド(ODN) 1826は、Technical University of Munich (ドイツ国Munich) のG. B. Lipford博士から親切に提供してもらった。GM-CSFは、PeproTech (米国Rocky Hill) から得た。刺激性抗CD40抗体を産生するFGK-45ハイブリドーマ細胞は、A. Rolinkにより提供された。MPLは、Ribi Immunochem. Research (米国、Hamilton) のM. Johnson博士に親切に提供してもらった。

【0099】

免疫戦略。 C57BL/6 マウスは、E7⁴⁹⁻⁵⁷ CTLエピトープのモル濃度が同程度になるように、PBSに溶解した50 µgのE7⁴⁹⁻⁵⁷ ペプチド又は150 µgのE7⁴³⁻⁷⁷ 35-merを皮下注射した。種々のアジュバントとの組み合わせを試験した。IFA及びMontanideの場合には、溶解したペプチドを、これらのそれぞれの物質50%に乳化した。ODN-CpG (50 µg/マウス), MPL (10 µg/マウス) 及びGM-CSF (4 µg/マウス) は全てPBSに溶解し、皮下ワクチン接種の前にペプチドと混合した。注射した総体積は200 µL/マウスであった。抗CD40抗体はPBSに溶解し、ペプチドとは別に、注射当り100 µgの量(総体積200 µL/マウス)で第0、1及び2日に静脈内注射した。10日後に脾臓を回収す

るか、又は、記載した場合には、初回免疫の50日後に同一のワクチンを追加免疫し、追加免疫10日後に脾臓を回収した。35-merのE7⁴³⁻⁷⁷の場合には、後者の戦略により、最初のワクチン接種の跡に記憶CTL及びTヘルパー細胞が形成され、追加免疫を行ったときにHPV16 E7⁴³⁻⁷⁷ 特異的Tヘルパー細胞によってDCが活性化されるかもしれない。治療的抗腫瘍実験では、腫瘍担持マウスは、全てのマウスにおいて腫瘍が触診可能な時及びその14日後に、2回ワクチン接種した。

【0100】

T細胞培養。 0.5 x 10⁶ 個のE7⁴⁹⁻⁵⁷ 発現細胞（腫瘍セルライン13.2）の存在下、あるいは、記載した場合には、D1細胞の存在下で、完全培地中で脾細胞（24ウェルプレート中5 x 10⁶ 細胞/ウェル）を培養することにより免疫マウスからT細胞を得た。使用前に、D1細胞をE7⁴³⁻⁷⁷ 35-merと共に16時間培養し、次いでLPS（10 µg/ml）を加えることにより6時間活性化し、次に完全に洗浄した。完全培地は、8% FCS, 100 IU/ml ペニシリン, 2 mM グルタミン（ICN, 米国オハイオ州Aurora）及び30 µM 2-ME（Merck, ドイツ国Darmstadt）を添加したIscoveの修飾ダルベッコ培地（IMDM; BioWhittaker, 米国メリーランド州Walkersville）から成る。培養物は、5% CO₂ を含む湿潤空气中で37℃で維持した。外来性IL-2は添加しなかった。第6日に、死んだ細胞をFicoll密度勾配遠心により培養物から除去し、残る細胞を1 x 10⁶ 細胞/ウェルで24ウェルプレートに播種した。第7日にテトラマー染色又は細胞内サイトカイン染色を行った。

【0101】

テトラマー染色。 腫瘍セルライン13.2で7日間刺激した脾臓培養物を、40 x 10⁴ 個/ウェルの量で96ウェルV底マイクロタイタープレートに移し、PBS/0.5% BSAで2回洗浄した。次いで、PE-標識E7⁴⁹⁻⁵⁷ 含有テトラマーを加えた。室温で30分間インキュベートした後、細胞をPBS/0.5% BSAで2回洗浄し、FITC-標識抗CD8b抗体と30分間インキュベートした。次いで細胞を、PBS/0.5% BSAで2回洗浄し、プロピジウム アイオダイド（PI）含有（0.5 µg/ml）PBS/0.5% BSAに懸濁し、チューブに移した。細胞試料を、Cell Questソフトウェアを用い、FACS Caliburフローサイトメーター（Becton Dickinson, 米国カリフォルニア州San Jose）で解析した。合計20 x 10⁴ 事象（event）の蛍光強度を解析した。破片はPI染色を用いてゲートアウトし、次いで、CD8⁺ 分画をゲートした。非免疫対照マウスからの、同様に培養し、染色した細胞の平均バックグランドテトラマー染色では、CD8⁺ 細胞が1%未満であることがわかった（0.94%、標準偏差0.36%）。陽性コントロールとして、HPV16 E7 特異的CTLクローン9.5を用いた。

【0102】

細胞内サイトカイン染色。 E7⁴³⁻⁷⁷ 35-merで7日間パルスしたD1細胞で脾臓培養物を刺激した。次いで、CD8⁺ 及びCD4⁺ IFN-γ 産生T細胞の割合を以前に記載した方法（van der Burg et al., 2001）で測定した。注目すべきことに、LPS-活性化非パルスD1細胞又はE7⁴⁹⁻⁵⁷ 若しくはE7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer（5 µg/ml）でパルスしたD1細胞を、刺激細胞として用いた。

【0103】

結果

HPV16 E7 Tヘルパー及びCTLエピトープを含む、35アミノ酸長のE7⁴³⁻⁷⁷ ペプチドを初回免疫-追加免疫ワクチン接種すると強いCTL応答がもたらされるマウス（B6）に、IFAと混合した、最小のCTLエピトープであるHPV16 E7⁴⁹⁻⁵⁷ 又は35残基長のHPV16 E7⁴³⁻⁷⁷ ペプチドを1回ワクチン接種した。ワクチン接種10日後、脾臓を回収し、生体外で1週間刺激した。次に、E7⁴⁹⁻⁵⁷ ペプチド特異的CTLの割合を、H2-D^b E7⁴⁹⁻⁵⁷ （RAHYNIVTF

）ーテトラマー染色（van der Burg et al., 2001）により測定した。両方の群で、9匹中3匹のマウスがワクチンに応答し、一般的にCD8⁺T細胞の5%がテトラマーで染色された（図11A-B）。これは、ワクチンが1回注射されたときに同等によく作用することを示している。

【0104】

強いE7^{4 9-5 7}特異的CTL応答を得るために、両方のワクチンを初回免疫ー追加免疫法に用いた。これにより、初回免疫されたT細胞が、50日後の第2のワクチン接種により応答が増強される前に記憶T細胞を形成することが可能であった。最小CTLエピトープを2回投与されたマウスは、1回ワクチン接種の後と同等なCD8⁺T細胞応答を示した（図11C）。対照的に、長いペプチドで初回免疫及び追加免疫されたマウスでは、11匹のうち9匹が、より多数のE7^{4 9-5 7}特異的CD8⁺T細胞（平均19%、5~40%の範囲）を形成し、強いE7^{4 9-5 7}特異的CTL応答を示した（図11D）。これらの実験は、均一初回ー追加免疫法で長いペプチドをワクチン接種する方が、最小のCTLエピトープをワクチン接種するよりも優れていることを示しており、これは、長いペプチド中に本来的に存在するTヘルパーエピトープによるTヘルパー細胞の形成が、CTL応答のレベルにかなり寄与していることを示している。

【0105】

強いE7^{4 9-5 7}特異的CTL応答はMHCクラスII拘束Tヘルパー細胞とCD40-CD40L相互作用に依存する

長いE7^{4 3-7 7}ペプチドで初回ー追加ワクチン接種した後に検出される印象的なCTL応答が実際にMHCクラスII拘束E7特異的Tヘルパー細胞により増強されたものであることを示すために、MHCクラスII^{-/-}マウスに長いペプチドワクチンを初回ー追加免疫した。MHCクラスII^{-/-}マウス中に検出されるE7^{4 9-5 7}特異的CTLの数は、2回のワクチン接種後のB6マウス中に見出される数よりもはるかに少なく、1回のワクチン接種後に見出される数と同等であった（図11E）。CD4⁺Tヘルパー細胞が初回免疫後に既に誘起されていることを確認するために、IFA中の長いペプチドをマウスに1回ワクチン接種した。次いで、E7^{4 3-7 7}特異的IFN γ 産生CD4⁺T細胞の割合を細胞内サイトカイン染色により測定した。バックグラウンドを超える応答は、免疫されていないマウス中には観察されなかったが（データ示さず）、ワクチン接種したマウスからのCD4⁺T細胞の5%以上は、長いE7^{4 3-7 7}ペプチドで刺激すると特異的に応答した（図12A）。これらのデータは、MHCクラスII拘束CD4⁺Tヘルパー1型応答が1回のワクチン接種後に誘起されていることを示しているだけではなく、これらのE7^{4 3-7 7}ペプチド特異的Tヘルパー細胞が、強いCTL応答を誘起するために必要であることを示している。追加免疫すると長いペプチドをプロセスして提示するプロフェッショナルAPCは、E7^{4 3-7 7}ペプチド特異的Tヘルパー細胞によるCD40-CD40L相互作用を介して活性化される。これは次いで増強されたCTL活性化をもたらすであろう。

【0106】

E7^{4 3-7 7}ペプチドとDC活性化剤とを1回ワクチン接種すると、HPV16 E7に対する強いTヘルパー及びCTL応答がもたらされる

もし、プロフェッショナルAPCのTヘルパー媒介活性化が、観察される強いCTL応答にとって重要であるならば、DCを直接活性化するとT細胞の助けの欠如を回避することができ、1回のワクチン接種が、十分なCTL応答を誘起するのに十分であるはずである。この主題について研究するために、B6マウスに、長いペプチド又は最小のE7^{4 9-5 7}ペプチドを、種々のDC活性化剤と組み合わせてワクチン接種した。IFA及びヒト用IFAであるMontanideを対照として用いた。IFA（図11A-B）の場合と同様、Montanideアジュバントを投与した場合、応答は見られなかった（データ示さず）。さらに、最小のCTLエピトープ又は長いペプチドと、抗CD40抗体又はGM-CSFとを組み合わせたものをワクチン接種されたマウスは、CTL応答を全く又は最小にしか示さなかった（図13A-B）。しかしながら、GM-CSFとIFAの

10

20

30

40

50

組み合わせは、長いペプチドを投与した時に穏やかな E7⁴⁹⁻⁵⁷ 特異的 CTL 応答をもたらした (図 13C)。MPL 又は ODN-CpG と混合した最小ペプチドを投与されたマウスは、IFA をワクチン接種されたマウスに比べて応答者の数は増えなかったが (それぞれ 4/9 及び 4/12) (図 11A)、数匹のマウスは明確な CTL 応答を示した (図 13D-E)。対照的に、長いペプチドをワクチン接種すると、すべてのマウスにおいて E7⁴⁹⁻⁵⁷ 特異的 CTL 応答がもたらされた。さらに、大部分の動物において、検出された CTL 応答は高かった (CD8⁺ T 細胞が 40% 以下)。さらに、長いペプチドと ODN-CpG とを 1 回ワクチン接種すると、IFA をアジュバントとして用いた場合に比べ、さらに多数の E7⁴³⁻⁷⁷ 特異的 IFN γ -産生 CD4⁺ T 細胞がもたらされた (CD4⁺ T 細胞の 15~20%) (図 12B)。誘起された応答が、本当に T ヘルパー細胞に非依存的であることを示すために、MHC クラス II^{-/-} マウスに長いペプチドと ODN-CpG をワクチン接種した。図 13F に示す通り、1 回のワクチン接種後に強い CTL 応答が検出された。T ヘルパー非依存性のセッティングにおいて、長いペプチドと DC 活性化剤とをワクチン接種する方が最小の CTL エピトープをワクチン接種するよりも優れていることは、全ての有核細胞上に存在する MHC クラス I 分子に結合することができる最小の CTL エピトープに比べて、長いペプチドが優先的にプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) によりプロセスされ提示されることを示している。

【0107】

35-mer と DC 活性化アジュバント ODN-CpG をワクチン接種することにより HPV16 発現腫瘍を効果的に根絶し得る

長いペプチドワクチンの有効性を試験するために、腫瘍担持マウスを、ODN-CpG と混合した E7⁴⁹⁻⁵⁷ ペプチド又は長い E7⁴³⁻⁷⁷ ペプチドで免疫した。注目すべきことに、全てのマウスにおいて腫瘍が触診可能である時 (第 10~14 日) にワクチン接種を行った。2 回目のワクチン接種は、E7 特異的 T ヘルパー及び CTL 免疫を維持するために 14 日後に行った。ODN-CpG 単独で処理したマウスは、抗腫瘍活性を示さなかった (図 14A)。動物の大部分は、処理後 14 日以内に、激しい腫瘍増殖の故に殺さなければならなかった。ペプチド及び ODN-CpG で処理した両方の群においては、処理の 8~12 日後に腫瘍増殖の阻害が見られた。E7⁴⁹⁻⁵⁷ ペプチドと ODN-CpG で処理したマウスでは、9 匹のうち 3 匹 (動物の 30%) において根絶が観察されたが、他のものは一時的に腫瘍の増殖を安定化し得たに過ぎず、次いで腫瘍のために死亡した。対照的に、長いペプチドと ODN-CpG で処理した 10 匹のマウスのうち 8 匹では、200~500 mm³ のものもいくつかあった腫瘍が根絶された。

【0108】

結論

我々は、HPV16 E7 から誘導された 35 残基の長いペプチドをワクチン接種した後の方が、最小の CTL エピトープをワクチン接種した後よりも、HPV16 E7 特異的 CTL 応答がはるかに強いことを示す。我々のデータは、2 つの独立したメカニズムの少なくとも 1 つでこれが説明されることを示している。第 1 に、この実施例で用いた 35 残基の長いペプチドは、CTL エピトープと T ヘルパーエピトープの両者を含んでいる。MHC クラス II^{-/-} マウスのワクチン接種により、APC と E7 特異的 T ヘルパー細胞の間の相互作用が CTL 応答のレベルにかなり寄与していることが示された。さらに、強い DC 活性化剤と混合した前記長いペプチドを投与することにより、T 細胞の助けの必要性を回避することができた。第 2 に、この実施例における最小の CTL エピトープ (9 残基) 又は前記長いペプチドワクチンと、DC 活性化剤との組み合わせにより誘起される CTL 応答を直接比較すると、野生型及び MHC クラス II^{-/-} の両方とも、長いペプチドをワクチン接種した方がはるかに良好な CTL 応答をもたらすことが示された。このことは、最小の CTL エピトープとは対照的に、長いペプチドが、プロフェッショナル APC によって好ましく提示されることを示している。さらに、我々は、長いペプチドと強い DC 活性化剤とをワクチン接種することにより、確立された腫瘍の完全な根絶がもたらされることを示す。これらのデータは、長い重なり合うペプチドを単独で、又は強い DC 活

性化剤と組み合わせて将来のヒト試験に用いる科学的な根拠を与える。

【0109】

我々の長いペプチドワクチンが高い有効性を有していることは、他のことよりも、Tヘルパー及びCTLエピトープが物理的に結合されていることに起因する。エピトープ連結の潜在的な利点は、MHCクラスI及びMHCクラスII拘束エピトープの両方を、単一のAPCの表面上に同時に提示するチャンスが増加し、それによって、同族のT細胞の助けをCTLの初回免疫に到達させることが容易になることにある。CTL及びThエピトープの混合物を用いたワクチンと、物理的に連結された同じCTL及びThエピトープを用いたワクチンとの直接比較により、後者の方がより強いCTL応答をもたらすことが示された (Shirai, 1994; Hiranuma, 1999; Bristol, 2000)。正常B6マウス及びMHCクラスII^{-/-}マウスの我々のワクチン接種により、物理的に結合されたTヘルパーエピトープを用いることが強いCTL応答の発達のために有利であることが確認された。さらに、これらの実験は、E7特異的Th細胞とAPCとの相互作用が、CTL応答のこの増強の原因となっていることを示している。正常マウス及びMHCクラスII^{-/-}マウスにおける、最小CTLエピトープ及び長いペプチドにより誘起されるCTL応答を比較することにより、我々の長いペプチドワクチンのもう1つの興味深い性質が明らかになった。これらの実験では、E7特異的Th細胞の寄与は排除されており、ペプチドの物理的性質又は動力学の相違のみが役割を果たす。そのサイズの故に、ペプチドを直接MHCクラスIに結合させることができないので、前記長いペプチドは、外部由来の抗原をプロセスし、MHCクラスI中にペプチドを提示することができるプロフェッショナルAPCに取り込まれる必要があった。我々は、最小ペプチドを用いた場合には、DC活性化がE7特異的CTL応答の結果にわずかにしか影響しないが、長いペプチドワクチンによる、より優れたE7特異的CTL応答の誘起のためにはDC活性化が予め必要であることを示した。総合すると、これらのデータは、前記長いペプチド中に存在するCTL及びThエピトープがプロフェッショナルAPCの表面に好ましく提示されることを示している。最小のHPV16誘導CTLエピトープをワクチン投与すると、DC活性化剤を共に注射しても改善されない、検出可能なCTL応答がもたらされる。このことは、前記ペプチドが、活性化されたプロフェッショナルAPCの表面に提示されるだけでなく、他の有核細胞のMHCクラスI分子中にも提示されることを示している。前記ペプチドは、細胞表面のMHCクラスIに直接結合することができる (Feltkamp et al., 1993) ので、驚くにはあたらない。共刺激を与えることができない細胞 (例えば非免疫細胞) により前記CTLペプチドが提示されると、CTL応答が弱められる。従って、これらの非プロフェッショナルAPCによる前記E7-CTLエピトープの提示は、E7特異的CTLの誘起にとって害である。注目すべきことに、我々は以前に、最小のE1A誘導CTLエピトープをワクチン接種すると、誘導されると本来はE1A誘起腫瘍に対して防御的である (Toes et al., 1996a,b) E1A特異的CTLの寛容又は機能欠失をもたらしたことを示した。HPV16 E7誘導CTLエピトープの非プロフェッショナルAPCの表面におけるあり得る提示は、アデノウイルス腫瘍モデルで見られるようにE7特異的CTLの誘起を妨害しないが、これらの応答の抗腫瘍効果は低減される。確立された腫瘍を、最小のCTLエピトープとDC活性化剤CpGの治療的ワクチン接種により処理することは、DC活性化剤と混合した長いペプチドワクチンと比較した場合にはるかに効果が少ない。

【0110】

これらの結果は、HPV16により誘起される疾病に対する、予防的及び治療的処置のヒト試験においてこのワクチンを評価するための科学的な基礎を与える。

【0111】

文献

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new g

10

20

30

40

50

eneration of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402 (1997).

BARRASSO, R., DE BRUX, J., CROISSANT, O. AND D ORTH, G., High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.*, 317, 916-23 (1987).

BAUR, M. P., NEUGEBAUER, M. AND DEPPE, H., Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In: E. D. Albert, M. P. Baur and W. R. Mayr (eds.), *Histocompatibility Testing*, pp. 333-341, Springer-Verlag, Berlin (1984).

Bermas, B. L. and Hill, J. A., Proliferative responses to recall antigens are associated with pregnancy outcome in woman with a history of recurrent spontaneous abortion. *J Clin Invest*, 100, 1330-4. (1997).

Borysiewicz, L. K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G. W. G., Westmoreland, D., Evans, A. S., Adams, M., Stacey, S. N., Boursnell, M. E. G., Rutherford, E., Hickling, E. and Inglis, S. C., A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, 347, 1523-1527 (1996).

BOSCH, F. X., MANOS, M. M., MUNOZ, N., SHERMAN, M., JANSEN, A. M., PETO, J., SCHIFFMAN, M. H., MORENO, V., KURMAN, R. AND SHAH, K. V., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87, 796-802 (1995).

BRISTOL, J. A., C. ORSINI, P. LINDINGER, J. THALHAMER, AND S. I. ABRAMS. 2000. Identification of a ras oncogene peptide that contains both CD4(+) and CD8(+) T cell epitopes in a nested configuration and elicits both T cell subset responses by peptide or DNA immunization. *Cell Immunol* 205: 73.

CLAAS, E. C., MELCHERS, W. J., VAN DER LINDEN, H. C., LINDEMAN, J. AND QUINT, W. G., Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 135, 703-9 (1989).

- Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M. L., Stefanon, B., Venzon, D. J., Shearer, G. M., De Palo, G. and Clerici, E., Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89, 245-250 (1997).
- Coleman, N., Birley, H. D., Renton, A. M., Hanna, N. F., Ryait, B. K., Byrne, M., Taylor-Robinson, D. and Stanley, M. A., Immunologic 10
al events in regressing genital warts. *Am. J. Clin. Pathol.*, 102, 768-74 (1994).
- DAS, S. N., KHANNA, N. N. AND KHANNA, S., A multiparametric observation of immune competence in breast cancer and its correlation with tumour load and prognosis. *Ann Acad Med Singapore*, 14, 374-81 (1985).
- DE BRUIJN, M. L., SCHUURHUIS, D. H., VIERBOOM, M. P., VERMEULEN, H., DE COCK, K. A., OOMS, 20
, M. E., RESSING, M. E., TOEBES, M., FRANKEN, K. L., DRIJFHOUT, J. W., OTTENHOFF, T. H., OF FRINGA, R. AND MELIEF, C. J., Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) on coprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumour cells. *Cancer Res.*, 58, 724-731 (1998).
- DE GRUIJL, T., BONTKES, H. J., WALBOOMERS, J. M. M., STUKART, M. J., DOEKHIE, F. S., REMMI 30
NK, A. J., HELMERHORST, T. J. M., VERHEIJEN, R. H. M., DUGGAN-KEEN, M. F., STERN, P. L., MEIJER, C. J. L. M. AND SCHEPER, R. J., Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: A longitudinal study. *Cancer Res.*, 58, 1700-1706 (1998).
- DYSON N, HOWLEY PM, MUNGER K, HARLOW E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is 40
able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 (4893):934, 1989.
- HO GY, BURK RD, FLEMING I, KLEIN RS: Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56 (6)
) :788, 1994
- EARLY, E. AND REEN, D. J., Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 116, 527 50

- 33 (1999).

EVANS, E. M., MAN, S., EVANS, A. S. AND BORYS I EWICZ, L. K., Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.*, 57, 2943-2950 (1997).

FELTKAMP MC, SMITS HL, VIERBOOM MP, MINNAAR RP, DE JONGH BM, DRIJFHOUT JW, TER SCHEGGET J, MELIEF CJ, KAST WM: Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 23 (9):2242, 1993 10

Franken, K. L., Hiemstra, H. S., van Meijgaarden, K. E., Subronto, Y., den Hartigh, J., Ottenhoff, T. H. and Drijfhout, J. W., Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif*, 18, 95-9 (2000). 20

Fu TM, Guan L, Friedman A, Schofield TL, Ulmer JB, Liu MA, et al., Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge. *J Immunol* 1999; 162 (7):4163-4170.

Geluk, A., Taneja, V., Van Meijgaarden, K. E., Zanelli, E., Abou-Zeid, C., Thole, J. E., de Vries, R. R., David, C. S. and Ottenhoff, T. H., Identification of HLA class II-restricted determinants of *Mycobacterium tuberculosis*-derived proteins by using HLA-transgenic, class II-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 10797-10802 (1998). 30

GELUK, A., VAN MEIJGAARDEN, K. E., DRIJFHOUT, J. W. AND OTTENHOFF, T. H., Clip binds to HLA class II using methionine-based, allele-dependent motifs as well as allele independent supermotifs. *Mol. Immunol.*, 32, 975-981 (1995). 40

GHOSH, P., KOMSCHLIES, K. L., CIPPITELLI, M., LONGO, D. L., SUBLESKI, J., YE, J., SICA, A., YOUNG, H. A., WILTROUT, R. H. AND OCHOA, A. C., Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst*, 87, 1478-83 (1995).

HALPERT R, FRUCHTER RG, SEDLIS A, BUTT K, BOYCE JG, SILLMAN FH: Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transpla 50

- nt patients. *Obstet Gynecol* 68 (2) : 251, 1986
- HAN R, CLADEL NM, REED CA, PENG X, CHRISTENSEN ND: Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. *J Virol* 73 (8) : 7039, 1999.
- HIRANUMA, K., S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, S. KUSUKI, M. ISOGAWA, G. KIM, M. KAITO, K. KURIBAYASHI, Y. ADACHI, AND Y. YASUTOMI. 1999. 10
Helper T cell determinant peptide contributes to induction of cellular immune responses by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J Gen Virol* 80:187.
- Ho GY, Bierman R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338 (7) : 423, 1998.
- HOHN, H., PILCH, H., GUNZEL, S., NEUKIRCH, C., HILMES, C., KAUFMANN, A., SELIGER, B. A 20
AND MAEURER, M. J., CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J. Immunol.*, 163, 5715-22 (1999).
- HOPFL, R., WIDSCHWENDTER, A., CHRISTENSEN, N. D., WIELAND, U., ZUMBACH, K., SANDRA, H., PFISTER, H. J., PAWLITA, M. AND HEIM, K., Delayed-type hypersensitivity to HPV16 E7 and humoral immunity to HPV16/18 E6, E7 and HP 30
V 6/11/16/18/31 L1-virus like particles in women with cervical neoplasia. In: X. Castellsague, F. X. Bosch, S. de Sanjose, V. Moreno and J. Ribes (eds.), 18th international papillomavirus conference, pp. 299, Institut Catala d'Oncologia, Barcelona, Spain (2000).
- JONDAL M, SCHIRMBECK R, REIMANN J: MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5 (4) : 295, 1996 40
- Karlsson, R., Jonsson, M., Edlund, K., Evander, M., Gustavsson, A., Boden, E., Rylander, E. and Wadell, G., Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm Dis*, 22, 119-27 (1995).
- KAJST WM, ROUX L, CURREN J, BLOM HJ, VOORDOUW AC, MELOEN RH, KOLAKOFSKY D, MELIEF CJ: Protection against lethal Sendai virus infect 50

ion by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (6) : 2283, 1991

KOUTSKY L: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Am J Med 102 (5A) : 3, 1997.

KURTS C, CARBONE FR, BARNDEN M, BLANAS E, AL LISON J, HEATH WR, MILLER JF:

CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. J Exp Med 186 (12) : 2057, 1997 10

Manca, F., Li Pira, G., Fenoglio, D., Fang, S. P., Habeshaw, A., Knight, S. C. and Dalglish, A. G., Dendritic cells are potent antigen-presenting cells for in vitro induction of primary human CD4+T-cell lines specific for HIV gp 120. J Acquir Immune Defic Syndr, 7, 15-23 (1994). 20

MARRAZZO JM, STINE K, KOUTSKY LA: Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women: a review. Am J Obstet Gynecol 183 (3) : 770, 2000

MATORRAS R, ARICETA JM, REMENTERIA A, CORRAL J, GUTIERREZ DE TERAN G, DIEZ J, MONTOYA F, RODRIGUEZ-ESCUDERO FJ: Human immunodeficiency virus-induced immunosuppression: a risk factor for human papillomavirus infection. Am J Obstet Gynecol 164 (1 Pt 1) : 42, 1991 30

McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hisao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., Winkelhake, J. and Spack, E. G., A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. J Immunol Methods, 210, 149-66 (1997).

MELIEF, C. J. M., TOES, R. E. M., MEDEMA, J. P., VAN DER BURG, S. H., OSSENDORP, F. AND OFFRINGA, R., Strategies for Immunotherapy of Cancer. Adv. Immunol., 75, 235 - 281 (2000). 40

Mellman, I., Turley, S. J. and Steinman, R. M., Antigen processing for amateurs and professionals. Trends Cell Biol, 8, 231-7 (1998)

NAIPAL, A. M., D'AMARO, J., BRUNING, J. W., VAN LEEUWEN, A. AND VAN ROOD, J. J., Automated reading of Propidium Iodide lymphocytotoxicity tests for HLA-DR, MB, MT typing. Tissue Antigens, 24, 302-6 (1984).

NIMAKO, M., FIANDER, A., WILKINSON, G. W. G. 50

- , BORYSIEWICZ, L. K. AND MAN, S., Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res.*, 57, 4855-4861 (1997).
- OSSENDORP F, MENGEDE E, CAMPS M, FILIUS R, MELIEF CJM: Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 187 (5):1, 1998. 10
- PARDOLL, D. M. AND TOPALIAN, S. L., The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 588-94 (1998).
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C. and Romero, P., High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.*, 190, 705-15 (1999). 20
- RAMMENSEE, H. G., FRIEDE, T. AND STEVANOVIĆ, S., MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41, 178-228 (1995).
- REIMANN J, KAUFMANN SH: Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr Opin Immunol* 9 (4):462, 1997 30
- RESSING, M. E., SETTE, A., BRANDT, R. M. P., RUPPERT, J., WENTWORTH, P. A., HARTMAN, M., OSEROFF, C., GREY, H. M., MELIEF, C. J. M. AND KAST, W. M., Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201 binding peptides. *J. Immunol.*, 154, 5934-5943 (1995).
- RESSING, M. E., VAN DRIEL, W. J., BRANDT, R. M., KENTER, G. G., DE JONG, J. H., BAUKNECHT, T., FLEUREN, G. J., HOOGHERHOUT, P., OFFRING A, R., SETTE, A., CELIS, E., GREY, H., TRIMBOS, B. J., KAST, W. M. AND MELIEF, C. J., Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J. Immunother.*, 23, 255-66 (2000). 40
- RESSING, M. E., VAN DRIEL, W. J., CELIS, E., SETTE, A., BRANDT, R. M. P., HARTMAN, M., ANH 50

- OLTS, J. D. H. , SCHREUDER, G. M. T. , TER HARMS
EL, W. B. , FLEUREN, G. J. , TRIMBOS, B. J. , KAS
T, W. M. AND MELIEF, C. J. M. , Occasional memo
ry cytotoxic T-cell responses of patients w
ith human papillomavirus type 16-positive
cervical lesions against a human leukocyte
antigen-A*0201-restricted E7-encoded epit
ope. *Cancer Res.* , 56, 582-588 (1996).
- Rodriguez, A. , Regnault, A. , Kleijmeer, M. ,
Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. 10
, Selective transport of internalized anti
gens to the cytosol for MHC class I presenta
tion in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, 1, 3
62-8 (1999).
- SCHEFFNER M, WERNESS BA, HUIBREGTSE JM, LEV
INE AJ, HOWLEY PM: The E6 oncoprotein encod
ed by human papillomavirus types 16 and 18 p
romotes the degradation of p53. *Cell* 63 (6) :
1129, 1990.
- SCHOENBERGER SP, TOES RE, VAN DER VOORT EI, 20
OFFRINGA R, MELIEF CJ: T-cell help for cyto
toxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD4
0L interactions. *Nature* 393 (6684) :480, 199
8.
- Sedlik C, Dadaglio G, Saron MF, Deriaud E, R
ojas M, Casal SI, et al. , In vivo induction
of a high-avidity, high-frequency cytotoxic
T-lymphocyte response is associated with
antiviral protective immunity. *J Virol* 200
0; 74 (13) :5769-5775. 30
- SELVAKUMAR R, BORENSTEIN LA, LIN YL, AHMED
R, WETTSTEIN FO: Immunization with nonstru
ctural proteins E1 and E2 of cottontail rab
bit papillomavirus stimulates regression o
f virus-induced papillomas. *J Virol* 69 (1) :
602, 1995.
- SHIRAI, M. , C. D. PENDLETON, J. AHLERS, T. T
AKESHITA, M. NEWMAN, AND J. A. BERZOFISKY. 1
994. Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) d
eterminant linkage required for priming of 40
anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vac
cine constructs. *J Immunol* 152:549.
- Thomas, K. K. , Hughes, J. P. , Kuypers, J. M. , K
iviat, N. B. , Lee, S. K. , Adam, D. E. and Kouts
ky, L. A. , Concurrent and sequential acqui
sition of different genital human papilloma
virus types [In Process Citation]. *J Infect
Dis*, 182, 1097-102 (2000).
- TOES RE, OFFRINGA R, BLOM RJ, MELIFF CJ, KAS
T WM: Peptide vaccination can lead to enhan 50

ced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. Proc Natl Acad Sci USA 93 (15) : 7855, 1996a.

