

(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2004-535816
(P2004-535816A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/70
A61K 38/00
A61K 39/00
A61P 35/00
C12Q 1/02

F 1

C 12 Q 1/70
A 61 K 39/00
A 61 P 35/00
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/53

Z N A
H
A 61 P 35/00
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/53

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 3
4 C 08 4
4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 213 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-514964 (P2003-514964)	(71) 出願人	503049667 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ ーシティ オブ テキサス システム アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウエスト 7ティーエイチ ストリート 201
(86) (22) 出願日	平成14年7月19日 (2002.7.19)	(74) 代理人	100078282
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月20日 (2004.1.20)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/023198	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(87) 國際公開番号	W02003/008649	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		
(31) 優先権主張番号	60/306,809		
(32) 優先日	平成13年7月20日 (2001.7.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C I N を含むH P V関連の前癌性増殖および癌性増殖に関する方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、前癌性または癌性の増殖（頸部内皮新形成（C I N）を含む）の発達または再発に関して、H P Vに感染した患者の予後を診断するために、その患者における細胞媒介性応答を評価するための、ヒトパピローマウイルス（H P V）由来のE 6ペプチドおよび/またはE 7ペプチドの使用に関する。1つの実施形態において、本発明のペプチドの使用は、以下：a) H P VのE 6ペプチドまたはE 7ペプチドのうち少なくとも1つを、患者由来のサンプルと共にインキュベートする工程；およびb) サンプルをペプチドに対する細胞媒介性免疫応答についてアッセイする工程、を包含する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトパピローマウイルス(HPV)に感染している患者またはHPVに感染している疑いのある患者における前癌性または癌性の増殖の再発の可能性を決定する方法であって、ここで、該患者はまた、頸部上または頸部周辺の前癌性または癌性の増殖を有するか、または有していたことがあり、該方法は、以下：

a) HPVのE6ペプチドまたはE7ペプチドのうち少なくとも1つを、該患者由来のサンプルと共にインキュベートする工程；および

b) 該サンプルを該ペプチドに対する細胞媒介性免疫応答についてアッセイする工程、を包含する、方法。

10

【請求項 2】

前記サンプルが、少なくとも2つのE6ペプチドまたは少なくとも2つのE7ペプチドと共にインキュベートされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが、HPVのE6ペプチドと共にインキュベートされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記E6ペプチドがK9L、E10I、C10R、Q15L、V10C、P9L、P10I、Q20P、R16R、またはG10Sである、請求項3に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記E6ペプチドが、K9L、E10I、C10R、Q15L、V10C、またはこれらの組み合わせである、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが、HPVのE7ペプチドと共にインキュベートされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記E7ペプチドが、T10Q、M9T、D9L、Q19D、R9F、R9V、L9V、G10C、またはD20Cである、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記E7ペプチドが、Q19D、R9F、R9V、L9V、G10Cまたはこれらの組み合わせである、請求項7に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記サンプルが、少なくとも1つのE6ペプチドおよび少なくとも1つのE7ペプチドと共にインキュベートされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記患者が、HPVに感染していることが既知である、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記患者がHPVに感染しているか否かを決定する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記患者が、前癌性増殖を有するか、または有していた、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記前癌性増殖が、頸部上皮内新形成(CIN)である、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記患者が、もはや前癌性増殖も、癌性増殖も有さない、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

前記患者が、もはや前癌性増殖を有さない、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記前癌性増殖が、CINである、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記サンプルが、血液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記サンプルが、腔スワブにより得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記サンプルが、末梢血液単核細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記サンプルを得た後に、培地中で該サンプルをインキュベートする工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記アッセイする工程が、前記サンプルを、前記ペプチドと接触させること、および該サンプルを、T 細胞増殖について測定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 2 2】

T 細胞増殖が、トリチウム化チミジンの取りこみを測定することによりアッセイされる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記サンプルが、細胞媒介性免疫応答を示す、2 . 0 以上の S I 値を有する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記サンプルが、細胞媒介性免疫応答を示す、3 . 0 以上の S I 値を有する、請求項 2 3 に記載の方法。 20

【請求項 2 5】

前記アッセイする工程が、T H 1 サイトカインまたはT H 2 サイトカインの量を測定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 T H 1 サイトカインの量が、測定される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 T H 1 サイトカインが、I L - 2 、I F N - 、T N F - 、またはT N F - である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 T H 2 サイトカインの量が、測定される、請求項 2 5 に記載の方法。 30

【請求項 2 9】

前記 T H 2 サイトカインが、I L - 4 、I L - 5 、I L - 1 0 、またはI L - 1 3 である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 T H 1 サイトカインまたはT H 2 サイトカインが、イムノアッセイを用いて測定される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記イムノアッセイが、E L I S A または放射免疫アッセイである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 T H 1 サイトカインまたはT H 2 サイトカインが、フローサイトメトリーにより測定される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記サンプルが、1 回より多くアッセイされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記サンプルが、種々のアッセイを用いてアッセイされる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記患者から第二のサンプルを得る工程、および該第二のサンプルを、少なくとも 1 つの H P V E 6 ペプチドまたはH P V E 7 ペプチドに対する、細胞媒介性免疫応答についてアッセイする工程をさらに包含する、請求項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記サンプルが、前癌性または癌性の増殖の処置の少なくとも 1 ヶ月後の患者から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記患者が、尿生殖路における前癌性または癌性の増殖の切除処置を受けている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前癌性または癌性の増殖の再発の危険性のある H P V に感染した患者を同定する方法であって、該方法は、以下：

a) 該患者由来の血液サンプルを、 E 6 ペプチドまたは E 7 ペプチドと共にインキュベートする工程；

b) 該サンプルを、該ペプチドに対する細胞媒介性免疫応答について評価する工程、を包含する、方法。

【請求項 3 9】

前記 E 6 ペプチドまたは E 7 ペプチドが K 9 L 、 E 1 0 I 、 C 1 0 R 、 Q 1 5 L 、 V 1 0 C 、 P 9 L 、 Q 2 0 P 、 P 1 0 I 、 R 1 6 R 、 G 1 0 S 、 T 1 0 Q 、 M 9 T 、 D 9 L 、 Q 1 9 D 、 R 9 F 、 R 9 V 、 L 9 V 、 G 1 0 C 、または D 2 0 C のアミノ酸配列を有する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記ヒトパピローマウイルスが高いグレードの型である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記ヒトパピローマウイルスが、 H P V 1 6 である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

H P V に感染し、そして該増殖について処置された患者における前癌性または癌性の増殖の再発を予防するための方法であって、該方法は、以下：

a) H P V 関連性の前癌性または癌性の増殖の再発の危険性のある患者を同定する工程；および

b) 該患者に、有効量の少なくとも 1 つの E 6 H P V ペプチドまたは少なくとも 1 つの E 7 H P V ペプチドを投与して、該ペプチドに対する細胞媒介性免疫応答を誘導する工程、

を包含する方法。

【請求項 4 3】

H P V に罹患し、そして該増殖について処置された患者における前癌性または癌性の増殖の再発の可能性を決定するためのキットであって、該キットは、適切な容器手段中に、少なくとも 1 つの E 6 H P V ペプチドまたは少なくとも 1 つの E 7 H P V ペプチド、抗体、および検出試薬を含む、キット。

【請求項 4 4】

前記キットが、少なくとも 1 つの E 6 ペプチドを含む、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 5】

前記 E 6 ペプチドが、 K 9 L 、 E 1 0 I 、 C 1 0 R 、 Q 1 5 L 、 V 1 0 C 、 P 9 L 、 P 1 0 I 、 Q 2 0 P 、 R 1 6 R 、または G S 1 0 S である、請求項 4 4 に記載のキット。

【請求項 4 6】

前記キットが、少なくとも 1 つの E 7 ペプチドを含む、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 7】

前記 E 7 ペプチドが、 T 1 0 Q 、 M 9 T 、 D 9 L 、 Q 1 9 D 、 R 9 F 、 R 9 V 、 L 9 V 、 G 1 0 C または D 2 0 C である、請求項 4 6 に記載のキット。

【請求項 4 8】

前記抗体が、 T H 1 サイトカインに対して指向される（対する抗体である）、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 9】

10

20

30

40

50

前記抗体が、T H 1 サイトカインレセプターに対して指向される、請求項 4 3 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の背景)

本願は、2001年7月20日に出願された米国仮特許出願第60/306,809号(本明細書中にその全体が参考として援用される)に対する優先権を主張する。合衆国政府は、国立癌研究所からの助成金番号CA65561およびCA77378ならびに国立衛生研究所からの助成金番号CA16672に従い、本発明における権利を有し得る。

10

【0 0 0 2】

(1. 発明の分野)

本発明は、一般に、免疫学、ウイルス学、および腫瘍学の分野に関する。より詳細には、本発明は、ヒトパピローマウイルス(HPV)により引き起こされる、前癌性増殖および癌性の増殖または病変(頸部上皮内新形成(CIN))の発生および再発に関する診断方法および治療方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

(関連分野の説明)

頸部癌は、世界中の女性における2番目に最も一般的な悪性疾患であり、女性において診断された全ての癌の15%を占める(Parkinら、1993)。合衆国において、頸部癌は、女性の生殖管の最も一般的な新生物の1つである。実験室的研究および表皮学的研究は、頸部新形成の病因論における、いくつかの型のヒトパピローマウイルス(HPV)の病因論的役割に集中した(Brinton、1992; Munozら、1992)。概して、HPV-DNAは、明確な頸部疾患を有する女性の検体の79%より多くにおいて検出してきた。最も優勢なHPVの型は、HPV16であり、これは、高いグレードの扁平上皮内の病変および扁平上皮癌において検出される(Loerinczら、1992)。上皮学的研究の結果は、頸部新形成とHPVとの間の関連を支持し、これは、16型HPVと非常に強く関連する(Morrisonら、1991; Kouotskyら、1992; およびMunozら、1992)。新形成は、細胞の異常な増殖により特徴付けられ、これは、しばしば、正常な組織の浸潤(例えば、原発性腫瘍または離れた器官への拡散(例えば、転移))を生じる。

20

【0 0 0 4】

HPV16のE6遺伝子およびE7遺伝子は、頻繁に、同時発現され、そしてHPV16陽性頸部癌由来の生検において最も豊富なウイルス転写物である(Wettstein、1990; Seedorfら、1987)。E6オープンリーディングフレームおよびE7オープンリーディングフレームの両方の同時発現が、種々の哺乳動物細胞の効率的な悪性トランスフォーメーションのために必要かつ十分であるという強力な証拠が存在する(Mungerら、1989)。さらに、ウイルスゲノムのE6領域およびE7領域の連続する発現は、悪性表現型を維持するために必要とされるようである(von Knebel Doeberitzら、1988)。

30

【0 0 0 5】

一部のHPV感染した患者が、頸部新形成を発生させるが、それ以外の患者は、それを発生させない。また、高い比率の自発的後退が観察され、このことは、宿主免疫応答の役割を示す。細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答の誘導は、ウイルス感染に対する有意な防御機構を構成し; しばしば、ウイルス特異的CTL応答は、隨伴性抗体応答を伴わない完全な防御をえたえ得る(Sastryら、1992; Bevan、1989; Lukacher、1984)。抗HPV抗体(特に、E7癌タンパク質に対する抗HPV抗体)の増加した有病率と、頸部疾患の重篤さとの関係を記載する文献における報告(Casonら、1992; Hamsikovaら、1994; Jhaら、1993)に基づき、HP

40

50

V特異的体液性応答が、HPV関連頸部新形成に対する保護的役割を果たさない可能性があることが示唆されている(Nakagawaら、1996)。一方、CMIに欠損を有する個体が、ヒトにおけるHPV関連頸部新形成の増加した有病率を有することが報告されており、このことは、T細胞が、HPV関連新形成の制御に関与することを示している(Nakagawaら、1996; Tsukuiら、1996; Feltkampら、1993およびClericiら、1997)。減少したIL-2産生およびマイトイジエン(例えば、PHAおよびコンカナバリン-A)に対する増殖応答が、浸潤性頸部癌を有する患者において観察されている(Parkら、1992)。マウスおよびヒトにおいてT細胞活性を誘導するHPV-16E6タンパク質、HPV-16E7タンパク質、およびL1タンパク質由来のペプチドを同定するための、多数のインビトロおよびインビボでの戦略が、記載されている(Feltkampら、1993; Strangら、1990; Tindelら、1991; Shepherdら、1992; Staussら、1992; Kastら、1993)。代表的に、ウイルス特異的CTLの誘導が、ウイルス性遺伝子産物を発現するウイルスまたは組み替えウイルスを用いた感染によりもたらされ得る。ウイルス性遺伝子産物が、プロセシングされ、そしてCTLによる認識について、MHCクラスI分子と会合して、感染した細胞の表面上のペプチドとして提示される(Unanue、1989)。

【0006】

さらに、精力的な研究が、ウイルス特異的CTL応答を誘発するHIVペプチドを同定および特徴付けることに集中された。Townsendらは、ワクチン候補物としてのタンパク質におけるT細胞エピトープを用いることの概念を例示し、この時、彼らのグループは、CTL応答についてのエピトープとしてのインフルエンザ核タンパク質由来の短い合成ペプチドの使用を示した(Townsendら、1986)。本発明者ら等は、インフルエンザウイルス、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス、センダイウイルスおよびHIVに対するウイルス特異的CTLをインビボで産生するために合成ペプチドを使用することを報告した(Kastら、1991; Aicheleら、1990; Deressら、1989; Sastryら、1992; Sastryら、1994; Casementら、1995)。

【0007】

90%を超える頸部癌は、ヒトパピローマウイルス(HPV)のE6タンパク質およびE7タンパク質を発現する。これらの特有の抗原は、抗腫瘍免疫治療のための細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の発生についての理想的な標的である。インビボでHPV特異的CTL応答の関与に有効であったHPV-16のE6癌タンパク質およびE7癌タンパク質に対応する合成ペプチドが同定されている(Sarkarら、1995)。最近、Nakagawaらは、HPV-16ペプチドおよびHPV-16タンパク質に対する全身性のT細胞増殖応答およびCTL応答が、頸部病変を有さない多数の純潔の女性および性的に活動的な女性において、検出可能であったが、活性な疾患を有する女性において検出されなかつたことを報告した(Nakagawaら、1997)。同様に、Tsukuiらは、HPV抗原に対するTHリンパ球応答(特にIL-2産生)が、細胞学的に正常な女性において、種々の程度の進行性頸部新形成を有する女性においてよりも強かつたことを報告した(Tsukuiら、1996)。また、Clericiらは、CMIを潜在的に増強するTH1サイトカイン(IL-2およびIFN-γ)の産生が、広範なHPV感染を有する女性において欠損していること、ならびにCINへの進行が、TH1サイトカイン産生からTH2サイトカイン産生への移行に関連することを観察した(Clericiら、1997)。TH活性を決定するために、長期にわたりインビトロでの刺激プロトコルを使用し、Kadishらは、特定のHPVペプチドに対するリンパ球増殖応答が、HPVクリアランスおよびCINへの後退に関連したことを報告した(Kadishら、1997)。一方、de Gruijilらは、HPV16 E7ペプチドに対するT細胞増殖応答が、HPV感染の存続に相關するが、抗原特異的IL-2産生は、ウイルスクリアランスおよび頸部病変の進行に関連したことを報告した(de Gruijilら、1995)

6) 。

【 0 0 0 8 】

C I N 患者のための一般的な臨床管理戦略は、切除 (e x c i s i o n a l) 処置または剥離 (a b l a t i v e) 処置を含む。しかし、追跡調査は、有意な人数の患者が再発を経験することを示している。現在、C I N についての切除 (e x c i s i o n a l) 処置または剥離 (a b l a t i v e) 処置を受けた患者における前癌性または癌性の増殖の発生、これらの再発、または疾患を有さない状態に関して、明確に理解されていない。H P V 関連性の前癌性および癌性の増殖および病変の有効な診断のための、より良好かつ改善された戦略が必要とされる。

【 発明の開示 】

10

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

(発明の要旨)

本発明は、H P V の E 6 ペプチドおよび / または E 7 ペプチドに対するヒトパピローマウイルス (H P V) に感染した患者による細胞媒介性免疫 (C M I) 応答が、これらの診断に相関するという観察に基づく。細胞媒介性免疫応答は、尿生殖路 (特に頸部) における前癌性増殖および癌性増殖の発生について、細胞媒介性免疫応答を示さない患者についての危険性より減少した危険性を示す ; 言い換えると、特定の E 6 ペプチドおよび / または E 7 ペプチドに対する陽性の細胞媒介性免疫応答を示す患者は、H P V 関連性の前癌性および癌性の増殖の発生に対する良好な予後を有する。あるいは、H P V の E 6 タンパク質化合物および E 7 タンパク質性化合物に対して C M I 応答を示さないかまたは低い C M I 応答を示す患者は、H P V 感染の結果としての生理学的效果に関して、悪性の予後のより高い危険性を有する。従って、本発明は、H P V 関連性の過剰増殖状態 (いぼ、C I N 、および悪性増殖または他の前癌性もしくは癌性の増殖を含む) の危険性のある患者を同定するための組成物および方法を包含する ; 本発明は、特に、患者を、過剰増殖状態の再発について評価することに適する。本明細書中で使用される場合、用語「増殖」および「病変」は、互換的に用いられる。また、用語「前癌性または癌性の増殖」とは、H P V 関連性の増殖をいう。頸部の前癌性または癌性の増殖または病変に加えて、そのような増殖または病変は、尿生殖路を通して生じ得、そしてそれらは、会陰性、外陰性、および陰茎性の増殖または病変を含む。これらの方法が適用され得る患者としては、H P V 感染し得る任意の哺乳動物が挙げられる ; いくつかの実施形態において、患者は、特に、ヒト (男性または女性に関わりなく) が企図される。