TOES RE, BLOM RJ, OFFRINGA R, KAST WM, MELIEF CJ: Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. J Immunol 156 (10) : 3911, 1996b

TOES, R. E. M., OSSENDORP, F., OFFRINGA, R. A AND MELIEF, C. J. M., CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. J. Exp. Med. , 189, 753 - 756 (1999).

VAN DER BURG, S. H., KWAPPENBERG, K. M., GELUK, A., VAN DER KRUK, M., PONTESILLI, O., HOVENKAMP, E., FRANKEN, K. L., VAN MEIJGAARDE N, K. E., DRIJFHOUT, J. W., OTTENHOFF, T. H., MELIEF, C. J. AND OFFRINGA, R., Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. J. Immunol. , 162, 152-60 (1999).

VAN DER BURG, S. H., K. M. C. KWAPPENBERG, T. O'NEILL, R. M. P. BRANDT, C. J. M. MELIEF, J. K. HICKLING, R. OFFRINGA (2001): Pre-clinical safety and efficacy of TA-GIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. Vaccine, 19:3652-3660

WANEBO, H. J., JUN, M. Y., STRONG, E. W. AND OETTGEN, H., T-cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg, 130, 445-51 (1975).

ZUR HAUSEN H: Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. Biochimica et Biophysica Acta 1288:F55, 1996.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、自然にプロセスされた抗原 (Ag) を認識する、ペプチド E7₄₁₋₆₂ により誘導された T 細胞応答を示す。健常 HLA-DR15, 4 及び DQ6, 7 陽性血液ドナーからの PBMC を、ペプチド E7₄₁₋₆₂ で 4 回刺激した。応答 T 細胞は、3 日間の増殖アッセイ (a, b, c) において試験し、又は、IFN γ の産生を ELISA により測定するために 1 日間刺激した (d)。応答細胞 (R) 及び自己の、又は MHC クラス II が合致した抗原提示細胞 (A) を、記載した抗原、すなわち、組換え HPV16 E6 タンパク (E6)、組換え HPV16 E7 タンパク (E7)、組換え HIV RT タンパク (RT) 又は E6 から誘導されたペプチド (例えば E6/81-102、ペプチド E6₈₁₋₁₀₂) 若しくは E7 から誘導されたペプチドと共にインキュベートした。バルク T 細胞培養物の増殖 (a)、バルク T 細胞培養物から誘導された T-ヘルパークローン

40

50

の増殖及びH L A－D Rに対する抗体を添加することによるE 7タンパク特異的応答のブロッキング（b）、部分的にM H CクラスI I 合致抗原提示細胞で刺激した際のT－ヘルパークローンの増殖（c）、及びT－ヘルパークローンによる24時間当りのI F N γの測定による最小エピトープの詳細なマッピング（d）。

【図2】

図2は、自然にプロセスされた抗原（A g）を認識する、ペプチドE 7₂₂₋₅₆により誘導されたT細胞応答を示す。健常H L A－D R 3及びD Q 2陽性血液ドナーからのP B M Cを、ペプチドE 7₂₂₋₅₆で4回刺激した。バルクT細胞培養物の増殖（a）、E 7₂₂₋₅₆、E 7₃₁₋₅₂及びE 7タンパクで刺激した場合にバルクT細胞培養物から誘導されたT－ヘルパークローンの特異的増殖（b）、及びT－ヘルパー細胞クロンによる24時間当りのI F N γ生産の測定による最小エピトープの詳細なマッピングとM H CクラスI I 拘束（c）。（また、図1及びそれに付随する説明を参照）。

10

【図3】

図3は、自然にプロセスされた抗原（A g）を認識する、ペプチドE 7₄₃₋₇₇により誘導されたT細胞応答を示す。健常H L A－D R 1, 3及びD Q 2陽性血液ドナーからのP B M Cを、ペプチドE 7₄₃₋₇₇で4回刺激した。バルクT細胞培養物の増殖（a）、ペプチドE 7₄₃₋₇₇及びE 7タンパクに対するTヘルパー細胞クローンの特異的増殖（b）、部分的に合致した（D R 3, D Q 2）ペプチドでパルスした抗原提示細胞（「A P C」）の認識（c）、抗H L A－D R抗体がTヘルパー細胞クローンのE 7特異的増殖をブロックすることによりH L A－D R 3が拘束要素であることが明らかにされた（d）、及びペプチドE 7₄₃₋₇₇又はE 7タンパクで刺激した際の、Tヘルパー細胞クローンによるI F N γの特異的生産（e）。（また、図1及びそれに付随する説明を参照）。

20

【図4】

図4は、M A C Sにより分離したC D 4 5 R A +（未利用の）T細胞（左）及びC D 4 5 R O +（記憶）T細胞（右）を、インフルエンザマトリックス1（M 1）ペプチドで刺激すると、C D 4 5 R O +サブセットのみにおいてI F N γの生産がもたらされることを示す。M 1タンパクは16個の重なり合うペプチドに分けられた。各プールは、15アミノ酸ずつ重なり合う4つの30アミノ酸長ペプチドから成る。

【図5】

図5は、自然にプロセスされた抗原（A g）を認識する、ペプチドE 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2₃₁₆₋₃₄₅により誘導されたT細胞応答を示す。健常H L A－D R 2陽性血液ドナーからのP B M Cを、ペプチドE 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2₃₁₆₋₃₄₅で4回刺激した。ペプチドE 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2₃₁₆₋₃₄₅並びにE 2タンパクに対するT－ヘルパー細胞クローンの特異的増殖（a）、E 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2₃₁₆₋₃₄₅ペプチドで刺激した際のTヘルパー細胞クローンによるI F N γの特異的生産（b）、最小エピトープE 2₃₁₆₋₃₃₀の詳細なマッピング（c）、及び抗H L A－D R抗体がTヘルパー細胞クローンのE 2特異的I F N γ生産をブロックすることによりH L A－D R 2が拘束要素であることが明らかにされた（d）。（また、図1及びそれに付随する説明を参照）。

30

40

【図6】

図6は、自然にプロセスされた抗原（A g）を認識する、ペプチドE 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2₃₁₆₋₃₄₅により誘導されたT細胞応答を示す。健常H L A－D R 2, D Q 6（1）陽性血液ドナーからのP B M Cを、ペプチドE 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2₃₁₆₋₃₄₅で4回刺激した。ペプチドE 2₃₀₁₋₃₃₀及びE 2タンパクに対するT－ヘルパー細胞クローンの特異的増殖（a）、E 2₃₀₁₋₃₃₀ペプチドで刺激した際のTヘルパー細胞クローンによるI F N γの特異的生産（b）、最小エピトープE 2₃₁₁₋₃₂₅の詳細なマッピング（c）、及び抗H L A－D R抗体がTヘルパー細胞クローンのE 2特異的I F N γ生産をブロックすることによりH L A－D Q 6（1）が拘束要素であることが明らかにされた（d）。（また、図1及びそれに付随する説明を参照）。

50

【図 7】

図 7 は、自然にプロセスされた抗原 (A g) を認識する、ペプチド E 2₃₃₁₋₃₆₅ により誘導された T 細胞応答を示す。健常 H L A - D R 2 陽性血液ドナーからの P B M C を、ペプチド E 2₃₃₁₋₃₆₅ で 4 回刺激した。ペプチド E 2₃₃₁₋₃₆₅ 及び E 2 タンパクに対する T-ヘルパー細胞クローンの特異的増殖 (a)、E 2₃₃₁₋₃₆₅ ペプチドで刺激した際の T ヘルパー細胞クローンによる I F N γ の特異的生産 (b)、最小エピトープ E 2₃₄₆₋₃₅₅ の詳細なマッピング (c)、及び抗 H L A - D R 抗体が T ヘルパー細胞クローンの E 2 特異的 I F N γ 生産をブロックすることにより H L A - D R 2 が拘束要素であることが明らかにされた (d)。(また、図 1 及びそれに付随する説明を参照)。

10

【図 8】

図 8 は、自然にプロセスされた抗原 (A g) を認識する、ペプチド E 2₃₃₁₋₃₆₅ により誘導された T 細胞応答を示す。健常 H L A - D R 1 陽性血液ドナーからの P B M C を、ペプチド E 2₃₃₁₋₃₆₅ で 4 回刺激した。ペプチド E 2₃₃₁₋₃₆₅ 及び E 2 タンパクに対する T-ヘルパー細胞クローンの特異的増殖 (a)、最小エピトープ E 2₃₅₁₋₃₆₅ の詳細なマッピング (b)、及び抗 H L A - D R 抗体が T ヘルパー細胞クローンの E 2 特異的 I F N γ 生産をブロックすることにより H L A - D R 1 が拘束要素であることが明らかにされた (c)。(また、図 1 及びそれに付随する説明を参照)。

【図 9】

図 9 は、P B M C の C D 4 5 R O + (記憶) 分画中に存在する T 細胞の E 2 ペプチド特異的 I F N γ 生産を示す。P B M C の C D 4 5 R O + 記憶分画は、M A C S 技術を用いて単離した。分離後、これらの記憶 T 細胞を、記載したペプチドで刺激した。10 日間のインキュベーション後、細胞を回収し、洗浄し、96 ウェル E L I S P O T プレート中で、ウェル当たり 50000 個の P B M C を、記載したペプチドで刺激した。数種類のプールに対する反応性により、健常血液ドナーから誘導された C D 4 5 R O + P B M C が H P V 16 E 2 特異的記憶 T 細胞を含む。前記プールは、以前のアッセイにより確立された、これらのペプチドの免疫原性に基づいて選択された、2 つの 30 アミノ酸長 E 2 ペプチド (第 1 のペプチドの第 1 番目のアミノ酸及び第 2 のペプチドの最後のアミノ酸を X 軸に示す) (a-b)、又は、4 つの 30 アミノ酸長 E 2 ペプチド (E 2 タンパク中の、これら 4 つのペプチドでカバーされる配列の最初と最後のアミノ酸を示す) (d-f)。MRM : M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s、破傷風トキソイド及び C a n d i d a a l b i c a n s 抗原の混合物から成る記憶応答混合物。(また、図 4 及びそれに付随する説明を参照)。*、統計学的に有意な応答 (p < 0.05)。

20

30

【図 10】

図 10 は、最小の C T L エピトープを含む、30 μg の 32 アミノ酸長ペプチド (R E C N S S T D S C D S G P S N T P P E I H P V V R L C P I I K P) で 1 回免疫した時の C 57/B 16 マウスの生存を示す。マウスは、14 日後に 50 万個の A R 5 腫瘍細胞で反対側の脇腹を攻撃した。対照的に、最小の 10 アミノ酸長の C T L ペプチド (S G P S N T P P E I) で免疫したマウスは防御されなかった。

【図 11】

図 11 A-E。H P V 16 E 7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer で初回-追加免疫した後、M H C クラス I I T ヘルパー細胞が E 7⁴³⁻⁷⁷ 特異的 C T L 応答を増強する。マウス (B 6) は、E 7⁴⁹⁻⁵⁷ ペプチド (A) 又は E 7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer (B) で 1 回初回免疫し、又は、50 日後に同一のペプチド、すなわち、E 7⁴⁹⁻⁵⁷ ペプチド (C) 又は E 7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer (D) で追加免疫した。M H C クラス I I - マウスは、同様に E 7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer で初回及び追加免疫した (E)。ペプチドは、I F A 中に乳化した。最後のワクチン接種から 10 日後に、脾臓を回収し、培養物を E 7⁴⁹⁻⁵⁷ 発現腫瘍セルライン 13.2 で刺激した。F A C S における、単離脾細胞の前方及び側方散乱パターン、C D 8 (F L 4-H) 染色並びに H-2 D^b-R A H Y N I V T F テトラマー染色に基づき、脾細胞 C D 8+ を H-2 D^b-R A H Y N I V T F

40

50

テトラマー陽性細胞の解析に付した。Y軸には、 $H-2D^b-R A H Y N I V T F$ テトラマー陽性の $C D 8 + T$ 細胞の百分率を示す。X軸上の各カラムは各マウスを示す。水平な線は、未利用のマウスのバックグランド応答+標準偏差を示す (1.31%)。

【図12】

図12A-B。 $E 7^{43-77} 35-mer$ をワクチン接種した後に、 $E 7$ 特異的 T ヘルパー1型細胞が誘起される。5匹のマウス (B6) のセットに、 $I F A$ (A) 又は $C p G$ (B) と混合した $E 7^{43-77} 35-mer$ を皮下注射した。10日後に脾臓を回収し、 $E 7^{43-77} 35-mer$ でパルスした $D 1$ 細胞で脾細胞培養物を刺激した。生体外刺激の1週間後、個々の T 細胞の $I F N \gamma$ 生産を測定することにより、培養物の $C D 4^{+}$ 分画の特異性を試験した。白抜きのカラムは、パルスされていない $D 1$ 細胞で刺激された $C D 4 + T$ -ヘルパー細胞によるバックグランド $I F N \gamma$ 生産を示し、黒塗りのカラムは、 $E 7^{43-77} 35-mer$ でパルスした $D 1$ 細胞で刺激した際の $C D 4 + T$ -ヘルパー細胞による $I F N \gamma$ 生産を示す。2つのカラムの各セットが個々のマウスを表す。

【図13】

図13A-F。 $D C$ 活性化アジュバントと組み合わせた $E 7^{43-77} 35-mer$ の1回のワクチン接種は、高い $C T L$ 応答をもたらす。マウス (B6) を、 $E 7^{49-57}$ ペプチド (左側に図示する) 又は $35-mer$ (右側に図示する) で初回免疫のみ行い、追加免疫を行わなかった。抗 $C D 40$ 抗体 (A), $G M - C S F$ (B), $G M - C S F + I F A$ (C), $M P L$ (D) 及び $O D N - C p G$ (E) をアジュバントとして用いた。同様に、 $M H C$ クラス $I I^{-/-}$ マウスを、 $E 7^{43-77} 35-mer$ と $O D N - C p G$ (13F) で初回免疫のみ行い、追加免疫を行わなかった。10日後に脾臓を回収し、培養物を $E 7^{49-57}$ 発現腫瘍セルライン13.2で7日間生体外刺激した。次に、 $E 7^{49-57}$ テトラマー陽性 $C D 8^{+}$ 細胞の百分率を $F A C S$ 解析 (Y軸) により測定した。X軸上の各カラムは、個々のマウスを示す。水平な線は、未利用のマウスのバックグランド応答+標準偏差を示す (1.31%)。

【図14】

図14は、樹状細胞活性化剤 ($C p G$) (B; $n = 9$ マウス) と混合した最小の $C T L$ エピトープ $E 7^{49-57}$ 、もしくは樹状細胞活性化アジュバント ($C p G$) (C; $n = 10$ マウス) と混合した $H P V 16 E 7_{43-77}$ をワクチン接種した、又はワクチン接種しなかった (A; $n = 10$ マウス)、 $T C - 1$ 腫瘍で攻撃したマウスにおける $H P V 16 E 7$ 陽性腫瘍の増殖を示す。ワクチン接種は、全てのマウスが触診可能な小さな腫瘍を有していた時 (第10日) に行った。14日後にマウスに追加免疫を施し、最初の免疫から65日間にわたって腫瘍の増殖を追跡した。腫瘍の体積は免疫後7~10日で減少し始め、それまでに $200 \sim 500 mm^3$ に達していた。さらに、非免疫マウスは、腫瘍がこのような体積に達した後、2~3日で死亡した。最小のエピトープをワクチン接種された9匹のマウスのうち6匹は腫瘍が原因となって死亡した。一方、長いペプチドをワクチン接種した10匹のマウスのうち8匹では、腫瘍が完全に根絶された。

【図15】

図15は、自然にプロセスされた $A g$ を認識する、ペプチド $E 2_{46-75}$ で刺激されたヒト $C D 4 + T$ -ヘルパークローンの増殖を示す。健常 $H L A - D R 4$ 陽性血液ドナーからの $P B M C$ を、ペプチド $E 2_{46-75}$ で4回刺激した。ペプチド $E 2_{46-75}$ 及び N 末端 $E 2$ タンパクに対するが $E 2$ タンパクの C 末端側半分には対しない、 T -ヘルパー細胞クローン47の特異的な増殖 (左) 並びに $H L A - D R 4$ を介する拘束 (右) を示す。異なるが、重複するペプチド $E 2_{61-75}$ を認識する T -ヘルパークローン36のペプチド特異性を下に示す。(また、図1及びそれに付随する説明を参照)。

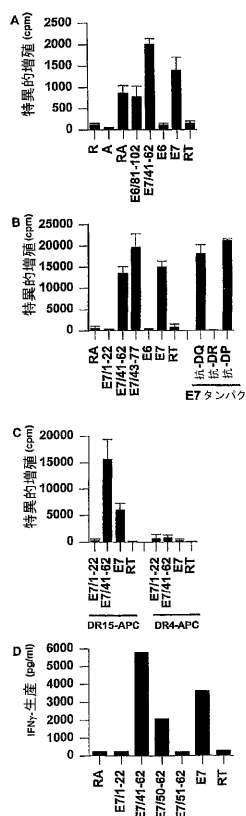
【図16】

図16は、自然にプロセスされた $A g$ を認識する、ペプチド $E 6_{127-158}$ で誘起された T 細胞応答を示す。健常 $H L A - D R 1$ 陽性血液ドナーからの $P B M C$ を、ペプチド $E 6_{127-158}$ で4回刺激した。バルク T 細胞培養物の増殖 (上、左) 及び $I F N \gamma$

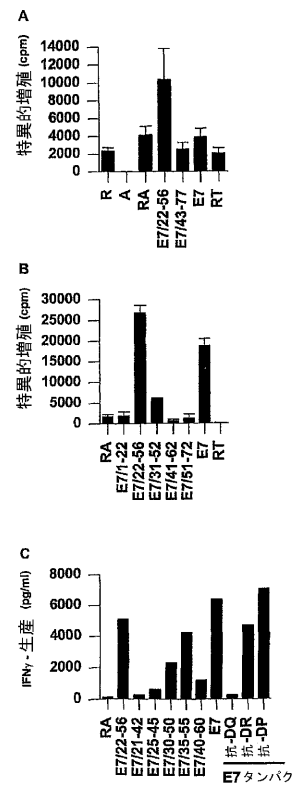
生産（上、右）。さらに、バルク T 細胞培養物から誘導された T-ヘルパークローンの特異的増殖（下、左）及び IFN γ 生産（下、右）、並びに E 6₁₂₇₋₁₅₈ 又は E 6 タンパクで刺激した時の H L A 拘束を示す。（また、図 1 及びそれに付随する説明を参照）

。

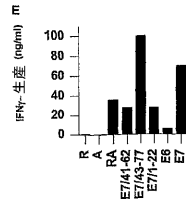
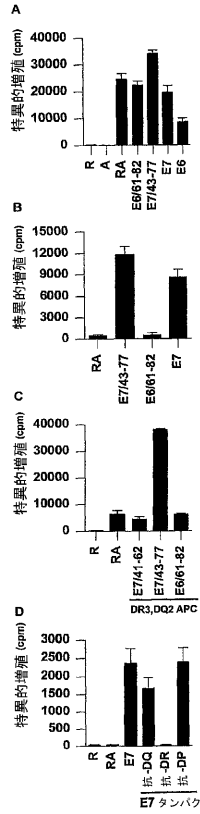
【図 1】



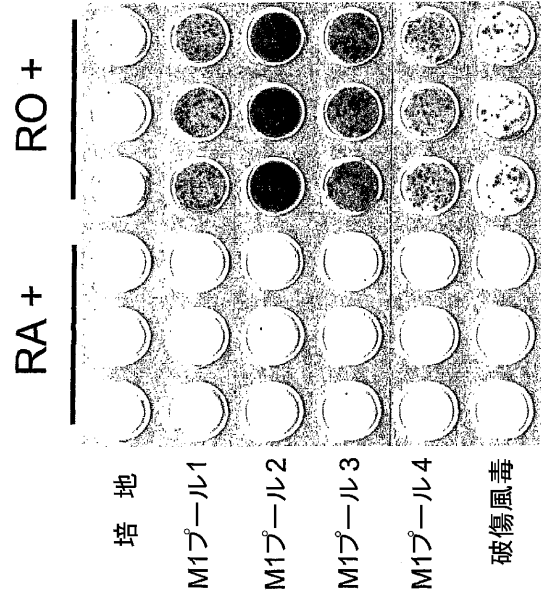
【図 2】



【図 3】



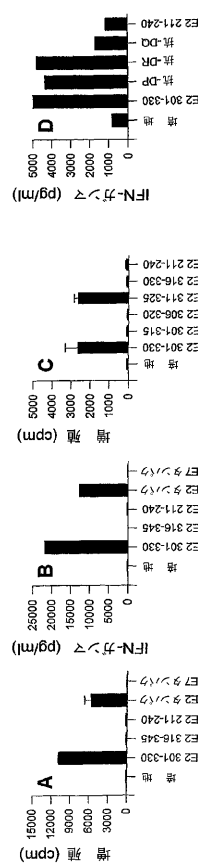
【図 4】



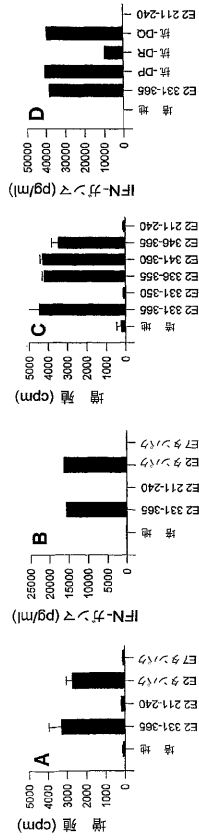
【図 5】



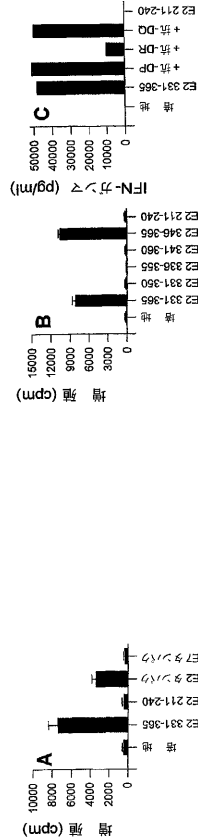
【図 6】



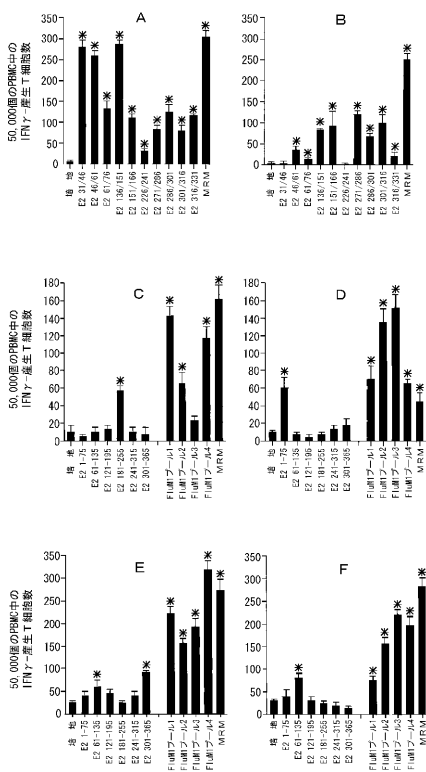
【図 7】



【図 8】

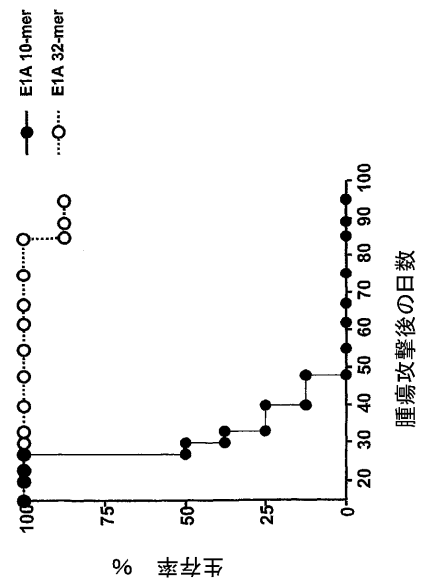


【図 9】

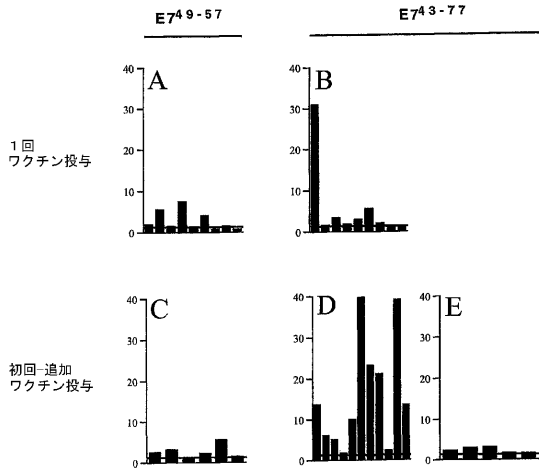


【図 10】

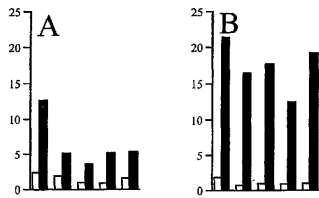
IFAIにAd5E1A 32-merをワクチン投与すると
保護的抗腫瘍免疫を誘起する



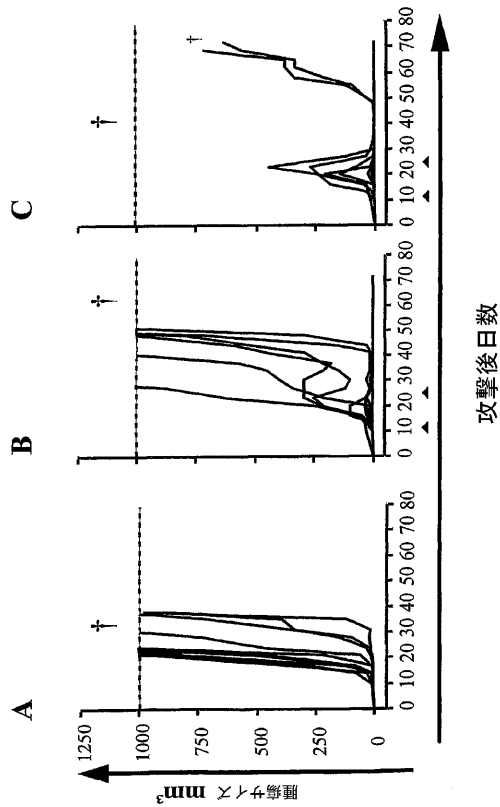
【図 1 1】



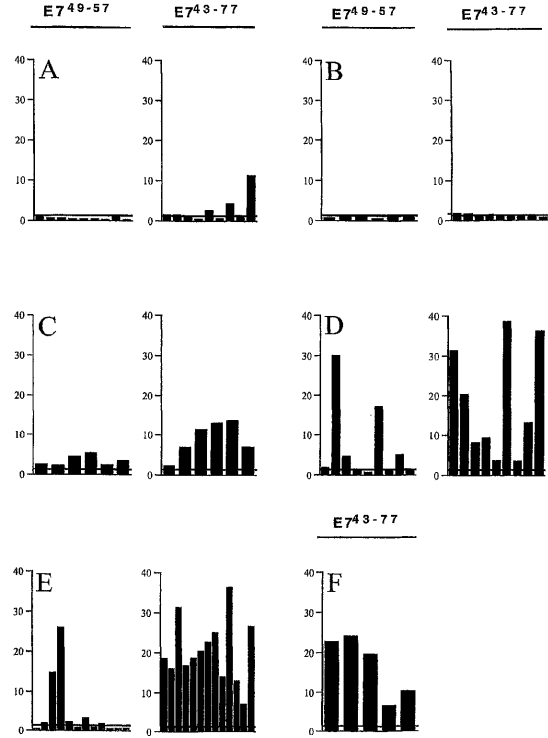
【図 1 2】



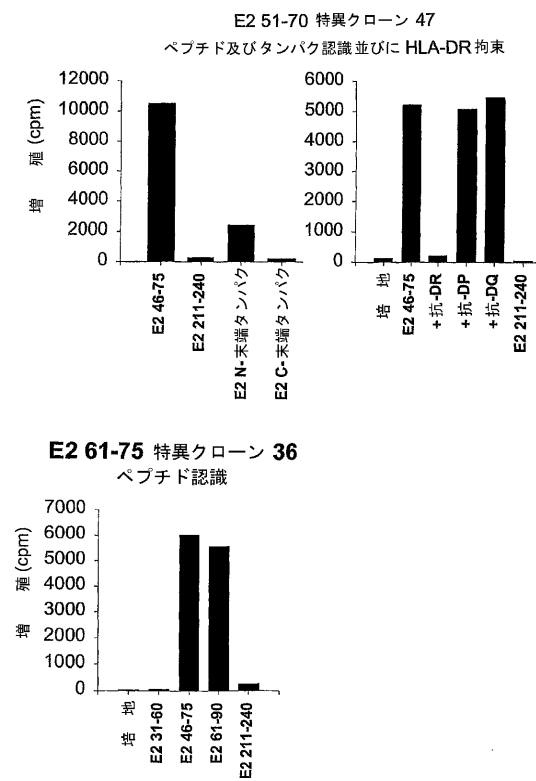
【図 1 4】



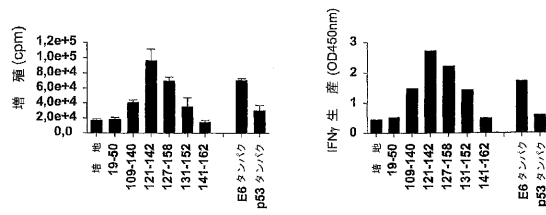
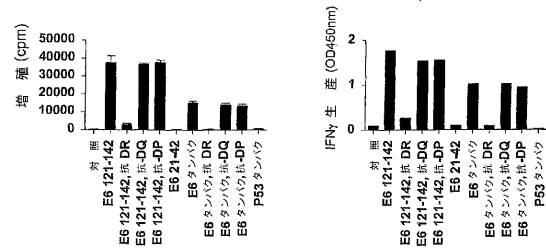
【図 1 3】



【図 1 5】



【図 16】

E6 127-158 刺激 HLA-DR1⁺ PBMCE6 127-158で刺激されたPBMCから誘導されたクローン9
増殖におけるHLA-DR制限及びIFN γ 生産

【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
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/070006 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 39/39
Everardus, Maria [NL/NL]; Hogewoerd 32c, NL-2311
TN Leiden (NL).
- (21) International Application Number: PCT/NL.01/00893
- (22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)
(74) Agent: PRINS, A., W.; Vereenigde, Nieuwe Parklaan 97,
NL-2587 BN The Hague (NL).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00204398.2 8 December 2000 (08.12.2000) EP
01203298.3 31 August 2001 (31.08.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US):
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL/NL];
Albinusdreef 2, NL-2333 ZA Leiden (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER BURG,
Sjoerd, Hendrikus [NL/NL]; Schaberthof 15, NL-2742
BT Waddinxveen (NL). OTTENHOFF, Tom, H., M.
[NL/NL]; Houllaan 7a, 2334 KB Oegstgeest (NL).
GELUK, Annetiecke [NL/NL]; C. Kempenaarslaan
69, NL-2481 XA Woubrugge (NL). SCHOENMAEK-
ERS-WELTERS, Maria, Johanna, Philomena [NL/NL];
Brandts Buyskade 35, NL-2324 LR Leiden (NL). DE
JONG, Annetiecke, M. [NL/NL]; Reguliersdwangracht
16, NL-1017 LR Amsterdam (NL). OFFRINGA, Rienk
[NL/NL]; Stichtjesmat 63, NL-2312 SJ Leiden (NL).
MELIEF, Cornelis, Johannes, Maria [NL/NL]; Wil-
helmina 33, NL-2012 KC Haarlem (NL). TOES, Rene,
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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,
NI, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: LONG PEPTIDES OF 22-45 AMINO ACID RESIDUES THAT INDUCE AND/OR ENHANCE ANTIGEN SPECIFIC
IMMUNE RESPONSES

(57) Abstract: The invention is concerned with epitopes derived from human papilloma virus, and peptides having a size of about 22-45 amino acid residues comprising minimal T cell epitopes. The invention further provides clinically relevant approaches for im-
munizing subjects against Mycobacterially and/or virally infected cells or tumor cells, and in particular against HPV. The invention
demonstrates that peptide sequences of 22-35 amino acid residues in length can induce both peptide-specific CD8+ cytolytic cells
and CD4+ T-helper cells. Moreover, the invention demonstrates that vaccination with 22-35 residue long peptides results in a more
vigorous CD8+ cytolytic T-cell response than vaccination with peptides of the exact minimal CTL epitope length. The invention
further demonstrates that the intrinsic capacity of certain minimal CTL epitopes which instead of activating cytolytic effector cells
tolerize these cytolytic cells, can be overcome by use of these 22-35 amino acid long peptides. The invention further provides clin-
ically relevant approaches for vaccination and/or treatment of subjects against HPV. The invention also provides methods and uses
suited to treat subjects suffering from progressive lesions and/or cervical cancer.