20

【 0 0 1 0 】

30

40

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒトパピローマウイルスに感染した患者における前癌性または癌性の増殖の発生または再発の可能性を決定するための方法を包理する。いくつかの場合において、この患者は、増殖について処置されている。これらの方法は、以下の工程の利用を包含する : 患者からサンプルを得る工程 ; このサンプルを、少なくとも 1 つの H P V E 6 ペプチドまたは H P V E 7 ペプチドと共にインキュベートする工程 ; およびサンプルを、このペプチドに対する細胞媒介性免疫 (C M I) 応答についてアッセイする工程。E 6 ペプチドもしくは E 7 ペプチド、またはこれらの組み合わせに対する細胞媒介性免疫応答は、そのような応答を示さないヒトと比較して減少した再発の危険性を示す。頸部癌の発生と共に頻繁に観察される前癌性の増殖は、頸部上皮内新形成 (すなわち C I N) である。本発明のいくつかの実施形態において、本発明の方法は、任意の病期の C I N (C I N 1 、 C I N 2 、もしくは C I N 3 または扁平上皮内病変 (S I L) 、低いグレードの S I L (L - S I L) および高いグレードの S I L (H - S I L)) を有するかまたはそれらを有していた患者に対して用いられる。さらに、他の実施形態において、これらの方法は、C I N より重篤な過剰増殖性増殖の病期 (例えば、悪性増殖または癌性増殖) を有するかまたは有していた患者で実行され得る。本願において使用される場合、用語「再発」とは、第一の前癌性または癌性の増殖が軽減、排除または処置された後の、前癌性または癌性の増殖の発生、または第一の増殖の再発もしくはその証拠をいう

50

。本明細書中で使用される場合、用語「インキュベートする工程」とは、サンプルを、ペプチドを含む組成物に曝すかまたはそれと接触させる工程をいう。

【0011】

本願の方法は、ヒトパピローマウイルス感染に対する適用性を有する。ヒトパピローマウイルスは、高いグレードの型または、高い危険性の型（例えば、HPV16、HPV18、HPV31、HPV45、HPV56、またはHPV58）であり得る。いくつかの実施形態において、ヒトパピローマウイルスは、HPV16である。他の実施形態において、ヒトパピローマウイルスは、中間の危険性の型（例えば、HPV33、HPV35、HPV37、HPV51、HPV52、HPV59、HPV66、またはHPV68）である。なおさらなる実施形態において、HPVは、低い危険性の型またはいばに関連する低いグレードの型（例えば、6型、11型、26型、40型、42型、43型、44型、53型、55型、62型、または66型）である。

10

【0012】

このサンプルは、細胞媒介性免疫反応を惹起する細胞を含む。いくつかの実施形態において、このサンプルは血液サンプルまたは血清サンプルであり、一方他の実施形態においては、このサンプルは、感染の疑いのある領域または感染されてることが既知の領域（例えば、膣領域、子宮頸部領域、または陰茎領域）の洗浄、スマアまたはスワブによって得られる。末梢血単球細胞（PBM C）は、細胞媒介性免疫応答を提供し得、そしてこのような細胞を含有する任意のサンプルはまた、本発明の方法において使用され得る。いくつかの実施形態において、サンプル由来の細胞は、それらが入手された後だがそれらがアッセイされる前に、培地中でインキュベートされることが企図される。このサンプルは、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間以上まで、そして1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日まで、そして1週間、2週間、3週間、4週間、または5週間以上まで、そして1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、または12ヶ月まで、アッセイする前に培地中でインキュベートされ得ることが企図される。これらの細胞は、培地中でインキュベートされ得、そして/またはアッセイする前に0以下の条件下で保存され得ることもまた、企図される。これらの細胞自体、または細胞培養物上清（培地であってインタクトな細胞ではない）は、その後の細胞媒介性免疫応答についてのアッセイのために使用され得る。いくつかの実施形態において、これらの細胞は、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン分析を実施する前に、2時間と8時間との間（いくつかの場合において6時間）、培地中でインキュベートされる。他の実施形態において、これらの細胞は、クロム放出アッセイを実施して細胞傷害性Tリンパ球（CTL）活性を決定する前に、2日と20日との間（いくつかの場合、15日の間）、培地中でインキュベートされる。

20

30

30

【0013】

本発明の方法は、患者がHPVペプチドに対する細胞媒介性免疫応答を提示するかどうかを決定する工程を包含する。いくつかの実施形態において、これらペプチドはE6ペプチドまたはE7ペプチドであり、これらが、E6ポリペプチドまたはE7ポリペプチドにおいて連続するアミノ酸配列に対して、その長さにわたって少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を有することを意味する。具体的には、配列番号19（HPV16由来のE6）または配列番号20（HPV16由来のE7）の、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個以上の連続するアミノ酸を含むペプチドの使用が企図される。いくつかの実施形態において、1つの配列のみのペプチドが試験され（例えば、E6ペプチド、または別の場合においてはE7ペプチド）、一方、他の実施形態において、複数の配列が試験され得ることが、企図される。1つの実施形態において、E6ペプチドおよびE7ペプチドは、本

40

50

発明の方法において使用される。他の実施形態において、少なくとも2つのE6ペプチド（少なくとも2つの異なるE6配列を言及している）、少なくとも2つのE7ペプチド（少なくとも2つの異なるE7配列を言及している）、または両方が、与えられ得る。1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、13個、14個、15個以上のE6ペプチドまたはE7ペプチド、ならびにそれらのE6ペプチドまたはE7ペプチドの任意の組み合わせが使用され得ることが企図される。なおさらなる実施形態において、このE6ペプチドは、K9L、E10I、C10R、Q15L、V10C、P9L、P10I、Q20P、R16R、G10Sまたはそれらの組み合わせである。特定の実施形態において、以下のE6ペプチドが個別に使用されるか、または以下のペプチドの1つ以上を含むカクテルとして使用される：K9L、E10I、C10R、Q15L、またはV10C。一方、他の実施形態において、E7ペプチドは、T10Q、M9T、D9L、Q19D、R9F、R9V、L9V、G10C、もしくはD20Cまたはそれらの組み合わせである。特定の実施形態において、以下のE7ペプチドが個別にまたはカクテルとして使用される：Q19D、R9F、R9V、L9V、G10C。さらに、以下に由来する少なくとも1つのE6ペプチドおよび少なくとも1つのE7ペプチドを含むカクテルが企図される：K9L、E10I、C10R、Q15L、V10C、Q19D、R9F、R9V、L9V、またはG10C。いくつかの実施形態において、上記のカクテル中の1つ以上のペプチドが除外されることが特に企図される。本発明の診断方法に関する考査された組成物がまた、本発明の予防方法または治療方法に適用され得ることもまた特に企図される。

10

20

30

40

50

【0014】

本発明の方法は、ヒトパピローマウイルスに対する細胞媒介性免疫（CMI）応答に関する。細胞媒介性免疫を同定しそして評価する異なる方法（血清免疫応答または抗体媒介性免疫応答から区別される）がある。本発明の1つの実施形態において、T細胞増殖が測定される。T細胞増殖は、トリチウム化チミジンの取り込みを測定することによってアッセイされ得る。少なくとも1つのE6ペプチドおよびE7ペプチドに対する、SIスケールを使用して2.0以上である増殖応答は、ポジティブと見なされ、そして前癌性もしくは癌性の増殖または病変の再発についてリスクが低減している患者について示す。少なくとも1つのE6ペプチドまたはE7ペプチドに対する、SIスケールを使用して3.0以上の増殖応答は、細胞媒介性応答について示し、従って、前癌性増殖または癌性増殖の発達に関して向上した予後を有する患者を同定する。あるいは、2.0未満のSI（0のSIを含む）を有する患者は、E6ペプチドまたはE7ペプチドに対して、非常に低い細胞媒介性応答を有するかまたは応答を有さないと見なされ、そして前癌性増殖または癌性増殖の発達または再発に関して増大したリスクを有すると見なされる。

【0015】

細胞媒介性応答はまた、生細胞（T細胞増殖）についての比色定量アッセイであるMTT（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド）色素アッセイもしくは還元アッセイ（da Costaら、1999）、またはアラマーブルーアッセイ（IL-2応答細胞を測定する別の比色定量アッセイ（Gloeccknerら、2001；Kwackら、2000））のような、非放射性手段を使用して測定され得る。

【0016】

本発明の別の実施形態において、細胞媒介性免疫応答についてアッセイすることは、TH1サイトカイン量またはTH2サイトカイン量を測定する工程を包含する。患者がT細胞増殖アッセイによってCMI応答を提示しない場合であっても、増大した再発リスクはTH2サイトカイン（例えば、IL-10）の産生と関連し得る。低減した再発リスクは、E6ペプチドおよび/またはE7ペプチドに応答してTH1サイトカイン（例えば、IFN-αおよびIL-2）の産生を示す患者に観察される。いくつかの実施形態において、TH1サイトカイン（例えば、IL-2、インターフェロン（IFN）、腫瘍壊死因子（TNF））、またはTNF-α、IL-3、IL-12、IL-15、IL-16、IL-17

L - 17、あるいはIL - 18)の量が測定される。特定の実施形態において、IL - 18の量が測定される。さらなる実施形態において、TH2サイトカイン(例えば、IL - 1、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 13、またはIL - 14)の量が測定される。

【0017】

CMI応答を測定することは、免疫アッセイ(例えば、ELISAもしくは放射性免疫アッセイ)またはフローサイトメトリーをによって達成され得る。本発明の実施形態において、サンプルは、二連のサンプルとしてかまたは異なるアッセイによるかのいずれかで1回より多くアッセイされ得る。いくつかの実施形態において、1つより多くのサンプルが患者から得られ得る。この複数のサンプルは、同型(例えば、複数の血液サンプル)であり得るか、または複数のサンプルは、異型(例えば、血液サンプルおよび膣スワブ)であり得る。

【0018】

本発明の方法が適用可能性を示す患者としては、まだHPVを有すると診断されていないがHPVを有することが予測される患者、一旦HPVで感染したがもはやHPV感染の徴候を示さない患者、HPVで感染されたことが既知の患者、子宮頸部または他の尿生殖器の領域にかまたはその周囲に、前癌性増殖または癌性増殖を有する患者(自分がHPVで感染されていることを知っていてもよいし、知らなくても良い)、前癌性増殖または癌性増殖が首尾良く処置されたかまたはうまく処置されなかつた患者、ならびに前癌性増殖または癌性増殖の少なくとも1つの再発を有する患者、が挙げられる。前癌性または癌性の増殖または病変は、増殖が制御されない過増殖性細胞をいい、そして前新生物(例えば、CIN)および新形成(良性および悪性)は、扁平上皮細胞および重要性が不確定の扁平上皮細胞(ASCUS)を含む。患者が1つを超える増殖または病変を有することが、企図される。任意の増殖に対する処置は、外科手術(剥離(ablative)または切除(excisional))ならびに従来の癌治療およびHPVに対する処置に關し得る。このような処置としては、化学治療法、放射線治療法、ホルモン治療法、免疫治療法、ホスルカルネット、Thioguvir、チオビル類似体(Biokeys)、ポドフィロックス(podoflox)、ポドフィリン、トリクロロ酢酸(TCA)または5-フルオロウラシル(5-FU)の投与、病変内インターフェロンおよび鼻腔内(intranasal)インターフェロン、イミキミド(imiquimod)クリームが挙げられる。剥離技術としては、液体窒素、電気焼灼もしくは電気剥離、外科的切除、またはレーザー技術の使用が挙げられる。首尾よい処置とは、任意の増殖の兆候を完全に除去する処置をいい、一方、部分的に首尾よい処置とは、増殖物のサイズもしくは増殖速度を低減すること、またはその肥大化を妨げること、または1つより多く存在する場合の増殖物の数を低減することによって、増殖に影響する処置をいう。一旦HPVに感染した患者は、後の時間にHPV感染の兆候を提示し得ない。しかし、そのような患者は依然として、継続性のHPV感染の兆候を有する患者のように、前癌性増殖または癌性増殖の再発を経験し得る。

【0019】

本発明のいくつかの方法において、患者は、その患者がHPVで感染されるかどうかについて決定するために評価される。さらなる実施形態において、HPVの血清分類(serotyping)もまた含まれるか、またはこれはまた、感染の初期決定の一部である。なおさらなる実施形態において、患者が前癌性または癌性の増殖を有するかどうか、そしてそれが癌性である場合、その増殖が良性か悪性であるかを決定するために評価される。

【0020】

本発明の方法は、サンプルが、前癌性または癌性の増殖のための処置の少なくとも一月後の患者から得られる実施形態を包含する。この患者は、少なくとも1つの前癌性または癌性の増殖物に対する処置(例えば、剥離のいくつかの形態による処置)を受け得る。

【0021】

本発明はまた、本発明の診断方法と共に使用され得る治療法も含む。本発明のいくつかの

10

20

30

40

50

実施形態において、患者は、前癌性または癌性の増殖物の再発について増大したリスクを有するとして認識される。患者がこの増大したリスクを有するとして確認される前に、これまでに見なされていなかった作用の進行を受けていなくてもよい。いくつかの実施形態において、別の方法で処置されていない患者は、前癌性または癌性の増殖物に対して予防処置を施されるかもしくはより頻繁に試験されるか、またはその両方がなされる。予防処置は、前癌性または癌性の増殖物の生理学的兆候の非存在下で施される処置であり；「治療処置」は、患者が提示する生理学的状態の医療的処置を包含する。これらの予防処置は、上記のように、HPV感染およびHPV関連の前癌性および癌性の増殖の両方に対する治療処置の使用を包含する。

【0022】

10

いくつかの実施形態において、前癌性および癌性の増殖物の発達のリスクに対して保護するかまたはそれを低減するための予防方法は、本明細書中に記載されるHPVのE6ペプチドおよびE7ペプチドを用いる免疫療法を包含する。患者が、特定のE6ペプチドまたはE7ペプチドに対するか、またはそれらのようなペプチドの組み合わせに対する細胞媒介性免疫応答を低度に有するかまたは有さないとして確認される場合、E6の配列またはE7の配列のペプチドは、CMI応答を引き出すために患者に投与され得る。これらののようなペプチドは、E6ペプチドまたはE7ペプチドのいずれかを含み、具体的には表3のペプチドの全てまたは一部を含む。また、E6ポリペプチドまたはE7ポリペプチド由来のペプチド（例えば、本発明の診断方法に関する考査されたペプチド）も、同様に予防方法において使用され得る。患者が1つ以上のペプチド配列、そしていくつかの実施形態において、アジュバント、リポソームベースの化合物、またはその両方とを共に含む組成物を投与され得ることが、企図される。さらなる実施形態において、患者はペプチドを1回より多く投与される。

20

【0023】

いくつかの実施形態において、本明細書中に開示された方法を使用してHPV関連増殖の再発についてリスクのある患者を同定することによって、HPVで感染されかつ増殖に対して処置された患者において、前癌性または癌性の増殖（例えば、CIN）の再発を予防するための方法があり、そして、いずれかの再発を予防するかまたは処置するために患者を処置するための方法がある。処置の選択肢は、上記のように、外科手術（剥離または切除）ならびに従来の癌治療およびHPVに対する処置を包含し得る。いくつかの実施形態において、この処置は、上記のHPV由来の少なくとも1つのE6ペプチドまたはE7ペプチドを含む免疫処置である。

30

【0024】

40

さらに、本発明はまた、一旦、HPVで感染したかまたは、増殖に対して処置された患者において、前癌性または癌増殖の再発可能性を決定するためのキットを含み、これは、適切な容器手段中に、少なくとも1つのHPV由来のE6ペプチドまたはE7ペプチド、およびそのペプチドに対する細胞媒介性免疫応答の検出を可能とする抗体を含む。いくつかの実施形態において、この抗体は、非反応性の構造物に結合され、この構造物上（例えば、ウェルを有するプレート）にサンプルが適用され得る。さらなる実施形態において、この非反応性の構造物はメンブレンを有し、これはその構造物に付加され得るかまたは接着され得る。いくつかの実施形態において、このキットは、サイトカイン分泌細胞を検出し、そしていくつかの実施形態の場合において定量するために、Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) アッセイで使用され得る。なおさらなる実施形態において、このキットは、本明細書中に開示されるTH1またはTH2のサイトカインに対する抗体を含む。他の実施形態は、含有される抗体を検出するための検出試薬を包含する。検出試薬は、別の化合物の検出を可能とする任意の化合物であり、これは、視覚的に（例えば、比色定量性の検出試薬によって）検出を可能とする試薬を含む。

【0025】

語「1つの（a）」または「1つの（an）」の使用は、本請求項および／または本明細書中で用語「～を含む（comprising）」と組み合わせて使用される場合、「1

50

つ（one）」を意味し得るが、「1つ以上」「少なくとも1つ」または「1つまたは1つより多く」の意味もまた一致する。

【0026】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な記載から明らかになる。しかし、この詳細な記載および特定の例は、本発明の特定の実施形態を示すが、単なる例示の目的で示されることが理解されるべきである。なぜなら、本発明の本質および範囲以内の種々の変更および改変が、この詳細な記載から当業者に明らかになるからである。