WO 02/070006

1

PCT/NL01/00893

Title : Long peptides of 22-45 amino acid residues that induce and/or enhance antigen specific immune responses.

The present invention relates generally to the field of medicine, and more specifically to induction and/or enhancement of a T cell response directed towards an antigen, using peptides comprising specific epitopes for said antigen.

The invention is exemplified mainly by using HPV directed immunity as a model. However, the invention should not be read as being limited to HPV but rather as being relevant for a wide variety of immune related or relatable diseases.

HPV infection is highly prevalent among young, sexually active male and female individuals. Large prospective studies showed that acquisition of HPV from male partners is common, occurring in 40-60% of subjects during a 3 year follow-up period (Koutsky *et al.*, 1997, Ho *et al.*, 1998, Marrazzo *et al.*, 2000). Therefore, HPV is probably the most common sexually transmitted disease.

Papillomaviruses of the high-risk types (*e.g.* HPV16, 18, 31, 33, and 45) are responsible for cervical cancer (Bosch *et al.*, 1995, Zur Hausen, 1996). Following infection of the basal epithelial cells, the immediate HPV early genes E1, E2, E5, E6 and E7 are expressed. The E1 and E2 genes regulate viral replication. Furthermore, the E2 protein controls the expression of the E6 and E7 oncoproteins. The E6 protein of the high-risk HPV types specifically binds to p53 and targets its rapid degradation through the ubiquitin pathway. P53 is involved in initiation of apoptosis and loss of this protein result in the prevention of apoptosis (Scheffner *et al.*, 1990). The E7 protein of high-risk types binds to pRB, which normally prevents cells from entering the cell cycle by inactivating E2F, a protein needed for cell cycle entry (Dyson *et al.* 1989). E7 expression results in the failure of infected cells to withdraw from the cell cycle and differentiate. Prolonged and elevated expression of the E6 and E7 oncoproteins is tightly associated with HPV-induced dysplasia and transformation into cervical carcinoma.

The protective role of the immune system in the defense against HPV-related diseases and HPV-induced cancer in humans is suggested by the fact that compared to normal controls, immunosuppressed renal transplant patients and patients infected with HIV display a 17-fold greater incidence of genital HPV infection (Ho *et al.*, 1994, Matorras *et al.* 1991, Halpert *et al.* 1986). The diminished capacity of immunosuppressed individuals to resolve HPV infection indirectly points towards a protective role of the

WO 02/070006

2

PCT/NL01/00093

immune system early in infection. Evidence of protection against HPV via immunity against the early antigens E2, E6 and E7 comes from the cottontail rabbit papillomavirus model which is the major animal model for cancer-associated papillomaviruses. Vaccination with the nonstructural proteins E1 and E2 induces the regression of virus-induced papillomas whereas viral tumor growth is suppressed. Furthermore, rabbits vaccinated with the combination of the E1, E2, E6, and E7 genes were completely protected against viral challenge (Han *et al.* 1999, Selvakumar *et al.* 1995). These data indicate that immunity against E2, E6, and E7 can be effective as immunoprophylaxis of papillomavirus infection as well as therapeutically for HPV-induced lesions and cancer.

Considerable interest exists in the identification of epitopes involved in the immune response to HPV16, given the possibility to incorporate these as subunits into a vaccine or to use these epitopes to monitor vaccine induced immunity *in vivo*. Since most epithelial cells express MHC class I but not class II, the attention has so far been focused on the induction of tumoricidal HPV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes (Melief *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1996). HPV-specific CD8+ T-cell reactivity has been found in the peripheral blood of patients diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia grade III (CIN III) lesions or cervical carcinoma (Nimako *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1996) and in tumor-infiltrating T-cell populations isolated from patients with cervical cancer (Evans *et al.*, 1997). Tumor-specific CD4+ T helper ("Th") immunity is now also considered pivotal for the efficient eradication of solid tumors, despite the fact that most of these tumors do not express MHC class II (reviewed in Melief *et al.*, 2000; Pardoll and Topalian, 1998; Toes *et al.*, 1999). Recent evidence indicates that CD4+ tumor specific T-cells are required not only for optimal induction of CD8+ tumor specific CTL but also for optimal exertion of local effector cell function by these CTL (Ossendorp *et al.*, 1998, Toes *et al.*, 1999). For induction of MHC class I restricted tumor-specific immunity, cross-presentation of antigens that have been captured by professional antigen presenting cells appears to play a dominant role. For proper induction of tumor-specific CTL by cross-priming tumor-specific CD4+ T cell help is required (Toes *et al.*, 1999, Schoenberger *et al.*, 1998). A positive role for HPV-specific Th-immunity was suggested by the predomination of CD4+ T-cells in regressing genital warts (Coleman *et al.*, 1994) as well as by the detection of delayed-type hypersensitivity responses to HPV16 E7 in the majority of subjects with spontaneous regressing CIN lesions (Hopfl *et al.*, 2000). Furthermore, HPV16-specific CD4+ T-cells have been detected in the blood of patients with persistent

WO 02/070006

3

PCT/NL01/00893

HPV infections, high-grade CIN lesions or cervical cancer (de Gruijl *et al.*, 1998). For the less prevalent oncogenic types HPV59 and HPV68, HLA-DR4 restricted Th-cells were isolated from the T-cells that infiltrated a cervical cancer lesion (Hohn *et al.*, 1999). In contrast, despite the presence of HPV16 in the majority of progressive CIN lesions and cervical cancers, no in depth information is available concerning HLA-restriction and epitope specificity of HPV16-specific T-helper responses.

For a clinically relevant approach of immunizing subjects, for instance against (Myco)bacterially and/or virally infected cells or tumor cells, and HPV in particular, it is preferred that both specific T-helper cells and CTL are induced. We have already shown that immunization with minimal CTL epitopes results in protection against tumors in some models (Felikamp *et al.* 1993, Kast *et al.* 1991) whereas, in other models, it can lead to tolerance or functional deletion of virus- and tumor-specific CTL that when otherwise induced are protective (Toes *et al.* 1996ab). The occurrence of tolerance or functional deletion decreases the effects of vaccination significantly. However, until the present invention there was no solution for this phenomenon. Epitopes involved with this effect were therefore not suitable for immunization purposes. Processing of exogenous antigens for presentation by MHC class I molecules by cross-priming as well as by other mechanisms is now widely recognized second pathway of processing for presentation by MHC class I, next to the well known endogenous route (Jondal *et al.* 1996, Reimann *et al.* 1997). The normal outcome of antigen processing via this pathway is CTL tolerance, unless APC activation by CD4+ T-cells takes place (Kurts *et al.*, 1997). Furthermore, in several studies with murine virus infections, a positive correlation was detected between the frequency of CTL precursors and protective immunity (Sedlik *et al.* 2000, Fu *et al.*, 1999). For an optimal induction of CTL, presentation of CTL epitopes preferably takes place at the surface of professional antigen presenting cells (APC's) such as dendritic cells (Mellman *et al.* 1998, Rodriguez *et al.* 1999). Whereas minimal CTL- and Th-epitopes can, without the need of processing by professional antigen presenting cells, be presented to T-cells, proteins need to be taken up and processed for an optimal presentation of CTL and Th-epitopes in MHC class I and MHC class II, respectively, can occur (Manca *et al.* 1994).

The present invention is concerned with means and methods for improving antigen specific immune responses. To this end the invention provides a method for inducing and/or enhancing an antigen specific T cell response comprising providing a system

WO 02/070006

4

PCT/NL01/00893

capable of exhibiting said response with a peptide comprising a T cell epitope specific for said antigen, said peptide comprising 22-45 amino-acid residues. These peptides can be synthesized efficiently whereas they also allow efficient uptake by cells capable of processing said peptide and present processed epitopes in the context of MHC-I or MHC-II. Preferably, said peptide is processed by a professional antigen presenting cell. Antigen presenting cells and particularly professional antigen presenting cells such as dendritic cells are very efficient in processing and presenting epitopes, whereas they further comprise additional functionalities allowing efficient communication with T-cells which ultimately leads to improved induction and/or enhancement of said antigen specific T cell response. Thus in a preferred embodiment a method of the invention is provided wherein said peptide comprises a sequence capable of activating an antigen presenting cell. By a sequence capable of activating an antigen presenting cell is meant a sequence which is capable of at least partly activating an antigen presenting cell, preferably a professional antigen presenting cell. Said activation preferably leads to presentation of at least one epitope of said peptide at the surface of said APC. In a particularly preferred embodiment said peptide comprises at least two T cell epitopes for said antigen. The presence of two T cell epitopes for said antigen allows an even more efficient induction and/or enhancement of said antigen specific T cell response. Preferably, at least one of said epitopes comprises a T-helper cell epitope for said antigen or a cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope for said antigen. Having at least one or the other epitope present on the peptide is favorable. Efficient induction and/or enhancement is achieved when said peptide comprises a T-helper activating sequence. By a T-helper activating sequence is meant herein a sequence capable of at least partly activating a T-helper cell. Said activation preferably leads to improved induction and/or enhancement of said antigen specific T cell response. In one embodiment said peptide comprises at least one T-helper cell epitope for said antigen and at least one cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope for said antigen. Surprisingly, it was found that with such peptides the problem of induction of (partial) tolerance against epitopes on said peptide does not, or to a lesser extent, occur whereas induction and/or enhancement of a specific T cell response for said antigen is very efficient. Thus in a particularly preferred embodiment of the invention said peptide comprises at least one T-helper cell epitope for said antigen and at least one cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope for said antigen.

An epitope for an antigen is capable of interacting with a T-cell receptor specific for said antigen, said T-cell receptor being specific for an MHC-I or MHC-II molecule presenting

WO 02/070006

5

PCT/NL01/00893

an antigen derived or derivable peptide comprising said epitope. Though said T-cell receptor must be capable of interacting with a peptide derived or derivable from said antigen, said epitope can be present on a wide variety of different compounds. Generally an epitope for antigen is present on an immunogenic part of said antigen, said part being at least 9 amino-acids long and capable of being presented by an MHC-I or MHC-II molecule. With the current technology, however, it is possible to provide epitopes that are generated in an entirely different way or comprising different matter. For instance, once a fragment of said antigen is known to comprise an epitope, peptides can be generated that are different in one or more amino-acid positions. Subsequently the presence or absence of said epitope can easily be verified by, for instance, an ELISPOT assay using a T cell specific for said epitope. Epitopes for an antigen can be present on a variety of different molecules such as but not limited to peptides, modified peptides, peptidomimetics.

A peptide of the invention may comprise an epitope for any particular antigen. However, preferably said antigen comprises a (Mycobacterial and/or viral protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof. In one aspect of the invention, said antigen comprises a Mycobacterium protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof. In a preferred embodiment of the invention said antigen comprises hsp65 369-412 (Ottenhof et al., 1991; Charo et al., 2001). Hsp65 369-412 comprises an HLA-A*0201 epitope at position 369-377, recognized by cytotoxic T-cells, and a DR5 epitope at position 390-412, recognized by T-helper cells. In another preferred embodiment, said antigen comprises a human papillomavirus (HPV) protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof. An immunogenic part, derivative and/or analogue of a protein comprises the same immunogenic capacity in kind not necessarily in amount as said protein itself. A derivative of such a protein can be obtained by preferably conservative amino acid substitution.

More preferably, said protein comprises E2, E6 and/or E7. Regions were identified in the E2, E6 and E7 sequence that were most immunogenic. Furthermore, a number of naturally processed Th-epitopes mapping in this region were identified. Methods included respectively short and long-term PBMC cultures derived from healthy blood donors. The PBMC cultures were stimulated with peptides of 22-35 amino acid residues in length. In parallel, the in vivo induced E2, E6 and E7-specific immunity, as detected by IFN γ ELISPOT assays, was analyzed in healthy subjects as well as subjects

WO 02/070006

6

PCT/NL01/00893

diagnosed with HPV16+ lesions.

Pathogen and tumor-specific T helper immunity was found to play a pivotal role in the natural and vaccine-induced immune defense against viral infections and tumors. The Th response against the human papilloma virus type 16 (HPV16) E2, E6 and E7 proteins was investigated in detail. By means of short and long term PBMC cultures from HLA-typed healthy donors, we identified three separate regions in the E2 protein (E2 31-120; E2 151-195; E2 271-365), the C-terminal part of HPV16 E6 (E6 81-158) and the central part of HPV16 E7 (E7 31-77) as the major immunogenic region within these antigens. Furthermore, we mapped ten distinct Th-epitopes within these proteins (DR1/E2 351-365, DR2/E2 316-330, DR2/E2 346-355, DR4/E2 51-70, E2 61-76, DQ6/E2 311-325, DR15/E7 50-62, DR3/E7 43-77, DQ2/E7 35-50, DR1/E6 127-142).

By employing the IFN γ ELISPOT analysis, we detected in the CD45RO+ T-cell memory subset Th-immunity against HPV16 E2 and HPV16 E6 in healthy individuals, suggesting E2 and E6 directed protective immunity against previous HPV infection. Furthermore, Th-immunity was detected towards HPV16 E7 in subjects with HPV16+ lesions. Several of these responses matched with the three E7-derived Th-epitopes defined in this study. A number of other HPV16+ subjects did not display any E7-specific type 1-cytokine producing T cell immunity, indicating failure of the immune response.

We have demonstrated that long peptides containing both CTL and Th-epitopes do not only induce antigen specific Th-cells but can induce antigen-specific CTL as well. Such peptides can also enhance antigen specific CTL responses. In contrast with immunization of C57/Bl6 mice with the minimal E1A-derived CTL epitope (SGPSNTPEI) which results in enhanced tumor outgrowth, immunization with the HPLC purified 32 amino acid long peptides containing this minimal CTL epitope of adenovirus E1A protein (RECNSSTDSCDSGPSNTPEIHPVVRLCPPIKP) resulted in protection against a challenge with adenovirus E1A +RAS transformed tumor cells. Furthermore, HPV16 specific H-2Db-restricted CTL were induced upon immunization with 35 amino acid residue long peptides, containing the minimal 9 amino acid long CTL epitope RAHYNIVTF, as shown by the presence of H-2Db-RAHYNIVTF tetramer positive CD8+ T-cells in a FACS analysis of spleen cells. Notably, in a direct comparison the CTL responses induced by the 35-mer peptide were by far stronger than CTL responses induced by the minimal CTL epitope and this difference was even more pronounced after specific activation of professional antigen presenting cells that can take up, process and present epitopes in the long peptide optimally. Furthermore, the

WO 02/070006

7

PCT/NL01/00893

present invention shows that stimulation of CTL by said long peptides, in the presence of antigen presenting cell activating agents, results in the complete eradication of small tumor nodules. In contrast, said minimal CTL epitope is not capable of inducing complete eradication of tumors in all mice.

Thus, vaccination with a long peptide of the invention circumvents the induction of tolerance which can occur when minimal CTL epitope peptides are used. A long peptide of the invention leads to a higher amount of CTL, generally associated with better protection. Without being bound by theory, at least one of two independent mechanisms account for this. One mechanism is the physical linkage of T-helper epitopes and CTL epitopes in one peptide. Another mechanism is the preferential presentation of at least one CTL- and/or T-helper-epitope present in a long peptide of the invention by professional antigen presenting cells. Because of its size, which excludes direct binding of a peptide of the invention to MHC class I, said peptide needs to be taken up by professional APC (eg. Dendritic Cells) that are able to process exogenously derived antigens and present peptides in MHC class I. Other cells are far less capable of processing and subsequent presenting epitopes. Thus background presentation by non-professional APC's is at least in part prevented. The effect of preferential targeting of a peptide of the invention to APC is enhanced when a long peptide of the invention is used together with a dendritic cell-activating agent, which is a preferred embodiment. In another preferred embodiment said antigen comprises an auto-antigen, preferably a tumor cell specific auto-antigen or a functional part, derivative and/or analogue thereof. The term "auto-antigen" refers to an antigen that is encoded by the animal species the T-cell belongs to. It also refers to an antigen that arises or becomes expressed as a result of aberrant expression, modification, folding of proteins of said animal and/or mutation of sequences in the DNA or RNA of a cell encoding a protein of said animal. In a preferred embodiment said auto-antigen comprises a MAGE, CTA or PSA antigen. In a particularly preferred embodiment said peptide comprises an antigen specific T-cell epitope that induces tolerance and/or functional deletion of antigen specific CTL and/or T-helper cells in said system.

It is well known in the art that antigen specific immune responses may be strengthened by providing systems capable of exhibiting said responses with an adjuvant. Adjuvants are also useful in the present invention. In a preferred embodiment said adjuvant comprises an exosome, a dendritic cell, MPL (monophosphoryl lipid A), poly I:C, Ampligen (poly I : poly C₁₂ U) and/or CpG nucleic acid.

According to the present invention, the advantage of epitope-linkage lies in the increased chance for simultaneous presentation of both the MHC class I and class II restricted epitopes on the surface of a single APC, thereby facilitating the delivery of cognate T cell help to CTL priming. Presentation by professional antigen presenting cells is preferred, because said cells can take up antigen more efficiently as compared to non-professional antigen presenting cells. Moreover, only professional antigen presenting cells are capable, in response to antigen uptake, of activating T helper cells. Said activation is important for an optimal immune response.

The level of the CTL response is dependent on activation of dendritic cells as shown in this invention. One of the mechanisms that result in the high efficacy of our long peptide HPV16 E7-vaccine, is the fact that the natural HPV16 E7 sequence contains a T helper- and CTL epitope that are physically linked to each other. To obtain long peptides containing Th-epitopes and CTL epitopes that are preferably presented by professional antigen presenting cells, one can link two or more T-helper and CTL epitopes that are not naturally occurring sequences but that result in a considerable sized peptide. These T-helper and CTL epitopes can be derived from two different antigens, are preferably from the same tumor cell or pathogen but may be unrelated. According to the invention, a T cell response directed towards a specific antigen can as well be induced or enhanced with a long peptide of the invention comprising a Th-epitope which is unrelated to said antigen. APC can generally be activated by said unrelated Th-epitope. However, preferably said Th-epitope is related to said antigen.

There are many systems available in which antigen specific immune responses can be induced and/or enhanced by providing said system with a peptide comprising an epitope specific for said antigen. For instance, in vitro cultures of peripheral blood mononuclear cells. Many other systems are available. However, in preferred embodiment of the invention said system comprises an animal. More preferably, said animal comprises a human.

A method of the invention is very suited for providing an animal with immunity against said antigen and/or for enhancing said immunity. Methods of the invention are suitable for any purpose that other immunization strategies are used for. Of old immunizations are used for vaccination purposes, i.e. for the prevention of disease. However, methods of the invention are not only suitable for preventing disease. Methods can also be used

WO 02/070006

9

PCT/NL01/00893

to treat existing disease, of course with the limitations that the disease is treatable by inducing and/or enhancing antigen specific T cell immunity. This feature can be used to treat, for instance, diseases associated with viral infections, such as some cancers. In principle, any disease curable in an immune related fashion can profit from methods of the invention. In a preferred embodiment said animal is suffering from or at risk of suffering from a disease that is at least in part treatable or preventable by inducing and/or enhancing said immune response. Preferably said disease comprises a viral disease and/or cancer. In another preferred embodiment said disease comprises a (myco)bacterial infection.

In another aspect the invention provides a peptide comprising 22-45 amino acid residues, comprising a T cell epitope specific for an antigen. Preferably, said peptide comprises at least two T cell epitopes specific for said antigen. Preferably said peptide comprises a CTL epitope for said antigen or a T helper cell epitope for said antigen. In a particularly preferred embodiment said peptide comprises a CTL epitope for said antigen and a T helper cell epitope for said antigen. Preferably said CTL and/or T-helper epitope for said antigen leads to tolerance or functional deletion of CTL and/or T-helper cells, respectively, specific for said epitope, when present on a peptide comprising 21 amino acid residues or less.. In a preferred embodiment said peptide comprises between 22-35 amino acid residues. More preferably, said peptide comprises between 32-35 amino acids.

The invention further provides a use of a peptide of the invention for inducing and/or enhancing an immune response specific for said antigen. Provided is also the use of a peptide for the preparation of a vaccine. Preferably, for the preparation of a vaccine for the treatment and/or the prevention of an HPV-related disease and/or cancer. Further provided is a use for the preparation of a medicament. Preferably for the preparation of a medicament for the treatment of an individual suffering from or at risk of suffering from a viral disease and/or cancer. In another preferred embodiment said individual is suffering from or at risk of suffering from a (myco)bacterial disease.

In yet another aspect the invention provides a method of the invention further comprising obtaining an antigen specific T cell from said system. Thus also provided is an isolated T cell obtainable by a method of the invention. Said T-cell can of course also be used for preparing a medicament. Provided is also a vaccine comprising a peptide of

WO 02/070006

10

PCT/NL01/00893

the invention. Provided is also a medicament comprising a peptide or a T-cell of the invention.

Peptides of the invention can also be used to determine whether a collection of cells comprises an antigen specific T cell, said peptide comprising an epitope for said antigen. For instance for determining whether an individual comprises immunity for said antigen. The presence of said T cell is, preferably determined by ELISA, ELISPOT, delayed type hypersensitivity response, intracellular cytokine staining, and/or extracellular cytokine staining.

In another aspect the invention provides a peptide comprising an immunogenic epitope selected from an immunogenic region of human papilloma virus type 16 E2, E6 and E7 proteins. Preferably, said immunogenic regions comprises three separate regions in the E2 protein (E2₃₁₋₁₂₀; E2₁₅₁₋₁₉₅; E2₂₇₁₋₃₆₅) spanning amino acid 31-120, 151-195 and 271-365 of human papillomavirus 16 E2 protein, the C-terminal region of HPV16 E6 (E6₈₁₋₁₅₈) spanning amino acid region 81-158 in the HPV 16 E6 protein and the central part of HPV16 E7 (E7₃₁₋₇₇) spanning amino acid 31-77 of a human papilloma virus 16 E7 protein.

More preferably said immunogenic regions comprises in said E2 protein a region spanning amino acid 46-75, a region spanning amino acid 51-70, a region spanning amino acid 61-76, a region spanning amino acid 316-330, a regions spanning amino acid 311-325, a region spanning amino acid 346-355 and a region spanning amino acid 351-365. In addition said immunogenic regions comprises in said E6 protein a region spanning amino acid 81-158. More preferably said immunogenic regions comprises in said E6 protein a region spanning amino acid 121-142, and a region spanning 127-140. In addition said immunogenic regions comprises in said E7 protein a region spanning amino acid 35-50, a region spanning amino acid 50-62 and/or a region spanning amino acid 43-77. A T-helper cell response can be very well elicited and/or enhanced, using anyone of the above-mentioned immunogenic regions. Notably, these immunogenic regions are able to elicit/enhance T-helper responses restricted by different HLA class II molecules.

In another aspect the invention provides a method to induce and/or enhance a T cell response directed towards an antigen, comprising contacting a T cell with a peptide, having a size of about 22-45 amino acid residues, which comprises a minimal T cell

WO 02/07006

11

PCT/NL01/00893

epitope of said antigen. Preferably, a peptide of the invention has a size of about 22-40 amino acid residues. Said minimal T cell epitope is preferably presented in the form of a peptide having a size of about 22-40 amino acid residues, because we found that the issue of tolerance or functional deletion of CTL by immunization with minimal epitopes can be circumvented by the use of long peptides (22-45; preferably 22-40 amino acid residues) which are able to prime CTL and/or T-helper cells. Said long peptides, comprising at least one minimal T cell epitope, are capable of inducing and/or enhancing a T cell response. Immunization with said long peptide, comprising a minimal T cell epitope, results in protection even when said minimal epitope leads to tolerance or functional deletion of virus- and tumor specific CTL when administered in a bare form to said CTL. Said minimal T cell epitope may be derived from an immunogenic region of the invention. Thus, in one aspect, the invention provides a method according to the invention, wherein said minimal epitope leads to tolerance or functional deletion of virus- and tumor-specific CTL when administered in a bare form to said CTL.

In another aspect the invention provides a method to induce and/or enhance a T cell response directed towards an antigen, comprising contacting said T cell with a peptide, having a size of about 22-45 amino acid residues, which comprises a minimal T cell epitope of said antigen. Said minimal T cell epitope is presented in the form of a peptide having a size of about 22-45, preferably of about 22-40, amino acid residues because we found that the induction of (virus- and tumor-specific) CTL is more efficient with said long peptides and results in higher numbers of antigen-specific CTL. The use of said long peptides results in a more efficient presentation of the comprised CTL and/or Th-epitopes. Without being bound by theory it is thought that long peptides need to be processed and presented by professional antigen presenting cells. Supporting evidence for this theory comes from a more efficient induction of CTL immunity after vaccination with said long peptides and professional antigen presenting cells-activating agents.

Contacting a T cell with a peptide, in terms of the invention, is preferably performed by means of a MHC class I or MHC class II molecule. Said MHC molecule may present said peptide after processing of the peptide to said T cell. An antigen of the invention can be an antigen derived from a virus, a bacterium or associated with tumor cells. Preferably an antigen comprises a protein of human papillomavirus (HPV). More preferably, said HPV comprises HPV 16. In a most preferred aspect, said protein comprises HPV 16 E2, E6 and/or E7. Said long peptides are capable of priming CTL

WO 02/070006

12

PCT/NL01/00893

and/or T-helper cells. Therefore, in one aspect the invention provides a method according to the invention, wherein said T cell comprises a CD8+ CTL. Alternatively, said T cell comprises a CD4+ T helper cell.

By inducing a T cell response is meant herein that a T cell response directed towards a certain antigen is elicited. Before said induction, said T cell response was not present, or below detection levels or not functional. By enhancing a T cell response is meant herein that the overall action of T cells directed towards a certain antigen is made higher and/or more efficient compared to the overall action of said T cells before said enhancement. For instance, after said enhancement more T cells directed towards said antigen may be generated. As a result, the action of the additionally generated T cells increases the overall action against said antigen. Alternatively, said enhancement may comprise the increment of the action of T cells directed towards said antigen. Said T cells may for instance react stronger and/or quicker with said antigen. Of course, the result of said enhancement may be generation of additional T cells together with increment of the action of said T cells. Alternatively, said enhancement may comprise generation of additional T cells, or increment of the action of T cells, only.

A minimal T cell epitope is defined herein as a peptide derived from an antigen, capable of inducing a T cell response against said antigen. Said minimal T cell epitope is suitable to be bound by a class I or II Major Histocompatibility molecule. Typically, a minimal CTL epitope consists of 8-11 amino acids. A minimal T cell epitope which is to be bound by an MHC class II molecule preferably at least consists of 11 amino acids. In terms of the invention, administering a minimal epitope in a bare form means that said epitope is administered as a peptide having the size of said epitope, or as a peptide comprising said epitope flanked on one or both sides with additional sequences, the size of said peptide being less than 22 amino acid residues. For instance, said epitope may be flanked by processing sites.

With the teachings of the present invention it is possible to induce and/or enhance a T cell response directed towards an antigen using a peptide of the invention. Of course, examples of said peptide are also herewith provided. Thus, one embodiment of the invention provides a peptide, having a size of about 22-45, preferably of about 22-40 amino acid residues, comprising at least one minimal T cell epitope. Said peptide comprises a minimal CTL epitope, and/or a minimal T helper cell epitope. Preferably said peptide comprises an immunogenic epitope of the invention.

WO 02/07006

13

PCT/NL01/00893

A peptide of the invention is more suitable to be used for vaccination purposes than a minimal epitope in a bare form, if immunization with said minimal epitope leads to tolerance or functional deletion of CTL. Thus in one aspect the invention provides a peptide according to the invention, wherein said minimal CTL epitope leads to tolerance or functional deletion of virus- and tumor-specific CTL when administered in a bare form to said CTL. A peptide of the invention preferably has a size of about 22-45 amino acid residues. Preferably, a peptide of the invention has a size of 22-35 amino acid residues. More preferably, a peptide of the invention comprises 32 amino acid residues. In another aspect a peptide of the invention comprises a size of 35 amino acid residues.