【0027】

（例示の実施形態の記載）

ヒトパピローマウイルス（HPV）感染は、子宮頸癌の主要なリスク因子であり、そして強力なHPV特異的細胞媒介性免疫とより低い重篤度の段階のCINとの間の関連がある。CIN患者についての通常の医療治療技術ストラテジーは、切除処置または剥離処置を含むが、追従する研究が、有意な数の患者が再発を経験することを示す。現在、これらの患者における疾患再発状態にも疾患なしの状態にも、関係する明確な理解が存在しない。感染、非感染の両方において、CINに対する予後および処置治療または予防治療、ならびに疾患が再発したヒトは、重要である。多くの処置治療が試験されそして実行されているが、これらは未だ疾患を排除しなければならないかまたは疾患の再発を予防しなければならない。有意な数の患者が、CINの再発を経験するが、再発の可能性および確率を試験するのに利用可能な手段がない。

【0028】

本発明は、HPVで感染され、かつCINに対して処置された患者において、予後または生物マーカーとしてCINの再発可能性を決定するための方法を提供する。本方法は、E6およびE7のようなHPV癌タンパク質のペプチドに対する細胞媒介性免疫応答のアッセイおよび分析に関する。本方法はまた、CIN再発についてのリスクにあるHPV感染患者を確認する際に役立つ。本発明はさらに、CINの再発を予防するため、そして高リスクのCINを有する患者を診断するための、標的化送達システム、キット、および免疫治療手段を利用する。

【0029】

（I. HPV）

ヒトパピローマウイルス（HPV）は、子宮頸の新生物および癌のステージの発達の際の重要な補因子として以前に同定された。しかし、HPVでの感染は、子宮頸癌を引き起こすのに十分ではない。HPVで感染された全ての女性が子宮頸癌を進行するわけではない。女性はしばしば、年1回のPapスメアで検出される形成異常の子宮頸部疾患に対して処置される。Papスメアスクリーニングの存在にも関わらず、疫学的調査は、子宮頸の新生物および癌の進行についての単独のもっとも大きなリスク因子としてHPVを包含し続ける。子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）は、ヒトパピローマウイルス（HPV）によって引き起こされる1つの型の子宮頸癌である。HPV、特にHPVの16型、18型、31型、45型、56型、および58型は、子宮頸癌の発達と関連する。これらは、高グレード型／高リスク型のHPVを含む。中程度グレード／リスク型としては、HPVの33型、35型、37型、51型、52型、59型、66型、および68型が挙げられる。いっぽと関係する他の低グレード型／低リスク型は、6型、11型、26型、40型、42型、43型、44型、53型、54型、55型、62型、および66型である。これらの低グレード型は、本来悪性ではない。このHPVゲノムは、CINにおいてエピソーム形態（組み込まれない、環状）で提供されるが、このゲノムはしばしば、侵襲性子宮頸癌において、宿主DNA中に組み込まれる。高リスク型のHPVにより発現されるE6癌タンパク質およびE7癌タンパク質は、それらが結合し、次いで2つの重要な腫瘍抑制因子（p53および網膜芽細胞腫遺伝子（Rb））を不活性化する能力の結果として、子宮頸部上皮細胞の悪性形質転換に重要であるようである。これらの腫瘍抑制タンパク質の不活性化は、HPVの癌遺伝子の能力の重要な成分であるようである。

【0030】

10

20

30

40

50

(A. 子宮頸癌の診断および治療)

ヒトパピローマウイルスは、子宮頸癌の発達と関連することがこれまでに確認されており、悪性腫瘍状態は子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)のいくつかのステージによって進行されるようである。Papスメアスクリーニングの実験にも関わらず、疫学的調査は、CINへの進行についての単独のもっとも大きなリスク因子としてHPVを包含し続け、多くの研究者がCINのリスクにあるHPVで感染された女性を確認するのを補助する宿主マーカーおよび/またはウイルスマーカーを探し続ける。処置された患者におけるCINの再発可能性が、同等に重要である。切除処置または剥離処置を受けた患者における追従研究は、有意な数の患者が再発を経験することを示す。従って、CINの再発可能性を評価し得ることは非常に重要である。再発の予後は、医者が予防または治療の選択肢を検討するのを可能にする。10

【0031】

HPVを頸部癌と結びつける最初の報告は、1980年代初頭になされているので(zur Hausen, 1994)、高リスクのHPV型が、浸潤性になる前の上皮内病変の、腫瘍の開始および癌腫への進行に寄与することが、一般に受け入れられている。実際、HPV感染は、核の異型性を伴う核周辺の清澄化によって特徴付けられる、パパニコラウスミア中の特徴的な細胞病理において最高に達することが、留意されてきた(Kurmanら、1994)。これらのHPV変化は、弱い異形成と組み合わされて、改定されたBethesdaの命名法における名称LSILと称される(KurmanおよびSolomon、1994)。HPV試験の有用性は、低リスク(L-SIL)HPV型と高リスク(H-SIL)HPV型(後者のみが異形成癌腫への進行に関連する有意な危険性をもたらす)との間、および進行の実際の危険性を識別する必要があるという事実によって、複雑化される。前者の場合、HPVについての新規ハイブリッド捕捉試験は、高リスクHPV型を識別する(Shermanら、1995; Poijakら、1999; Clayveleら、2000)。DNA画像サイトメトリーが、頸部病変の危険性がある患者を診断するために、本発明の方法に加えて使用され得る(Lorenzatoら、2001)。20

。

【0032】

(1. パパニコラウスミア)

過去50年にわたり、パパニコラウ染色塗沫標本(「パパニコラウスミア」)は、頸部癌死亡率を低減する試みの基礎になっている。パパニコラウスミアは、頸部癌の初期段階を同定するので、有効である。毎年米国において6千万~7千万のパパニコラウスミアが行われているという現在の概算がある。従って、パパニコラウスミアは、頸部癌の検出において基準になっている。医学界において広く受容されているにもかかわらず、研究は、パパニコラウスミアスクリーニングが、低い悪性度分類の癌性病変の50%~80%を検出できず、そして高い悪性度分類の癌性病変の15%~30%さえも検出できないことを示している。30

【0033】

任意の細胞学的診断方法の第一工程は、検査のために適切なパパニコラウスミア細胞を獲得する工程である。従来のパパニコラウスミア試験において、細胞学者は、頸部の内層からいくつかの細胞を搔き取り、細胞をスライドに塗沫し、そしてパパニコラウ染色によって染色することによって得られた、剥脱性細胞検体を試験する。細胞学者は、悪性状態の存在を示す、異常に見える細胞の存在について、染色されたスミアを試験する。用語「悪性状態」は、上皮内腺癌(AIS)、浸潤性癌腫(CA)、新生物、悪性細胞または腫瘍細胞などを含む異形成の存在をいう。40

【0034】

本発明の方法において、剥脱性細胞検体は、患者から得られ、この患者は、悪性状態を有しても有さなくてもよい。この検体は、細胞サンプルを得るために、頸部サンプリングデバイス(例えば、スワブ、スパチュラまたは細胞ブラシ(cytobrush)を、頸部粘膜または膣粘膜の一部に沿って回転させることによって得られ得る。適切な検体は、扁50

平上皮細胞および／または腺細胞と共に頸管内細胞を含む。

【0035】

剥脱性細胞検体は、一般に、スライドの表面上に検体の薄層を提供するために、スライド上に塗沫される。しかし、細胞異常の手動観察または細胞学的物質の自動化分析は、検体スライド上の細胞の「単層」を調製することによって、最適化され得る。「単層」は、主に単一細胞および細胞の小クラスターからなる、均一に分布した細胞性物質の実質的に二次元の層として定義される。

【0036】

パパニコラウスミアスクリーニングを実施する場合、産婦人科医は、頸部の表面から剥脱性細胞を収集し、そしてこの細胞をスライド上に配置し、このスライドを、さらなる試験のために細胞学者に送る。次いで、細胞学者は、スライド上に配置された細胞を検査し、そして異常な細胞を探す。異常な細胞が見出されると、パパニコラウスミアは、陽性とみなされる。異常な細胞が見出されない場合、パパニコラウスミアは、陰性とみなされる。パパニコラウスミアスクリーニングは、一般に、頸部癌の早期検出のための実際的かつ経済的な手順として認識されている。本発明において、HPV陽性を、V ir a p a p / V ir a t y p e アッセイ (Technologies Inc.、G a i t h e r s b u r g、M D) によって決定した。

【0037】

(2. コルポスコピー)

パパニコラウスミアプロセスは、最初のスクリーニングのために設計されたが、コルポスコピーおよび関連手順は、一般に、パパニコラウスミアの異常性を確認し、そして癌性病変および潜在的癌性病変を病期分類するために使用される。コルポスコピーは、1925年に導入されたので、コルポスコピーは、パパニコラウスミアスクリーニングによって潜在的な頸部異常を有すると同定された患者についての追跡臨床手順としての、広い認識を得た。コルポスコピーは、異常なパパニコラウスミアを有する患者を評価する際に非常に有効であり、従って、この状況についての、西洋世界での医療の標準となっていることが、一般に認識されている。約400万回のコルポスコピー試験が、米国において現在毎年実施されていると概算される。

【0038】

(3. 蛍光分光法)

前癌性および癌性の増殖または病変を検出するための別の方法としては、蛍光分光法が挙げられ、これは、組織が新生物になるときに生じる生化学的变化および形態学的变化を、迅速に、非侵襲的に、かつ定量的に探索する能力を有する。新生物組織の変更された生化学的状態および形態学的状態は、測定された蛍光のスペクトル特徴に反映される。米国特許第6,258,576号および同第6,135,965号は、頸部扁平上皮内(CIN)病変の診断について考察しており、参考として具体的に援用される。

【0039】

(4. 前癌性増殖および癌性増殖の処置)

処置は、この増殖の排除、低減または退行をもたらすために意図される。癌性増殖は、切除(excision)または剥離(ablation)手順によって処置され得る。以下でさらに詳細に考察される免疫療法に加えて、以下の処置は、本発明の方法において治療的または予防的に使用され得る。

【0040】

(i) 化学療法)

癌治療はまた、化学物質ベースの処置および照射ベースの処置の両方との、種々の併用療法を含む。併用化学療法としては、例えば、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア(nitrosurea)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン(platinum mycins)、マイトマイシン、エトポシド(VP16)、タモ

10

20

30

40

50

キシフェン、ラロキシフェン、エストロゲンレセプター結合剤、タキソール、ゲムシタビン、ナベルバイン (n a v e l b i n e)、ファルネシル - タンパク質トランスフェラーゼインヒビター、トランスプラチン (t r a n s p l a t i n u m)、5 - フルオロウラシル、ビンクリスチニン、ビンプラスチニンおよびメトトレキサート、または上記ものの任意のアナログもしくは誘導体。

【 0 0 4 1 】

(i i) 放射線療法)

D N A 損傷を引き起こし、そして広範に使用されてきた他の因子としては、線、X線および／または腫瘍細胞への放射性同位体の指向された送達として一般に公知の因子が挙げられる。D N A 損傷因子の他の形態 (例えば、マイクロ波およびU V 照射) もまた、意図される。これらの因子の全てが、D N A 、D N A の前駆体、D N A の複製およびD N A の修復、ならびに染色体の凝集および維持に対して広範な損傷をもたらす可能性が最も高い。X線についての線量範囲は、長い期間 (3 ~ 4 週間) にわたって、5 0 ~ 2 0 0 レントゲンの毎日線量から、2 0 0 0 ~ 6 0 0 0 レントゲンの単回線量までの範囲である。放射性同位体についての線量範囲は、広く変動し、そして同位体の半減期、放射される照射の強度および型、ならびに新生細胞による取り込みに依存する。

【 0 0 4 2 】

用語「接触された」および「曝された (曝露された) 」は、細胞に対して適用される場合、治療的もしくは診断的なペプチドもしくはポリヌクレオチド、または化学療法剤もしくは放射線療法剤が標的細胞に送達されるか、あるいは標的細胞の直ぐそばに配置されるプロセスを記載するために、本明細書中で使用される。細胞の殺傷および停止を達成するために、両方の因子が、細胞を殺傷するかまたは細胞の分裂を防止するのに有効な併用量で送達される。

【 0 0 4 3 】

(i i i) 遺伝子)

なお別の実施形態において、二次的治療は、治療的ポリヌクレオチドが、本発明のキメラポリペプチドの投与の前、後または同時に投与される、遺伝子治療である。以下の遺伝子産物の1つをコードする第二のベクターと組み合わせたキメラポリペプチドの送達は、標的組織に対する併用抗過剰増殖効果を有する。あるいは、両方の遺伝子をコードする単一のベクターが使用され得る。種々のタンパク質が本発明に包含され、このタンパク質としては、細胞増殖の誘導因子 (例えば、増殖因子レセプター) 、細胞増殖のインヒビター (例えば、腫瘍サプレッサー) およびアポトーシスの調節因子が挙げられる。

【 0 0 4 4 】

(i v) 切除手順)

任意の癌を有する人の多くは、一般に、予防的、診断的または病期分類的な、治療的手術および緩和手術を含む、いくつかの型の手術を受ける。治療的手術は、他の治療 (例えば、本発明の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン治療、遺伝子治療、免疫治療および／または代替的治療) と組み合わせて使用され得る、前癌処置または癌処置である。

【 0 0 4 5 】

治療的手術は、前癌性組織または癌性組織の全てまたは一部が、物理的に除去、切除および／または破壊される切除を含む。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去をいう。腫瘍切除に加えて、手術による処置としては、レーザー手術、凍結外科手術、電気外科手術、および顕微鏡により制御される手術 (モース氏手術) が挙げられる。本発明は、表在性の癌、前癌または偶発量の正常組織の除去と組み合わせて使用され得ることが、さらに意図される。

【 0 0 4 6 】

癌性の細胞、組織または腫瘍の一部または全てを切除する際に、空洞が、身体内に形成され得る。処置は、さらなる抗癌治療を用いて、その領域の灌流、直接的注射または局所的適用によって達成され得る。このような処置は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日毎、または1週間、2週間、3週間、4週間および5週間毎、または

10

20

30

40

50

1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月もしくは12ヶ月毎に、繰り返され得る。これらの処置は、変動する投薬量の処置でもある。

【0047】

(v) 他の薬剤)

他の薬剤が本発明と組み合わせて使用されて、処置の治療的効力を改善し得ることが意図される。これらのさらなる薬剤としては、免疫調節剤、細胞表面レセプターおよびGAPジャンクションのアップレギュレーションに影響を与える薬剤、細胞分裂停止因子および分化因子、細胞接着のインヒビター、またはアポトーシス誘導因子に対する過剰増殖細胞の感受性を増大させる薬剤が挙げられる。免疫調節剤としては、腫瘍壊死因子；インターフェロン、インターフェロンおよびインターフェロン；IL-2および他のサイトカイン；F42Kおよび他のサイトカインアナログ；またはMIP-1、MIP-1、MCP-1、RANTESおよび他のケモカインが挙げられる。細胞表面レセプターまたはそのリガンド（例えば、Fas/Fasリガンド、DR4またはDR5/TRA1L）のアップレギュレーションが、過剰増殖細胞に対するオートクライイン効果またはパラクライイン効果の確立によって、本発明のアポトーシス誘導能力を増強することが、さらに意図される。GAPジャンクションの数を増加させることによる細胞内シグナル伝達の増大は、隣接する過剰増殖細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増大させる。他の実施形態において、細胞分裂停止因子または分化因子は、本発明と組み合わせて使用されて、処置の抗過剰増殖効果を改善し得る。細胞接着のインヒビターが、本発明の効力を改善するために意図される。細胞接着インヒビターの例は、フォーカルアドヒージョンキナーゼ（FAK）インヒビターおよびロバスタチンである。アポトーシスに対する過剰増殖細胞の感受性を増大させる他の薬剤（例えば、抗体c225）が、本発明と組み合わせて使用されて、処置効力を改善し得ることが、さらに意図される。

10

20

30

40

【0048】

ホルモン治療もまた、本発明と組み合わされるか、または以前に記載された任意の他の癌治療と組み合わされて使用され得る。ホルモンの使用は、特定の癌（例えば、乳房癌、前立腺癌、卵巣癌または頸部癌）の処置において使用されて、特定のホルモン（例えば、テストステロンまたはエストロゲン）のレベルを低減させるか、またはその効果をブロックし得る。この処置は、しばしば、処置の選択肢としてか、または転移の危険性を低減するために、少なくとも1つの他の癌治療と組み合わせて使用される。

【0049】

(v) 抗ウイルス剤)

HPVに感染した患者は、抗ウイルス剤を、単独でかまたは抗癌治療と組み合わせて用いて処置され得る。「抗ウイルス剤」は、ウイルス感染を予防または阻害する組成物；ウイルス感染の進行を予防または阻害する組成物；ウイルスの感染性を低減する組成物；ウイルス感染の生理学的症状を予防、阻害または低減する組成物；ウイルス活性化の発生を予防または低減する組成物；ウイルスの宿主である細胞を阻害する組成物；宿主細胞がアポトーシスを受けるように誘導する組成物；身体の全てまたは一部からウイルスを除去する組成物；ウイルスの不活化を誘導する組成物；あるいは上記の任意の組み合わせをいう。

【0050】

HPVに対して使用される薬剤としては、ホスカネット、Thiovir、thiovirアナログ（BioKeys）、ポドフィロックス、ポドフィリン、トリクロロ酢酸（trichloroacetic acid）（TCA）または5-フルオロウラシル（5-FU）、病変内インターフェロンもしくは鼻腔内（intranasal）インターフェロン、あるいはImiquimodクリームの投与が挙げられる。他の薬剤は、米国特許第6,245,568号、同第6,238,659号および同第6,214,874号に開示される。

【0051】

(II. タンパク質およびペプチドの選択、合成および使用)

50

本発明において、ペプチドが、診断方法および処置方法において使用される。これらのペプチドは、HPV 16 腫瘍タンパク質に対応する。

【0052】

(A. タンパク質性組成物)

特定の実施形態において、本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19のペプチド、ならびに配列番号20および配列番号21のポリペプチド中に見出され得るような、少なくとも1つのタンパク質性分子を含む、新規組成物に関する。本明細書中で使用される場合、「タンパク質性分子」、「タンパク質性組成物」、「タンパク質性化合物」、「タンパク質性鎖」または「タンパク質性物質」は、一般に以下をいうが、これらに限定されない：約200アミノ酸より大きいタンパク質もしくはある遺伝子から翻訳された全長の内在性配列；約100アミノ酸より大きいポリペプチド；および／または約3～約100アミノ酸のペプチド。上記の全ての「タンパク質性」との用語は、本明細書中で相互交換可能に使用され得る。

【0053】

特定の実施形態において、少なくとも1つのタンパク質性分子の大きさは、以下を含むが、これらに限定されない：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500またはそれより多いアミノ酸残基、およびこれらから誘導される任意の範囲。本発明のペプチドは、配列番号1～21由来の4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または100までの連続アミノ酸を包括的に含む。配列番号1～10は、HPVのE6ポリペプチド由来のペプチドであり、一方、配列番号11～19は、HPVのE7ポリペプチド由来である。配列番号20および21は、それぞれ、HPV腫瘍タンパク質E6およびE7についてのポリペプチド配列である。HPV16中のE6についてのGenBank登録番号は、AF327851であり（配列番号26）、一方、HPV16中のE7についてのGenBank登録番号は、U76404（配列番号27）であり、これらは共に、参考として具体的に援用される。表3に基づいて、本発明の一部として具体的に意図されるペプチドとしては、以下のE6ペプチドが挙げられることが理解される：K9L（配列番号26のアミノ酸18-26）、E10I（配列番号26のアミノ酸23-34）、C10R（配列番号26のアミノ酸37-46）、Q15L（配列番号26のアミノ酸43-57）、V10C（配列番号26のアミノ酸49-58）、P9L（配列番号26のアミノ酸66-74）、P10I（配列番号26のアミノ酸102-111）、Q20P（配列番号26のアミノ酸97-116）、R16R（配列番号26のアミノ酸131-146）、G10S（配列番号26のアミノ酸141-150）またはこれらの組み合わせ。表3に基づいて、本発明の一部として具体的に意図されるペプチドとしては、以下のE7ペプチドが挙げられることが理解される：T10Q（配列番号27のアミノ酸7-15）、M9T（配列番号27のアミノ酸12-20）、D9L（配列番号27のアミノ酸14-22）、Q19D（配列番号50

27のアミノ酸44-62)、R9F(配列番号27のアミノ酸49-57)、R9V(配列番号27のアミノ酸66-74)、L9V(配列番号27のアミノ酸82-90)、G10C(配列番号27のアミノ酸85-94)、D20C(配列番号27のアミノ酸75-94)またはこれらの組み合わせ。

【0054】

本明細書中で使用される場合、「アミノ分子」とは、当業者に公知の任意のアミノ酸、アミノ酸誘導体またはアミノ酸模倣物をいう。特定の実施形態において、タンパク質性分子の残基は連続であり、アミノ分子残基の配列を中断する任意の非アミノ分子を有さない。他の実施形態において、この配列は、1以上の非アミノ分子部分を含み得る。特定の実施形態において、これらのタンパク質性分子の残基の配列は、1以上の非アミノ分子部分によって中断され得る。

【0055】

従って、用語「タンパク質性組成物」は、天然に合成されたタンパク質中に、20種の一般的アミノ酸のうち少なくとも1種、または以下の表1に示されるものが挙げられるがこれらに限定されない、少なくとも1種の改変アミノ酸もしくは通常でないアミノ酸を含む、アミノ分子配列を包含する。

【0056】

【表1】

表1
改変アミノ酸および通常でないアミノ酸

Abbr.	アミノ酸	Abbr.	アミノ酸
Aad	2-アミノアジピン酸	EtAsn	N-エチルアスパラギン
Baad	3-アミノアジピン酸	Hyl	ヒドロキシリジン
Bala	β-アラニン、β-アミノプロピオン酸	AHyl	アロ-ヒドロキシリジン
Abu	2-アミノ酪酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Abu	4-アミノ酪酸、ピペリジン酸	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Acp	6-アミノカプロン酸	Ide	イソデスマシン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	Alle	アロ-イソロイシン
Aib	2-アミノイソ酪酸	MeGly	N-メチルグリシン、 サルコシン
Baib	3-アミノイソ酪酸	MeIle	N-メチルイソロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	MeLys	6-N-メチルリジン
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸	MeVal	N-メチルバリン
Des	デスマシン	Nva	ノルバリン
Dpm	2,2'-ジアミノピメリン酸	Nle	ノルロイシン
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸	Orn	オルニチン
EtGly	N-エチルグリシン		

特定の実施形態において、このタンパク質性組成物は、少なくとも1つのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含む。さらなる実施形態において、このタンパク質性組成物は、生体適合性のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含む。本明細書中で使用される場合、用語「生体適合性」は、本明細書中に記載される方法および量に従って所定の生物に適用または投与された場合に、有意な有害効果を生じない物質をいう。生物として

10

20

30

40

50

は、以下が挙げられるが、これらに限定されない。このような有害効果または所望でない効果は、例えば、有意な毒性または有害な免疫学的反応である。好ましい実施形態において、生体適合性のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含有する組成物は、一般に、哺乳動物のタンパク質もしくはペプチド、または合成のタンパク質もしくはペプチドであり、その各々は、毒性も病原性も有害な免疫原も、実質的に含まない。

【0057】

タンパク質性組成物は、当業者に公知の任意の技術（標準的な分子生物学的技術による、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現、天然の供給源由来のタンパク質性化合物の単離、あるいはタンパク質性物質の化学的合成）によって作製され得る。種々の遺伝子についてのヌクレオチド配列、ならびにタンパク質配列、ポリペプチド配列およびペプチド配列が以前に開示されており、そして当業者に公知の電子化データベースにおいて見出され得る。1つのこのようなデータベースは、National Center for Biotechnology Information's GenBank and GenPeptデータベースである(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。これらの既知の遺伝子についてのコード領域は、本明細書中に開示されるか、または当業者に公知の技術を使用して、增幅および／または発現され得る。あるいは、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドの種々の市販の調製物が、当業者に公知である。

【0058】

特定の実施形態において、タンパク質性化合物が、精製され得る。一般に、「精製される」は、種々の他のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを除去するための分画に供された、特定のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの組成物をいい、そしてこの組成物は、例えば、特定または所望のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドについて、当業者に公知のタンパク質アッセイによって評価され得るように、その活性を実質的に保持する。

【0059】

実質的に任意のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含む組成物が、本明細書中に開示される組成物および方法において使用され得ることが意図される。しかし、タンパク質性物質が生体適合性であることが好ましい。特定の実施形態において、手順の間中、この組成物が、より正確もしくは容易に、組織に適用されるか、または組織と接触したままで維持されることを可能にする点で、より粘性のある組成物の形成が有利であることが想定される。このような場合、ペプチド組成物、またはより好ましくはポリペプチド組成物もしくはタンパク質組成物の使用が、意図される。粘性の範囲は、約40ポイズ～約100ポイズを含むが、これに限定されない。特定の局面において、約80ポイズ～約100ポイズの粘性が好ましい。

【0060】

(B. ポリペプチドの選択、合成および使用)

HPV16のE6およびE7腫瘍性タンパク質(oncoprotein)に対応するペプチド配列を、両親媒性構造および文献に記載される既知のT細胞エピトープに関する情報に基づいて選択する。

【0061】

本発明のペプチドは、従来の技術に従って、溶液中または固体支持体上で合成され得る。種々の自動化合成機が、市販されており、そして公知のプロトコルに従って使用され得る。小さい合成ペプチド配列(代表的には、100残基長未満)が、段階的固相合成を使用して慣用的に調製される。このような固相合成は、成長オリゴマーのための不溶性樹脂支持体を使用する。所望のポリマーを含むことになっているサブユニットの配列は、この支持体上で、順に一緒に反応する。末端アミノ酸は、初期の反応において、直接的またはキーイング剤(keying agent)を介してのいずれかで、固体支持体に結合される。末端残基は、一連のさらなる残基(例えば、アミノ酸またはブロックされたアミノ酸部分)と順に反応して、末端残基を介して固体支持体に結合した成長オリゴマーを生成す

10

20

30

40

50

る。この合成スキームの各段階において、未反応の反応物質は、洗浄されるか、またはそうでなければ、固相と接触させることにより除去される。このサイクルは、所望のポリマーが完全に合成されるまで、予め選択した残基配列を用いて続けられるが、固体支持体に結合したままである。次いで、このポリマーは、この固体支持体から切断され、使用するために精製される。上記の一般的な合成スキームは、特定のペプチドの調製における使用のために、R. B. Merrifieldにより開発された (Merrifield, 1986)。これらのペプチドは、改変された Vega 250 自動化ペプチド合成機 (Vega Biochemicals, Tucson, AZ) でか、または Houghten (Houghten, 1985) により記載されるような「バッグ方法」によってのいずれかで、合成され得る。例えば、Stewart および Young, (1984) ; Tamら (1983) ; ならびに Barany および Merrifield (1979) (各々は本明細書中で参考として援用される) もまた参照のこと。

【0062】

本明細書中に記載される選択された領域に対応する、短いペプチド配列または重複ペプチドのライブラリー (通常、約 6 から約 35 ~ 50 までのアミノ酸) は、容易に合成され得、次いで、反応性ペプチドを同定するために設計されたスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングされる。配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21 の、少なくとも 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 または約 100 までの連続するアミノ酸残基を有するペプチドが、本発明により企図される。

【0063】

本発明の組成物は、その活性を増強するように、または生物学的に保護されるように改変されたペプチドを含み得る。生物学的に保護されたペプチドは、米国特許第 5,028,592 号 (本明細書中で参考として援用される) に開示されるように、ヒト被験体に投与された場合、保護されていないペプチドを越える特定の利点を有し、保護されたペプチドは、しばしば、増加した薬理学的活性を示す。

【0064】

本発明における使用のための組成物はまた、全ての L-アミノ酸、全ての D-アミノ酸またはそれらの混合物を含むペプチドを含み得る。D-アミノ酸の使用は、ヒト身体内に本来見出されるプロテアーゼに対するさらなる耐性を与え得、そしてそれほど免疫原性ではなく、従って、より長い生物学的半減期を有すると予測され得る。

【0065】

(I) タンパク質精製)

HPV 由来のペプチドおよびタンパク質は、多くの方法で精製され得る。一般に、「精製された」とは、種々の他のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを除去するための分画化に供された、特定のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド組成物をいい、この組成物は、例えば、本明細書中以下に記載されるような、または当業者に公知であるような、タンパク質アッセイにより、所望のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドについてアッセイされ得る場合、その活性を実質的に保持する。

【0066】

タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術としては、ある水準において、ポリペプチド分画および非ポリペプチド分画への細胞環境の粗分画化が挙げられる。他のタンパク質からポリペプチドを分離すると、目的のポリペプチドは、部分的または完全な精製 (または同質になるまでの精製) を達成するために、クロマトグラフィー技術および電気泳動技術を使用して、さらに精製され得る。純粋なペプチドの調製に特に適した分

10

20

30

40

50

析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、イオン排除クロマトグラフィー；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；等電集束法である。ポリペプチドを精製するために特に有効な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィー、さらにはHPLCである。

【0067】

本発明の特定の局面は、コードされたタンパク質またはペプチド（例えば、E6およびE7腫瘍性タンパク質由来のペプチド）の精製に関し、そして特定の実施形態において、このようなタンパク質またはペプチドの実質的な精製に関する。用語「精製されたタンパク質またはペプチド」は、本明細書中で使用される場合、他の成分から単離可能な組成物をいうことが意図され、ここでタンパク質またはペプチドは、天然で取得可能な状態に対して任意の程度まで精製される。従って、精製されたタンパク質またはペプチドとはまた、これらが天然で存在し得る環境を含まないタンパク質またはペプチドをいう。

10

【0068】

一般に、「精製された」とは、種々の他の成分を除去するための分画化に供されたタンパク質またはペプチド組成物をいい、この組成物は、その発現された生物学的活性を実質的に保持する。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この記載は、タンパク質またはペプチドが組成物の主要成分を形成している（例えば、この組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれ以上を構成している）組成物をいう。

20

【0069】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量するための種々の方法が、本開示の観点で、当業者に公知である。これには、例えば、活性分画の比活性を決定する工程、またはSDS/PAGE分析によって分画中のポリペプチドの量をアッセイする工程が含まれる。分画の純度をアッセイするための好ましい方法は、この分画の比活性を計算すること、この比活性を、初期の抽出物の比活性と比較すること、および純度を計算すること（ここでは、「～倍の精製数」により評価される）である。この活性量を表すために使用される実際の単位は、もちろん、精製を追跡するために選択された特定のアッセイ技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存する。

20

【0070】

タンパク質精製における使用に適切な種々の技術が、当業者に周知である。これには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いる沈降、または熱変性に続く遠心分離による沈降；クロマトグラフィー工程（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltrationクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびアフィニティクロマトグラフィー）；等電集束法；ゲル電気泳動；ならびにこのような技術と他の技術の組合せが挙げられる。当該分野で一般的に公知であるように、種々の精製工程を実施する順序は、変えられること、または特定の工程が省略され得、そしてなお実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製のために適切な方法が生じ得ると考えられる。

30

【0071】

タンパク質またはペプチドが、常に最も精製された状態で提供されるという一般的な要件はない。実際に、実質的には精製されていない生成物が特定の実施形態における有用性を有することが企図される。部分的な精製は、いくつかの精製工程を組合せて使用することによって、または同じ一般的な精製スキームの異なる形態を使用することによって、達成され得る。例えば、HPLC装置を使用して実施される陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般に、低圧クロマトグラフィーシステムを使用する同じ技術よりも、より「倍」の大きい精製を生じることが理解される。低い程度の相対的精製を示す方法は、タンパク質産物の全回収率、または発現されたタンパク質の活性の維持における利点を有し得る。

40

【0072】

ペプチドの移動は、SDS/PAGEの異なる状態に伴って、時折、有意に変化し得る（Capaldiら、1977）。従って、異なる電気泳動条件下で、精製されたかまたは

50

部分的に精製された発現産物の見かけの分子量は、変動し得ることが理解される。

【0073】

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、ピークの並外れた分解能での非常に迅速な分離により特徴付けられる。これは、適切な流速を維持するために非常に微細な粒子および高压を使用することにより達成される。分離は、数分足らず、またはせいぜい1時間で達成され得る。さらに、少量のサンプルしか必要ではない。なぜなら、粒子は、非常に小さくかつ密に充填されているので、空隙容量が床容量の非常に小さな割合であるからである。また、サンプルの濃縮はそれほど大幅には必要ではない。なぜなら、バンドは、非常に狭いので、サンプルをほんのわずかだけ希釈するからである。

【0074】

ゲルクロマトグラフィー、またはモレキュラーシーブクロマトグラフィーは、分子サイズに基づく特殊なタイプの分配クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーの背後にある理論は、小さい細孔を含む不活性物質の非常に小さい粒子を用いて調製されるカラムが、細孔の大きさに依存して細孔を通過するか周りを通過するのでより小さい分子からより大きい分子を分離するということである。この粒子が作製される材料が分子を吸着しない限り、流速を決定する唯一の因子は、サイズである。従って、分子は、その形状が比較的一定である限り、サイズが減少しながら、カラムから溶出される。ゲルクロマトグラフィーは、異なるサイズの分子を分離するために卓絶している。なぜなら、分離は、全ての他の因子（例えば、pH、イオン強度、温度など）と無関係であるからである。また、実質的に吸着はなく、領域の分散はほとんどなく、そして溶出容量は、分子量にとって単純な事項である。

【0075】

アフィニティクロマトグラフィーは、単離される物質と、この物質が特異的に結合し得る分子との間の特定の親和性に依存する、クロマトグラフィー手順である。これは、レセプター-リガンド型相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの1つを不溶性マトリクスに共有結合することによって、合成される。次いで、このカラム材料は、溶液から物質を特異的に吸着し得る。この条件を、結合が生じない条件に変えることによって（例えば、pH、イオン強度および温度を変える）、溶出が生じる。

【0076】

炭化水素含有化合物の精製に有用な特定のタイプのアフィニティクロマトグラフィーは、レクチンアフィニティクロマトグラフィーである。レクチンは、種々の多糖類および糖タンパク質に結合するクラスの物質である。レクチンは、通常、プロモシアンによってアガロースに結合される。セファロースに結合したConcanavalin Aは、使用されるこの種類の第1の材料であり、そして多糖類および糖タンパク質、レンズマレクチンを含む他のレクチン、N-アセチルグルコサミニル残基の精製において有用であるコムギ胚芽アグルチニン、ならびにHelix pomatiaレクチンの単離において広く使用してきた。レクチン自体は、炭化水素リガンドを用いるアフィニティクロマトグラフィーを使用して精製される。ラクトースは、ヒマの実およびピーナツからレクチンを精製するために使用されており；マルトースは、レンチルマメおよびジャックマメからのレクチンの抽出において有用であり；N-アセチル-Dガクトサミンは、ダイズからレクチンを精製するために使用され；N-アセチルグルコサミルは、コムギ胚芽由来のレクチンに結合し；D-ガラクトサミンは、二枚貝からレクチンを得る際に使用され；そしてL-フルコースは、スイレン由来のレクチンに結合する。