A peptide of the invention is more suitable to be used for vaccination purposes than a minimal epitope in a bare form, if immunization with a peptide of the invention leads to higher numbers of CTL. This can be achieved by assuring that presentation predominantly takes place by professional antigen presenting cells. Thus in one aspect the invention provides a peptide according to the invention wherein said peptide leads to higher numbers of virus- and/or tumor-specific CTL than when minimal CTL epitopes are administered. In another aspect a peptide of the invention leads to a vigorous CTL response capable of eradicating (small) tumor nodules.

The art currently knows many ways of generating a peptide. The invention is not limited to any form of generated peptide as long as the generated peptide comprises a minimal T cell epitope. By way of example, a peptide of the invention can be obtained from protein E2, E6 or E7, synthesized *in vitro* or by a cell, for instance through an encoding nucleic acid. A peptide of the invention can be present as a single peptide or incorporated into a fusion protein. In one embodiment said peptide is flanked by processing sites allowing processing of said peptide inside a cell such as to allow transport and/or incorporation into an MHC molecule on the surface of said cell. In a preferred embodiment a peptide of the invention is after processing capable of complexing with an MHC class II molecule. MHC class II restricted T-cell immunity is currently considered to be important in eradication of for instance tumor cells although said tumor cells often do not express MHC class II molecules. Peptides of the invention are particularly well suited for eliciting, inducing and/or stimulating both MHC class I and MHC class II dependent T cells. Thus, in one aspect the invention provides a use of a peptide of the invention to induce and/or enhance a T cell response directed towards an antigen. A method to elicit and/or enhance an immune response in an individual, comprising administering to said individual a peptide of the invention is also herewith

WO 02/070006

14

PCT/NL01/00893

provided. In another aspect, the invention provides a use of a peptide of the invention for the preparation of a vaccine. Preferably, said vaccine comprises a vaccine for, at least in part, prophylaxis of an HPV-related disease.

For instance, reactive T cells to HPV E2 and E6 protein have been found in healthy individuals indicating that the identified immunogenic regions in the HPV16 E2 and E6 protein comprises epitopes relevant for prophylactic anticancer treatments based on vaccination and/or adoptive immunotherapy approaches. Additionally, reactive T cells to HPV E7 and HPV E6 protein have been found in subjects comprising CIN III lesions and in subjects having cervical cancer. This indicates that the identified immunogenic regions of the HPV16 E7 and E6 protein comprise epitopes relevant for anticancer treatments based on vaccination and/or adoptive immunotherapy approaches.

Peptides of the invention are suited for the generation and/or induction of HPV specific T-cells. In one aspect the invention therefore provides a method for generating a human papilloma virus 16 specific T-cell comprising contacting a collection of naïve T-cells with a peptide of the invention and culturing at least part of said collection of T-cells. In another aspect the invention provides a method for inducing antigen-specific cytokine (like, for instance, IL-2 or IFN γ) production by a human papilloma virus 16 specific memory T-cell comprising contacting a collection of T-cells of a subject infected with human papilloma virus 16 with a peptide of the invention and culturing at least part of said collection of T-cells. In a preferred embodiment of these aspects said human papilloma virus 16 specific T-cell is isolated.

In yet another aspect a method of the invention further comprises obtaining a T cell directed towards an antigen, comprising inducing and/or enhancing a T cell with a method of the invention and collecting formed T cells directed towards said antigen. Of course, an isolated T cell obtainable by a method of the invention is also provided herein. Said T cell can be used in many ways, for instance for the detection of an epitope of the invention for instance in a diagnostic assay. However, preferably said T cell is used in immunotherapy approaches. Such approaches incorporate but are not limited to approaches wherein such T cells are infused into a subject suffering from an HPV-16 induced cervical cancer or lesion. Thus in one aspect the invention provides a use of a T cell of the invention for at least in part treatment of an HPV-related disease. In such approaches it is preferred that said T cell and said subject are histocompatible.

Although this may not always be true. In some cases mismatches for histocompatible even enhance the functionality of said T cell in said subject. The risk of developing graft versus host disease can often be limited by assuring that T cells not restricted to an

WO 02/070006

15

PCT/NL01/00893

epitope of the invention are not present in a graft given to said subject. Of course, host versus graft responses resulting in elimination of infused T cells of the invention can occur. To limit such responses histocompatibility is preferred. However, in case wherein eradication of tumor cells is very rapid, host mediated removal of grafted cells can be an advantage as an additional safety feature of immunotherapy. In one embodiment the invention therefore provides a method for eliciting and/or enhancing an HPV16 E2, E6 and/or E7 protein specific immune response in an individual comprising administering to said individual a peptide of the invention or a T-cell of the invention. A peptide of the invention is particularly suited to elicit HPV 16 specific immune responses in an individual. These immune responses can be sufficiently high to provide a subject with protection against infection by HPV-16. However, a peptide or a T cell of the invention can also be used to aid in combatting an already present infection in a subject. Thus another embodiment of the invention provides a use of a peptide or a T cell of the invention for the preparation of a medicament. Preferably, said medicament comprises a medicament for an HPV-related disease. Of course, a vaccine and/or a medicament comprising a peptide of the invention is also provided herewith. Said vaccine is particularly suitable for prophylaxis of an HPV related disease. Therefore the invention also provides a method for, at least in part, prophylaxis of an HPV-related disease, comprising administering to an individual a vaccine of the invention. A medicament of the invention is of course particularly suitable for treatment of an HPV related disease. Thus, a method for, at least in part, treatment of an HPV-related disease, comprising administering to an individual a medicament of the invention is also provided herewith. In another aspect the invention provides a method for determining whether a collection of T cells comprises a memory T cell specific for an epitope comprising providing said collection of T cells with a peptide of the invention comprising said epitope, culturing said collection of T cells in the presence of an antibody specifically directed towards an antigen-specific cytokine (like, for instance, IL-2 or IFN γ) and detecting any bound antigen-specific cytokine. In one embodiment said antibody is bound to a solid phase, preferably a solid surface. Said method is very useful to determine whether an individual has a T cell response directed towards a certain antigen, for instance towards an HPV protein. Said method can be used for diagnosis of an HPV infection. Alternatively, said method is suitable to determine whether a T cell response is elicited after vaccination of an individual. Preferably, said individual is provided with a vaccine of the invention. Thus one embodiment of the invention provides a use of a peptide of the invention to determine the presence of a T cell directed towards an antigen. In one

WO 02/070006

16

PCT/NL01/00893

embodiment, said presence of said T cell is determined in a sample. For instance, a blood sample from an individual can be obtained. After that, the presence of a T cell directed towards a specific antigen can be determined using a peptide of the invention, in an immunologic assay. For instance, the above mentioned method can be used. In this method, the detection of bound antigen-specific cytokine (like, for instance, IL-2 or IFN γ) indicates the presence of said T cell. Of course, a person skilled in the art can think of many more techniques for detection of a T cell directed towards a certain antigen, using a peptide of the invention. For instance ELISA, ELISPOT, delayed type hypersensitivity (DTH) response, intracellular cytokine staining and extracellular cytokine staining or the use of tetrameric MHC class II molecules comprising said peptides are important techniques, known by the artisan.

The invention is further explained by the use of the following illustrative examples.

WO 02/070006

17

PCT/NL01/00893

ExamplesExample 1**Material and Methods***Subjects and Controls.*

Samples of umbilical cord blood mononuclear cells (CBC) were used as immunologically naive controls for influenza matrix-specific responses. PBMC of HLA-typed, anonymous healthy blood bank donors (D) obtained after informed consent, served as control PBMC for HPV16 E7 and influenza matrix-specific responses. Since these donors are anonymous, no additional data is available. However, donors with a known recent history of infection, including abnormal pap-smear, were, as part of normal regulations, discouraged to donate blood. The study of subjects (S; Table I) with CIN or cervical carcinoma in this paper was nested in the "CIRCLE study" that investigates cellular immunity against HPV16 infected cervical lesions. Women presenting with histologically proven CIN III or cervical carcinoma at the department of gynecology of the Leiden University Medical Center (LUMC) were, after informed consent, enrolled in this study. The study design was approved by the ethics committee of the LUMC. Blood was drawn at day of treatment. Subjects with CIN III were treated by LEEP or cold knife conization. In case of stage IB-IIA a radical hysterectomy was performed. All individuals for whom enough PBMC were available were typed for HLA MHC class II (Naipal *et al.*, 1984). Subjects were typed for HPV16 using HPV16-specific primers on DNA isolated from paraffin-embedded sections of biopsies or surgical resection specimens (Claas *et al.*, 1989). Since HPV-specific T-helper response were expected to be found in subjects with progressive disease (de Gruijl *et al.*, 1998), we chose to analyze three subjects presenting with CIN III, 4 subjects with stage IB cervical cancer and 4 subjects with recurrent cervical cancer.

Antigens.

The peptides used spanning the E7 protein consisted of nine overlapping 22-mer peptides and are indicated by their first and last amino acid in the protein (1-22, 11-32,

WO 02/07006

18

PCT/NL01/00893

21-42, 31-52, 41-62, 51-72, 61-82, 71-92 and 77-98) or 4 long peptides defined by amino acids 1-35, 22-56, 43-77 and 64-98. The peptides spanning the influenza matrix 1 protein of A/PR/8/43 that were used as control peptides in the ELISPOT assay consisted of sixteen 30-mer peptides overlapping by 15 amino acids. Peptides were synthesized and dissolved as described previously (van der Burg *et al.*, 1999).

Recombinant HPV16-E7 protein, HPV16-E6 protein and HIV-1 RT protein (the latter two proteins served as control proteins in proliferation assays) were produced in recombinant *E. coli* transformed with Pet-19b-HPV16-E7, Pet-19b-HPV16-E6 (De Bruijn *et al.*, 1998) or Pet-19b-HIV-1 reverse transcriptase (RT) and purified as described previously (van der Burg *et al.*, 1999).

Memory Response Mix (MRM): A mixture of tetanus toxoid (1 LF/ml; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands) and *Mycobacterium tuberculosis* sonicate (2.5 µg/ml; generously donated by Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, The Netherlands) was used to control the capacity of PBMC to proliferate in response to typical recall antigens.

HLA-DR-peptide binding assay.

Binding of peptides was measured as reported previously (van der Burg *et al.*, 1999). Briefly, as a source of HLA-DR molecules B-lymphoblastic cell lines homozygous for HLA-DR were used: LG2.1 (DRB*0101, DR1), IWB (DRB1*0201, DR2), HAR (DRB*0301, DR3), BSM (DRB*0401, DR4) and Pitout (DRB1*0701, DR7). DR molecules were purified by affinity chromatography and the purity confirmed by SDS-PAGE. The analysis of peptide binding to purified HLA-DR molecules was performed using N-terminally fluorescence-labeled standard peptides. As standard fluorescent peptides in the binding assays, either HA 308-319 (PKYVKQNTLKLAT, DR1 and DR2), hsp65 3-13 (KTLAYDEEARR, DR3), HA 308-319 Y?F (PKFVKQNTLKLAT, DR4) or Ii 80-103 (LPKPPKPVSKMRMATPLMQA LPM, DR7) were used.

Immunogenicity Assay.

HPV16-E7 derived peptide induced proliferation of PBMC isolated from blood obtained from healthy donors was measured as described previously (van der Burg *et al.*, 1999). Briefly, PBMC were seeded at a density of 1.5×10^5 cells/well of a 96 well U-bottom plate (Costar, Cambridge, MA) in 200 µl of ISCOVE's medium (Gibco) enriched with 10%

WO 02/070006

19

PCT/NL01/00893

autologous serum, in the presence or absence of 10µg/ml of indicated 22-mer E7 peptide. As positive control, PBMC were cultured in the presence of a Memory Response Mix. Peptide specific proliferation was measured at day 6 by tritium-thymidine incorporation. Peptides were scored as immunogenic, *i.e.*, able to stimulate T-cells, when the proliferation of >25% of the 8 test wells exceeded the mean proliferation + 2 times the standard deviation of medium control wells.

Proliferation assays.

Cultures were pulsed with 0.5µCi [³H] thymidine (5Ci/mM, Amersham, UK) per well for 18 hours. Plates were harvested with a Micro cell Harvester (Skatron, Norway). Filters were packed in plastic bags containing 10 ml of scintillation fluid and subsequently counted in a 1205 Betaplate counter (Wallac, Turku, Finland).

MHC class II blocking experiments were carried out as described before using murine monoclonal antibodies against HLA-DQ SPV.L3, against HLA-DR B8.11.2 and against HLA-DP B7/21 (van der Burg *et al.*, 1999). Antibodies were added to APC 1 h prior to protein-APC incubation.

Isolation and expansion of HPV16-E7-specific T-helper cells.

Peptide-specific T-cell bulk cultures were generated as described previously (van der Burg *et al.*, 1999) using either the E7 22-mer or E7 35-mer peptides. Specific proliferation was measured by incubation of 50,000 responders with an equal amount of irradiated (30Gy) APC (autologous PBMC unless indicated otherwise) and peptide or protein as indicated. E7-peptide and -protein-specific bulk T-cells were cloned by limiting dilution as described previously (van der Burg *et al.*, 1999).

Cytokine assays.

To determine specific excretion of cytokines, T-cell clones were stimulated by incubation of 50,000 T-cells with an equal amount of APC (30Gy) together with 10µg/ml peptide, control peptide, E7 protein or control protein as indicated. After 24 hours of incubation, supernatant was harvested and replicate wells were pooled. Cytokine production was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) as described previously (van der Burg *et al.*, 1999).

WO 02/070006

20

PCT/NL01/00893

Analysis of antigen-specific T-cells by ELISPOT.

PBMC or cord blood cells (CBC) were seeded at a density of 2×10^6 cells/well of a 24 well plate (Costar, Cambridge, MA) in 1ml of ISCOVE's medium (Gibco) enriched with 10% FCS, in the presence or absence of 5µg/ml of indicated E7-derived 22-mer peptide. As positive control PBMC were cultured in the presence of indicated pools of influenza A/PR/8/34 M1 protein derived peptides consisting of 4 overlapping 30 amino acid long peptides in each pool. Based on our observations, we used a 4-day stimulation before PBMC were transferred to the ELISPOT plates. This resulted in a pronounced IFN γ - production towards influenza M1-derived peptides in the CD45RO+ (memory) subset of T-cells but not in naïve T-cells obtained from adult PBMC (unpublished observations). Following 4 days of incubation at 37°C, PBMC were harvested, washed and seeded in six replicate wells at a density of 10^5 cells/well of a Multiscreen 96-well plate (Millipore, Etten-Leur, The Netherlands) coated with a IFN γ catching antibody (Mabtech AB, Nacka, Sweden). The ELISPOT was further performed according to the instructions of the manufacturer (Mabtech). The number of spots were analyzed with a fully automated computer assisted video imaging analysis system (Carl Zeiss Vision). Specific spots were calculated by subtracting the mean number of spots + 2xSD of the medium only control from the mean number of spots of experimental wells. Antigen-specific T-cell frequencies were considered to be increased compared to non-responders when T-cell frequencies were $> 1/10,000$ PBMC.

Results*Identification of the immunogenic sequences within HPV16 E7.*

We set out to identify the sequences within the HPV16 E7 protein that function as major immunogenic determinants in the context of MHC class II. A set of HPV16 E7 derived overlapping peptides was tested for binding to HLA-DR 1, 2, 3, 4 and 7 in a quantitative peptide/MHC binding assay (Geluk *et al.*, 1995). Together, these HLA-DR molecules cover at least 50-60% of the caucasian, oriental and negroid populations (Baur *et al.*, 1984). Four peptides, E7₁₋₂₂, E7₄₁₋₆₂, E7₅₁₋₇₂ and E7₇₇₋₉₈, bound to three or more different HLA-DR molecules (Table II): peptide E7₁₋₂₂ bound to HLA DR2, 3, 4 and 7, peptide E7₄₁₋₆₂ bound to DR1, 2, 3 and 4 whereas peptide E7₅₁₋₇₂ bound to DR1, 3

WO 02/070006

21

PCT/NL01/00893

and 7 and peptide E7₇₇₋₉₈ bound to DR1, 2 and DR7. This is in accordance with the fact that the peptide binding restrictions for MHC class II molecules were found to be less strict than those for MHC class I (Rammensee *et al.*, 1995). Of note, these peptides failed to bind to one or two other DR molecules tested indicating that their binding, although rather ubiquitous in character, was specific.

Our subsequent experiments focused on the four peptides binding to multiple HLA-DR molecules, as these are the most likely to comprise naturally presented T-helper (Th) epitopes (Geluk *et al.*, 1998). We analyzed whether the peptides could stimulate T-cells to proliferate by adding these to PBMC from 13 HLA-typed healthy blood donors. This assay does not discriminate between the reactivity of memory T-cells and naïve, in vitro, primed T-cells but can be readily employed for identification of immunogenic peptides (van der Burg *et al.*, 1999). All four peptides were able to stimulate proliferative responses in PBMC from multiple donors (Table II). Most PBMC cultures reacted to the peptides E7₄₁₋₆₂ and E7₅₁₋₇₂ indicating that the central region of the E7 protein harbors the most immunogenic sequences and is likely to be targeted by the immune system in HPV16 infected individuals.

Table I Subject characteristics

Patient number	Age	HPV type	MHC class II type	Stage of Disease
1	38	16	HLA DR4, 11(5); DQ3	CIN III
2	41	16	HLA DR15(2), 3; DQ6(1), 2	CIN III
3	32	16	HLA DR15(2), 4; DQ3, 6	CIN III
4	67	16	HLA DR15(2), 4; DQ6(1), 8(3)	FIGO IB
5	59	16	HLA DR11(5); DQ3	FIGO IB
6	36	16	Non-Available	FIGO IB
7	28	16	HLA DR1, 7; DQ5(1), 2	FIGO IB
8	48	16	HLA DR15(2), 7; DQ6(1)	Recurrent cervical carcinoma
9	46	16	HLA DR15(2), 7; DQ6(1), 2	Recurrent cervical carcinoma
10	47	16	HLA DR6, 7; DQ1, 2	Recurrent cervical carcinoma
11	46	16	HLA DR3, DQ2	Recurrent cervical carcinoma

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

22

Table II Binding capacity and immunogenicity of HPV16-E7 derived peptides

	Binding							Immunogenicity												
	E7	DR1	DR2	DR3	DR4	DR7		D #1 DR1.3 DQ1.2	D #2 DR1.4 DQ5.8	D #3 DR2.4 DQ6.8	D #4 DR3.6 DQ5.2	D #5 DR2.3 DQ1.2	D #6 DR2.3 DQ6.2	D #7 DR1.3 DQ5.2	D #8 DR2.13 DQ6	D #9 DR4.7 DQ3	D #10 DR4.3 DQ5.2	D #11 DR7 DQ2	D #12 DR3.13 DQ6.2	D #13 DR7.13 DQ6.3
aa	1-22 ^a	>70 ^b	10	0.8	30	7		- ^c	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	11-32	>70	>70	50	>70	>70														
	21-42	>70	12	>70	>70	>70														
	31-52	>70	>70	>70	>70	NT														
	41-62	7.4	50	55	38	>70		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	51-72	70	>70	50	>70	11		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	61-82	>70	15	65	>70	>70														
	71-92	12	2	>70	>70	>70		+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	77-98	46	22	>70	>70	0.9		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Memory Response Mix																			

^a First and last amino acid number of 22-mer overlapping peptides derived from the HPV16-E7 protein.^b Binding capacity of each peptide is expressed as the IC50 value; this is the test peptide concentration (μM) at which 50% of the maximal binding of the standard fluorescence labeled peptide is inhibited. >70, indicates undetectable binding.^c Fresh PBMC derived from HLA-DR and -DQ typed healthy blood donors (D) were stimulated with peptides that bound to ≥ 3 different HLA-purified DR molecules. Donors were considered to react specifically to a peptide when >25% of all wells tested displayed a proliferation that exceeded the mean + 2x standard deviation of the medium only control. More than 85% of all wells stimulated with the Memory Response Mix were found positive.

Table III Evaluation of HPV16 E7-specific T cell responses by IFN γ ELISPOT

	CBC #1	CBC #2	CBC #3	D #20	D #21	D #22	D #23	D #24	D #25	D #26	S #1	S #2	S #3	S #4	S #5	S #6	S #7	S #8	S #9	S #10	S #11
HLA-DR	NA	NA	NA	3 ^a	15 (2)	1	2	4	1	11 (6)	4	15 (2)	15 (2)	15 (2)	11 (5)	NA	1	15 (2)	15 (2)	6	3
HLA-DQ	NA	NA	NA	13 (6)	13 (6)	4	4	8	7	11 (6)	3	4	4	4	4	7	13 (6)	7	7	7	2
E7				1,2	6 (1)	3,5	1	4,8	5	NA	3	6 (1), 2	6 (1), 3	6 (1), 3	3	NA	8 (1), 2	6 (1)	6 (1), 2	1, 2	2
1-22 ^a	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1	<1	<1	<1	<1	<1
11-32	<1	1	<1	15	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	8
21-42	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	<1	<1	<1	2
31-52	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	14
41-62	<1	2	2	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	14	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	5
51-72	<1	<1	<1	4	<1	<1	<1	<1	<1	<1	32	76	<1	<1	98	<1	<1	<1	<1	<1	<1
61-82	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	13
71-82	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
77-98	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	12	<1	<1	6	<1	<1	6
M1																					
pool 1	<1 ^b	<1	<1	8	9	46	<1	7	5	13	<1	<1	27	<1	<1	1	113	<1	<1	<1	15
pool 2	<1	<1	<1	12	36	41	<1	28	<1	65	8	<1	29	47	2	6	66	11	<1	<1	19
pool 3	<1	<1	<1	<1	47	42	<1	<1	9	17	92	6	<1	59	100	<1	41	39	<1	<1	20
pool 4	<1	<1	<1	<1	47	38	27	<1	16	2	<1	22	16	<1	40	<1	34	17	<1	<1	21

^a First and last amino acid number of 22-amino acid long peptides derived from the HPV16-E7 protein that were used to stimulate T-cells of umbilical cord blood cells (CBC), PBMC from donors (D) or PBMC from HPV16+ subjects (S). For the influenza M1 protein only the number of the pool is indicated. Each pool consists of four 30 amino acid long peptides that overlap by 15.

^b HLA class II typing of each individual. NA, non available

^c The number of antigen-specific cells per 100,000 cord blood cells or PBMC. Frequencies $\geq 1/10,000$ are depicted in bold. Underscored are the responses that match in specificity to that of T1-clones described in figures 1,2,3.

Mapping of naturally processed T-helper epitopes in HPV16 E7.

As a next step in the identification of Th-epitopes in HPV16 E7, peptide specific bulk T-cell cultures were generated from PBMC of HLA-typed healthy blood donors by repeated stimulation with several long peptides covering the central region of E7. The responding T-cells were subsequently tested for recognition of antigen presenting cells (APC) pulsed with either peptide or whole E7 protein. In the latter setting, presentation of the relevant peptide-epitopes requires antigen-uptake and -processing. Approximately 30% of the Th-cell cultures generated specifically responded to the peptides against which they were raised. Of these, three cultures also showed modest but specific activity against E7 protein pulsed APC, indicating the presence of Th-cells with the capacity to respond against naturally processed antigen (FIGs. 1a, 2a and 3a). FIG. 1b shows the reactivity of a Th-clone that was isolated from HLA-DR15, 4 and DQ6, 7 positive PBMC raised against peptide E7₄₁₋₆₂. These Th-cells specifically respond to APC pulsed with peptide E7₄₁₋₆₂, peptide E7₄₃₋₇₇ or E7 protein. The specificity of the response by this Th-clone exceeded that of the polyclonal culture from which this Th-clone was isolated (compare to FIG. 1a), illustrating that by limiting dilution we have succeeded in isolating the T-cells of interest. Further studies using MHC class II blocking antibodies against HLA-DR, -DQ or -DP (FIG. 1b) and partially MHC class II mismatched APC revealed that the Th-clone was restricted by HLA-DR15 (FIG. 1c). Fine mapping of the epitope showed that the core sequence recognized was E7₅₀₋₆₂. Furthermore, this Th-clone produced the Th type 1 cytokine IFN γ (FIG. 1d). In a similar fashion a HPV16 E7-specific Th-clone was obtained from HLA-DR3, DQ2 positive PBMC stimulated with peptide E7₂₂₋₄₆ (FIG. 2a). Also this Th-clone secreted IFN γ upon triggering by peptide E7₂₂₋₄₆ and E7 protein pulsed APC (FIG. 2bc). Further analysis showed that this Th-clone recognized the core sequence E7₃₅₋₅₀, as indicated the fact that both peptides E7₃₀₋₅₀ and E7₃₅₋₅₅ recognized, in an HLA-DQ2 restricted fashion (FIG. 2c). A third type 1 cytokine producing Th-clone with distinct specificity was derived from a HLA-DR1, 3 and DQ2 positive PBMC culture stimulated with peptide E7₄₃₋₇₇ (FIG. 3ab). This clone was HLA-DR3 restricted (FIG. 3cd) and produced IFN γ upon recognition of both peptide and protein pulsed APC (FIG. 3e). Whereas peptide E7₄₃₋₇₇ was recognized, the smaller peptide E7₄₁₋₆₂ was not, indicating that the C-terminal part of the E7₄₃₋₇₇ peptide harbors the core epitope. In conclusion, using established Th-clones we mapped three naturally processed epitopes in HPV16 E7. It is

WO 02/070006

25

PCT/NL01/00893

conceivable that HPV16+ individuals expressing the relevant MHC class II molecules display in vivo induced Th-immunity against these peptides.

Memory T-helper responses in subjects with HPV16+ CIN III lesions or cervical carcinoma.

In an approach parallel to the mapping of Th-epitopes using PBMC cultures of healthy individuals, the response against HPV16 E7 in subjects with HPV16+ lesions was analyzed (see Table I for subject characteristics). Primary, in vitro, stimulation of naive T-cells from newborns or adults can result in the production of IL-2 and proliferation of T-cells. However, at this stage such T-cells fail to secrete IFN γ . The production of IFN γ follows when the antigen is encountered again (Early and Reen, 1999; Pittet *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1999). This feature allowed us to discriminate between in vitro primed and memory T-cell responses by ELISPOT. Th-responses against the influenza A matrix (M1) protein, which are readily detectable in PBMC of most donors of diverse HLA-types (Table III and our unpublished observations), were measured in parallel as a positive control for the detection of memory T-cell immunity in the assay. Stimulation with M1-peptides of MACS-separated CD45RA+ (naïve) T-cells and CD45RO+ (memory) T-cells resulted in the production of IFN γ in the CD45RO+ subset only, confirming that our ELISPOT setup specifically detects memory responses (FIG. 4). Furthermore, cord blood cells (CBC), in accordance with their naive phenotype, did not react by secreting IFN γ when stimulated in vitro with influenza M1 derived peptides. In addition to the PBMC from all healthy donors, those from 9/11 of the HPV16+ subjects reacted to one or more pools of M1-peptides (Table III).

Analysis of HPV16 E7-immunity revealed responses against one or more peptides in 2/3 subjects diagnosed with CIN III and in 3/8 subjects with cervical carcinoma. In addition, one of the seven donors tested displayed immunity against a peptide. The central region of HPV16 E7 that is covered by the peptides E7₅₁₋₅₂, E7₄₁₋₆₂ and E7₅₁₋₇₂ was targeted by the immune system of all five HPV16+ individuals (Table III), not only confirming that this region is highly immunogenic (Table II) but also demonstrating that this region harbors epitopes that are targeted by natural immune responses against HPV16. Interestingly, the specificity of IFN γ responses detected in three HPV16+ subjects, in combination with their HLA-type, matched that of the established Th-clones for which we examined specificity and HLA-restriction in detail (FIGs. 1-3). In particular (Table III, underscored frequencies), subject 2 exhibited significantly

WO 02/070006

26

PCT/NL01/00893

increased immunity matching the specificity of the two HLA-DR restricted clones as well as weak immunity matching the HLA-DQ2/E7₈₅₋₉₀ clone. Subject 8 displayed a response matching the DR15/ E7₉₀₋₉₂ clone, whereas subject 11 showed reactivity matching the HLA-DQ2/E7₈₅₋₉₀ clone. It should be noted that in other subjects expressing the relevant MHC class II molecules such responses could not be detected (subjects 3, 4, 7 and 10).

Example 2

Materials and methods

Lymphocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum of HLA-typed anonymous healthy blood donors were obtained after informed consent. Because these donors are anonymous, no data on medical history are available. Importantly, donors with a known recent history of infection, including abnormal pap-smear were, as part of normal regulations, discouraged to donate blood.

Antigens

A set of peptides spanning the whole HPV16 E2 protein consisting of 23 overlapping peptides, 22 of which have a length of 30 amino acids and one of which (E2₃₃₁₋₃₆₅) has a length of 35 amino acids, was used. These peptides share an overlap of 15 amino acids. For epitope fine-mapping and the determination of cross-reactivity of HPV16-E2 specific Th-clones, peptides with a length of 15 and 20 amino acids were used. The peptides spanning the Influenza Matrix 1 protein of A/PR/8/34, which were used as control peptides in ELISPOT assays, consisted of 16 30-mer peptides overlapping by 15 amino acids. Peptides were synthesized by solid phase technique on an automated multiple peptide synthesizer (Abimed AMS 422, Langenfeld, Germany), and analysed by reverse phase HPLC. The lyophilized peptides were dissolved in 50µl of DMSO, diluted in PBS to a final concentration of 2.5 mg/ml. The HPV16 E2 C-terminal (E2₂₈₀₋₃₃₅) protein and HPV16 E7 protein were produced according to previously described procedures (Franken et al., 2000)

WO 02/070006

27

PCT/NL01/00893

Memory Response Mix (MRM), consisting of a mixture of tetanus toxoid (0.75 LIU/ml final concentration; National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, The Netherlands), Mycobacterium tuberculosis sonicate (2.5µg/ml; generously donated by Dr.P. Klatser, Royal Tropical institute, Amsterdam, The Netherlands) and Candida albicans (0.005%, HAL, Allergen Lab, Haarlem, The Netherlands), was used to confirm the capacity of PBMC to proliferate and produce cytokine in response to common recall antigens.

HLA-DR – peptide binding assay

Binding of peptides to HLA-DR was measured as reported previously (van der Burg et al., 1999). Briefly, as a source of DR molecules B-LCL homozygous for DR were used: LG2.1 (DRB*0101, DR1), IWB (DRB1*0201, DR2), HAR (DRB*0301, DR3), and BSM (DRB*0401, DR4). DR molecules were purified by affinity chromatography and the purity confirmed by SDS-PAGE. The analysis of peptide binding to purified DR molecules was performed using N-terminally fluorescence-labeled standard peptides. As standard peptide in the binding assays HA₃₀₈₋₃₁₉ (PKYVKQNTLKLAT, DR1 and DR2), hsp65 3-13 (KTIAYDEEARR, DR3) or HA₃₀₈₋₃₁₉ Y→F (PKFVKQNTLKLAT) was used.

Short-term T cell proliferation assay

Immunogenicity of individual HPV16 E2 peptides was determined by short term proliferation assays of healthy donor PBMC with HPV16-E2 peptides, according to previously described procedures (van der Burg et al. 1999). Briefly, freshly isolated PBMC were seeded at a density of 1.5×10^5 cells/well in a 96-well U-bottom plate (Costar, Cambridge, MA) in 200µl of IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Bio Whittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% autologous serum (10% FCS was used for CBC cultures). HPV16-E2 peptides were added at a concentration of 10µg/ml. Medium alone was taken along as negative control; phytohemagglutinine (PHA, 0.5µg/ml) served as a positive control. For each peptide 8 parallel micro-cultures were initiated; each donor was tested twice. Peptide-specific proliferation was measured at day 6 by ³H-thymidine incorporation. Peptides were scored positive, when – in both assays – the proliferation of >50% of the test wells exceeded the mean proliferation + 3 x SD of the control wells, and the stimulation index (SI) of all test wells over medium control wells was higher than 3.

Generation and analysis of long-term HPV16-E2 specific Th-cultures

Long-term HPV16 E2-specific T-cell cultures and Th-clones were established according to previously described procedures (van der Burg et al. 1999). Briefly, PBMC from healthy HLA-typed donors were stimulated in vitro with the following HPV16 E2 peptides (E2₂₇₁₋₃₀₀+E2₂₈₆₋₃₁₅; E2₃₀₁₋₃₃₀+E2₃₁₆₋₃₄₅; E2₃₃₁₋₃₅₅). 1.5×10^6 PBMC were seeded in 25cm² culture flasks (Nalge Nunc, USA) in 6 ml IMDM supplemented with 10% autologous serum. Peptides were added at a concentration of 5 µg/ml. At day 7, 1.5×10^6 PBMC were added, together with fresh medium and peptides. At day 14 and 21 viable T cells were harvested from the cultures, counted and restimulated with an equal amount of autologous irradiated PBMC and peptide (5 µg/ml). T-cell growth factor (Biotest, Dreieich, Germany) was added 2 days after restimulation at a final concentration of 10%. The T-cell cultures were tested for peptide recognition by proliferation assay at day 28. Peptide-specific T-cell cultures were cloned by limiting dilution and T-cell clones were subsequently tested for the recognition of E2-peptide and -protein-pulsed APC. Specificity of the Th clones was analysed as described previously (Van der Burg et al. 1999). Notably, in proliferation assays in which Th-clones were tested for protein recognition, autologous monocytes were used as APC. For measurement of proliferation, cultures were pulsed with 0.5 Ci [³H] thymidine (5 µCi / mM, Amersham, UK) per well for 18 hours. Plates were harvested with a Micro cell Harvester (Skatron, Norway). Filters were packed in plastic covers containing 10 ml of scintillation fluid and subsequently counted on a 1205 Betaplate counter (Wallac, Turku, Finland). HLA-class II blocking experiments were performed using murine monoclonal antibodies: anti-DQ SPV. L3, anti-DR B8.11.2, and anti-DP B7/21. Supernatants of the proliferation assays were harvested 24 hrs after incubation and analysed for the presence of IFN-γ by ELISA (van der Burg et al., 1999).

Detection of memory Th-cells by ELISPOT

Memory cells (CD45RO⁺) were isolated freshly from buffycoats by MACS after incubation with CD45RO microbeads (cat. no. 460-01, Miltenyi Biotec, Germany). The purity of the obtained CD45RO⁺ fraction was > 95% as determined by flowcytometry after surface staining for CD45RO and CD45RA (CD45RA-FITC, cat. no. 347723, CD45RO-PE, cat. no. 347967, Becton Dickinson Biosciences, USA). CD45RO⁺ cells were

WO 02/070006

29

PCT/NL01/00893

seeded at a density of 10^6 cells/well in a 24-wells plate (Costar) in 1ml of IMDM supplemented with 10% FCS. 10^6 irradiated autologous cells were added to each well as APC. The responder cells were incubated with either medium alone, pools of HPV16-E2 peptides at 5µg/ml/peptide, MRM 1:50 dilution or pools of Influenza Matrix peptides (positive controls) and cultured for 11 days in order to improve the detection of antigen-specific cells (Mc Cutcheon et al. 1997). The cells were then harvested, washed and seeded in 4 replicate wells at a density of 5×10^4 cells / well of a Multiscreen 96-well plate (Millipore, Etten-Leur, The Netherlands) coated with a IFN- γ catching antibody. Per well, 10^5 irradiated autologous PBMC were added as APC together with 5µg/ml peptide. ELISPOT analysis was further performed according to the instructions of the manufacturer (Mabtech AB, Natcha, Sweden). Analysis of the number of spots was done with a fully automated computer-assisted-video-imaging analysis system (Carl Zeiss Vision).

Intracellular cytokine staining (ICS) of memory T-cells

Autologous monocytes were isolated from PBMC by adherence to a flat-bottom 48-wells plate during 2 hours in X-vivo 15 medium (Bio Whittaker, Verviers, Belgium) at 37°C, and then used as APC. CD45RO+ cells were stimulated for 11 days with peptide, then harvested, washed and suspended in IMDM + 0.1% BSA at a concentration of 1.5×10^6 cells/ml. 200µl of cell suspension was added to the monocytes + 200µl of 10µg/ml HPV16-E2 peptide (stimulated) or 200µl of medium (non-stimulated control). After 1 hour of incubation at 37°C, 800µl of IMDM + 10%FCS + 12.5µg/ml Brefeldin A (Sigma) was added and cells were incubated for another 5 hours. The cells were then harvested, transferred into a V-bottom 96-wells plate, washed twice with ice-cold PBS and fixed with 50µl paraformaldehyde 4% for 4 minutes on ice. Following fixation, the cells were washed once with cold PBS and once with PBS/NaAz 0.2%/BSA 0.5%/Saponin 0.1%. This was followed by an incubation in 50µl PBS/NaAz 0.2%/BSA 0.5%/Saponin 0.1%/FCS 10% for 10 minutes on ice. Cells were washed twice with PBS/NaAz 0.2%/BSA 0.5%/Saponin 0.1% and supernatant was removed before 25µl of PBS/NaAz 0.2%/BSA 0.5%/Saponin 0.1% containing 1µl FITC-labelled mouse-anti-human IFN- γ (0.5 g/ml, BD Pharmingen, cat.no. 554551) 2µl PE-labelled anti-CD4 (BD Bioscience, cat.no. 345769), and 2µl PerCP-labelled anti-CD8 (BD Bioscience cat.no. 347314) was

WO 02/070006

30

PCT/NL01/00893

added. Following 30 minutes of incubation at 4°C, the cells were washed, suspended in 100µl paraformaldehyde and analysed by flowcytometry.

Homology search in protein database

The search for sequence homology of the overlapping HPV16 E2 peptides in a protein database (SwissProt) was performed using standard Basic Local Alignment Tool (BLAST: www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi). Statistical significance threshold (EXPECT) was 10 (Altschul et al., 1997). Reported matches with > 60% aminoacid homology with HPV16 E2 peptides were included.

Results

High reactivity of healthy donor PBMC against HPV16 E2-derived peptides.

We examined the proliferative responses of healthy donor PBMC against HPV16 E2 protein by using an array of overlapping 30-mer peptides covering the entire E2 sequence. Incubation of freshly isolated PBMC of 8 HLA-typed donors with each of the 23 E2-derived 30-mer peptides showed that 4 out of 8 donors reacted to 2 or more of the peptides. The observed E2 peptide-specific proliferative responses were remarkably strong (Table IV). In all cases more than 75% of the parallel microcultures reacted against the stimulating peptide. For instance, in two independent experiments we found the peptide-specific proliferation of donor # 8 against peptides E2₃₁₋₆₀, E2₄₆₋₇₅, E2₉₁₋₁₂₀, E2₁₅₁₋₁₈₀, E2₂₇₁₋₃₀₀ and E2₂₈₆₋₃₁₅ to exceeded background proliferation in 75-94% of all eight parallel microcultures tested. This points at the presence of a very high frequency of E2-specific T-cells in the PBMC isolates. In particular, PBMC of donors # 3, 5 and 8 displayed strong responses with a broad specificity. Please note that the 30-mer peptides have a 15 amino acid overlap with their neighboring peptides. Consequently, responses against adjacent peptides (e.g. donor # 3, E2₃₁₋₆₀ and E2₄₆₋₇₅) most likely involve the same epitope, whereas responses against non-adjacent peptides are directed against distinct epitopes.

WO 02/070006

31

PCT/NL01/00893

Not only the frequency of responding cultures but also the magnitude of the proliferative responses were remarkably high. The peptide-specific proliferation of several cultures from donors #3, 5 and 8 exceeded background with mean stimulation indices ranging from 9.2-16.5 and, as such, are comparable to responses found against the tetanus toxoid antigen in several of the donors (#3, 4, 5 and 7; SI ranging from 13.3 – 25; see Table IV). These stimulation indices clearly exceed the threshold ($SI \geq 3$) that is commonly used for the detection of memory T cell responses (Bermas et al., 1997). Please note that responses against tetanus toxoid are considerably higher in some of the other donors ($SI \geq 100$ in donors # 3 and 6), but that these strong values most likely represent very broad responses against multiple epitopes comprised by an entire antigen, rather than against a single 30-mer E2-peptide. Taken together, our data indicate that the T cell repertoire of healthy donors can contain particularly high frequencies of T-cells specific for the HPV16 E2 antigen resulting in vigorous proliferative responses, and suggest that these responses may reflect T-cell memory.

WO 02/070006

32

PCT/NL01/00893

Table IV Immunogenicity of HPV16 E2 derived peptides.

	D1 ¹	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
E2 ₁₋₈₉ ²								
E2 ₁₆₋₄₅								
E2 ₈₁₋₆₀			81% (8,8) ³					88% (8,6)
E2 ₄₆₋₇₅			88% (5,5)		81% (6,8)			94% (6,5)
E2 ₆₁₋₉₀								
E2 ₇₆₋₁₀₅								
E2 ₉₁₋₁₂₀					94% (4,8)			75% (4,0)
E2 ₁₀₆₋₁₃₅								
E2 ₁₂₁₋₁₅₀								
E2 ₁₈₆₋₁₆₅								
E2 ₁₅₁₋₁₈₀			81% (6,4)					81% (4,1)
E2 ₁₆₆₋₁₉₅			94% (16,5)		81% (10,6)			
E2 ₁₉₁₋₂₁₉								
E2 ₁₉₆₋₂₂₅								
E2 ₂₁₁₋₂₄₀								
E2 ₂₂₆₋₂₅₅								
E2 ₂₄₁₋₂₇₀								
E2 ₂₅₆₋₂₈₅								
E2 ₂₇₁₋₃₀₀								88% (4,8)
E2 ₂₈₆₋₃₁₅			88% (16,2)					94% (9,2)
E2 ₃₀₁₋₃₃₀								
E2 ₃₁₆₋₃₄₅							94% (4,7)	
E2 ₃₃₁₋₃₆₀			100% (11,4)				75% (4,1)	
TT	100% (29,1)	100% (36,5)	100% (25)	100% (16,4)	100% (23,6)	100% (139)	100% (13,3)	100% (59)

¹ D: Donor, Eight different healthy blood donors were tested.² HPV16 E2 peptides are indicated by the first and last amino acid. TT is the common recall antigen tetanus toxoid.³ Peptides were scored positive, when - in both assays - the proliferation of > 50% of the test wells exceeded the mean proliferation +3 * SD of the control wells, and the stimulation index (SI) of the positive test wells over medium control wells was higher than 3. Only positive scores are depicted as the mean percentage of wells exceeding medium control + 3 * SD from the percentages found in both assays. Between brackets the mean stimulation index of all test wells of both assays.*HPV16 E2-specific Th cultures recognize naturally processed epitopes.*

The proliferation data pointed at the existence of multiple immunogenic Th-epitopes within HPV16 E2. We performed a more detailed analysis of the nature and specificity of such responses, thereby focussing on the N-terminal and C-terminal region which our

WO 02/070006

33

PCT/NL01/00893

data (Table IV) revealed to comprise several highly immunogenic peptides. The overlapping peptides comprised in this C-terminal region (E2₂₇₁₋₃₀₀; E2₂₈₆₋₃₁₅; E2₃₀₁₋₃₃₀; E2₃₁₆₋₃₄₅; E2₃₃₁₋₃₆₅) were tested for their capacity to bind to HLA-DR molecules. Each of the five peptides showed intermediate to strong binding to two or more of the common HLA-DR molecules tested (Table V), which supports the notion that these peptides can indeed represent class II MHC-restricted Th-epitopes.

Table V. Binding affinity of HPV16-E2 derived peptides to different HLA-DR types

Amino acid sequence	HPV16-E2	DR1	DR2	DR3	DR4
FNSSHKGRINCNSNTTFIVHLKGDANFLKC	271-300	22	65	37	>70
TPIVHLKGDANFLKCLRYRFFKKHCTLYTAV	286-315	8	68	20	>70
LRVRFKKHCTLYTAVSSTWHTGHNVRKKS	301-330	6	8	>70	10
SSYVHWTFGHNVRKKSALVILTYDSEWQRDQ	316-345	6	55	30	>70
AIIVILTYDSEWQRDQFLSQVKIEKTIIVSTGFMSI	331-365	8	20	10	15

Binding affinity of each peptide is expressed as the IC₅₀ value: this is the peptide concentration (μM) at which binding of the standard fluorescence labeled peptide is reduced to 50% of its maximal value. >70 represents undetectable binding

Subsequently, long-term E2-specific Th cultures were generated through stimulation of PBMC from HLA-typed healthy blood donors at weekly intervals with either peptides E2₂₇₁₋₃₀₀ and E2₂₈₆₋₃₁₅, peptides E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅, or with peptide E2₃₃₁₋₃₆₅ or with peptide E2₄₆₋₇₈. PBMC from 2 donors showed strong peptide-specific proliferative responses against one or more of the stimulating peptides (data not shown). Through cloning via limiting dilution of these cultures, we succeeded in the isolation of stable T cell clones, uniformly displaying a CD4⁺CD8⁻ phenotype, against six distinct peptide-epitopes. Two of these Th clones were established from HLA-DR15(2)-, -DQ6(1)- PBMC stimulated with E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅. Although both Th-clones recognized E2₃₀₁₋₃₃₀, in depth analysis of the specificity of these Th-clones revealed that they recognized distinct, yet overlapping, sequences, restricted by different class II HLA molecules. One of the clones recognized peptide E2₃₁₆₋₃₃₀ in the context of HLA-DR15(2), whereas the other clone was specific for peptide E2₃₁₁₋₃₂₅ in the context of HLA-DQ6(1) (Figures 5, 6). The two other Th-clones were similarly related, in that one recognized peptide E2₃₄₆₋₃₅₅ in the context of DR15(2), whereas the other reacted against E2₃₅₁₋₃₆₅ in a DR1-restricted manner (Figures 7, 8). Notably, these data are in correspondence with the peptide binding data in Table V, in that longer variants of these DR15(2) and DR1-restricted epitopes were indeed found to bind to the restricting HLA molecules (binding

WO 02/070006

34

PCT/NL01/00893

assay not available for HLA-DQ6). In addition, two clones were found to react to peptide E2₄₆₋₇₅, one reacted against peptide E2₅₁₋₇₀ in a HLA-DR4 restricted manner and the other clone reacted against peptide E2₆₁₋₇₅. (Figure 15)

Further evidence that the four E2 peptides identified represent physiologically relevant Th epitopes is provided by the fact that the E2-specific Th clones did not only respond against peptide-loaded APC, but also specifically responded against APC that were pulsed with the E2 protein (Figures 5-8). Because in the latter case presentation of the peptide epitopes depends on uptake and processing of the E2 antigen, and not merely on exogenous loading of class II molecules at the APC cell surface, these data provide definite proof that the four E2 peptides recognized by our Th clones correspond to naturally processed epitopes. Finally, all four Th-clones produced IFN- γ upon antigenic stimulation, which is indicative of a Th-type 1 cytokine profile. Taken together our data show that the T cell repertoire of healthy individuals harbors IFN- γ -secreting E2-specific CD4⁺ Th cells (Figures 5-8).

Detection of HPV16 E2 specific memory Th-cells in healthy individuals

The strikingly frequent detection of HPV16 E2-specific Th immunity in healthy individuals, as described in the first paragraph, prompted us to analyse whether the underlying T cell repertoire would represent immunological memory as a the result of previous encounter with antigen, or whether it would primarily consist of particularly abundant naïve T cell precursors specific for this antigen. In view of the high incidence of, generally transient, genital HPV infections in young sexually active individuals (Karlsson et al., 1995; Koutsky et al., 1997; Ho et al., 1998), as well as the prominent expression of E2 during HPV infection, it seems conceivable that T cell memory against E2 is to be found in healthy subjects. We examined the nature of the HPV16 E2-specific immunity detected by us through analysis of the E2-specific reactivity of the CD45RO⁺ fraction of healthy donor PBMC, which contains antigen-experienced T-cells but is devoid of their naïve counterparts (Young et al., 1997). Because we found the T cell repertoire of healthy donors to contain IFN γ -producing Th cells (Figures 5-8), we measured the antigen-specific T-cell responses through IFN γ ELISPOT. We first analysed the reactivity of CD45RO⁺ T cells of two healthy donors while focusing our attention on a selection of E2 peptides which on basis of our previous experiments (Table IV) appear to be localized in the most immunogenic regions of HPV16 E2. Interestingly, these CD45RO⁺ PBMC were found to respond against multiple E2

WO 02/07006

35

PCT/NL01/00893

peptides (Figure 9 a,b), supporting the notion that healthy subjects can display HPV16E2-specific T cell memory. We confirmed that the responding IFN γ -producing cells belonged to the CD4 $^{+}$ Th cell subset by employing IFN γ intracellular cytokine staining instead of ELISPOT as a readout (not shown). A broader survey of E2-specific reactivity against the full array of peptides, using CD45RO $^{+}$ PBMC from 8 additional healthy donors, revealed that 4 of these PBMC isolates responded against one or more of the HPV16 E2 peptides (Figure 9 c-f and not shown). Taken together, our data reveal the presence of CD45RO $^{+}$ memory-type, IFN γ secreting Th cells reactive against HPV16 E2 peptides in approximately half of the healthy donors tested. Notably, the incidence by which these responses are detected is very similar to that of the strongest subset of proliferative responses found in total PBMC (Table IV), implicating that also these responses are likely to represent reactivity by memory T cells rather than by in vitro primed naïve T cells.

Cross-reactivity of HPV16 E2 specific Th-clones with peptide sequences of other HPV types

Due to the common nature of HPV infections, a majority of the human population is likely to encounter multiple HPV types (Thomas et al. 2000; Koutsky et al. 1997). Furthermore, the protein sequences of the viral gene products are conserved to considerable extent between HPV types. It is therefore possible that at least a fraction of the T cell repertoire induced by a previous encounter with a given type of HPV could cross-react, and therefore cross-protect, during subsequent infection with other HPV types. Alignment of the sequence of the HPV16 E2 protein with that of various other HPV types revealed that it is most prominently conserved with that of other high risk types. Although this conservation is somewhat less conspicuous when the HPV16 E2 sequence is compared to that of low risk or common types it is evident that in all cases maximal conservation is confined to certain regions within the E2 sequence. In particular, three areas of HPV16E2 share homology with E2 of other HPV types: the N-terminal portions E2₃₁₋₁₂₀ and E2₁₅₁₋₁₉₅ as well as the C-terminal portion E2₂₇₁₋₃₆₅. These regions co-localise with the major functional domains of E2, in that the N-terminal domain harbours the transcriptional activation functions of this protein whereas the C-terminal portion mediates its sequence-specific DNA-binding properties. The intervening sequences ranging from residues 210 to 270 constitute the so-called hinge-region connecting the two key functional domains, which is poorly conserved between

WO 02/070006

36

PCT/NL01/00893

HPV types. Interestingly, our analyses of E2-specific responses in short-term proliferation assays have revealed that the most immunogenic peptides are clustered in the two conserved domains of the HPV16 E2 sequence (see Table IV). In view of these considerations, we tested whether our established Th clones, raised against epitopes derived from the C-terminal part of the HPV16 E2 sequence (Figure 5-8), would be capable of cross-reacting with E2 peptides of a number of other HPV types that shared maximal homology with HPV16 with respect to this particular E2 sequence. Indeed, the DQ6-restricted E2₃₁₁₋₃₂₈-specific Th-clone showed strong recognition of the corresponding peptides of HPV types 26, 31, 35 and 45 (not shown). The amino acid homology within this epitope varies from 73 to 87% (identical or amino acids with similar physico-chemical properties). Our other Th clones did not reveal considerable cross-reactivity for highly homologous E2 peptides of other HPV types (not shown). These data indicate that part of the HPV16 E2-reactive Th memory detected in our assays may relate to encounter of HPV types other than HPV16, but also suggest that the majority of this immune repertoire was most likely established through encounter with HPV16 itself.

Example 3

Material and Methods

Subjects and Controls.

PBMC of anonymous healthy blood bank donors (D) were obtained. Since these donors are anonymous, no additional data is available. However, donors with a known recent history of infection, including abnormal pap-smear, were, as part of normal regulations, discouraged to donate blood.

The study of subjects (S; Table II) with CIN or cervical carcinoma in this paper was nested in the "CIRCLE study" that investigates cellular immunity against HPV16 infected cervical lesions. Women presenting with histologically proven CIN III or cervical carcinoma at the department of gynecology of the Leiden University Medical Center (LUMC) were, after informed consent, enrolled in this study. The study design was approved by the ethics committee of the LUMC. Blood was drawn at day of treatment. Subjects with CIN III were treated by LEEP or cold knife conization. In case of stage IB-IIA a radical hysterectomy was performed. Subjects were typed for

WO 02/070006

37

PCT/NL01/00893

HPV16 using HPV16-specific primers on DNA isolated from paraffin-embedded sections of biopsies or surgical resection specimens (Claas *et al.*, 1989). Since HPV-specific T-helper response were expected to be found in subjects with progressive disease (de Gruijl *et al.*, 1998), we chose to analyze subjects with stage IB cervical cancer.

Antigens.

The peptides used spanning the E6 protein consisted of 15 overlapping 22-mer peptides and are indicated by their first and last amino acid in the protein (e.g. 1-22, 11-32, 21-42, 31-52, 41-62, 51-72, 61-82, 71-92 and so forth, the last peptide consists of amino acid 137-158). Peptides were synthesized and dissolved as described previously (van der Burg *et al.*, 1999).

Memory Response Mix (MRM): A mixture of tetanus toxoid (1 LF/ml; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands) and *Mycobacterium tuberculosis* sonicate (2.5 µg/ml; generously donated by Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, The Netherlands) was used to control the capacity of PBMC to proliferate in response to typical recall antigens.

Analysis of antigen-specific T-cells by ELISPOT.

PBMC were seeded at a density of 2×10^6 cells/well of a 24 well plate (Costar, Cambridge, MA) in 1 ml of ISCOVE's medium (Gibco) enriched with 10% FCS, in the presence or absence of 5 µg/ml of indicated E6-derived 22-mer peptide. As positive control PBMC were cultured in the presence of indicated pools of influenza A/PR/8/34 M1 protein derived peptides consisting of 4 overlapping 30 amino acid long peptides in each pool.

In case CD45RO+ cells were used the CD45RO+ cells were seeded at a density of 10^6 cells/well in a 24-wells plate (Costar) in 1 ml of IMDM supplemented with 10% FCS together with indicated single or pools of peptides at a concentration of 10 µg/ml/peptide. Following 4 days of incubation at 37°C, PBMC were harvested, washed and seeded in four to six replicate wells at a density of 10^5 cells/well of a Multiscreen 96-well plate (Millipore, Etten-Leur, The Netherlands) coated with a IFN γ catching antibody (Mabtech AB, Natcha, Sweden). The ELISPOT was further performed according to the instructions of the manufacturer (Mabtech). The number of spots were analyzed with a fully automated computer assisted video imaging analysis system (Carl Zeiss Vision).

WO 02/070006

38

PCT/NL01/00893

Specific spots were calculated by subtracting the mean number of spots + 2xSD of the medium only control from the mean number of spots of experimental wells. Antigen-specific T-cell frequencies were considered to be increased compared to non-responders when T-cell frequencies were $\geq 1/10,000$ PBMC.

Isolation of the CD45RO+ memory fraction of PBMC

Memory cells (CD45RO⁺) were isolated freshly from buffycoats by MACS after incubation with CD45RO microbeads (cat. no. 460-01, Miltenyi Biotec, Germany) according to the instructions of the manufacturer. The purity of the obtained CD45RO⁺ fraction was > 95% as determined by flowcytometry after surface staining for CD45RO and CD45RA (CD45RA-FITC, cat. no. 347723, CD45RO-PE, cat. no. 347967, Becton Dickinson Biosciences, USA).

Results

In view of the high incidence of, generally transient, genital HPV infections in young sexually active individuals (Karlsson et al., 1995; Koutsky et al., 1997; Ho et al., 1998), as well as the prominent expression of HPV16 E2-specific immunity (see example 2) in about half of the healthy subjects tested, we studied the natural, in vivo induced, HPV16 E6-specific response in the human population by means of the 4-day IFN γ - ELISPOT assay. This assay detects only memory T helper-cells, which upon stimulation will secrete IFN γ whereas their naïve counterparts will not (see example 1 and 2 and references therein). A survey of E6-specific reactivity against the full array of peptides present in PBMC from 18 healthy blood donors, revealed that 11 of these 18 (>60%) PBMC isolates responded against one or more of the HPV16 E6 peptides (Table VIa). The majority of the responses were found at the C-terminal end of E6 (E6₈₁₋₁₅₈). Furthermore, all healthy donors reacted against the common recall antigen influenza matrix 1 protein. The frequency of both influenza M1 and HPV16 E6-specific T-helper cells were of comparable magnitude. Interestingly, a similar survey in HPV16+ patients revealed that only 3/12 (25%) reacted against HPV16 E6 peptides indicating that the E6 response found in healthy subjects is protective against disease.

WO 02/070006

39

PCT/NL01/00893

Table VI. Detection of HPV16 E6-specific T-helper reactivity in healthy donor PBMC.

Donor ¹	1-32 ²	11-32	21-42	31-42	41-62	51-72	61-82	71-92	81-102	91-112	101-122	111-132	121-142	131-152	141-158	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4
1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1	<1
2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	2	26	12	7
3	<1	4	<1	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	6	18	4	50	7	19	<1
4	<1	<1	<1	10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	22	15	14	10
6	<1	5	1	1	2	9	5	7	6	10	2	6	5	8	1	7	10	12	37
6	3	34	<1	9	<1	<1	2	<1	11	14	6	12	10	<1	5	<1	33	41	5
7	<1	2	1	<1	<1	<1	<1	<1	2	14	<1	<1	1	3	14	5	21	97	28
8	4	4	<1	<1	9	<1	<1	<1	12	14	3	6	7	3	<1	27	38	34	16
9	2	<1	7	3	<1	<1	4	<1	<1	3	<1	<1	3	<1	<1	22	10	14	4
10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	7	<1	<1	13	23	19	11
11	2	<1	<1	2	<1	<1	<1	7	3	4	2	15	10	27	17	33	28	24	62
12	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	14	15	<1	5	10	12	<1
13	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	1	21
14	5	5	<1	10	5	<1	2	20	12	5	28	18	37	40	2	12	42	28	45
15	18	16	4	15	2	1	<1	3	12	21	8	11	8	<1	<1	52	68	94	5
16	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	39	66	49	43
17	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	3	<1	66
18	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	<1	2	<1	<1	11	1	1	<1	<1	1	10	<1

¹ 18 different healthy blood donors were tested.

² First and last amino acid number of HPV16 E6-derived peptides are indicated. M1P1 – M1P4 are the four different pools of 4, by 15 residues overlapping, 30-amino acid long peptides derived from influenza A matrix 1 protein (inf A/PR/8/34).

³ Indicated are the number of specific spots per 100,000 PBMC. Specific spots are calculated by subtracting the mean number of spots + 2xSD of the medium control from the mean number of spots after stimulation with peptide. Numbers in bold indicate T-cell frequencies $\geq 1/10,000$

Table VIIb. Detection of HPV16 E6-specific T-helper reactivity in HPV16+ patients.

patient	1-22	11-32	21-42	31-62	41-62	51-72	61-82	71-92	81-102	91-112	101-122	111-132	121-142	131-152	141-158	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4
C40	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3
C41	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	10	<1
C43	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1
C47	<1	<1	<1	23	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	15	<1	<1	<1	<1	<1
C47	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	22	<1	<1	2	62	30
C58	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C63	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1
C66	<1	<1	<1	<1	<1	13	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	31	<1	15	<1
C75	<1	<1	<1	<1	2	1	<1	3	4	5	<1	8	7	7	8	5	2	4	2
C79	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	15	<1
C80	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	1	2	<1	1	1	<1	2	<1	7	2	7	1
C91	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	2	<1	<1

To confirm our observation that HPV16-specific memory T-cells were present in a large fraction of the human population we isolated the specific CD45RO+, memory fraction of PBMC before they were subjected to stimulation with HPV16 E6 peptides. After a 4-days of stimulation a clear response to HPV16 E6 could be detected. Taken together, our data reveal the presence of CD45RO+ memory-type, IFN γ secreting T helper cells reactive against both HPV16 E6 peptides in approximately half of the healthy donors tested.

Furthermore, PBMC of two different HLA-DR1 positive blood donors were stimulated with a pool of two long 35-mer peptides that together covered E6 109-158. PBMC of these donors proliferated specifically against peptide E6 121-142 and peptide E6 127-158 as well as E6 protein. A CD4+ T-helper clone derived from one of these bulks was analyzed further and specifically proliferated and produced IFN γ when stimulated with HPV16 E6 peptide and HPV16 E6 protein in a HLA-DR1 restricted manner (Figure 16).

Conclusions

Through analysis of the IFN γ -responses in PBMC cultures from healthy subjects against the HPV16 E6 antigen we have demonstrated that this protein contains highly immunogenic peptide sequences to which strong T cell reactivity is detected in approximately half of these donors. Subsequent testing of the CD45RO+ memory fraction of healthy donor PBMC revealed that these HPV16 E6-specific IFN γ -secreting CD4+ T cells were present in the T-cell memory fraction of PBMC and thus have been primed in vivo upon encounter with HPV. A similar survey demonstrated that HPV16 E6-specific IFN γ secreting T-cells were almost absent in HPV16+ patients. Taken together, our data demonstrate that the T cell repertoire of a majority of the healthy subjects contains particularly high frequencies of memory type 1 cytokine producing T helper cells reactive against the HPV16 E6 antigen and indicates that these are protective against disease.