【0077】

マトリクスは、それ自体が任意の有意な程度まで分子を吸着せず、かつ広い範囲の化学的安定性、物理的安定性および熱的安定性を有する物質でなければならない。リガンドは、その結合特性に影響を与えない様な様式で、結合されなければならない。このリガンドはまた、比較的密な結合を提供しなければならない。そして、サンプルまたはリガンドを破壊することなく、物質を溶出することが可能でなければならない。アフィニティクロマトグラフィーの最も一般的な形態の1つは、イムノアフィニティクロマトグラフィーである

10

20

30

40

50

。本発明に従う使用に適切な抗体の作製は、以下で考察する。

【0078】

(I V . 核酸)

(A . DNAのスクリーニング)

本発明において、核酸のスクリーニングは、サンプルを感染についてスクリーニングするためだけではなく、疾患の再発の可能性を検出するために、用いられ得る。核酸ハイブリダイゼーションに依存するスクリーニング手順により、適切なプローブが利用可能である限り、任意の生物由来の任意の遺伝子配列を単離することが可能になる。オリゴヌクレオチドプローブ(これは、問題のタンパク質をコードする配列の一部に対応する)は、化学的に合成され得る。これは、アミノ酸配列の短いオリゴペプチドストレッチが、既知でなければならぬことを必要とする。このタンパク質をコードするDNA配列は、遺伝コードから推定され得るが、このコードの縮重を考慮しなければならない。この配列が縮重配列である場合、混合付加反応を実施することが可能である。これは、変性二本鎖DNAの異種混合物を含む。このようなスクリーニングのために、ハイブリダイゼーションが、好みしくは、一本鎖DNAまたは変性二本鎖DNAのいずれかについて実施される。ハイブリダイゼーションは、目的のポリペプチドに関連する非常に少量のmRNA配列が存在する供給源由来のcDNAクローニングにおいて、特に有用である。言い換えると、非特異的結合の回避に関するストリングエントなハイブリダイゼーション条件を使用することによって、例えば、標的DNAの完全な相補体である、混合物中の単一のプローブへのこの標的DNAのハイブリダイゼーションによって行われる特定のcDNAのオートラジオグラフ的可視化を可能にすることができる(Wallaceら、1981)。13ヌクレオチド長と100ヌクレオチド長との間、好みしくは17ヌクレオチド長と100ヌクレオチド長との間、または本発明のいくつかの局面において、1~2キロベースまで、またはそれ以上の長さのプローブまたはプライマーの使用により、安定かつ選択的である二重分子の形成を可能にする。20塩基長より長い連續したストレッチにわたって相補配列を有する分子が、得られたハイブリッド分子の安定性および/または選択性を増大するために、一般に好みしい。当業者は、一般に、20~30ヌクレオチド、または所望される場合、さらに長い1つ以上の相補配列を有する、ハイブリダイゼーションのための核酸分子を設計することを好む。このようなフラグメントは、例えば、化学的手段によってフラグメントを直接合成することによって、または組換え産生のための組換えベクター中に選択した配列を導入することによって、容易に調製され得る。

【0079】

従って、本発明のヌクレオチド配列は、DNAおよび/またはRNAの相補ストレッチを有する二重分子を選択的に形成する能力、またはサンプル由来のDNAまたはRNAの増幅のためのプライマーを提供する能力のために、使用され得る。想定される用途に依存して、当業者は、様々なハイブリダイゼーション条件を用いて、標的配列に対するプローブまたはプライマーの様々な選択性の程度を達成することを望む。

【0080】

高い選択性を必要とする用途について、当業者は、代表的に、比較的高いストリングエンサーの条件を用いて、ハイブリッドを形成することを望む。例えば、約50~約70の温度で、約0.02M~約0.10MのNaClにより提供されるような比較的低い塩および/または高い温度の条件。このような高いストリングエンサーの条件は、存在したとしてもわずかしかプローブまたはプライマーとテンプレートまたは標的鎖との間のミスマッチを許容せず、そして特定の遺伝子を単離するため、または特定のmRNA転写を検出するために特に適切である。この条件は、増量したホルムアミドを添加することにより、よりストリングエントにされ得ることが一般的に理解されている。

【0081】

特定の用途(例えば、部位特異的変異)について、より低いストリングエンサー条件が好みしいことが理解される。これらの条件下で、ハイブリダイズする鎖の配列が、完全には相補的ではなく、1つ以上の位置でミスマッチしているにもかかわらず、ハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーションが生じ得る。塩濃度を増加することによって、および／または温度を下げることによって、条件は、ストリンジエンシーを低くされ得る。例えば、培地のストリンジエンシー条件は、約37～約55の温度で、約0.1～0.25MのNaClにより提供され得、一方、低いストリンジエンシー条件は、約20～約55の範囲の温度で、約0.15M～約0.9Mの塩により提供され得る。ハイブリダイゼーション条件は、所望の結果に依存して、容易に操作され得る。

【0082】

他の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、例えば、約20～約37の温度で、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、1.0mM ジチオスレイトールの条件下で達成され得る。使用される他のハイブリダイゼーション条件としては、約40～約72の範囲の温度で、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂ が挙げられ得る。

【0083】

特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションを決定するために、適切な手段（例えば、標識）と組み合わせて本発明の規定された配列の核酸を用いることが有利である。広範な適切な指示手段が、当該分野で公知であり、これには、蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素リガンドまたは検出され得る他のリガンド（例えば、アビジン／ビオチン）が挙げられる。好ましい実施形態において、当業者は、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識または酵素タグ（例えば、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ）を用いることを望み得る。酵素タグの場合、相補核酸を含むサンプルとの特異的ハイブリダイゼーションを同定するために、視覚的または分光学的に検出可能な検出手段を提供するために用いられ得る比色指示物質が、公知である。

【0084】

一般に、本明細書中に記載のプローブまたはプライマーは、対応する遺伝子の発現を検出するための、溶液ハイブリダイゼーションにおいて（PCRTMにおけるように）、および固相を用いる実施形態において、試薬として有用であることが想定される。固相に関する実施形態において、試験DNA（またはRNA）は、吸着されるか、またはそうでなければ選択されたマトリクスまたは表面に固定される。この固定された一本鎖核酸は、次いで、所望の条件下で、選択されたプローブとのハイブリダイゼーションに供される。この選択される条件は、特定の環境に依存する（例えば、G+C含量、標的核酸のタイプ、核酸の供給源、ハイブリダイゼーションプローブのサイズなどに依存する）。特定の目的の用途についてのハイブリダイゼーション条件の最適化は、当業者に周知である。ハイブリダイズした分子を洗浄して、非特異的に結合したプローブ分子を除去した後、ハイブリダイゼーションが検出され、そして／または結合した標識の量を決定することによって、定量される。代表的な固相ハイブリダイゼーション方法は、米国特許第5,843,663号、同第5,900,481号および同第5,919,626号に開示される。本発明の実施において使用され得る他のハイブリダイゼーション方法は、米国特許第5,849,481号、同第5,849,486号および同第5,851,772号に開示される。本明細書のこの節で特定されるこれらおよび他の参考文献の関連の部分は、本明細書中で参考として援用される。

【0085】

（B. DNAの合成）

DNA配列の合成は、しばしば、所望のポリペプチド産物のアミノ酸残基の配列全体が基地である場合に適切な方法である。所望のポリペプチドのアミノ酸残基の配列全体が、既知ではない場合、DNA配列の直接合成は可能ではなく、そして適切な方法は、cDNA配列の合成である。目的のcDNA配列を単離するための標準的な手順には、高レベルの遺伝子発現を有するドナー細胞に豊富に存在するmRNAの逆転写から誘導されるプラスミ保有cDNAライブラリーまたはファージ保有cDNAライブラリーの形成がある。ポリメラーゼ連鎖反応技術と共に使用される場合、より稀な発現産物が、クローニングされ得る。このポリペプチドのアミノ酸配列のかなりの部分が既知である場合、標的cDNA

10

20

30

40

50

中に存在すると推定される配列を複製する、標識された一本鎖DNAまたは二本鎖DNAまたはRNAプローブの配列の生成が、一本鎖形態に変性されたcDNAのクローン化コピーで実施されるDNA/DNAハイブリダイゼーション手順において用いられ得る。

【0086】

(1. バイオチップ)

種々の支持体上の生体分子のアレイ(バイオチップと呼ばれる)を単離する方法が、開発され、そしてDNAの合成、配列決定、変異研究、遺伝子発現分析および遺伝子の発見において用いられている。バイオチップは、本発明において有用である。なぜなら、このバイオチップにより、後の診断的価値を有し得る病理学的状態のマーカー(この場合、HPV感染)を同定することが可能となるからである。

10

【0087】

バイオチップの使用は、バイオチップ上に固定された標的への、標識分子または分子のプールのハイブリダイゼーションを含む。この標識分子は、通常、細胞または組織のmRNA内容物のcDNAコピーである。この例において、各別個のタイプのcDNAのコピー数は、初期の単離物中の対応するmRNA種のコピー数を反映する。一般的に、バイオチップ上に固定された標的へのハイブリダイゼーションの強度は、cDNAの濃度に比例し、従って、ハイブリダイゼーション強度の測定により、初期の単離物中のmRNAの相対量を推定することが可能となる。単離された2つの異なるmRNA中の同じmRNAの相対量は、同じ標的スポットへのハイブリダイゼーションの強度を、2つのサンプルの間で比較することによって、決定され得る。これらの測定値は、特定の細胞型または後の診断的価値を有し得る病理学的状態マーカーを同定するために使用され得る。あるいは、所定の疾患状態における特定のmRNAの量における急激な増加が、薬物攻撃のための可能な標的を示し得、それにより、新規の治療標的を提供する。

20

【0088】

(C. 核酸増幅反応)

核酸分子は、種々の技術(増幅反応を含む)を使用して、検出され得る。本発明は、細胞媒介性免疫応答を検出するため、またはHPVに感染し、そして/または前癌増殖または癌増殖を有する患者を同定するために、これらの増幅反応を使用することを意図する。例えば、細胞媒介性免疫応答は、本明細書中で開示されるTH1サイトカインまたはTH2サイトカインのRT-PCRによって検出され得る。

30

【0089】

(1. ポリメラーゼ連鎖反応(PCRTM))

増幅のためのテンプレートとして使用される核酸は、標準的な方法論(Sambrook, 1989)に従って、生物学的サンプル中に含まれる細胞から単離される。この核酸は、ゲノムDNA、または分画化された細胞RNAもしくは総細胞RNAであり得る。RNAが使用される場合、RNAをcDNAに変換することが望ましくあり得る。

40

【0090】

KATPチャネルタンパク質またはその変異体に対応する核酸に選択的にハイブリダイズするプライマー対を、選択的なハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、単離された核酸と接触させる。用語「プライマー」とは、本明細書中で定義される場合、テンプレート依存プロセスにおいて新生核酸の合成を刺激し得る任意の核酸を含むことを意味する。代表的には、プライマーは、10~20塩基対長のオリゴヌクレオチドであるが、より長い配列が用いられ得る。プライマーは、二本鎖形態または一本鎖形態で提供され得るが、一本鎖形態が好ましい。

【0091】

一旦、ハイブリダイズすると、核酸:プライマー複合体を、テンプレート依存性核酸合成を促進する1つ以上の酵素と接触させる。複数の回の増幅(「サイクル」とも呼ばれる)を、十分な量の増幅産物が作製されるまで行う。

【0092】

次いで、増幅産物を検出する。特定の適用において、検出は、視覚的手段によって実施さ

50

れ得る。あるいは、検出は、組み込まれた放射標識もしくは蛍光標識の化学ルミネセンス、放射性シンチグラフィーを介するかまたは電気的もしくは熱的インパルスシグナル(*Affymax technology*)を使用するシステムを介する、生成物の間接的な同定を包含し得る。

【0093】

多数のテンプレート依存性プロセスが、所定のテンプレートサンプルに存在するマークー配列を增幅するために利用可能である。最も良く知られた增幅方法のうちの1つは、ポリメラーゼ連鎖反応(*PCR* TM と呼ばれる)であり、これは、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号に詳細に記載され、そしてそれぞれが、本明細書中において、その全体が参考として援用される。

10

【0094】

簡単に述べると、 *PCR* TM において、マークー配列の対向する相補鎖上の領域に対して相補的な2つのプライマー配列が、調製される。過剰なデオキシヌクレオシドトリホスフエートが、 *DNA* ポリメラーゼ(例えは、 *Taq* ポリメラーゼ)とともに反応混合物に添加される。マークー配列がサンプル中に存在する場合、プライマーは、マークーに結合し、そしてポリメラーゼによって、プライマーが、ヌクレオチド上に添加することによって、マークー配列に沿って伸長される。反応混合物の温度を上昇および低下させることによって、伸長したプライマーは、マークーから解離して反応生成物を形成し、過剰なプライマーが、マークーおよび反応生成物に結合し、そしてこのプロセスが繰り返される。

20

【0095】

逆転写酵素 *PCR* TM (*RT-PCR* TM) 増幅手順は、増幅された *mRNA* の量を定量するために、または所望の *mRNA* から *cDNA* を調製するために実施され得る。 *RNA* を *cDNA* に逆転写する方法は、周知であり、そして *Sambrook* ら、1989に記載される。逆転写のための代替の方法は、熱安定性 *RNA* 依存性 *DNA* ポリメラーゼを利用する。これらの方法は、1990年12月21日に出願されたWO90/07641(これは、本明細書中において参考として援用される)に記載される。ポリメラーゼ連鎖反応方法論は、当該分野において周知である。

20

【0096】

(2 . 他の核酸増幅反応)

増幅のための別の方法は、EPA番号320308(本明細書中において、その全体が参考として援用される)に開示されるリガーゼ連鎖反応(「 *LCR* 」)である。 *LCR* において、2つの相補的なプローブ対が調製され、そして標的配列の存在下において、各対は、標的の対向する相補鎖に結合し、その結果、それらは、当接する。リガーゼの存在化において、2つのプローブ対は、連結して、単一の単位を形成する。温度サイクリング(*PCR* TM におけるように)によって、結合した連結単位は、標的から解離し、次いで、過剰なプローブ対の連結のために「標的配列」として役立つ。米国特許第4,883,750号は、標的配列にプローブ対を結合するための、 *LCR* と類似の方法を記載する。

30

【0097】

Qbeta Replicase (*PCT* 出願番号 *PCT/US87/00880* (本明細書中において参考として援用される) に記載される) はまた、本発明におけるなお別の増幅方法として使用され得る。この方法において、標的の配列に相補的な領域を有する *RNA* の複製配列は、 *RNA* ポリメラーゼの存在下においてサンプルに添加される。ポリメラーゼは、複製配列をコピーして、次いで、この複製配列が、検出され得る。

40

【0098】

等温増幅方法(制限エンドヌクレアーゼおよびリガーゼが使用されて、制限部位の1つの鎖中のヌクレオチド5'-[-チオ] -トリフオスフェートを含む標的分子の増幅を達成する) はまた、本発明における核酸の増幅において有用であり得る。

【0099】

鎖置換増幅(*Strand Displacement Amplification*) (*SDA*) は、複数回の鎖置換および合成(すなわち、ニックトランスレーション) を含

50

む核酸の等温增幅を実施する別 の方法である。類似の方法（修復鎖反応（Repair Chain Reaction (RCR) ）と呼ばれる）は、増幅に対して標的化された領域全体にわたつていいくつかのプローブをアニーリングし、続いて、4つの塩基のうちの2つのみが、存在する修復反応を行うことを包含する。他の2つの塩基が、簡単な検出のためにビオチニル化誘導体として添加され得る。類似のアプローチがSDAにおいて使用される。標的特異的配列はまた、環式プローブ反応（CPR）を使用して検出され得る。CPRにおいて、非特異的DNAの3'配列および5'配列ならびに特定のRNAの中間配列を有するプローブが、サンプル中に存在するDNAにハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションにおいて、反応は、RNase Hを用いて処理され、そしてプローブの生成物が、消化後に放出される特徴的な生成物として同定される。元のテンプレートは、別のサイクリングプローブにアニールされ、そして反応が繰り返される。

10

【0100】

GB出願番号2202328、およびPCT出願番号PCT/US89/01025に記載されるなお別の増幅方法（それぞれが、本明細書中において、その全体が参考として援用される）は、本発明に従つて使用され得る。前者の出願において、「改変」プライマーは、PCRTM様のテンプレート依存性合成および酵素依存性合成において使用される。プライマーは、捕捉部分（例えば、ビオチン）および/または検出器部分（例えば、酵素）を用いて標識することによって改変され得る。後者の出願において、過剰標識プローブが、サンプルに添加される。標的配列の存在下において、プローブが結合し、そして触媒的に切断される。切断後、標的配列が、インタクトなまま放出され、過剰なプローブによって結合される。標識プローブの切断は、標的配列の存在を示す。

20

【0101】

他の核酸増幅手順は、転写ベースの増幅系（TAS）を含み、これは、核酸配列ベースの増幅（NASBA）および3SR Gingerasら、PCT出願WO 88/10315（本明細書中において参考として援用される）を含む。NASBAにおいて、核酸は、標準的なフェノール/クロロホルム抽出、臨床的サンプルの熱変性、溶解緩衝液を用いる処理、ならびにDNAおよびRNAの単離のためのミニスピンドラムまたはRNAの塩化グアニジニウム抽出によって増幅のために調製され得る。これらの増幅技術は、標的特異的配列を有するプライマーをアニーリングすることを包含する。重合に続いて、DNA/RNAハイブリッドをRNase Hで消化し、二本鎖DNA分子を再び熱変性する。いずれの場合においても、一本鎖DNAを、第2標的特異的プライマーの添加によって完全二本鎖を作製し、続いて、重合する。次いで、二本鎖DNA分子をRNAポリメラーゼ（例えば、T7またはSP6）によって複数転写する。等温サイクル反応において、RNAは、一本鎖DNAに逆転写され、次いでこれは、二本鎖DNAに変換され、次いで、もう一度RNAポリメラーゼ（例えば、T7またはSP6）を用いて転写される。得られる生成物は、短縮されているか完全であるかにかかわらず、標的特異的配列を示す。