Importantly, we have not found any previous report concerning the presence of memory T-cell responses against E2 and E6 or any of the other non-structural HPV16 proteins in healthy individuals. In fact, healthy individuals served in many cases as negative control for the culture conditions used. We have now shown, in two independent studies (example 2 and example 3), that healthy donor derived PBMC contain HPV16-specific

WO 02/070006

41

PCT/NL01/00893

T-helper cells. The majority of the T-helper responses are directed against specific regions in E2 and E6. The presence of these memory type T-helper cells show that these individuals have encountered HPV16 infection, responded to it via the cellular T-cell arm of the immune system and cleared the infection. This implies that the T-cell response to these antigens is a part of the protective response to HPV infection. Induction or boosting of these type of responses can therefore be a powerful tool in the protection against HPV induced diseases.

Example 4

Material & Methods

Male C57/Bl6 mice (n=8 per group) were vaccinated with either 10 µg of the exact E1A-derived CTL epitope (SGPSNTTPEI) or with 30µg of the HPLC-purified 32-amino acid long peptide RECNSTDS~~CD~~SGPSNTTPEIHPVVRLCPKP containing this CTL epitope. Peptides were dissolved in PBS and mixed in a 1:1 ratio with IFA. Mice were vaccinated subcutaneously with peptide in a volume of 200µl at day 1. Fourteen days later mice were challenged with 0.5x10⁶ AR5 tumor cells (E1A + Ras transformed mouse embryo cells). Survival of mice was monitored during a 100 day follow-up.

Results

Vaccination with synthetic peptides representing cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes can lead to a protective CTL-mediated immunity against tumors or viruses. B6 tumor cells transformed by the human adenovirus early region 1 (Ad5E1) present an Ad5E1A- and an Ad5E1B-encoded CTL epitope to the immune system. CTL clones directed against either of these epitopes are able to eradicate established Ad5E1-induced tumors, showing that these CTL epitopes are targets of CTL that can mediate tumor regression. Protective immunity against Ad5E1-expressing tumor cells can be established by immunization with Ad5E1-transformed cells and with an adenovirus vector containing the Ad5E1 region. Protective immunity, in either case, is associated with specific CTL memory. When, however, mice were vaccinated with either the minimal peptide-epitope sequence of the E1A-derived CTL epitope or the minimal peptide-epitope sequence of the E1B-derived CTL epitope protection against Ad5A1-expressing tumors was lost.

WO 02/070006

42

PCT/NL01/00893

Vaccination with a CTL epitope derived from the human adenovirus type 5 E1A-region (Ad5E1A234-243), enhances rather than inhibits the growth of Ad5E1A-expressing tumors. In contrast to peptide vaccination, immunization with adenovirus, expressing Ad5E1A, induced Ad5E1A-specific immunity and prevented the outgrowth of Ad5E1A-expressing tumors. These results show that immunization with synthetic peptides can lead to the elimination of anti-tumor CTL responses (Toes *et al.*, 1996a). Furthermore, vaccinated mice s.c. with a low dose of the Ad5E1B peptide also showed this adverse reaction. The Ad5E1B peptide was chosen because the CTL response against the Ad5E1B-encoded CTL epitope contributes most to the antitumor response in B6 mice after vaccination with Ad5E1-transformed cells. Ad5E1B peptide-vaccinated mice were not protected against the outgrowth of Ad5E1-expressing tumor cells, but instead were no longer able to reject a tumor inoculum that was rejected by nonvaccinated mice. Moreover, the protection induced by tumor cell vaccination against Ad5E1B-expressing tumors was gone when the Ad5E1B-encoded CTL epitope was injected a few days before tumor challenge. This is associated with peptide-induced tolerance of Ad5E1B-specific CTL activity (Toes *et al.* 1996b).

In conclusion, immunization with synthetic peptides of the exact CTL epitope length, can also lead to CTL tolerance associated with the inability to reject tumors. The issue of tolerance or functional deletion of CTL by immunization with minimal epitopes is circumvented by the use of long peptide (22-35 amino acid residues). To proof this statement we vaccinated C57/B16 mice with a 32-amino long E1A derived peptide that contains the 10 amino acid long CTL E1A-derived epitope, which when given as the exact peptide-epitope is involved in loss of tumor-protection. As shown in FIG. 10, control mice (n=8) that have been vaccinated with the exact peptide-epitope SGPSNTPPEI, all die within 50 days after tumor-challenge. In contrast, the group of mice vaccinated with the 32-amino acid long peptide all live at 50 days and only one mouse is lost during the 100 day follow-up.

Conclusion

For a clinically relevant approach of immunizing subjects against virally infected cells or tumor cells both specific T-helper cells and CTL should be induced. We have already shown that immunization with minimal CTL epitopes results in protection against tumors in some models (Kast *et al.* 1991, Feltkamp *et al.* 1993) whereas it can also lead to tolerance or functional deletion of virus- and tumor-specific CTL that when otherwise

induced are protective (Toes *et al.* 1996ab). Processing of exogenous antigens for presentation by MHC class I molecules by cross-priming as well as by other mechanisms is now widely recognized second pathway of processing for presentation by MHC class I, next to the well known endogenous route (Jondal *et al.*, 1996, Reimann *et al.* 1997). We have now shown that in contrast to vaccination of mice with the exact peptide-epitope, vaccination with long peptide sequences containing CTL epitopes does not result in the loss of CTL that are involved in the protection of mice against tumors but instead result in a CTL mediated immune response that protects mice against a subsequent tumor-challenge.

Example 5

Mice and cell lines. C57BL/6 (B6, H-2^b) mice were obtained from IFFA Credo (Paris, France). MHC class II^d B6 mice were purchased from Taconic (USA) and CD40^{-/-} B6 mice were obtained from The Jackson Laboratory (Maine, USA). Tumor cell line TC-1 was generated by transfection of Mouse Embryo Cells (MEC) of C57BL/6 origin by HPV 16 E6/E7 and c-H-ras oncogenes. Tumor cell line 13.2 was derived from MEC (B6) transformed with adenovirus type 5 derived E1 protein in which the H-2D^b E1A epitope was replaced with the HPV 16 E7⁴⁹⁻⁵⁷ CTL epitope. D1 cells are long-term growth factor dependent immature splenic dendritic cells (DC) derived from C57BL/6 mice.

Peptides. The HPV16 E7-derived peptides E7⁴⁹⁻⁵⁷: RAHYNIVTF and E7⁴³⁻⁷⁷: GQAEPDRAHYNIVTFCKCKDSTLRLCVQSTHVDIR were synthesized by solid phase strategies on an automated multiple peptide synthesizer (Abimed AMS 422, Langenfeld, Germany). The peptides were analyzed by reverse phase HPLC for contaminants and stored at -20°C.

Tetramers and antibodies. PE-labeled H-2D^b epitope E7⁴⁹⁻⁵⁷ (RAHYNIVTF)-containing tetramers were constructed and used for the analysis of peptide-specific CTL-immunity. FITC labeled anti-CD8b.2 Ab (Ly-3.2) (clone 53-5.8), APC labeled anti-CD4 Ab (L3T4) (clone RM4-5) and PE labeled anti-IFN- γ Ab (clone XMG1.2) (BD PharMingen, San Diego, USA) were used in the various FACS procedures.

Adjuvantia. IFA (incomplete Freund's adjuvant) was obtained from Difco Laboratories (Michigan, USA). Montanide ISA 51 was purchased from SEPPIC (Paris, France). CpG-oligodeoxynucleotides (ODN) 1826 were kindly provided by Dr. G.B. Lipford, Technical University of Munich (Munich, Germany). GM-CSF was obtained from PeproTech (Rocky Hill, USA). The FGK-45 hybridoma cells producing stimulatory anti-CD40 Ab were provided by A. Rolink. MPL was kindly provided by Dr. M. Johnson, Ribi Immunochem. Research (Hamilton, USA).

Immunization strategies. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with either 50 µg E7⁴⁹⁻⁵⁷ peptide or 150 µg E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer dissolved in PBS in order to achieve similar molar levels of the E7⁴⁹⁻⁵⁷ CTL epitope in both cases. Combinations with various adjuvantia were tested. In the case of IFA and Montanide, the dissolved peptides were emulsified in 50% of these respective substances. ODN-CpG (50 µg/mouse), MPL (10 µg/mouse) and GM-CSF (4 µg/mouse) were all dissolved in PBS and mixed with the peptides before subcutaneous vaccination. The total injected volume was 200 µl/mouse. Anti-CD40 Ab was dissolved in PBS and injected separately from the peptides intravenously on day 0, 1 and 2 at an amount of 100 µg per injection (total volume 200 µl/mouse). Either spleens were harvested after 10 days or, when indicated, mice were boosted with identical vaccines 50 days after priming and spleens were harvested 10 days after booster immunization. In the case of the 35-mer E7⁴³⁻⁷⁷, the latter strategy might allow the formation of memory CTL- and T helper cells after the first vaccination and activation of DC by HPV16 E7⁴³⁻⁷⁷ specific T helper cells when the booster immunization was given. In the therapeutic anti-tumor experiments, tumor-bearing mice were vaccinated twice: at the time that tumors were palpable in all mice and 14 days later.

T cell cultures. T cells were obtained from immunized mice by culturing spleen cells (5×10^6 cells/well of a 24-wells plate) in complete medium in the presence of 0.5×10^6 E7⁴⁹⁻⁵⁷-expressing cells (tumor cell line 13.2) or, when indicated, in the presence of D1 cells. Before use, the D1 cells were incubated for 16 hours with the E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer and subsequently activated by adding LPS (10 µg/ml) for 6 hours and then thoroughly washed. Complete medium consists of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) supplemented with 8% FCS, 100 IU/ml penicillin, 2mM glutamine (ICN, Aurora, Ohio, USA) and 30 µM 2-ME (Merck, Darmstadt, Germany). Cultures were maintained at 37°C in humidified air containing

WO 02/070006

45

PCT/NL01/00893

5% CO₂. No exogenous IL-2 was added. On day six, dead cells were removed from the culture by centrifugation over a Ficoll density gradient and remaining cells were seeded in 24-wells plates at 1x10⁶ cells/well. On day seven tetramer staining or intracellular cytokine staining was performed.

Tetramer staining. Spleen cultures, stimulated with tumor cell line 13.2 for seven days, were transferred at an amount of 40x10⁴ per well to 96-well V-bottom microtiter plates and washed twice with PBS/BSA 0.5%. Subsequently, PE-labeled E7⁴⁹⁻⁵⁷-containing tetramer was added. After 30 minutes of incubation at room temperature, cells were washed twice with PBS/BSA 0.5% and incubated with FITC-labeled anti-CD8b Ab for 30 minutes. Subsequently cells were washed twice in PBS/BSA 0.5%, suspended in PBS/BSA 0.5% containing Propidium Iodide (PI) (0.5µg/ml) and transferred to tubes. Cell samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using CellQuest software. A total of 20x10⁴ events was analyzed for fluorescence intensity. Debris was gated out using the PI staining and subsequently the CD8⁺ fraction was gated. Mean background tetramer-staining of similarly cultured and stained cells from non-immunized control mice was found to be below 1 percent of CD8⁺ cells (0.94%, standard deviation 0.36%). As a positive control the HPV16 E7 specific CTL clone 9.5 was used.

Intracellular cytokine staining. Spleen cultures were stimulated with D1 cells pulsed with E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-mer for seven days. Subsequently, the percentage of CD8⁺ and CD4⁺ IFN-γ producing T cells was measured as described before (van der Burg et al., 2001). Notably, LPS-activated non-pulsed D1 cells or D1 cells pulsed with E7⁴⁹⁻⁵⁷ or E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-mer (5 µg/ml) were used as stimulator cells.

Results

Prime-boost vaccinations with the E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35 amino acid long HPV16 E7 T helper- and CTL epitope containing peptide result in a vigorous CTL response.

Mice (B6) were vaccinated once with either the minimal CTL epitope HPV16 E7⁴⁹⁻⁵⁷ or the HPV16 E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-residue long peptide, admixed with IFA. Ten days following vaccination spleens were harvested and stimulated in vitro for 1 week. Subsequently, the percentage of E7⁴⁹⁻⁵⁷ peptide-specific CTL was determined by H2-D^b E7⁴⁹⁻⁵⁷ (RAHYNIVTF)-tetramer staining (van der Burg *et al.*, 2001). In both groups 3 out of 9

WO 02/070006

46

PCT/NL01/00893

mice responded to the vaccine while generally 5 percent of the CD8⁺ T cells stained with tetramers (Figure 11A-B), suggesting that the vaccines do equally well when injected once.

To obtain a vigorous E7⁴⁹⁻⁵⁷-specific CTL response, both vaccines were used in a prime-boost regimen, which allowed primed T cells to form memory T cells before the response was boosted by a second vaccination 50 days later. Mice that received twice the minimal CTL epitope, showed CD8⁺ T cell responses that were comparable to that after one vaccination (Figure 11C). In contrast, mice primed and boosted with the long peptide displayed a vigorous E7⁴⁹⁻⁵⁷-specific CTL response in 9/11 mice, with high numbers of E7⁴⁹⁻⁵⁷-specific CD8⁺ T cells (mean 19%, range 5-40%) (Figure 11D). These experiments demonstrate that vaccination with the long peptide in a homologous prime-boost regimen is superior to vaccination with the minimal CTL epitope and this indicates that the formation of T helper cells, by the intrinsic T helper epitope present in the long peptide, contributes considerably to the level of the CTL responses.

The vigorous E7⁴⁹⁻⁵⁷-specific CTL response is dependent on MHC class II-restricted T helper cells and CD40-CD40L interactions.

In order to demonstrate that the impressive CTL responses, detected following prime-boost vaccinations with the long E7⁴³⁻⁷⁷ peptide, were in fact enhanced by MHC class II-restricted E7-specific T helper cells, MHC class II^{-/-} mice were prime-boosted with the long peptide vaccine. The number of E7⁴⁹⁻⁵⁷-specific CTL detected in the MHC class II^{-/-} mice was far lower than found in B6 mice after two vaccinations, and comparable to that found after one vaccination (Figure 11E). To confirm that CD4⁺ T helper cells are already induced after priming, mice were vaccinated once with the long peptide in IFA. Subsequently the percentage of E7⁴³⁻⁷⁷-specific IFN γ -producing CD4⁺ T cells was measured by intracellular cytokine staining. Whereas no responses over background were observed in naïve mice (data not shown), 5 percent or more of the CD4⁺ T cells from vaccinated mice specifically responded upon stimulation with the long E7⁴³⁻⁷⁷ peptide (Figure 12A). These data not only indicate that MHC class II restricted CD4⁺ T helper type 1 responses are induced after one vaccination but also that these E7⁴³⁻⁷⁷ peptide-specific T helper cells are required for inducing vigorous CTL responses. Professional APC, that process and present the long peptide upon the booster immunization, are activated through CD40-CD40L interactions by E7⁴³⁻⁷⁷ peptide-specific T helper cells. This will subsequently lead to enhanced CTL activation.

Single vaccinations with the E7⁴³⁻⁷⁷ peptide and DC-activating agents result in vigorous T helper- and CTL responses towards HPV16 E7.

If the T helper-mediated activation of professional APC is important for the observed vigorous CTL response, direct activation of DC should bypass a lack of T cell help and a single vaccination should be sufficient to raise adequate CTL responses. To address this subject, B6 mice were vaccinated once with the long peptide or the minimal E7⁴³⁻⁵⁷ peptide in combination with various DC-activating agents. IFA and Montanide - a human grade IFA - were used as controls. As with IFA (Figure 11A-B) no responses were observed when Montanide adjuvant was administered (data not shown).

Furthermore, mice vaccinated with either the minimal CTL epitope or the long peptide combined with anti-CD40 antibody or GM-CSF displayed no or minimal CTL responses (Figure 13A-B). However, the combination of GM-CSF and IFA resulted in moderate E7⁴³⁻⁵⁷-specific CTL responses when the long peptide was administered (Figure 13C). Mice receiving the minimal peptide mixed with MPL or ODN-CpG showed clear-cut CTL responses in several mice (Figure 13D-E) although the number of responders was not increased (4/9 and 4/12 mice respectively) compared to mice vaccinated with IFA (Figure 11A). In contrast, vaccination with the long peptide resulted in E7⁴³⁻⁵⁷-specific CTL responses in all mice. Moreover, the level of the CTL response detected was high (up to 40% of CD8⁺ T cells) in the majority of animals. In addition, a single vaccination with the long peptide and ODN-CpG resulted in even higher numbers of E7⁴³⁻⁷⁷-specific IFN γ -producing CD4⁺ T cells (15 to 20% of CD4⁺ T-cells) when compared to the use of IFA as adjuvant (Figure 12B). To demonstrate that the induced responses were indeed T helper cell independent, MHC class II^{-/-} mice were vaccinated with the long peptide and ODN-CpG. As shown in figure 13F, robust CTL responses were detected after one vaccination. The observation that in a T helper independent setting, vaccination with the long peptide and a DC-activating agents is superior to vaccination with the minimal CTL epitope shows that, compared to the minimal CTL epitope that can bind to MHC class I molecules present on all nucleated cells, the long peptide is preferentially processed and presented by professional antigen presenting cells (APC).

Vaccination with the 35-mer and the DC-activating adjuvant ODN-CpG can effectively eradicate HPV16 expressing tumors.

In order to test the efficacy of the long peptide vaccine, tumor bearing mice were immunized with the E7⁴⁹⁻⁵⁷ peptide or the E7⁴⁹⁻⁷⁷ long peptide admixed with ODN-CpG. Notably, the vaccination was given at the time when tumors were palpable (day 10-14) in all mice. A second vaccination was administered 14 days later in order to sustain E7-specific T helper- and CTL immunity. Mice treated with ODN-CpG alone did not display anti-tumor activity (Figure 14A). The majority of animals had to be killed due to extensive tumor growth within 14 days after treatment. In both groups treated with peptide and ODN-CpG inhibition of tumor growth was seen 8-12 days after treatment. Although complete eradication was observed in 3 out of 9 mice treated with the E7⁴⁹⁻⁵⁷ peptide and ODN-CpG (30% of the animals), others were only capable of stabilizing tumor growth temporarily and then died of their tumor. In contrast, 8 out of 10 mice treated with the long peptide and ODN-CpG eradicated their tumors, some of them sizing up from 200-500 mm³. In

Conclusion

We show that the HPV16 E7-specific CTL response is far more vigorous after vaccination with a HPV16 E7 derived 35-residue long peptide than following vaccination with the minimal CTL epitope. Our data demonstrate that at least one of two independent mechanisms account for this. Firstly, the long 35-residue peptide used in this example contains both a CTL epitope and a T helper epitope. Vaccination of MHC class II ^{-/-} mice demonstrated that the interaction between APC and E7-specific T-helper cells contributed considerably to the level of the CTL response. Furthermore, administration of said long peptide mixed with strong DC-activating agents was able to bypass the requirement for T cell help. Secondly, a direct comparison of the CTL response induced by the minimal CTL epitope (9 residues) of this example or said long peptide vaccine combined with DC activating agents in both wild type and MHC class II ^{-/-} mice showed that vaccination with the long peptide resulted in a far better CTL response, showing that in contrast to the minimal CTL epitope, the long peptide is preferably presented by professional APC. Moreover, we show that vaccination with the long peptide and strong DC activating agents result in the complete eradication of established tumors. These data provide a scientific basis for the use of long overlapping peptides, alone or in combination with strong DC activating agents in future human trials.

The high efficacy of our long peptide-vaccine is among other things due to the fact that the T helper- and CTL epitope are physically linked to each other. The potential advantage of epitope-linkage lies in the increased chance for simultaneous presentation of both the MHC class I and class II restricted epitopes on the surface of a single APC, thereby facilitating the delivery of cognate T cell help to CTL priming. A direct comparison of vaccines that used a mix of CTL and Th-epitopes with vaccines that used physically linked, but identical, CTL and Th-epitopes demonstrated that the latter resulted in more vigorous CTL responses (Shirai, 1994; Hiranuma, 1999; Bristol, 2000). Our vaccinations of normal B6 and MHC class II $-/-$ mice confirm that the use of a physically linked T-helper epitope is advantageous for the development of a strong CTL response. In addition, these experiments demonstrated that the interaction between E7-specific Th-cells and APC is responsible for this boost of the CTL response. Comparison of the CTL response induced by the minimal CTL epitope and the long peptide in normal and MHC class II $-/-$ mice revealed another interesting property of our long peptide vaccine. In these experiments the contribution of E7-specific Th-cells was eliminated and only differences in physical properties or kinetics of the peptides are likely to play a role. Because of its size, which excluded direct binding of peptide to MHC class I, said long peptide needed to be taken up by professional APC that are able to process exogenously derived antigens and present peptides in MHC class I. We demonstrated that DC activation only marginally affected the outcome of the E7-specific CTL response when the minimal peptide was used whereas DC activation was a prerequisite for the induction of a superior E7-specific CTL response by the long peptide vaccine. Together these data show that the CTL and Th-epitope present in said long peptide are preferably presented at the surface of professional APC. Vaccination with the minimal HPV16-derived CTL epitope results in a detectable CTL response that is not improved when DC activating agents are co-injected. This indicates that said peptide is not only presented at the surface of activated professional APC but also in MHC class I molecules of other nucleated cells. This is not surprising because said peptide can directly bind to MHC class I at the cell surface (Feltkamp et al., 1993). Presentation of said CTL peptide by cells that cannot deliver co-stimulation (e.g. non-immune cells) results in a dampening of CTL responses and the presentation of said E7-CTL epitope by these non-professional APC are, therefore, deleterious to the induction of E7-specific CTL. Notably, we have shown previously that vaccination with the minimal E1A-derived CTL epitope resulted in tolerance of E1A-specific CTL that,

WO 02/070006

50

PCT/NL01/00893

otherwise, were protective against E1A induced tumors (Toes 1996). Although, the possible presentation of the HPV16 E7-derived CTL epitope at the surface of non-professional APC does not hinder the induction of E7-specific CTL as seen in the adenovirus tumor model, the anti-tumor efficacy of these responses is hampered. Treatment of established tumors by therapeutic vaccination with the minimal CTL epitope and the DC activating agent CpG is far less effective when compared to the long peptide vaccine mixed with DC activating agents.

These results provide a scientific basis for the evaluation of this vaccine in human trials for both prophylactic and therapeutic intervention against HPV16 induced disease.

Brief Description of the Figures

FIG. 1 depicts the peptide E7₄₁₋₆₂ induced T-cell response that recognizes naturally processed antigen (Ag). PBMC from a healthy HLA-DR15, 4 and DQ6,7 positive blood donor were stimulated four times with peptide E7₄₁₋₆₂. The responding T-cells were tested in a 3-day proliferation assay (a, b, c) or stimulated for 1 day in order to measure the production of IFN γ by ELISA (d). Responder cells (R) and autologous or MHC class II matched antigen presenting cells (A) were incubated with the indicated Ags: recombinant HPV16 E6 protein (E6), recombinant HPV16 E7 protein (E7), recombinant HIV RT protein (RT) or peptides derived from E6 (eg E6/81-102, peptide E6₈₁₋₁₀₂) or derived from E7. Proliferation of the bulk T-cell culture (a), proliferation of the T-helper clone, derived from the bulk T-cell culture, and blocking of the E7 protein-specific response by adding an antibody against HLA-DR (b), proliferation of the T-helper clone when stimulated with partially MHC class II matched antigen presenting cells (c), and fine mapping of the minimal epitope by measurement of the IFN γ production per 24 h by the T-helper clone (d).

FIG. 2 depicts a peptide E7₂₂₋₅₆ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR3 and DQ2 positive blood donor were stimulated four times with peptide E7₂₂₋₅₆. Proliferation of the bulk T-cell culture (a), specific proliferation of the T-helper clone, derived from the bulk T-cell culture, when stimulated with E7₂₂₋₅₆, E7₈₁₋₅₃ and E7 protein (b), and fine mapping of the minimal epitope and MHC class II restriction by measurement of the IFN γ production per 24 h of the T-helper cell clone (c). (See, also, FIG. 1 and associated description).

FIG. 3 depicts a peptide E7₄₃₋₇₇ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR1,3 and DQ2 positive blood donor were stimulated four times with peptide E7₄₃₋₇₇. Proliferation of the bulk T-cell culture (a), specific proliferation of the T-helper cell clone against peptide E7₄₃₋₇₇ and E7 protein (b), recognition of partially matched (DR3,DQ2) peptide pulsed antigen presenting cell ("APC") (c) anti HLA-DR antibody blocks the E7-specific proliferation of the T-helper cell clone revealing HLA-DR3 as restriction element (d), and specific production of IFN γ by the T-helper cell clone when stimulated with E7₄₃₋₇₇ peptide or E7 protein (e). (See, also, FIG. 1 and associated description).

WO 02/070006

52

PCT/NL01/00093

FIG. 4 depicts the stimulation with influenza matrix 1 (M1)-peptides of MACS-separated CD45RA+ (naïve) T-cells (*left*) and CD45RO+ (memory) T-cells (*right*) results in the production of IFN γ in the CD45RO+ subset only. The M1 protein was divided in 16 overlapping peptides. Each pool consists of four 30 amino acid long peptides that overlap by 15 amino acids. Tet. tox.: tetanus toxoid.

FIG. 5 depicts a peptides E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR2 positive blood donor were stimulated four times with peptides E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅. Specific proliferation of the T-helper cell clone against peptide E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅ and E2 protein (a), specific production of IFN γ by the T-helper cell clone when stimulated with E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅ peptides (b), fine-mapping of the minimal epitope E2₃₁₆₋₃₃₀ (c) and anti HLA-DR antibody blocks the E2-specific IFN γ production of the T-helper cell clone revealing HLA-DR2 as restriction element (d). (See, also, FIG. 1 and associated description).

FIG. 6 depicts a peptides E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR2, DQ6(1) positive blood donor were stimulated four times with peptides E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2₃₁₆₋₃₄₅. Specific proliferation of the T-helper cell clone against peptide E2₃₀₁₋₃₃₀ and E2 protein (a), specific production of IFN γ by the T-helper cell clone when stimulated with E2₃₀₁₋₃₃₀ (b), fine-mapping of the minimal epitope E2₃₁₁₋₃₂₅ (c), and anti HLA-DQ antibody blocks the E2-specific IFN γ production of the T-helper cell clone revealing HLA-DQ6(1) as restriction element(d). (See, also, FIG. 1 and associated description).

FIG. 7 depicts a peptide E2₃₃₁₋₃₆₅ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR2 positive blood donor were stimulated four times with peptide E2₃₃₁₋₃₆₅. Specific proliferation of the T-helper cell clone against peptide E2₃₃₁₋₃₆₅ and E2 protein (a), specific production of IFN γ by the T-helper cell clone when stimulated with E2₃₃₁₋₃₆₅ peptide (b), fine-mapping of the minimal epitope E2₃₄₆₋₃₅₅ (c) and anti HLA-DR antibody blocks the E2-specific IFN γ production of the T-helper cell clone revealing HLA-DR2 as restriction element (d). (See, also, FIG. 1 and associated description).

WO 02/070006

53

PCT/NL01/00893

FIG. 8 depicts a peptide E2₃₅₁₋₃₆₅ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR1 positive blood donor were stimulated four times with peptide E2₃₅₁₋₃₆₅. Specific proliferation of the T-helper cell clone against peptide E2₃₅₁₋₃₆₅ and E2 protein (a), fine-mapping of the minimal epitope E2₃₅₁₋₃₆₅ (b), and anti HLA-DR antibody blocks the E2-specific IFN γ production of the T-helper cell clone revealing HLA-DR1 as restriction element (c). (See, also, FIG. 1 and associated description).

FIG. 9 depicts E2-peptide specific IFN γ -production of T-cells present in the CD45RO+ (memory)-fraction of PBMC. The CD45RO+ memory fraction of PBMC were isolated using MACS technology. Following separation these memory T-cells were stimulated with indicated peptides. After 10 days of incubation the cells were harvested, washed and then stimulated with the indicated peptides in a 96-well ELISPOT plate at 50,000 PBMC per well. Healthy blood donor derived CD45RO+ PBMC contain HPV16 E2-specific memory T-cells as shown by the reaction to several pools of: two 30 amino acid long E2 peptides (first amino acid of first peptide and last amino acid of second peptide are indicated at X-axis) that were selected based on immunogenicity of these peptides, which was established in previous assays (a-b), or four 30 amino acid long E2 peptides (indicated are the position of the first and last amino acid of the sequence that is covered by these 4 peptides in the E2-protein) (d-f). MRM: memory response mix which consists of a mix of *Mycobacterium tuberculosis*, Tetanus toxoid and *Candida albicans* antigens. (See, also, FIG. 4, and associated description). *, statistically significant response (p<0.05).

FIG. 10 depicts the survival of C57/Bl6 mice when immunized once with 30 μ g of the 32 amino acid long peptide (RECNSSTDSCDSGPSNTPPEIHVPVRLCPPIKP) containing the minimal CTL epitope. Mice were challenged 14 days later with 0,5 million AR5 tumor cells at the opposite flank. In contrast, mice immunized with the minimal 10 amino acid long CTL epitope (SGPSNTPPEI) were not protected.

FIG. 11 A-E. MHC class II T helper cells enhance E7⁴⁹⁻⁵⁷-specific CTL responses following prime-boost vaccinations with the HPV16 E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-mer. Mice (B6) were either primed once with E7⁴⁹⁻⁵⁷ peptide (A) or E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-mer (B), or boosted 50 days later with the same peptides: E7⁴⁹⁻⁵⁷ peptide (C) or E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-mer (D). MHC class II^{-/-} mice were similarly primed and boosted with E7⁴⁹⁻⁷⁷ 35-mer (E). Peptides

WO 02/070006

54

PCT/NL01/00893

were emulsified in IFA. Ten days following the final vaccination spleens were harvested and cultures were stimulated with the E7⁴⁹⁻⁵⁷-expressing tumor cell line 13.2. Based on the forward and side scatter pattern of isolated spleen cells in the FACS, CD8 (FL4-H) staining and H-2D^b-RAHYNIVTF-tetramers staining spleen cells are subjected to the analysis of CD8⁺ H-2D^b-RAHYNIVTF-tetramer positive T-cells. Indicated on the y-axis are the percentage of CD8⁺ T-cells that were H-2D^b-RAHYNIVTF-tetramers positive. Each column on the x-axis represents an individual mouse. The horizontal line indicates background responses plus standard deviation of naïve mice (1.31%).

FIG 12A-B. E7-specific T helper type 1 cells are induced following vaccination with the E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer. Sets of 5 Mice (B6) were injected subcutaneously with E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer admixed with IFA (A) or CpG (B). Spleens were harvested after 10-days and spleen cells cultures were stimulated with D1 cells pulsed with the E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer. After 1 week of in vitro stimulation the specificity of the CD4⁺ fraction of the cultures was tested by measuring the IFN- γ production of individual T cells. White columns illustrate background IFN- γ production by CD4⁺ T-helper cells stimulated with non-pulsed D1 cells, whereas black columns represent IFN- γ production by CD4⁺ T-helper cells when stimulated with E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer pulsed D1 cells. Each set of two columns represents an individual mouse.