30

【0102】

Daveyら（EPA番号329822、その全体が参考として本明細書中で参考として援用される）は、一本鎖RNA（「ssRNA」）、ssDNA、および二本鎖DNA（dsDNA）（これらは、本発明に従つて、使用され得る）をサイクル的に合成することを包含する核酸増幅プロセスを開示する。ssRNAは、第1のプライマーオリゴヌクレオチドに対するテンプレートであり、これを、逆転写酵素（RNA依存性DNAポリメラーゼ）によって伸長する。次いで、RNAを、リボヌクレアーゼH（RNase H、DNAまたはRNAのいずれかとの二重鎖においてRNAに特異的なRNase）の作用によって、得られるDNA:RNA二重鎖から除去される。得られたssDNAは、第2プライマーに対するテンプレートであり、これはまた、このテンプレートに対して相同な5'側のRNAポリメラーゼプロモーター（T7 RNAポリメラーゼによって例示される）の配列を含む。次いで、このプライマーを、DNAポリメラーゼ（E. coli DNAポリメラーゼIの大きな「Klenow」フラグメントによって例示される）によって伸長され、二本鎖DNA（「dsDNA」）分子を生じ、この二重鎖分子は、プライマー

40

50

間に元のRNAの配列と同一の配列を有し、そしてさらに、1つの末端において、プロモーター配列を有する。このプロモーター配列は、DNAの多くのRNAコピーを作製するために適切なRNAポリメラーゼによって使用され得る。次いで、これらのコピーは、再びサイクルに入り得、非常に速い増幅を導く。酵素の適切な選択とともに、この増幅は、各サイクルにおける酵素の添加なしで、等温的になされ得る。これらのプロセスの臨床的性質に起因して、開始配列は、DNAまたはRNAのいずれかの形態であるように選択され得る。

【0103】

Milnerら(PCT出願WO89/6700、その全体が本明細書中において参考として援用される)は、標的一本鎖DNA(「ssDNA」)へのプロモーター/プライマー配列のハイブリダイゼーション、続く、配列の多くのRNAコピーの転写に基づく核酸配列増幅スキームを開示する。このスキームは、サイクル的ではなく、すなわち、新たなテンプレートが、得られたRNA転写物から作製されない。他の増幅方法としては、「RACE」および「1側面(one-sided)PCR」が挙げられる(Frohman, 1990、参考として援用される)。

10

10

20

得られる「ジ-オリゴヌクレオチド」の配列を有する核酸の存在下での2個(またはそれ以上)のオリゴヌクレオチドの連結、それによるジ-オリゴヌクレオチドの増幅に基づく方法はまた、本発明の増幅工程において使用され得る。

【0104】

(D. 核酸の検出)

任意の増幅に続いて、テンプレートおよび/または過剰なプライマーから増幅生成物を分離することは望ましくあり得る。核酸の検出は、HPVに感染した患者および/あるいは前癌増殖または癌増殖を有する患者の、細胞媒介免疫応答を同定する際に有用であり得る。

【0105】

1つの実施形態において、増幅生成物は、標準的方法(Sambrookら、1989)を使用して、アガロース、アガロース-アクリルアミドまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離される。分離された増幅生成物は、切断され、されなる操作のためにゲルから溶出され得る。低融点アガロースゲルを使用して、分離されたバンドを、ゲルを加熱することによって除去し、続いて、核酸を抽出し得る。

30

【0106】

核酸の分離はまた、当該分野において公知のクロマトグラフィー技術によってもたらされ得る。本発明の実施において使用され得る多くの種類のクロマトグラフィーが存在し、これには、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、およびガスクロマトグラフィーならびにHPLCが挙げられる。

40

【0107】

特定の実施形態において、増幅生成物は、可視化される。代表的な可視化方法は、臭化工チジウムを用いるゲルの染色およびUV光下でのバンドの可視化を含む。あるいは、増幅生成物が、放射線標識または蛍光分析標識ヌクレオチドを用いて一体的に標識される場合、分離された増幅生成物は、X線フィルムに暴露され得るか、または適切な励起スペクトラル下で可視化され得る。

【0108】

1つの実施形態において、増幅生成物の分離に続いて、標識核酸プローブが、増幅マーカー配列と接触する。プローブは、好ましくは、発色団に結合されるが、放射標識され得る。別の実施形態において、プローブは、結合パートナー(例えば、抗体またはビオチン)、あるいは検出可能な部分を有する別の結合パートナーに結合される。

40

50

【0110】

特定の実施形態において、検出は、サザンプロットおよび標識プロープとのハイブリダイゼーションによる。サザンプロットに含まれる技術は、当業者に周知である (Sambr ookら、1989を参照のこと)。上記の1つの例は、米国特許第5,279,721号に(本明細書中において参考として援用される)に記載され、これは、核酸の自動化電気泳動および移動のための装置および方法を開示する。装置は、ゲルの外部操作なしに電気泳動およびプロットを可能にし、そして本発明に従って、方法を実施することに理想的に適する。

【0111】

HPV感染はまた、触媒化シグナル増幅化比色DNAインサイチュハイブリダイゼーション(CSAC-ISH)(GenPoint system, DAKO)(Birnerら、2001)によって検出され得る。 10

【0112】

本発明の実施において使用され得る核酸の検出の他の方法は、米国特許第5,840,873号、同第5,843,640号、同第5,843,651号、同第5,846,708号、同第5,846,717号、同第5,846,726号、同第5,846,729号、同第5,849,487号、同第5,853,990号、同第5,853,992号、同第5,853,993号、同第5,856,092号、同第5,861,244号、同第5,863,732号、同第5,863,753号、同第5,866,331号、同第5,905,024号、同第5,910,407号、同第5,912,124号、同第5,912,145号、同第5,919,630号、同第5,925,517号、同第5,928,862号、同第5,928,869号、同第5,929,227号、同第5,932,413号、および同第5,935,791号(これらのそれぞれは、本明細書中において、参考として援用される)に開示される。 20

【0113】

(V. 細胞媒介免疫(CMI)):

本願発明のいくつかの方法は、再発の予後診断インジケーターとして、またはCINの発生に対する予防的治療として、それらを使用することによってT細胞応答を有利にする。より詳細には、これらの方法は、HPV16のE6腫瘍タンパク質(oncoprotein)およびE7腫瘍タンパク質からの合成ペプチドに対するCMI応答についてアッセイする。HPV16のE6遺伝子およびE7遺伝子は、しばしば、同時に発現され、そしてHPV16陽性頸部癌からの生検における最も豊富なウイルス転写物である(Wettstein, 1990; Seedorffら、1987)。E6オープンリーディングフレームおよびE7オープンリーディングフレームの両方の同時発現が、種々の哺乳動物細胞の種々の悪性疾患形質転換の有効な悪性疾患形質転換に必要であり、そして十分であるという強い証拠がある(Mungerら、1989)。さらに、ウイルスゲノムのE6領域およびE7領域の連続発現は、悪性疾患表現型を維持するのに必要とされるようである(von Knebel Doeberitzら、1988)。 30

【0114】

免疫能(immune competent)哺乳動物における大部分のウイルス感染は、ウイルス感染細胞に対する細胞媒介免疫応答を生じ、正味の効果が細胞の溶解である。ウイルス感染の間、ウイルスタンパク質は、新規なウイルス粒子への封入のために細胞内に合成される。内因性ウイルスタンパク質のうちのいくつかはまた、分解して、クラスI抗原提示経路に輸送され、ここで、外来抗原が、クラスI MHC分子と会合する。次いで、このペプチドMHC複合体は、細胞表面に輸送され、ここで、外来ペプチドが細胞傷害性T細胞(CTL)に対して、自己MHCの文脈で提示される。 40

【0115】

CTLは、抗原特異的エフェクター細胞である。リンパ細胞表面マーカー研究は、当業者に公知の種々の手順(免疫蛍光およびフローサイトメトリーの使用を含む)を使用するこのようなT細胞表面マーカーの存在についてアッセイするために使用され得る。外来とし 50

て抗原を認識するとすぐに、C T Lは、アポトーシスを誘導する分子相互作用を介するかまたはその完全性を破壊する原形質膜に穴を作製する孔形成酵素の分泌によってのいずれかで、標的細胞を溶解する。従って、C T L媒介免疫応答は、ウイルス感染細胞のクリアランスにおいて有意な役割を果たす。

【0116】

C T Lエフェクター細胞がウイルス感染標的細胞を溶解する能力は、遺伝的制限および抗原的制限によって調製される。標的細胞は、もともとC T Lを誘導したウイルス抗原と同じかまたは等しいウイルス抗原を保有しなければならない。標的細胞および誘導C T Lはまた、同じM H CクラスI分子を有しなければならない。

【0117】

(A. 末梢血単核細胞 (P B M C))

増殖性応答は、P B M Cから得られる。P B M Cを単離し得る方法が少しある。

【0118】

単核細胞は、リムルス変形細胞溶解アッセイによって、内毒素を含まないことが決定された、20%ウシ胎仔血清 (F C S) を有するR P M I 1640において、コラーゲンコーティングを有するかまたは有さないガラスまたはポリエチレン組織培養容器に接着させることによって非ロゼッティング (non-rosetting) 細胞から分離される；あるいは、自家血清、または10%A B + 通常ドナー血清を、血清供給源として使用し得る。非接着細胞を、穏やかに洗浄することによって除去する。これらの方法を使用して、接着細胞は、通常、>90%の単核細胞である。組織学的分析が、T細胞、B細胞、またはN K細胞の有意な混入が存在することを示唆する場合、これらの混入細胞は、モノクローナル抗体のカクテル (抗l e u 5 b、抗l e u 12および抗l e u 11 bならびに仔のウサギ相補物を含む) を用いる処理によって除去された (Rossenら、1985)。

【0119】

単核細胞は、テフロン (登録商標) コートされた容器中での懸濁培養のために、加湿5%C O₂ 霧囲気下で37°で1時間以上の接着後に、放出される (Croweら、1987)。コラーゲンでコーティングされた表面上にプレートされた細胞の場合において、1m g / m lコラーゲナーゼ1型を培地に添加する。細胞を、5%F S CおよびE D T Aを含む、カルシウムおよびマグネシウムを含まないD u l b e c c oリン酸緩衝化生理食塩水中で、15分間以上、インキュベーションによって放出する。E D T Aを伴うインキュベーションを、氷上で行う。使い捨て可能な細胞スクレーパーを使用して、細胞の取り除きを助ける。取り除かれた細胞を、2回、カルシウムおよびマグネシウムを含まないD u l b e c c oのP B Sで洗浄し、そしてCroweら (1987) によって記載されるように、T e f l o n g ; ジャーにおいて、R P M I 1640および10%A B + ヒト血清中で培養する。

【0120】

末梢血単核細胞を単離するための第2のストラテジーは、H e s t e r およびW a l k e r (1981) に従う、単核細胞濃度を非ロゼッティング集団において濃縮するためのP e r c o l l密度勾配である。単核細胞濃縮集団を、必要に応じて、混入残渣T細胞、B細胞およびN K細胞を取り除くために、モノクローナル抗体カクテル (上記) および相補物を用いて処理する。単核細胞は、この方法によって回収され、単核細胞が表面に接着する場合、必要に応じて生じる「活性化」無しに、T e f l o n コーティング容器内で直接的に培養される。しかし、P e r c o l l密度勾配工程、ならびに / あるいは抗体および相補物の暴露がまた、異なる様式で可能な場合、これらの細胞を「活性化」し得ることが可能である。

【0121】

末梢血単核細胞を単離するための第3のアプローチは、フローサイトメーターの高速細胞選別機能を使用して、前方角度光散乱に基づいて、それらを選別するための単核細胞の屈折特性を利用することである。この代替法は、高度に純粋な細胞を生成する可能性があり

10

20

30

40

50

、この細胞は、抗体または相補物との接触による影響を受けていない。

【0122】

(B. T細胞応答)

T細胞応答は、当業者に公知の種々のプロトコルによって測定され得る。これらのアッセイのうちのいくつかは、以下にさらに詳細に記載される。

【0123】

(1. ³ [H]チミジン組み込みアッセイ)

異なるサンプルからのPBM Cの増殖性応答は、公開された論文 (Nehete, 1996; Nehete, 1995) に記載されるように、標準的な³ [H]チミジン組み込みアッセイによって決定され得る。個々のE6ペプチドおよびE7ペプチドに対するT細胞増殖性応答の重要性 (刺激指数 [SI] の点で) は、ペプチドが添加されなかったコントロールよりも、そのペプチドに暴露された細胞によって³ [H]チミジン組み込みを数倍増加するとして計算され得る。少なくとも2.0 (少なくとも約2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0またはそれ以上を含む) のSI値が、ポジティブな応答であると考えられる。一般的に、SI値は、ペプチドとともにインキュベートされる細胞から培地における放射能 (cpm) の量を測定し、そしてペプチドとともにインキュベートされていない細胞からの培地 (培地のみ) における放射能の量によって除算することによって計算される。

【0124】

(2. ⁵ [Cr]を使用する溶解)

細胞媒介リンパ球溶解 (CML) は、T細胞応答の指標として使用され得る。標的細胞を、エフェクター細胞への暴露の前に、放射性クロミウム-51 (⁵ [Cr]) を用いて標識し得る。培地に放出される⁵ [Cr] の量は、細胞媒介溶解のレベルに比例する。

【0125】

(3. -インターフェロン産生)

インターフェロン (-インターフェロン) (II型または免疫インターフェロンとも呼ばれる) は、T細胞およびNK細胞によって産生される。これは、ヘルパーT細胞の発生に重要である。これは、主要なマクロファージ活性化因子であるので、細胞媒介免疫において強力なサイトカインである。-インターフェロンは、MHCクラスI発現およびMHCクラスII発現のレベルを増加し、これは、抗原提示および他の認識反応を改善する。さらに、これは、TNF- の効果を增幅し、そして脈管内皮細胞の表面上において接着分子の発現レベルを上昇させ、これは、T細胞接着および管外遊出を導く。

【0126】

(4. テトラマーアッセイ)

テトラマーアッセイは、当業者に周知である。Altman, 1996を参照のこと。

【0127】

(5. サイトカイン産生)

サイトカインは、免疫応答の調節および種々の細胞型の分化経路において重要な役割を果たすタンパク質である。これらは、T細胞の調節および発生において重要な機能を有し、そしてこれらは、-インターフェロン、インターロイキン1 (IL-1)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、リンホトキシン、MIF、TGF-、TGF-、および他の走化性サイトカインが挙げられる。TH1サイトカインは、IL-2、インターフェロン (IFN) 、腫瘍壊死因子 (TNF) 、またはTNF-、IL-3、IL-12、IL-15、IL-16、IL-17、またはIL-18を含む。TH2サイトカインは、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-13、IL-14またはIL-18を含む。サイトカインに対するアッセイは、当該分野において周知であり、これらのうちのいくつが本明細書中に開示される。

10

20

30

40

50

【0128】

(6. サイトカイン分析)

TH1サイトカインおよびTH2サイトカインの測定は、ELISA、放射免疫アッセイ(RIA)またはフローサイトメトリー(FACS)によってなされ得る。種々の有用な免疫検出方法の工程が、科学文献(例えば、DoolittleおよびBen-Zeev、1999; GulbisおよびGal and、1993; およびDe Jagerら、1993(それぞれが、本明細書中において参考として援用される)に記載されている。

【0129】

(7. イムノアッセイ)

なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的成分のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを結合、精製除去、定量および/またはそれ以外で一般的に検出するための免疫検出方法に関する。いくつかの実施形態において、イムノアッセイは、HPVペプチドに対する細胞媒介免疫応答を検出するために使用される。いくつかの免疫検出法としては、少し挙げると、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学ルミネセンスアッセイ、生物ルミネセンスアッセイ、およびウェスタンプロットが挙げられる。種々の有用な免疫検出方法の工程は、科学文献(例えば、Doolittle MHおよびBen-Zeev O、1999; GulbisおよびGal and P、1993; およびDe Jagerら、1993(それぞれが、本明細書中において参考として援用される)に記載されている。

10

20

【0130】

一般的に、免疫結合方法は、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを含むことが推測されるサンプルを得る工程、およびサンプルを本発明に従って抗体と、場合によって、免疫複合体を形成させるのに有効な条件下で、接触させる工程を包含する。例えば、本発明において、E6ペプチドおよび/またはE7ペプチドは、T細胞応答を誘発するために、細胞をチャレンジするために使用され得る。抗体は、細胞媒介応答の結果として產生されるサイトカインに指向し得るか、またはT細胞上のサイトカインレセプターに指向し得る。あるいは、CD69またはCD45、あるいはその両方に対する抗体が使用され得る。

30

【0131】

これらの方法は、細胞小器官、細胞、組織、または生物のサンプルからタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを生成するための方法を包含する。これらの例において、抗体は、サンプルからタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド成分を除去する。この抗体は、好ましくは、固体支持体(例えば、カラムマトリクスの形態で)に結合され、そしてタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド抗原性成分を含むと推定されるサンプルは、固定化された抗体に適用される。望ましくない成分は、カラムから洗浄され、固定化抗体に免疫複合体化された抗原を残して溶出させる。