FIG13 A-F. A single vaccination of the E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer combined with DC-activating adjuvantia results in high CTL responses. Mice (B6) were only primed and not boosted with the E7⁴³⁻⁷⁷ peptide (depicted on the left) or the 35-mer (depicted on the right). Anti-CD40 Ab (A), GM-CSF (B), GM-CSF plus IFA (C), MPL (D) and ODN-CpG (E) were used as adjuvants. Similarly, MHC class II^{-/-} mice were only primed and not boosted with the E7⁴³⁻⁷⁷ 35-mer and ODN-CpG (13F). Spleens were harvested after 10-days and cultures were in vitro stimulated with the E7⁴⁹⁻⁵⁷-expressing tumor cell line 13.2 for 7 days. Subsequently, the percentage of E7⁴⁹⁻⁵⁷-tetramer-positive CD8⁺ cells was determined by FACS-analysis (y-axis). Each column on the x-axis represents an individual mouse. The horizontal line indicates background responses plus standard deviation of naïve mice (1,31%).

FIG.14 depicts the outgrowth of HPV16 E7 positive tumors in either TC-1 tumor challenged mice that were vaccinated with either the minimal CTL epitope E7⁴⁹⁻⁵⁷

WO 02/070006

55

PCT/NL01/00893

mixed with a dendritic cell activating agent (CpG) (B; n=9 mice) or vaccinated with HPV16 E7₄₈₋₇₇ mixed mixed with a dendritic cell activating adjuvant (CpG) (C; n=10 mice) or not vaccinated (A; n=10 mice) at the day that all mice had small palpable tumors (day 10). Mice were boosted 14 days later and tumor outgrowth was followed for 65 days after the first immunization. Note that tumor volumes started to decrease 7-10 days after immunization and they had reached volumes of 200-500 mm³. Furthermore, non-immunized mice died 2-3 days after such a tumor volume was reached. 6/9 mice vaccinated with the minimal epitope died of their tumor, whereas 8/10 mice vaccinated with the long peptide completely eradicated their tumor.

FIG. 15 depicts the proliferation of human CD4⁺ T-helper clones stimulated with peptide E2₄₆₋₇₅ that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR4 positive blood donor were stimulated four times with peptides E2₄₆₋₇₅. Specific proliferation of the T-helper cell clone 47 against peptide E2₄₆₋₇₅ and the N-terminal E2 protein but not the C-terminal half of the E2 protein (left) and the restriction via HLA-DR4 (right) is shown. The peptide-specificity of T-helper clone 36 that recognizes a different, yet overlapping, peptide E2₅₁₋₇₆ is shown at the bottom. (See, also, FIG. 1 and associated description).

FIG.16 depicts a peptide E6₁₂₇₋₁₅₈ induced T-cell response that recognizes naturally processed Ag. PBMC from a healthy HLA-DR1 positive blood donor were stimulated four times with peptide E6₁₂₇₋₁₅₈. Proliferation of the bulk T-cell culture (top, left) and IFN γ production (top, right). In addition, the specific proliferation (bottom, left) and IFN γ production (bottom, right) of the T-helper clone, derived from the bulk T-cell culture, and HLA-restriction when stimulated with E6₁₂₇₋₁₅₈, or E6 protein is depicted. (See, also, FIG. 1 and associated description).

WO 02/070006

56

PCT/NL01/00093

References

- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., and Lipman,D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402 (1997).
- BARRASSO, R., DE BRUX, J., CROISSANT, O. AND ORTH, G., High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.*, **317**, 916-23 (1987).
- BAUR, M.P., NEUGEBAUER, M. AND DEPPE, H., Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. *In*: E.D. Albert, M.P. Baur and W.R. Mayr (eds.), *Histocompatibility Testing*, pp. 333-341, Springer-Verlag, Berlin (1984).
- Bermas,B.L. and Hill,J.A., Proliferative responses to recall antigens are associated with pregnancy outcome in woman with a history of recurrent spontaneous abortion. *J Clin Invest*, **100**, 1330-4. (1997).
- Borysiewicz, L.K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G.W.G., Westmoreland, D., Evans, A.S., Adams, M., Stacey, S.N., Boursnell, M.E.G., Rutherford, E., Hickling, E. and Inglis, S.C., A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, **347**, 1523-1527 (1996).
- BOSCH, F.X., MANOS, M.M., MUNOZ, N., SHERMAN, M., JANSEN, A.M., PETO, J., SCHIFFMAN, M.H., MORENO, V., KURMAN, R. AND SHAH, K.V., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 796-802 (1995).
- BRISTOL, J. A., C. ORSINI, P. LINDINGER, J. THALHAMER, AND S. I. ABRAMS. 2000. Identification of a ras oncogene peptide that contains both CD4(+) and CD8(+) T cell epitopes in a nested configuration and elicits both T cell subset responses by peptide or DNA immunization. *Cell Immunol* **205**:73.

WO 02/070006

57

PCT/NL01/000893

CLAAS, E.C., MELCHERS, W.J., VAN DER LINDEN, H.C., LINDEMAN, J. AND QUINT, W.G., Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 135, 703-9 (1989).

Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M.L., Stefanon, B., Venzon, D.J., Shearer, G.M., De Palo, G. and Clerici, E., Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J.Natl.Cancer Inst.*, 89, 245-250 (1997).

Coleman, N., Birley, H.D., Renton, A.M., Hanna, N.F., Ryait, B.K., Byrne, M., Taylor-Robinson, D. and Stanley, M.A., Immunological events in regressing genital warts. *Am. J. Clin. Pathol.*, 102, 768-74 (1994).

DAS, S.N., KHANNA, N.N. AND KHANNA, S., A multiparametric observation of immune competence in breast cancer and its correlation with tumour load and prognosis. *Ann Acad Med Singapore*, 14, 374-81 (1985).

DE BRULIN, M.L., SCHUURHUIS, D.H., VIERBOOM, M.P., VERMEULEN, H., DE COCK, K.A., OOMS, M.E., RESSING, M.E., TOEBES, M., FRANKEN, K.L., DRIJFHOUT, J.W., OTTENHOFF, T.H., OFFRINGA, R. AND MELIEF, C.J., Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein- loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res.*, 58, 724-731 (1998).

DE GRUIJL, T., BONTKES, H.J., WALBOOMERS, J.M.M., STUKART, M.J., DOEKHIE, F.S., REMMINK, A.J., HELMERHORST, T.J.M., VERHEIJEN, R.H.M., DUGGAN-KEEN, M.F., STERN, P.L., MEIJER, C.J.L.M. AND SCHEPER, R.J., Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: A longitudinal study. *Cancer Res.*, 58, 1700-1706 (1998).

DYSON N, HOWLEY PM, MUNGER K, HARLOW E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243(4893):934, 1989.

WO 02/07006

58

PCT/NL01/00893

HO GY, BURK RD, FLEMING I, KLEIN RS: Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56(6):788, 1994

EARLY, E. AND REEN, D.J., Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 116, 527-33 (1999).

EVANS, E.M., MAN, S., EVANS, A.S. AND BORYSIEWICZ, L.K., Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.*, 57, 2943-2950 (1997).

FELTKAMP MC, SMITS HL, VIERBOOM MP, MINNAAR RP, DE JONGE BM, DRIJFHOUT JW, TER SCHEGGET J, MELIEF CJ, KAST WM: Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16- transformed cells. *Eur J Immunol* 23(9):2242, 1993

Franken,K.L., Hiemstra,H.S., van Meijgaarden,K.E., Subronto,Y., den Hartigh,J., Ottenhoff, T.H. and Drijfhout,J.W., Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif*, 18, 95-9 (2000).

Fu TM, Guan L, Friedman A, Schofield TL, Ulmer JB, Liu MA, et al., Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge. *J Immunol* 1999; 162(7):4163-4170.

Geluk, A., Taneja, V., Van Meijgaarden, K.E., Zanelli, E., Abou-Zeid, C., Thole, J.E., de Vries, R.R., David, C.S. and Ottenhoff, T.H., Identification of HLA class II-restricted determinants of Mycobacterium tuberculosis-derived proteins by using HLA-transgenic, class II- deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 10797-10802 (1998).

GELUK, A., VAN MEIJGAARDEN, K.E., DRIJFHOUT, J.W. AND OTTENHOFF, T.H., Clip binds to HLA class II using methionine-based, allele-dependent motifs as well as allele-independent supermotifs. *Mol.Immunol.*, 32, 975-981 (1995).

WO 02/070006

59

PCT/NL01/00893

GHOSH, P., KOMSCHLIES, K.L., CIPPITELLI, M., LONGO, D.L., SUBLESKI, J., YE, J., SICA, A., YOUNG, H.A., WILTROUT, R.H. AND OCHOA, A.C., Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst*, 87, 1478-83 (1995).

HALPERT R, FRUCHTER RG, SEDLIS A, BUTT K, BOYCE JG, SILLMAN FH: Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 68(2):251, 1986

HAN R, CLADEL NM, REED CA, PENG X, CHRISTENSEN ND: Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. *J Virol* 73(8):7039, 1999.

HIRANUMA, K., S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, S. KUSUKI, M. ISOGAWA, G. KIM, M. KAITO, K. KURIBAYASHI, Y. ADACHI, AND Y. YASUTOMI. 1999. Helper T cell determinant peptide contributes to induction of cellular immune responses by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J Gen Virol* 80:187.

HO GY, Bierman R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338(7):423, 1998.

HOHN, H., PILCH, H., GUNZEL, S., NEUKIRCH, C., HILMES, C., KAUFMANN, A., SELIGER, B. AND MAEURER, M.J., CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR- restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J. Immunol.*, 163, 5715-22 (1999).

HOPFL, R., WIDSCHWENDTER, A., CHRISTENSEN, N.D., WIELAND, U., ZUMBACH, K., SANDRA, H., PFISTER, H.J., PAWLITA, M. AND HEIM, K., Delayed-type hypersensitivity to HPV16 E7 and humoral immunity to HPV16/18 E6, E7 and HPV 6/11/16/18/31 L1-virus like particles in women with cervical neoplasia. *In*: X. Castellsague, F.X. Bosch, S. de Sanjose, V. Moreno and J. Ribes (eds.), 18th international papillomavirus conference, pp. 299, Institut Catala d'Oncologia, Barcelona, Spain (2000).

WO 02/070006

60

PCT/NL01/00893

JONDAL M, SCHIRMBECK R, REIMANN J: MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5(4):295, 1996

Karlsson,R., Jonsson,M., Edlund,K., Evander,M., Gustavsson,A., Boden,E., Rylander,E. and Wadell,G., Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm Dis*, 22, 119-27 (1995).

KAST WM, ROUX L, CURREN J, BLOM HJ, VOORDOUW AC, MELOEN RH, KOLAKOFSKY D, MELIEF CJ: Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88(6):2283, 1991

KOUTSKY L: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 102(5A):3, 1997.

KURTS C, CARBONE FR, BARNDEN M, BLANAS E, ALLISON J, HEATH WR, MILLER JF: CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 186(12):2057, 1997

Manca,F., Li Pira,G., Fenoglio,D., Fang,S.P., Habeshaw,A., Knight,S.C. and Dalgleish,A.G., Dendritic cells are potent antigen-presenting cells for in vitro induction of primary human CD4+T-cell lines specific for HIV gp 120. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7, 15-23 (1994).

MARRAZZO JM, STINE K, KOUTSKY LA: Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women: a review. *Am J Obstet Gynecol* 183(3):770, 2000

MATORRAS R, ARICETA JM, REMENTERIA A, CORRAL J, GUTIERREZ DE TERAN G, DIEZ J, MONTOYA F, RODRIGUEZ-ESCUDERO FJ: Human immunodeficiency virus-induced immunosuppression: a risk factor for human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 164(1 Pt 1):42, 1991

WO 02/070006

61

PCT/NL01/00893

McCutcheon,M., Wehner,N., Wensky,A., Kushner,M., Doan,S., Hisao,L., Calabresi,P., Ha,T., Tran,T.V., Tate,K.M., Winkelhake,J. and Spack,E.G., A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods*, **210**, 149-66 (1997).

MELIEF, C.J.M., TOES, R.E.M., MEDEMA, J.P., VANDER BURG, S.H., OSSENDORP, F. AND OFFRINGA, R., Strategies for Immunotherapy of Cancer. *Adv. Immunol.*, **75**, 235 - 281 (2000).

Mellman,L., Turley,S.J. and Steinman, R.M., Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol*, **8**, 231-7 (1998).

NAIPAL, A.M., D'AMARO, J., BRUNING, J.W., VAN LEEUWEN, A. AND VAN ROOD, J.J., Automated reading of Propidium Iodide lymphocytotoxicity tests for HLA- DR, MB, MT typing. *Tissue Antigens*, **24**, 302-6 (1984).

NIMAKO, M., FIANDER, A., WILKINSON, G.W.G., BORYSIEWICZ, L.K. AND MAN, S., Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res.*, **57**, 4855-4861 (1997).

OSSENDORP F, MENGEDE E, CAMPS M, FILIUS R, MELIEF CJM: Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J.Exp.Med.* 187(5):1, 1998.

PARDOLL, D.M. AND TOPALIAN, S.L., The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 588-94 (1998).

Pittet, M.J., Valmori, D., Dunbar, P.R., Speiser, D.E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J.C. and Romero, P., High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.*, **190**, 705-15 (1999).

RAMMENSEE, H.G., FRIEDE, T. AND STEVANOVIIC, S., MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, **41**, 178-228 (1995).

WO 02/070006

62

PCT/NL01/00893

REIMANN J, KAUFMANN SH: Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr Opin Immunol* 9(4):462, 1997

RESSING, M.E., SETTE, A., BRANDT, R.M.P., RUPPERT, J., WENTWORTH, P.A., HARTMAN, M., OSEROFF, C., GREY, H.M., MELIEF, C.J.M. AND KAST, W.M., Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201 binding peptides. *J.Immunol.*, 154, 5934-5943 (1995).

RESSING, M.E., VAN DRIEL, W.J., BRANDT, R.M., KENTER, G.G., DE JONG, J.H., BAUKNECHT, T., FLEUREN, G.J., HOOGERHOUT, P., OFFRINGA, R., SETTE, A., CELIS, E., GREY, H., TRIMBOS, B.J., KAST, W.M. AND MELIEF, C.J., Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J. Immunother.*, 23, 255-66 (2000).

RESSING, M.E., VAN DRIEL, W.J., CELIS, E., SETTE, A., BRANDT, R.M.P., HARTMAN, M., ANHOLTS, J.D.H., SCHREUDER, G.M.T., TER HARMSSEL, W.B., FLEUREN, G.J., TRIMBOS, B.J., KAST, W.M. AND MELIEF, C.J.M., Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.*, 56, 582-588 (1996).

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S., Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, 1, 362-8 (1999).

SCHIEFFNER M, WERNES BA, HUIBREGTSE JM, LEVINE AJ, HOWLEY PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63(6):1129, 1990.

SCHOENBERGER SP, TOES RE, VAN DER VOORT EI, OFFRINGA R, MELIEF CJ: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393(6684):480, 1998.

WO 02/070006

63

PCT/NL01/00893

Sedlik C, Dadaglio G, Saron MF, Deriaud E, Rojas M, Casal SI, et al., In vivo induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity. *J Virol* 2000; 74(13):5769-5775.

SELVAKUMAR R, BORENSTEIN LA, LIN YL, AHMED R, WETTSTEIN FO: Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol* 69(1):602, 1995.

SHIRAI, M., C. D. PENDLETON, J. AHLERS, T. TAKESHITA, M. NEWMAN, AND J. A. BERZOWSKY. 1994. Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 152:549.

Thomas,K.K., Hughes,J.P., Kuypers,J.M., Kiviati,N.B., Lee, S.K., Adam,D.E. and Koutsky, L.A., Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types [In Process Citation]. *J Infect Dis*, 182, 1097-102 (2000).

TOES RE, OFFRINGA R, BLOM RJ, MELIEF CJ, KAST WM: Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15):7855, 1996a.

TOES RE, BLOM RJ, OFFRINGA R, KAST WM, MELIEF CJ: Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol* 156(10):3911, 1996b

TOES, R.E.M., OSSENDORP, F., OFFRINGA, R. AND MELIEF, C.J.M., CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J.Exp.Med.*, 189, 753 - 756 (1999).

VAN DER BURG, S.H., KWAPPENBERG, K.M., GELUK, A., VAN DER KRUK, M., PONTESILLI, O., HOVENKAMP, E., FRANKEN, K.L., VAN MEL/GAARDEN, K.E., DRIJFHOUT, J.W., OTTENHOFF, T.H., MELIEF, C.J. AND OFFRINGA, R., Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J. Immunol.*, 162, 152-60 (1999).

WO 02/070006

64

PCT/NL01/00893

VAN DER BURG, S.H., K.M.C. KWAPPENBERG, T.O'NEILL, R.M.P. BRANDT, C.J.M. MELIEF, J.K. HICKLING, R.OFFRINGA (2001): Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vaccine*, 19:3652-3660

WANEBO, H.J., JUN, M.Y., STRONG, E.W. AND OETTGEN, H., T-cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Am J Surg*, 130, 445-51 (1975).

ZUR HAUSEN H: Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288:F55, 1996.

CLAIMS

1. A method for inducing and/or enhancing an antigen specific T cell response comprising providing a system capable of exhibiting said response with a peptide comprising a T cell epitope specific for said antigen, said peptide comprising 22-45 amino-acid residues.
2. A method according to claim 1, wherein said peptide comprises 22-40 amino acid residues.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein said peptide comprises a sequence capable of activating an antigen presenting cell.
4. A method according to any one of claims 1-3, wherein said peptide comprises a T-helper activating sequence.
5. A method according to any one of claims 1-4, wherein upon providing said peptide said peptide is processed by an antigen presenting cell.
6. A method according to any one of claims 1-5, wherein said peptide comprises at least two T cell epitopes for said antigen.
7. A method according to any one of claims 1-6, wherein at least one of said epitopes comprises a T-helper cell epitope for said antigen or a cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope for said antigen.
8. A method according to any one of claims 1-7, wherein said peptide comprises at least one T-helper cell epitope for said antigen and at least one cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope for said antigen.
9. A method according to any one of claims 1-8, wherein said antigen comprises a viral protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof.
10. A method according to claim 9, wherein said antigen comprises a human papillomavirus (HPV) protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof.
11. A method according to claim 9 or claim 10, wherein said protein comprises E2, E6 and/or E7.
12. A method according to any one of claims 1-8, wherein said antigen comprises an auto-antigen, preferably a tumor cell specific auto-antigen or a functional part, derivative and/or analogue thereof.
13. A method according to any one of claims 1-8, wherein said antigen comprises a viral or (Myco)bacterial antigen.

14. A method according to claim 13, wherein said antigen comprises *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* hsp65 369-412.
15. A method according to any one of claims 1-14, wherein immunizing with a peptide comprising 21 amino-acids or less induces tolerance and/or functional deletion of antigen specific CTL in said system.
16. A method according to any one of claims 1-15, further comprising providing said system with an adjuvant.
17. A method according to claim 16, wherein said adjuvant comprises an exosome, a dendritic cell, monophosphoryl lipid A and/or CpG nucleic acid.
18. A method according to any one of claims 1-17, wherein said system comprises an animal.
19. A method according to claim 18, wherein said system comprises a human.
20. A method according to claim 18 or claim 19, wherein said animal is suffering from or at risk of suffering from a disease that is at least in part treatable or preventable by inducing and/or enhancing said immune response.
21. A method according to claim 20, wherein said disease comprises a (myco)bacterial disease, a viral disease and/or cancer.
22. A peptide comprising 22-45 amino acid residues, comprising a T cell epitope specific for an antigen.
23. A peptide according to claim 22, which comprises 22-40 amino acid residues.
24. A peptide according to claim 22 or 23, comprising at least two T cell epitopes specific for said antigen.
25. A peptide according to any one of claims 22-24, wherein said peptide comprises a CTL epitope.
26. A peptide according to any one of claims 22-25, wherein said peptide comprises a T helper cell epitope.
27. A peptide according to claim 26, wherein said CTL epitope leads to tolerance or functional deletion of CTL specific for said epitope, when present on a peptide comprising less than 22 amino acid residues.
28. A peptide according to any one of claims 22-27, which comprising between 22-35 amino acid residues.
29. A peptide according to claim 28, comprising 32, 33, 34 or 35 amino acid residues.
30. Use of a peptide according to any one of claims 22-29 for inducing and/or enhancing an immune response specific for said antigen.
31. Use of a peptide according to any one of claims 22-29, for the preparation of a

WO 02/070006

67

PCT/NL01/00893

vaccine.

32. Use of a peptide according to any one of claims 22-29, for the preparation of a vaccine for the treatment and/or the prevention of an HPV-related disease.
33. Use of a peptide according to any one of claims 22-29, for the preparation of a medicament.
34. Use of a peptide according to anyone of claims 22-29 for the preparation of a medicament for the treatment of an individual suffering from or at risk of suffering from a (myco)bacterial disease, a viral disease and/or cancer.
35. A method for obtaining an antigen specific T cell, comprising inducing and/or enhancing a T cell response specific for said antigen with a method according to any one of claims 1-21, and collecting said antigen specific T cell from said system.
36. An isolated T cell obtainable by a method according to claim 35.
37. Use of a T cell according to claim 36, for preparing a medicament.
38. A vaccine comprising a peptide according to any one of claims 22-29.
39. A medicament comprising a peptide according to any one of claims 22-29, and/or a T cell according to claim 36.
40. A use of a peptide according to any one of claims 22-29, to determine whether a collection of cells comprises an antigen specific T cell, said peptide comprising an epitope for said antigen.
41. A use according to claim 40, for determining whether an individual comprises immunity for said antigen.
42. A use according to claim 40 or 41, wherein the presence of said T cell is determined by ELISA, ELISPOT, delayed type hypersensitivity response, intracellular cytokine staining, and/or extracellular cytokine staining.
43. An immunogenic epitope selected from the central part of a human papilloma virus 16 E7 protein.
44. An immunogenic epitope according to claim 43, wherein said central part comprises a region spanning amino acid 35-77 of a human papilloma virus 16 E7 protein.
45. An immunogenic epitope according to claim 43, wherein said central part comprises a region spanning amino acid 35-50 in said E7 protein.
46. An immunogenic epitope according to claim 43, wherein said central part comprises a region spanning amino acid 50-62 in said E7 protein.
47. An immunogenic epitope according to claim 43, wherein said central part comprises a region spanning amino acid 43-77 in said E7 protein.

WO 02/07006

68

PCT/NL01/00893

48. An immunogenic epitope selected from the C-terminal part of a human papilloma virus 16 E6 protein.
49. An immunogenic epitope according to claim 48, wherein said C-terminal part comprises a region spanning amino acid 81-158 of a human papilloma virus 16 E6 protein.
50. An immunogenic epitope according to claim 48, wherein said C-terminal part comprises a region spanning amino acid 127-140 of a human papilloma virus 16 E6 protein.
51. An immunogenic epitope according to claim 48, wherein said C-terminal part comprises a region spanning amino acid 121-142 of a human papilloma virus 16 E6 protein.
52. An immunogenic epitope selected from a region spanning amino acid 31-120, 151-195 or 271-365 of a human papilloma virus 16 E2 protein.
53. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 46-75 in said E2 protein.
54. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 51-70 in said E2 protein.
55. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 61-76 in said E2 protein.
56. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 811-825 in said E2 protein.
57. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 316-330 in said E2 protein.
58. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 346-355 in said E2 protein.
59. An immunogenic epitope according to claim 52, wherein said region is spanning amino acid 351-365 in said E2 protein.
60. A peptide comprising an immunogenic epitope according to anyone of claims 43-59.
61. A peptide according to claim 60, capable of complexing with an MHC class II molecule.
62. A peptide according to claim 60, tested for its capability of eliciting IFN γ production by PBMC derived from an individual diagnosed with CIN III and/or cervical carcinoma.
63. A method for generating a human papilloma virus 16 specific T-cell comprising contacting a collection of naïve T-cells with a peptide according to anyone of claim 60.

WO 02/070006

69

PCT/NL01/00893

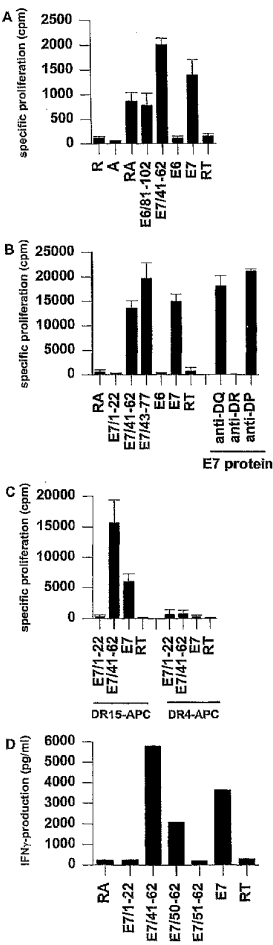
- 62 and culturing at least part of said collection of T-cells.
- 64.A method for inducing IFN γ production by a human papilloma virus 16 specific memory T-cell comprising contacting a collection of T-cells of a subject infected with human papilloma virus 16 with a peptide according to anyone of claim 60-62 and culturing at least part of said collection of T-cells.
- 65.A method according to claim 63 or claim 64 further comprising isolating said human papilloma virus 16 specific T-cell.
- 66.An isolated T cell obtainable by a method according to claim 65.
- 67.A method for eliciting and/or enhancing an HPV16 E7 protein-specific, and/or an HPV16 E6 protein-specific, and/or an HPV16 E2 protein-specific immune response in an individual comprising administering to said individual a peptide according to anyone of claims 60-62 and/or a T-cell according to claim 66.
- 68.A vaccine comprising a peptide according to anyone of claims 60-62 and a suitable carrier.
- 69.Use of a T cell according to claim 66 for immunotherapy.
- 70.Use of a vaccine according to claim 68 or a T cell according to claim 66, for the treatment of a subject comprising an HPV16 lesion.
- 71.A method for determining whether a collection of T cells comprises a memory T cell specific for an epitope comprising
- providing said collection of T cells with a peptide comprising said epitope
 - culturing said collection of T cells in the presence of an IFN γ antibody, and
 - detecting any bound IFN γ .

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

1/16

Fig. 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

2/16

Fig. 2

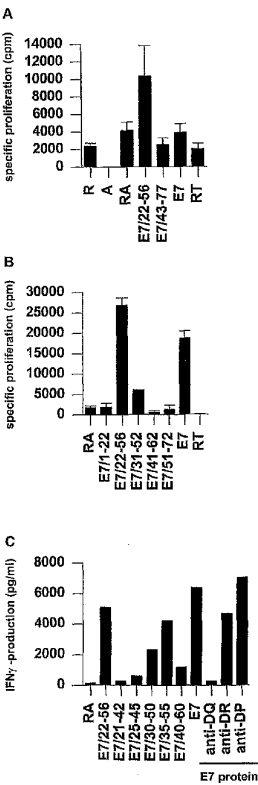


Fig. 3

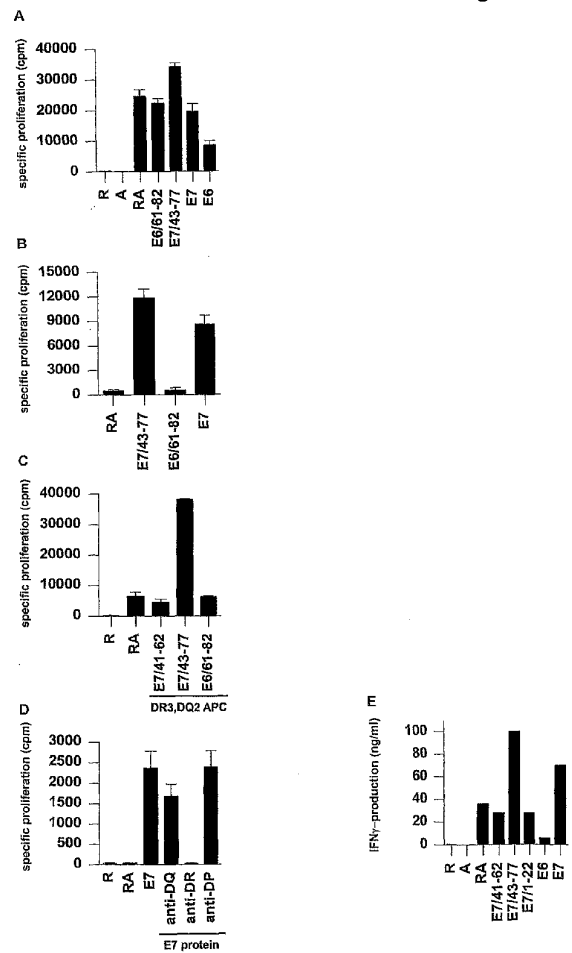
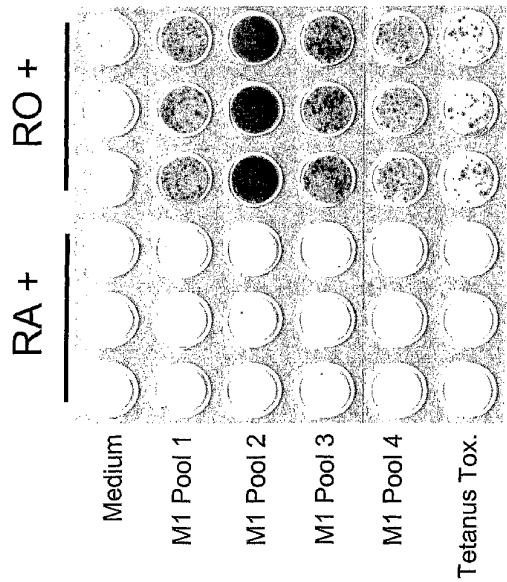


Fig. 4



WO 02/070006

5/16

PCT/NL01/00893

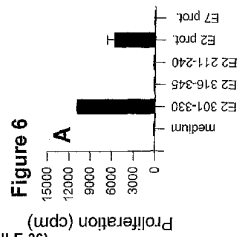
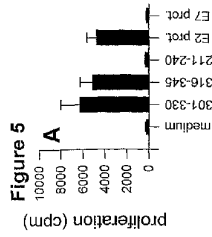
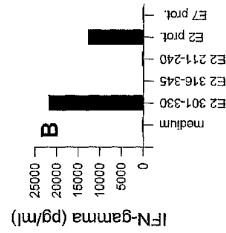
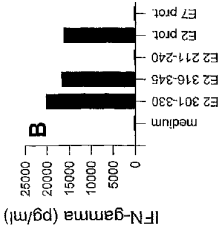
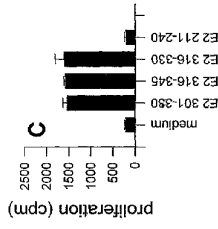
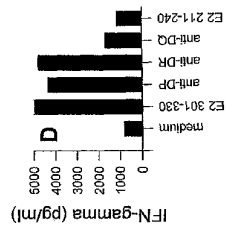
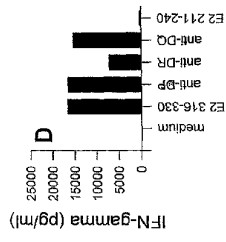


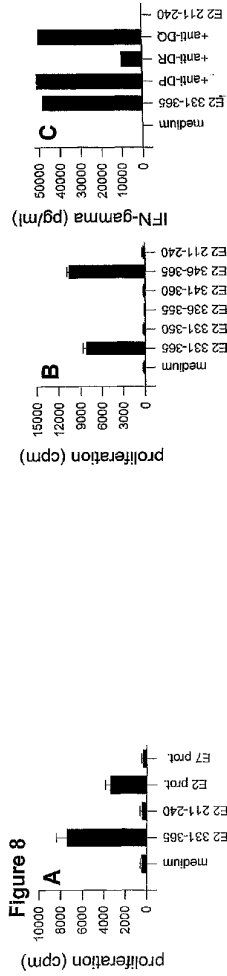
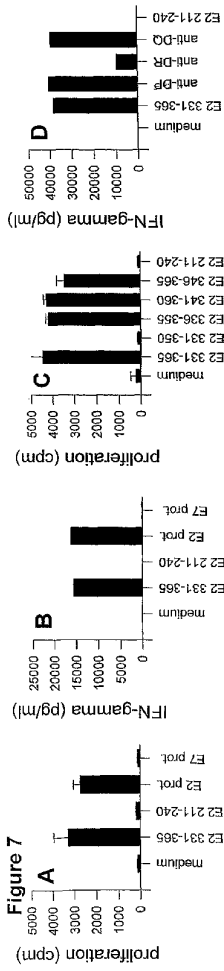
Figure 5

Figure 6

WO 02/070006

6/16

PCT/NL01/00893

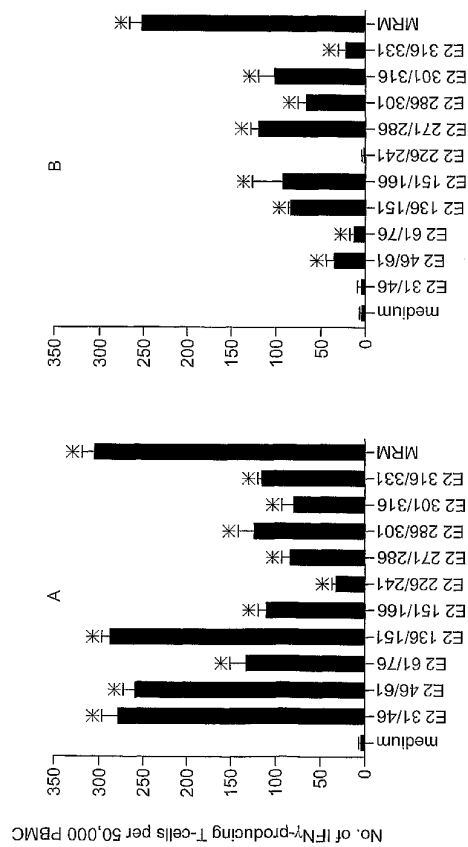


WO 02/070006

PCT/NL01/00893

7/16

Fig. 9



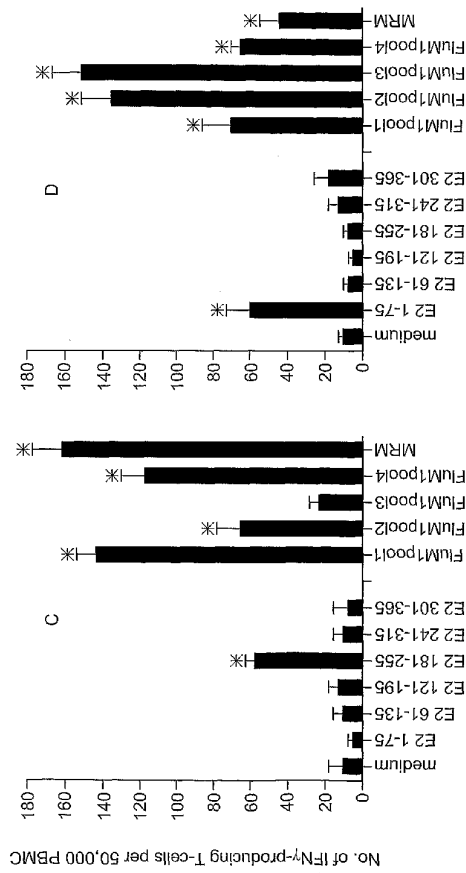
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

8/16

Fig. 9, contd.