40

【0132】

サイトカイン応答検出によって、分析される生物学的サンプルは、サイトカインを含むと疑われる任意のサンプル(例えば、組織切片または標本、ホモジナイズされた組織抽出物、細胞、オルガネラ、上記抗原含有組成物のいずれかの分離および/もしくは精製された形態、または細胞もしくは組織と接触する任意の生物学的流体さえも(血液および/または血清を含む))であり得るが、組織サンプルまたは抽出物が好ましい。

【0133】

免疫複合体(一次免疫複合体)の形成を可能にするのに有効な条件下でかつそれに十分な時間の間、選択された生物学的サンプルを抗体と接触させることは、一般に、抗体組成物をサンプルに単に添加し、そして抗体が、存在する任意の抗原と免疫複合体を形成する、すなわち、この抗原に結合するに十分に長い時間の間、混合物をインキュベートすることである。この時点後、一般には、このサンプル-抗体組成物(例えば、組織切片、ELISAプレート、ドットプロット、またはウェスタンプロット)は洗浄されて、いかなる非

50

特異的結合抗体種も除去し、一次免疫複合体内で特異的に結合された抗体のみが検出されることを可能にする。

【0134】

一般に、免疫複合体形成の検出は、当該分野で周知であり、多数のアプローチの適用によって達成され得る。これら的方法は、一般に、標識またはマーカー（例えば、放射能タグ、蛍光タグ、生物学的タグおよび酵素タグのいずれか）の検出に基づく。このような標識の使用に関する米国特許としては、以下が挙げられる：3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；および4,366,241（各々は、本明細書中に参考として援用される）。もちろん、当業者は、当該分野で公知であるように、二次結合リガンド（例えば、第二の抗体および／またはビオチン／アビジンリガンド結合配置）の使用によってさらなる利点を見出し得る。

10

【0135】

検出において使用される抗原抗体は、それ自体、検出可能な標識に結合され得る。ここで、当業者は、次いで、この標識を単に検出することにより、組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能である。あるいは、一次免疫複合体中で結合されるようになる第一の抗体は、この抗体について結合親和性を有する第二の結合リガンドによって検出され得る。これらの場合において、この第二の結合リガンドは、検出可能な標識に結合され得る。この第二の結合リガンドは、それ自体、しばしば抗体であり、これは、従って、「二次」抗体と呼ばれ得る。一次免疫複合体は、二次免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下でかつそれに十分な時間の間、標識された二次結合リガンド（または抗体）と接触される。一般には、次いで、この二次免疫複合体が洗浄されて、いかなる非特異的結合の標識された二次抗体またはリガンドを除去し、そして次いで、二次免疫複合体中の残存する標識が検出される。

20

【0136】

さらなる方法としては、二段階アプローチによる一次免疫複合体の検出が挙げられる。抗体について結合親和性を有する第二の結合リガンド（例えば、抗体）は、上記のように、二次免疫複合体を形成するために使用される。洗浄後、この二次免疫複合体は、この第二の抗体について結合親和性を有する第三の結合リガンドまたは抗体と、再度、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件下でかつそれに十分な時間の間、接觸される。第三のリガンドまたは抗体は、検出可能な標識に結合され、そのように形成される三次免疫複合体の検出を可能にする。この系は、このことが所望である場合に、シグナルの増幅を提供し得る。

30

【0137】

Charles Cantorにより設計された免疫検出の1つの方法は、2つの異なる抗体を使用する。第一の工程のビオチン化されたモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体は、標的抗原（1つまたは複数）を検出するために使用され、そして第二の工程の抗体は、複合体化されたビオチンに付着されたビオチンを検出するために、次いで使用される。その方法において、試験されるべきサンプルがまず、第一の工程の抗体を含有する溶液中でインキュベートされる。標的抗原が存在する場合、抗体のいくつかが抗原に結合し、ビオチン化された抗体／抗原複合体を形成する。次いで、この抗体／抗原複合体が、ストレプトアビシン（もしくはアビシン）、ビオチン化DNA、および／またはビオチン化された相補DNAの逐次溶液中のインキュベーションによって増幅され、各工程において、さらなるビオチン部位を抗体／抗原複合体に添加する。この増幅工程は、適切なレベルの増幅が達成されるまで反復され、その時点で、サンプルは、ビオチンに対して第二の工程の抗体を含有する溶液中でインキュベートされる。この第二の工程の抗体は、例えば、色原体基質を用いる組織酵素的方法（histoenzymology）によって抗体／抗原複合体の存在を検出するために使用され得る酵素を用いて、標識される。適切な増幅によって、肉眼で見える結合体が生成され得る。

40

【0138】

50

別の公知の免疫検出方法は、免疫 P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) 方法を利用する。P C R 法は、ビオチン化 D N A とのインキュベーションまで C a n t o r 法に類似するが、複数回のストレプトアビジンとビオチン化 D N A とのインキュベーションを用いる代わりに、D N A / ビオチン / ストレプトアビジン / 抗体複合体が、抗体を遊離する低いp H または高い塩類の緩衝液で洗い流される。得られる洗浄溶液は、適切なコントロールと共に適切なプライマーを用いる P C R 反応を実施するために、次いで使用される。この方法は、子宮頸癌または C I N を有する H P V に感染した女性の集団を同定する有用な手段を提供する。

【 0 1 3 9 】

H P V によって感染した人が前癌増殖または癌性増殖を有するかを決定する別の手段は、B i r n e r ら 2 0 0 1 および C l a v e l ら 2 0 0 0 (共に参考として援用される) において示されるようなハイブリッド捕捉によるものである。 10

【 0 1 4 0 】

本発明の免疫検出方法は、特異性 (例えば、癌特異的遺伝子産物など) が発現される、種々の疾患のような状態の診断および予後において明白な有用性を有する。ここで、C I N に至り得る、H P V に感染していると疑われる生物学的および / または臨床サンプルが使用される。しかし、これらの実施形態はまた、非臨床サンプル (例えば、抗原もしくは抗体サンプルの力価測定 (例えば、ハイブリドーマの選択の際) におけるような) への適用を有する。

【 0 1 4 1 】

(a . E L I S A)

上記で詳述したように、免疫アッセイは、それらの最も簡素かつ / または直接的な意味において、結合アッセイである。特定の好ましい免疫アッセイは、当該分野で公知の種々のタイプの酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) および / または放射性免疫アッセイ (R I A) である。組織切片を用いる免疫組織化学検出もまた、特に有用である。しかし、検出がこのような技術に制限されないことは容易に理解され、そして / またはウェスタンプロットティング、ドットプロットティング、F A C S 分析、および / または同様のものもまた使用され得る。 20

【 0 1 4 2 】

1つの例示の E L I S A において、本発明における、(抗原を含む) 細胞媒介免疫応答の産物に対する抗体は、タンパク質親和性を提示する選択された表面 (例えば、ポリスチレンマイクロタイパレート中のウェル) 上に固定化される。次いで、抗原を含有することが疑われる試験組成物 (例えば、臨床サンプル) がこのウェルに添加される。結合および / または、非特異的結合免疫複合体を除去するための洗浄後、結合された抗原が検出され得る。検出は、一般に、検出可能な標識に連結される別の抗体の添加によって達成される。このタイプの E L I S A は、シンプルな「サンドイッチ E L I S A」である。検出はまた、第二の抗体の添加、次いで第二の抗体について結合親和性を有する第三の抗体 (この第三の抗体は検出可能な標識に連結されている) の添加によって達成され得る。 30

【 0 1 4 3 】

別の例示の E L I S A においては、抗原を含有することが疑わしいサンプルが、ウェル表面上に固定化され、そして / または次いで、(抗原を含む) 細胞媒介免疫応答の産物に対して産生される抗体と接触される。結合および / または、非特異的結合免疫複合体を除去するための洗浄後、結合された抗体が検出される。出発抗体が検出可能な標識に連結されている場合、免疫複合体は直接的に検出され得る。再度、免疫複合体が、第一の抗体について結合親和性を有する第二の抗体 (第二の抗体は検出可能な標識に連結されている) を用いて検出され得る。 40

【 0 1 4 4 】

抗原が固定化されている別の E L I S A は、検出における抗体競合の使用を包含する。この E L I S A においては、抗原に対する標識された抗体がウェルに添加されて、結合させられ、そして / またはそれらの標識によって検出される。未知のサンプル中の抗原の量は 50

、コーティングされたウェルとのインキュベーションの間、抗原に対する標識された抗体とこのサンプルを混合することにより、次いで決定される。サンプル中の抗原の存在は、ウェルへの結合に利用可能な抗原に対する抗体の量を減少させるように作用し、そして従って、最終シグナルを減少させる。これはまた、未知のサンプル中の抗原に対する抗体を検出するために適切であり、ここで未標識の抗体は、抗原でコーティングされたウェルに結合し、そしてまた標識された抗体に結合するのに利用可能な抗原の量を減少させる。

【0145】

用いられるフォーマットにかかわらず、ELISAは、共通するある特徴（例えば、コーティング、インキュベートおよび結合、非特異的結合種を除去するための洗浄、および結合免疫複合体の検出）を有する。これらを以下に説明する。

10

【0146】

抗原または抗体のいずれかでプレートをコーティングする際に、当業者は、一般に、このプレートのウェルを、その抗原または抗体の溶液と、一晩または特定の時間（時間単位）の間、インキュベートする。プレートのウェルは、次いで、不完全に吸着された材料を除去するために洗浄される。ウェルの残存する利用可能な表面がいずれも、次いで、試験抗血清に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質で「コーティング」される。これらとしては、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは乳粉末の溶液が挙げられる。このコーティングは、固定化表面上の非特異的吸着部位の遮断を可能にし、そして従って、表面上への抗血清の非特異的結合により引き起こされるバックグラウンドを減少させる。

20

【0147】

ELISAにおいては、おそらく、直接的な手順よりむしろ、二次的なまたは三次的な検出手段を使用することが、より慣例的なことである。従って、ウェルへのタンパク質または抗体の結合、バックグラウンドを減少させる非反応性材料でのコーティング、および未結合材料の除去のための洗浄後、この固定化表面は、免疫複合体（抗原／抗体）形成を可能にするのに有効な条件下で、試験されるべき生物学的サンプルと接触される。免疫複合体の検出は、次いで、標識化された二次結合リガンドまたは抗体を必要とし、そして標識された三次抗体または第三の結合リガンドと組み合わせて二次結合リガンドまたは抗体を必要とする。

30

【0148】

「免疫複合体（抗原／抗体）形成を可能にするのに有効な条件下」とは、好ましくは抗原および／または抗体を溶液（例えば、BSA、ウシガンマグロブリン（BGG）、またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）／Tween）で希釈することを包含する条件を意味する。これらの添加された薬剤はまた、非特異的バックグラウンドの減少を補助する傾向にある。

40

【0149】

「適切な」条件はまた、このインキュベーションが有効な結合を可能にするのに十分な温度で、または時間の間にあることを意味する。インキュベーション工程は、代表的には、約1時間から、2時間まで、4時間などまでで、好ましくは25～27の程度の温度であり、または約4で一晩などであり得る。

【0150】

ELISAにおける全てのインキュベーション工程の後、接触された表面は、非複合化材料を除去するように洗浄される。好ましい洗浄手順は、PBS／Tween、またはホウ酸緩衝液のような溶液での洗浄を包含する。試験サンプルと本来結合される材料との間の特異的免疫複合体の形成、および続く洗浄後、免疫複合体の微小な量の発生でさえも決定され得る。

【0151】

検出手段を提供するために、第二または第三の抗体は、検出を可能にする結合された標識を有する。好ましくは、これは、適当な色原体基質とのインキュベーションの際に発色を生じる酵素である。従って、例えば、当業者は、第一のおよび第二の免疫複合体を、ウレ

50

アーゼ結合体化抗体、グルコースオキシダーゼ結合体化抗体、アルカリホスファターゼ結合体化抗体、または水素ペルオキシダーゼ結合体化抗体と、さらなる免疫複合体の形成の発生に好都合である時間の間、かつその条件下で接触またはインキュベートすることを望む（例えば、P B S 含有溶液（例えば、P B S - T w e e n ）中の室温で2時間のインキュベーション）。

【0152】

標識された抗体とのインキュベーション、および未結合材料を除くための続く洗浄後に、標識の量は定量される（例えば、酵素標識としてペルオキシダーゼの場合において、色原体基質（例えば、尿素、またはプロモクレゾールパープル、または2,2'-アジノ-ジ-（3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸（A B T S ）、またはH₂O₂）とのインキュベーションにより）。次いで、定量は、生成した色の程度を測定することにより（例えば、可視光分光光度計を用いて）達成される。

【0153】

(b. 免疫組織化学)

抗体はまた、免疫組織化学（I H C ）による研究のために調製した、新鮮に凍結したおよび／またはホルマリン固定した、パラフィン包埋した組織塊と共に使用され得る。これらの粒子状標本から組織塊を調製する方法は、種々の予後因子の以前のI H C 研究において首尾よく使用されており、そして／または当業者に周知である（Brownら、1990；Abbondanzoら、1990；Allredら、1990）。

【0154】

簡潔には、凍結切片が、50ngの凍結「粉碎」組織を、プラスチック小カプセル中でリン酸緩衝化生理食塩水（P B S ）中で室温で再水和し；遠心分離により粒子をペレット化し；それらを粘性包埋培地（O C T ）中に再懸濁し；カプセルを逆にし、かつ／または遠心分離により再度ペレット化し；-70℃イソペンタン中で瞬時凍結し；プラスチックカプセルを切断し、かつ／または凍結された組織シリンダーを取り出し；クリオスタットマイクロトームチャック（c r y o s t a t m i c r o t o m e c h u c k ）上に組織シリンダーを固定し；かつ／または25～50の連続した切片を切断することにより調製され得る。

【0155】

永久切片は、プラスチック遠心分離管中の50mgのサンプルの再水和；ペレット化：4時間固定のための10%ホルマリン中の再懸濁；洗浄／ペレット化；温2.5%寒天中の再懸濁；ペレット化；寒天の硬化のための氷冷水中の冷却；管からの組織／寒天塊の取り出し；パラフィン中の塊の浸潤および／もしくは包埋；ならびに／または50までの連続した永久切片の切断を包含する同様の方法によって調製され得る。

【0156】

(c. 蛍光選別細胞分光)

タンパク質はまた、F u j i s h i m a ら、1996において記載されるようにフローサイトメトリーによって検出され得る。この方法の実施において、細胞が固定され、そして次いで検出されるべき発現タンパク質に対するモノクローナル抗体とインキュベートされる。次いで、結合された抗体は、例えば検出のために、標識された抗IgGと接触される。代表的な標識は、F I T C である。次いで、蛍光強度が、フローサイトメーター（例えば、Ortho Cytron、Ortho diagnostics、またはF A C S can；B e c t o n D i c k i n s o n ）により測定され得る。

【0157】

F A C S は、それらがレーザビームを通して通過するような、それらの光散乱特性にまず基づいて、細胞の亜集団の分離を可能にする。前方光散乱（F A L S ）は、細胞の大きさに関連し、そして右角光散乱は細胞密度、細胞輪郭、および核-細胞質比に関連する。細胞が蛍光標識抗体でタグ化されているので、次いで、それらは、蛍光強度、および明るい蛍光の細胞および低い蛍光の細胞を集めるようにF A C S において設定されたポジティブウィンドウおよびネガティブウィンドウによってさらに特徴付けられ得る。細胞は、一秒

10

20

30

40

50

あたり約3000細胞の流動速度で選別され、そしてポジティブ細胞およびネガティブ細胞に集められる。

【0158】

(d. ウエスタンプロット)

本発明の組成物は、免疫プロット分析またはウェスタンプロット分析において用途を見出しえる。ペプチドは、サイトカインを産生する細胞をチャレンジするために使用され得る。本発明の抗体は、固体支持体マトリクス(例えば、ニトロセルロース、ナイロン、またはそれらの組み合わせ)上に固定化されたタンパク質の同定のための高親和性一次試薬として使用され得る。免疫沈降、続くゲル電気泳動と共に、これらは、その抗原の検出において使用される二次試薬が不利なバックグラウンドを引き起こす抗原を検出する際に使用するための一工程試薬として使用され得る。これは、研究される抗原が免疫グロブリン(細菌細胞壁成分を結合する免疫グロブリンの使用を除く)である場合、研究される抗原が検出剤と交差反応する場合、またはそれらが交差反応シグナルと同じ相対的分子量で移動する場合に、特に有用である。

10

【0159】

ウェスタンプロッティングと共に使用するための免疫学的に基づく検出方法は、タンパク質部分に対する酵素タグ化、放射能タグ化、または蛍光タグ化された二次抗体を包含し、これは、この点において特に有用であると考えられる。

20

【0160】

(VII. 免疫療法)

感染または癌の処置へのアプローチとしての免疫療法は、特異的抗体および/または細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の産生を惹起する抗原を腫瘍細胞が保有するという前提に基づく。

【0161】

(A. 免疫療法のタイプ) :

癌の免疫療法は、以下の節において記載されるように、養子免疫、受動免疫、および能動免疫として、広範に分類され得る。

30

【0162】

(1. 受動免疫療法)

受動免疫療法のための多数の異なるアプローチが存在する。それらは、以下に広範にカテゴリー化され得る: 抗体単独の注入; 毒素または化学療法剤にカップリングされた抗体の注入; 放射性同位体にカップリングされた抗体の注入; 抗イディオタイプ抗体の注入; および最終的に、骨髄における腫瘍細胞の一掃。