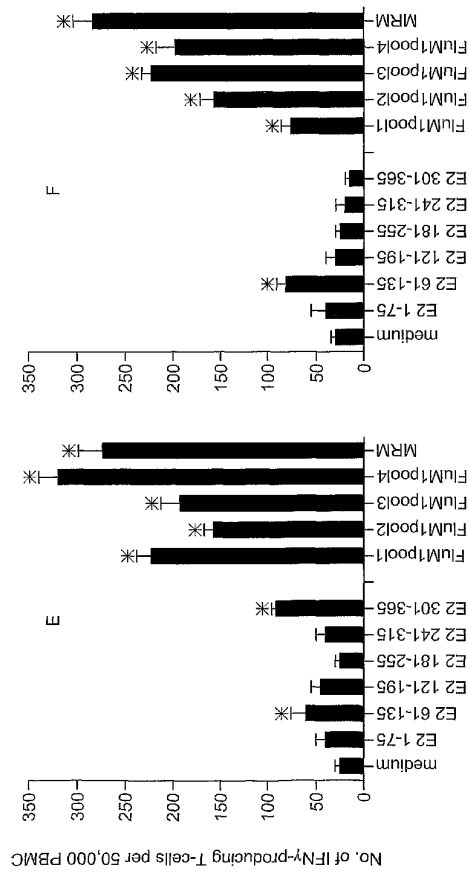
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

9/16

Fig. 9, contd.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

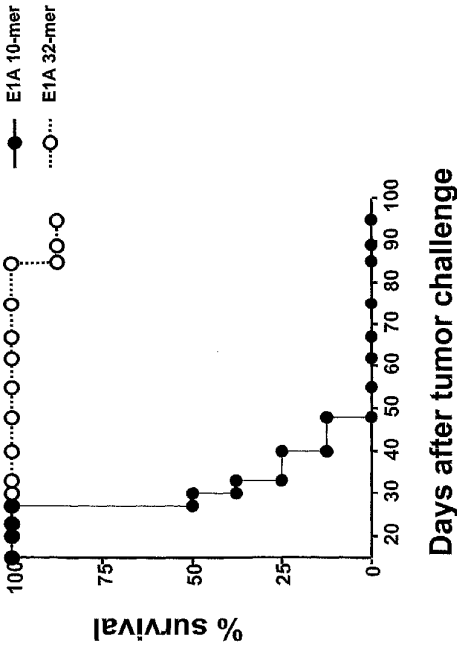
WO 02/070006

PCT/NL01/00893

10/16

Fig. 10

Vaccination with Ad5E1A 32-mer peptide in IFA
induces protective anti-tumor immunity

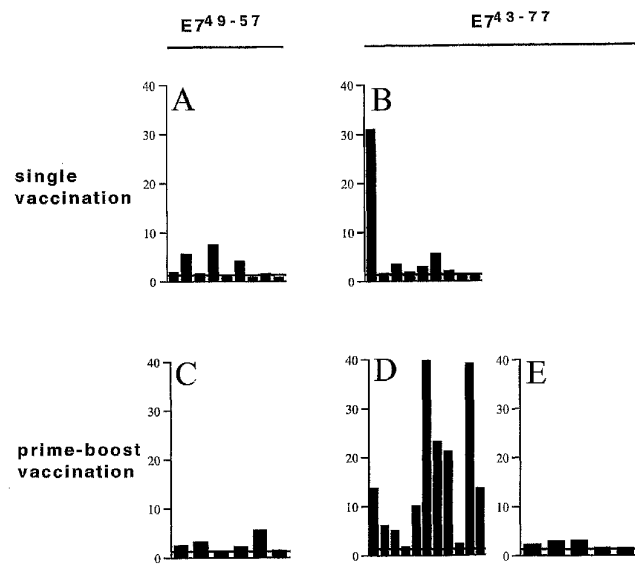


WO 02/070006

PCT/NL01/00893

11/16

Fig. 11

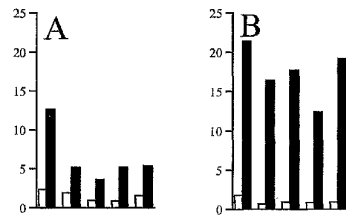


WO 02/070006

12/16

PCT/NL01/00893

Fig. 12

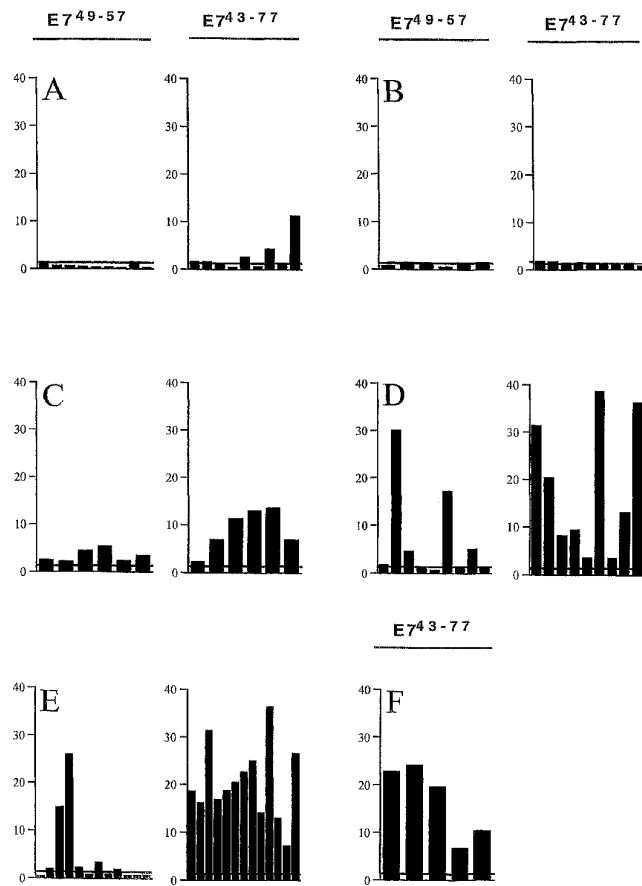


WO 02/070006

13/16

PCT/NL01/00893

Fig. 13



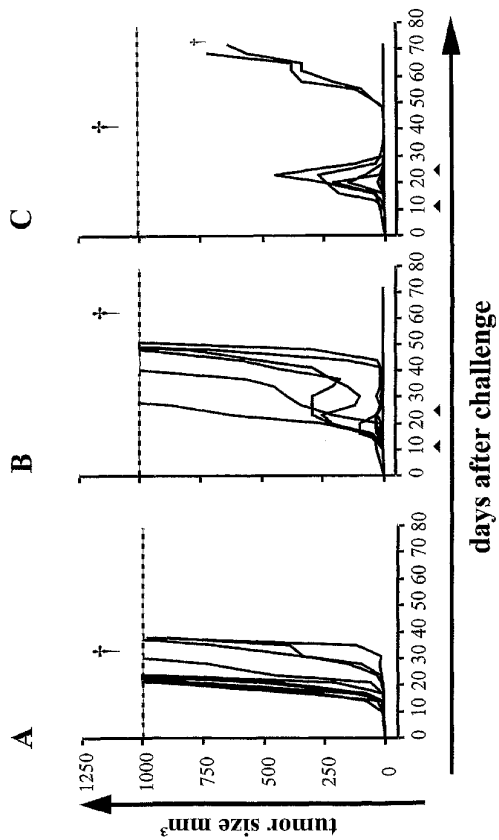
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

14/16

Fig. 14



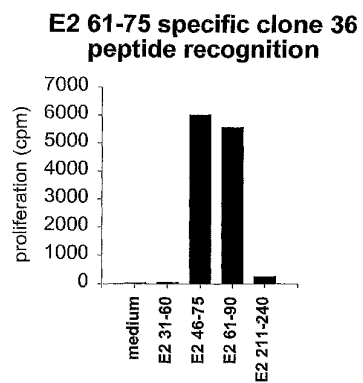
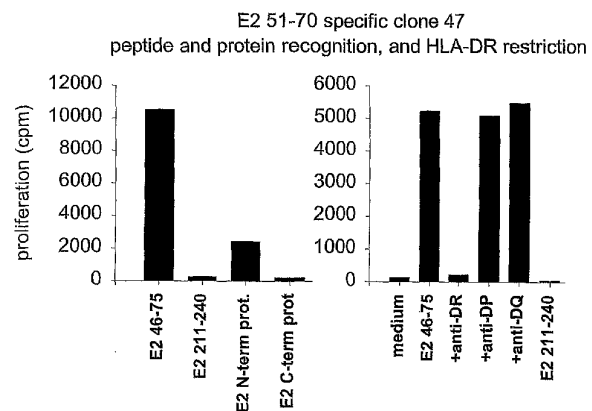
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

15/16

Fig. 15



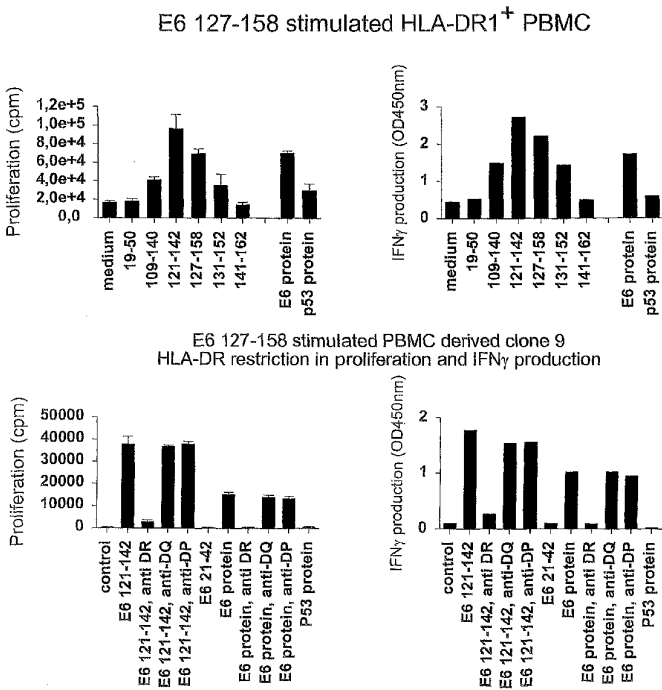
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/070006

PCT/NL01/00893

16/16

Fig. 16



【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)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/070006 A3(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/025, Everardus, Maria [NL/NL]; Hogewerf 32c; NL-2311
A61K 38/17, 39/12 IIN Leiden (NL).(21) International Application Number: PCT/NL.01/00893 (74) Agent: PRINS, A., W.; Verenigde, Nieuwe Parklaan 97,
NL-2587 BN The Hague (NL).

(22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00264398.2 8 December 2000 (08.12.2000) EP
01203298.3 31 August 2001 (31.08.2001) EP(71) Applicant (for all designated States except US):
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL/NL];
Albinusdreef 2, NL-2333 ZA Leiden (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER BURG,
Sjoerd, Hendrikus [NL/NL]; Schuberthof 15, NL-2742
BT Waddinxveen (NL). OTTENHOFF, Tom, H., M.
[NL/NL]; Houtlaan 7a, 2334 KB Oegstgeest (NL).
GELUK, Annemieke [NL/NL]; C. Kempenaartlaan
69, NL-2481 XA Woubrugge (NL). SCHOENMAEK-
ERS-WELTERS, Maria, Johanna, Philomena [NL/NL];
Brandts Buyskade 35, NL-2324 LR Leiden (NL). DE
JONG, Annemieke, M. [NL/NL]; Reguliersdwarsgracht
16, NL-1017 LR Amsterdam (NL). OFFERINGA, Rienk
[NL/NL]; Stieltjesstraat 63, NL-2312 SJ Leiden (NL).
MELIJEF, Cornelis, Johannes, Maria [NL/NL]; Wil-
helmina 33, NL-2012 KC Haarlem (NL). TOES, Rene,(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (util-
ity model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DU (util-
ity model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HN, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,
SI, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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
(BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
28 August 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/070006 A3

(54) Title: LONG PEPTIDES OF 22-45 AMINO ACID RESIDUES THAT INDUCE AND/OR ENHANCE ANTIGEN SPECIFIC
IMMUNE RESPONSES(57) Abstract: The invention is concerned with epitopes derived from human papilloma virus, and peptides having a size of about
22-45 amino acid residues comprising minimal T cell epitopes. The invention further provides clinically relevant approaches for im-
munizing subjects against (Mycobacterially and/or virally infected cells or tumor cells, and in particular against HPV. The invention
demonstrates that peptide sequences of 22-35 amino acid residues in length can induce both peptide-specific CD8⁺ cytolytic cells
and CD4⁺ T-helper cells. Moreover, the invention demonstrates that vaccination with 22-35 residue long peptides results in a more
vigorous CD8⁺ cytolytic T-cell response than vaccination with peptides of the exact minimal CTL epitope length. The invention
further demonstrates that the intrinsic capacity of certain minimal CTL epitopes which instead of activating cytolytic effector cells
tolerize these cytolytic cells, can be overcome by use of these 22-35 amino acid long peptides. The invention further provides clin-
ically relevant approaches for vaccination and/or treatment of subjects against HPV. The invention also provides methods and uses
suited to treat subjects suffering from progressive lesions and/or cervical cancer.

【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
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/070006 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/025, A61K 38/17, 39/12 (74) Agent: PRINS, A., W., Mercenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).
- (21) International Application Number: PCT/NL.01/00893 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00204398.2 8 December 2000 (08.12.2000) EP
01203298.3 31 August 2001 (31.08.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US):
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL/NL];
Albinusdreef 2, NL-2333 ZA Leiden (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VAN DER BURG, Sjoerd, Hendrikus [NL/NL]; Schubertshof 15, NL-2742 BT Waddinxveen (NL). OTTENHOF, Tom, H., M. [NL/NL]; Houtlaan 7a, 2334 KB Oegstgeest (NL). GELUK, Annetiekke [NL/NL]; C. Kempenaarslaan 69, NL-2481 XA Woubrugge (NL). SCHOENMAEKERS-WELTERS, Maria, Johanna, Philomena [NL/NL]; Brandis Buyskade 35, NL-2324 LR Leiden (NL). DE JONG, Annetiekke, M. [NL/NL]; Reguliersdwarsgracht 16, NL-1017 LR Amsterdam (NL). OFFRINGA, Rienk [NL/NL]; Sijdelijestraat 63, NL-2312 SJ Leiden (NL). MELIJER, Cora, Johannes, Maria [NL/NL]; Willehelmina 33, NL-2012 KC Haarlem (NL). TOES, Rene, Everardus, Maria [NL/NL]; Hogewoerd 32c, NL-2311 HN Leiden (NL).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 28 August 2003
- (48) Date of publication of this corrected version: 27 November 2003
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 48/2003 of 27 November 2003, 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 02/070006 A3
- (54) Title: LONG PEPTIDES OF 22-45 AMINO ACID RESIDUES THAT INDUCE AND/OR ENHANCE ANTIGEN SPECIFIC IMMUNE RESPONSES
- (57) Abstract: The invention is concerned with epitopes derived from human papilloma virus, and peptides having a size of about 22-45 amino acid residues comprising minimal T cell epitopes. The invention further provides clinically relevant approaches for immunizing subjects against (Mycobacterially and/or virally infected cells or tumor cells, and in particular against HPV. The invention demonstrates that peptide sequences of 22-35 amino acid residues in length can induce both peptide-specific CD8+ cytolytic cells and CD4+ T-helper cells. Moreover, the invention demonstrates that vaccination with 22-35 residue long peptides results in a more vigorous CD8+ cytolytic T-cell response than vaccination with peptides of the exact minimal CTL epitope length. The invention further demonstrates that the intrinsic capacity of certain minimal CTL epitopes which instead of activating cytolytic effector cells to kill these cytolytic cells, can be overcome by use of these 22-35 amino acid long peptides. The invention further provides clinically relevant approaches for vaccination and/or treatment of subjects against HPV. The invention also provides methods and uses suited to treat subjects suffering from progressive lesions and/or cervical cancer.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/NL 01/00893
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 . C07K14/025 A61K38/17 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		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 344 940 A (SCRIPPS CLINIC RES) 6 December 1989 (1989-12-06)	1-13, 15-38, 52, 57, 60-62, 67, 68
A	page 12, line 16; claim 11 page 14, line 41 - line 44	31-42, 56, 58, 59, 63-66, 68-70
	---	-/--
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 October 2002		Date of mailing of the international search report 22. 04. 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 346-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 346-3016		Authorized officer Schwachtgen, J-L

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/NL 01/00893

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	*Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 18294 A (MEDSCAND AB) 28 November 1991 (1991-11-28)	52,60, 61,67
A	Immunopeptide #11 the whole document	1-13, 15-42, 56-59, 62-66, 68-70
A	----- FELTKAMP MARIET C W ET AL: "Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 9, 1995, pages 2638-2642, XP000994814 ISSN: 0014-2980 the whole document -----	1-13, 15-42, 52,56-70

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/NL 01/00893
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 1-21, 30, 67, 69 and 70 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☒ Claims Nos.: 53-55 and 1-13, 15-42, 52, 60-70 (partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 52-59; 1-13, 15-42, 60-70 (partially)	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/NL 01/00893

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 53-55 and 1-13, 15-42, 52, 60-70 (partially)

Present claims 52-59 (completely) and 1-13, 15-42, 60-70 (partially) relate to a peptide or epitope derived from HPV16 E2, defined by reference to desirable properties, e.g. its ability to induce or enhance an antigen specific T-cell response

The claims cover all compounds having this property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. Indeed the description of the present application shows that only some of the tested peptides are immunogenic. Therefore, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to immunogenic epitopes and peptides derived from HPV16 E2 as disclosed by their sequence listings SEQ ID NO: 8-12 (Rule 13ter (c) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International application No.
PCT/NL 01/00893

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

1. Claims: 52-59; 1-13, 15-42, 60-70 (partially)

A peptide comprising a T cell epitope specific for an antigen derived from HPV E2. Subject-matter relating to said peptide.

2. Claims: 48-51; 1-13, 15-42, 60-70 (partially)

A peptide comprising a T cell epitope specific for an antigen derived from HPV E6. Subject-matter relating to said peptide.

3. Claims: 43-47; 1-13, 15-42, 60-70 (partially)

A peptide comprising a T cell epitope specific for an antigen derived from HPV E7. Subject-matter relating to said peptide.

4. Claims: 14; 1-13, 15-42 (partially)

A peptide comprising a T cell epitope specific for an antigen derived from Mycobacterium. Subject-matter relating to said peptide.

5. Claim : 71

A method for determining whether a collection of T cells comprises a memory T cell specific for a given epitope.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

invention on patent family members

International Application No.

PCT/NL 01/00893

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0344940 A	06-12-1989	US 5180806 A	19-01-1993
		AT 130855 T	15-12-1995
		AU 628337 B	17-09-1992
		AU 3481389 A	16-11-1989
		CA 1341287 C	28-08-2001
		DE 68924928 D	11-01-1996
		DE 68924928 T	17-10-1996
		DK 234789 A	17-11-1989
		ES 2082775 T	01-04-1996
		GR 3018773 T	30-04-1996
		JP 2096593 A	09-04-1990
		JP 2918904 B	12-07-1999
		PT 90574 A,B	30-11-1989
		US 5486453 A	23-01-1996
		US 5401627 A	28-03-1995
WO 9118294 A	28-11-1991	AT 160020 T	15-11-1997
		AU 668499 B	09-05-1996
		AU 7889091 A	10-12-1991
		CA 2040849 A	20-10-1992
		CA 2082658 A	12-11-1991
		DE 69128152 D	11-12-1997
		DE 69128152 T	05-03-1998
		DK 594613 T	02-06-1998
		EP 0594613 A	04-05-1994
		FI 925098 A	10-11-1992
		JP 6501542 T	17-02-1994
		US 5932412 A	03-08-1999

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 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/025	C 0 7 K 14/025	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/06	C 1 2 P 21/02	F
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/48	M
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	P
	C 1 2 N 5/00	E

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ゲルク・アンネミエケ
オランダ国 ワウブルゲ エヌエルー 2 4 8 1 エックスエー シー ケンペナールラン 6 9

(72)発明者 シェーンマエケルス・ウェルテルス・マリア・ヨハネス・フィロメナ
オランダ国 ライデン エヌエルー 2 3 2 4 エルアール ブランツ ブイスカーデ 3 5

(72)発明者 デヨング・アンネミエケ・エム
オランダ国 アムステルダム エヌエルー 1 0 1 7 エルアール レグリエルドワルスグラット 1 6

(72)発明者 オフリンガ・リエンク
オランダ国 ライデン エヌエルー 2 3 1 2 エスジェイ スティールジェスストラート 6 3

(72)発明者 メリエフ・コルネリス・ヨハネス・マリア
オランダ国 ハーレム エヌエルー 2 0 1 2 ケイシー ウィルヘルミン 3 3

(72)発明者 トエス・レネ・エヴェラルダス・マリア
オランダ国 ライデン エヌエルー 2 3 1 1 エイチエヌ ホゲウォルド 3 2 シー

Fターム(参考) 2G045 BB20 BB24 CB01 CB02 DA80 FB03 FB08 FB12 GC15
4B063 QA06 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QX02
4B064 AG12 BH20 CA10 CD20 DA01 DA13
4B065 AA94X BB19 CA24 CA44 CA46
4C085 AA03 BA76 CC03 CC08 CC21 EE01 EE06 FF14 FF18
4C087 AA01 AA02 BB37 NA14 ZB33 ZB35
4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 CA11 CA42 DA18 DA86 EA28 EA51
FA74

专利名称(译)	由22至45个氨基酸残基组成的长肽，其诱导和/或增强抗原特异性免疫应答		
公开(公告)号	JP2004525115A	公开(公告)日	2004-08-19
申请号	JP2002569178	申请日	2001-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	莱顿教学医院		
申请(专利权)人(译)	Akademisu梓肯·罗伊斯莱顿		
[标]发明人	ヴァンデルバーグショエルドヘンドウリクス オッテンホフトムエイチエム ゲルクアンネミエケ シェーンマエケルスウェルテルスマリアヨハネスフィロメナ デヨングアンネミエケエム オフリンガリエンク メリエフコルネリスヨハネスマリア トエスレネエヴェラルダスマリア		
发明人	ヴァンデルバーグ・ショエルド・ヘンドウリクス オッテンホフ・トム・エイチ・エム ゲルク・アンネミエケ シェーンマエケルス・ウェルテルス・マリア・ヨハネス・フィロメナ デヨング・アンネミエケ・エム オフリンガ・リエンク メリエフ・コルネリス・ヨハネス・マリア トエス・レネ・エヴェラルダス・マリア		
IPC分类号	G01N33/48 A61K35/14 A61K38/095 A61K39/00 A61K39/04 A61K39/12 A61K39/23 A61K39/39 A61P31/04 A61P31/12 C07K14/025 C12N5/06 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K39/0011 A61K39/04 A61K39/12 A61K39/39 A61K2039/515 A61K2039/525 A61K2039/55522 A61K2039/55555 A61K2039/55561 A61K2039/55566 A61K2039/55572 A61K2039/57 A61P31/04 A61P31/12 C07K14/005 C12N2710/20022 C12N2710/20034 A61K39/001186 A61K39/001194 A61K2039/55516 C12N7/00		
FI分类号	A61K39/12.ZNA A61K35/14.Z A61K39/23 A61K39/39 A61P31/04 A61P31/12 C07K14/025 C12P21/02.F C12Q1/02 G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/53.P C12N5/00.E		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA80 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG12 4B064/BH20 4B064/CA10 4B064/CD20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA94X 4B065/BB19 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA76 4C085/CC03 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF14 4C085/FF18 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/NA14 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA11 4H045/CA42 4H045/DA18 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	谷川荣次郎		
优先权	2000204398 2000-12-08 EP 2001203298 2001-08-31 EP		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明涉及衍生自人乳头瘤病毒的表位，以及具有约22-45个氨基酸残基的肽，其包含最小的T细胞表位。本发明进一步提供临床相关的方法，用于免疫受试者针对（Myco）细菌和/或病毒感染的细胞或肿瘤细胞，特别是针对HPV。本发明证明长度为22-35个氨基酸残基的肽序列可以诱导肽特异性CD8 +细胞溶解细胞和CD4 + T辅助细胞。此外，本发明证明用22-35个残基长肽接种导致比用精确最小CTL表位长度的肽接种更强烈的CD8 +细胞溶解性T细胞应答。本发明进一步证明，通过使用这些22-35个氨基酸长的肽，可以克服某些最小CTL表位的内在能力而不是激活溶细胞效应细胞对这些细胞溶解细胞的耐受性。本发明进一步提供了针对HPV的受试者的疫苗接种和/或治疗的临床相关方法。本发明还提供了适合于治疗患有进行性病变和/或宫颈癌的受试者的方法和用途。

				(P2004-52511)	
				(43) 公表日 平成16年8月19日 (2004. 8.	
(51) Int. Cl. ⁷	F 1		テーマコード (参考)		
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	Z N A	2 G 0 4 5		
A 6 1 K 35/14	A 6 1 K 35/14	Z	4 B 0 6 3		
A 6 1 K 39/23	A 6 1 K 39/23		4 B 0 6 4		
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39		4 B 0 6 5		
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04		4 C 0 8 5		
審査請求		未請求	予備審査請求	有	(全 151 頁) 最終頁に
(21) 出願番号	特願2002-569178 (P2002-569178)		(71) 出願人	503107439	
(86) (22) 出願日	平成13年12月7日 (2001. 12. 7)		アカデミス ツイーケンホイス ライ		
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月6日 (2003. 6. 6)		オランダ国、エヌエル-2 3 3 3 ゼッ		
(86) 国際出願番号	PCT/NL2001/000893		アー ライデン、アルビヌスドレーフ		
(87) 国際公開番号	W02002/070006		(74) 代理人	100088546	
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002. 9. 12)		弁理士 谷川 英次郎		
(31) 優先権主張番号	00204398. 2		(72) 発明者	ヴァンデルバーク・ショエルド・ヘント	
(32) 優先日	平成12年12月8日 (2000. 12. 8)		リクス		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		オランダ国 ワーディンクスヴェーン		
(31) 優先権主張番号	01203298. 3		ヌエル-2 7 4 2 ビーティー シュヘ		
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001. 8. 31)		トフ 1 5		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		(72) 発明者	オッテンホフ・トム・エイチ・エム	
			オランダ国 オエグストギースト エス		
			ル-2 3 3 4 ケービー ハウトラーン		
			7エー		
最終頁に繰					

最終頁に繰り