40

【0163】

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体は、それらが、患者において少数または全く副作用を生じないので、受動免疫療法において使用される。しかし、それらの適用は、それらの希少性によって幾分制限され、そしてこれまで病巣内投与のみされてきた。ガングリオシド抗原に対するヒトモノクローナル抗体は、皮膚再発性メラノーマを罹患する患者に病巣内投与されてきた(IrieおよびMorton, 1986)。毎日のまたは週毎の病巣内注入後に、10人の患者のうち6人において、退縮が観察された。別の研究においては、2つのヒトモノクローナル抗体の病巣内注入から、適度な成功が達成された(Irieら, 1989)。

【0164】

2つの異なる抗原に対する1つより多くのモノクローナル抗体、または複数の抗原特異性を有する抗体を投与することが有利であり得る。処置プロトコルはまた、Bajorinら(1988)におけるようなリンホカインまたは他の免疫増強剤の投与を包含し得る。ヒトモノクローナル抗体の発達は、明細書中の他の箇所においてさらに詳細に記載される。

50

【0165】

(2. 能動免疫療法)

能動免疫療法において、抗原性ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質、または自己もしくは異種の腫瘍細胞組成物または「ワクチン」が、一般には、別個の細菌アジュvantと共に投与される (RavindranathおよびMorton、1991; MortonおよびRavindranath、1996; Mortonら、1992; Mitchellら、1990; Mitchellら、1993)。メラノーマの免疫療法において、高い IgM 応答を惹起する患者は、しばしば、IgM 抗体を全く惹起しないまたは低い IgM 抗体を惹起する患者よりもよく生存する (Mortonら、1992)。IgM 抗体は、しばしば一過性の抗体であり、そしてこの原則に対する例外は、抗ガングリオシド抗体または抗炭水化物抗体であるようである。

【0166】

10

(3. 養子免疫療法)

養子免疫療法において、患者の循環リンパ球、または腫瘍浸潤リンパ球が、インピトロで単離されるか、リンホカイン（例えば、IL-2）によって活性化されるか、または腫瘍壊死の遺伝子で形質導入されるかされ、そして再投与される (Rosenbergら、1988; 1989)。このことを達成するために、当業者は、動物またはヒト患者に、免疫学的に有効な量の活性化されたリンパ球を、本明細書中に記載のようにアジュvant取り込み抗原性ペプチド組成物と共に投与する。活性化されたリンパ球は、最も好ましくは、より早期に、そして血液または腫瘍サンプルから単離され、そしてインピトロで活性化（または「拡大」）された患者自身の細胞である。この形態の免疫療法は、メラノーマおよび腎臓癌の退縮のいくつかの例を生じたが、応答者の割合は、応答しなかったものに比較して少数でしかなかった。

【0167】

20

(B. ワクチン接種)

本発明は、細胞媒介免疫応答を誘発または改善するために、HPV に由来する E6 ペプチドおよび E7 ペプチドを用いる免疫療法の使用を包含する。これは、HPV 由来の E6 ペプチドおよび / または E7 ペプチドに対して CMI 応答を提示しないまたは低い CMI 応答を提示する患者にとって特に意義を有する。配列番号 1 から 19 のアミノ酸配列の全てまたは一部を含むペプチドまたはポリペプチドは、患者における細胞介免疫応答の誘導において、HPV 感染の処置および予防 (HPV 関連の前癌性増殖もしくは癌性増殖の予防を含む) の両方のための有効なワクチンとして臨床的に非常に重要であり得る。

30

【0168】

40

一旦生成、合成および / または精製されると、本発明のペプチドおよびポリペプチドは、患者への投与のためのワクチンとして調製され得る。本発明のペプチド、ポリペプチド、およびワクチンは、抗原に対する免疫応答を刺激するために、他のワクチンまたはワクチン成分（例えば、他のさらなる抗原）と組み合わされ得ることもまた企図される。この実施形態において、好ましいさらなる抗原は、癌および過剰増殖性状態において特異的であるか、または優先的に発現されるとして示されるものである。本発明のペプチド、ポリペプチド、およびワクチンとの組み合わせが企図されるさらなる抗原およびワクチンとしては、米国特許第 5,840,317 号および第 5,882,654 号（本明細書中に参考として援用される）において記載されるものが挙げられる。

【0169】

当業者は、試験のための一連の潜在的な治療剤および送達プロトコールを構想し得る。例えば、潜在的な抗 HPV 剤および抗腫瘍剤は、ヒト設計の天然産物または合成分子であり得る。さらに、このモデルは、公知の化合物および新規化合物の一群の中から有効な薬剤を選択するための媒体を提供する。任意の特定の潜在的な治療剤の投薬様式および送達様式は、薬学的に活性な組成物を調製するための十分に確立された指針を元にして決定され得る。試験化合物は、例えば、静脈内に、皮内に、筋内に、局所的に、経口的に、または任意の他の薬学的に有効な経路によって投与され得る。本発明の方法によって生成される動物を使用して、研究者らは、ここに初めて、高いリスクのヒトパピローマウイルス誘導性疾患（おそらく、ウイルス複製および伝播を含む）に対する予防剤および治療剤

50

を評価し得る。これらとしては、とりわけ、化学型の医薬、遺伝子治療、アンチセンス阻害的戦略、または予防的ワクチン接種もしくは治療的ワクチン接種が挙げられ得る。提案された治療の実験室的試験の結果を評価する多くの方法が、公知である。

【0170】

種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増強するために使用され得、これらとしては、フロイント（完全および不完全）、鉱質ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン）、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント（例えば、BCG（カルメット-ゲラン杆菌）およびCorynebacterium parvum）が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の免疫療法における使用に加えて、アジュバントは、本発明の状況下における細胞媒介性免疫応答の検出を増強するために使用され得る。

【0171】

（C. 標的化された送達系）

ウイルス特異的T細胞応答について試験するため、本願発明のいくつかの実施形態において、HPVポリペプチドまたはペプチドは、T細胞応答を誘発するために、細胞の表面上にこのウイルスタンパク質のフラグメントを発現するようにこれらの細胞を標的化するように送達され得る。灌流、発現構築物のトランスフェクション、ウイルスベクター、および以下に開示される他の手段を含む、種々の送達の方法が存在する。

【0172】

（1. 灌流による移入）

本願発明の1つの実施形態は、灌流によって細胞にペプチドまたはペプチドの組み合わせを移入する。発現構築物またはウイルス構築物の連続的灌流がまた、企図される。連続的灌流において送達される構築物またはペプチドの量は、所望の取り込み量によって決定され得る。本発明は、灌流の実施例を開示し、それによって 10^6 細胞/m³の初期濃度を有する細胞培養物が、まず標識され得、洗浄され得、次いで、2時間、100μgの合成ペプチドと共にインキュベートされ得る。

【0173】

（2. 発現ベクター）

治療ペプチドの送達は、発現ベクターを使用して達成され得る。本発明の本実施形態において、HPVポリペプチドおよびペプチドは、発現構築物の使用を介して標的細胞に送達される。本願全体を通して、用語「発現構築物」は、HPVポリペプチドをコードする核酸を含む遺伝子構築物の任意の型を含むことを意味する。「ウイルスベクター」は、主にウイルス配列に由来する発現構築物をいう。この構築物を発現させるために、HPVポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターの転写制御下に置かれる。「プロモーター」は、宿主細胞の合成機構によって、または導入された合成機構によって認識されるDNA配列をいい、これは、遺伝子の特異的な転写を開始するために必要である。句「転写制御下」は、プロモーターが、RNAポリメラーゼの開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために、ポリヌクレオチドに対して正しい位置に存在することを意味する。

【0174】

用語プロモーターは、本明細書中で、転写制御モジュールの群をいうために使用され、このモジュールは、RNAポリメラーゼIIの開始部位の周りにクラスター形成される。プロモーターがどのように配置されるかという考察の多くは、いくつかのウイルスプロモーター（これは、HSVチミジンキナーゼ（tk）およびSV40初期転写単位のプロモーターを含む）の分析から得られている。これらの研究は、より最近の研究によって補強され、プロモーターが別個の機能的モジュールから構成され、各モジュールは、約7~20bpのDNAからなり、そして転写活性化因子またはリプレッサータンパク質の1つ以上の認識部位を包含することが示されている。

【0175】

10

20

30

40

50

各プロモーター中の少なくとも 1 つのモジュールは、RNA 合成のための開始部位を位置づけるために機能する。この最も知られている例は、TATA ボックスであるが、TATA ボックスを欠失するいくつかのプロモーター（例えば、哺乳動物末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよび SV40 後期遺伝子のプロモーターおよび SV40 後期遺伝子のプロモーター）では、開始部位そのものと重複する別個のエレメントが、開始位置を固定することを補助する。

【0176】

さらなるプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を制御する。代表的には、これらは、開始部位の 30 ~ 110 bp 上流の領域に位置するが、多くのプロモーターは、開始部位の下流にも同様の機能エレメントを含むことが最近示された。プロモーターエレメントの間の間隔は、しばしば変更され、その結果、プロモーター機能は、エレメントが互いにに対して相対的に反対にされるかまたは移動される場合に保存される。tk プロモーターにおいて、プロモーターエレメントの間の間隔は、活性が低減するまで、50 bp 間隔まで増加し得る。プロモーターに依存して、個々のエレメントが、転写を活性化するために協調的または独立してのいずれかによって機能し得ることは明らかである。

【0177】

HPV ポリヌクレオチドの発現を制御するために使用される特定のプロモーターは、標的細胞中でポリヌクレオチドを発現し得る限り、重要とは考えられない。従って、ヒト細胞が標的化される場合、ヒト細胞内で発現され得るプロモーターに隣接して、およびそのプロモーターの制御下に、ポリヌクレオチドコード領域を配置することが好ましい。概していえば、このようなプロモーターは、ヒトプロモーターまたはウイルスプロモーターのいずれかを含み得る。発現レベルが T 細胞応答を誘導するのに十分であるという条件下で、ポリヌクレオチドの発現を達成するために、当該分野で周知である他のウイルスプロモーターまたは哺乳動物細胞プロモーターまたは細菌ファージプロモーターの使用も、同様に意図される。

【0178】

周知の特徴を有するプロモーターの使用によって、トランスフェクション後のポリヌクレオチドの発現レベルおよび発現パターンが、最適化され得る。例えば、特定の細胞において活性なプロモーター（例えば、チロシナーゼ（黒色腫）、- フェトプロテインおよびアルブミン（肝臓腫瘍）、CC10（肺腫瘍）ならびに前立腺特異的抗原（前立腺腫瘍））の選択により、HPV ポリヌクレオチドの組織特異的発現が可能となる。さらに、特定の生理学的シグナルに応答して調節されるプロモーターを選択することにより、HPV ポリペプチド構築物の誘導発現を可能にし得る。

【0179】

エンハンサーは、DNA の同一分子上の異なる位置に配置されるプロモーターからの転写を増大する遺伝子エレメントとしてもともと検出された。長い距離にわたって作用するこの能力は、原核生物転写制御の権威ある研究においてはほとんど知られていなかった。後の研究により、エンハンサー活性を有する DNA 領域がほぼプロモーター様に組織化されていることが示された。すなわち、これらエンハンサーは、多くの個々のエレメントから構成され、これらの各々は、1 つ以上の転写タンパク質に結合する。

【0180】

エンハンサーとプロモーターとの間の基本的な違いは、作動的な違いである。エンハンサー領域は、全体として、一定距離を置いて転写を刺激し得なければならず；このことは、プロモーター領域またはその成分エレメントでは当てはまる必要はない。他方、プロモーターは、特定の部位および特定の方向で RNA 合成の開始を指示する 1 つ以上のエレメントを有さねばならない一方、エンハンサーは、これらの特異性を欠く。プロモーターおよびエンハンサーは、しばしば重複的および連続的であり、しばしば、非常に類似したモジュール構成を有するように見える。

【0181】

さらに、任意のプロモーター / エンハンサーの組み合わせ（Eukaryotic Pr 50

omoter Data Base EPDBによる)もまた、HPVポリヌクレオチド構築物の発現を駆動するために使用され得る。T3、T7またはSP6細胞質発現系の使用は、別の可能な実施形態である。真核生物細胞は、送達複合体の一部またはさらなる遺伝子発現ベクターのいずれかとして、適切なバクテリオファージポリメラーゼが提供される場合に、特定のバクテリオファージプロモーターからの細胞質転写を支持し得る。

【0182】

本発明の特定の実施形態において、細胞における発現ベクターの送達は、発現ベクター中にマーカーを含ませることによって、インビトロまたはインビボで同定をされ得る。マーカーは、トランスフェクト細胞に対して同定可能な変化を生じさせ、発現の同定を可能にする。通常、薬物選択マーカーを含ませることは、形質転換体のクローニングおよび選択を補助する。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)(真核生物性)またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)(原核生物性)のような酵素が使用され得る。免疫学的マーカーもまた使用され得る。使用される選択マーカーは、HPVポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと共に発現され得る限り、重要ではないと考えられる。選択マーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0183】

代表的に、適切にポリアデニル化された転写物を得るために、ポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の首尾よい実施に重要であると考えられず、任意のこのような配列が、使用され得る。本発明者らは、SV40ポリアデニル化シグナルを使用した。このSV40ポリアデニル化シグナルは、都合がよく、そして使用される標的細胞において良好に機能することが公知である。ターミネーターもまた、発現構築物のエレメントとして企図される。これらのエレメントは、メッセージレベルを増加させ、そして構築物から他の配列へのリードスルーを最小化させるように作用し得る。

【0184】

(3. ウイルスベクター)

本発明のいくつかの実施形態において、発現構築物は、ウイルスまたはウイルスゲノム由来の遺伝子操作構築物を含む。特定のウイルスが、レセプター媒介性エンドサイトーシスを介して細胞に入る(いくつかの場合、宿主細胞の染色体に組込まれる)能力は、これらウイルスを哺乳動物細胞への遺伝子移入のための魅力的な候補にした。しかし、裸のDNAの直接的な取り込みおよびDNA複合体(以下に議論される)のレセプター媒介性取り込みが示されたので、発現ベクターは、ウイルスである必要がなくなり、代わりに、哺乳動物細胞中にコードされる遺伝子の発現を支持し得る任意のプラスミド、コスミド、またはファージ構築物(例えば、pUCプラスミドシリーズまたはBlue scriptTMプラスミドシリーズ)もあり得る。

【0185】

(a. レトロウイルス)

レトロウイルスのクラスは、以下の3つの主要な群にさらに分割される: オンコウイルス(例えば、マウス白血病ウイルス); レンチウイルス、および泡状ウイルス(スプマウイルス)。レトロウイルスは、一本鎖RNAウイルスであり、感染細胞内で逆転写プロセス(Coffin, 1990)によって、これらのRNAを二本鎖DNAに転換する能力によって特徴付けられる。次いで、得られたDNAは、細胞染色体にプロウイルスとして安定に組込まれ、そしてウイルスタンパク質合成を指示する。この組み込みは、レシピエント細胞およびその子孫における、ウイルス遺伝子配列の保有を生じる。

【0186】

レトロウイルスゲノムは、3つの遺伝子(gag、pol、およびenv)を含み、これらは、それぞれキャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をコードする。gag遺伝子の上流に見出される配列(と命名される)は、ゲノムのビリオンへのパッケージングのためのシグナルとして機能する。2つの長い末端反復(LTR)配列は、ウイルスゲノムの5'末端および3'末端に存在する。これらは、強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含み、そして、また、宿主細胞ゲノムにおける組込

10

20

30

40

50

みに必要とされる (Coffin, 1990)。

【0187】

レトロウイルスベクターを構築するために、HPVポリペプチドをコードする核酸を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損のウイルスを产生する。あるいは、HPV感染を誘導し得ない変異型HPVウイルスが、使用され得る。ビリオンを生成するために、gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子を含むがLTRおよび成分を含まないパッケージング細胞株が、構築される (Mann, 1983)。ヒトcDNAをレトロウイルスのLTRと配列と共に含む組換えプラスミドがこの細胞株に（例えば、リン酸カルシウム沈降法によって）導入される場合、配列は、組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子にパッケージングされ、次いで、培養培地に分泌されることを可能にする (NicolasおよびRubenstein, 1988; Mann, 1983)。組換えレトロウイルスを含む培地は、次いで収集され、必要に応じて濃縮され、そして遺伝子移入に使用される。レトロウイルスベクターは、広い種類の細胞型に感染し得る。しかし、組込みおよび安定な発現は、宿主細胞の分裂を必要とする (Paskind, 1975)。

【0188】

レトロウイルスベクターの特異的標的化を可能にするように設計された新規アプローチが、ウイルスエンベロープへのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的改変に基づいて最近開発された。この改変は、肝細胞のシアロ糖タンパク質レセプターを介する特異的感染を可能にし得る。

【0189】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特定の細胞レセプターに対するビオチン化抗体を使用する、組換えレトロウイルスの標的化のための異なるアプローチが、設計された。この抗体は、ストレプトアビジンを使用することによって、ビオチン成分を介して結合された (Roux, 1989)。主要組織適合性複合体クラスI抗原およびクラスII抗原に対する抗体を使用することによって、その研究者らは、インビトロでの表面抗原を保有する種々のヒト細胞の、エコトロピックウイルスでの感染を示した (Roux, 1989)。

【0190】

(b. アデノウイルス)

ヒトアデノウイルスは、約36kbのゲノムサイズを有する二本鎖DNA腫瘍ウイルスである (Toozé, 1981)。真核生物遺伝子発現についてのモデル系として、アデノウイルスは、広く研究され、そして十分に特徴付けられており、このことは、アデノウイルスを、遺伝子移入系としてのアデノウイルスの開発のために魅力的な系にする。このウイルスの群は、増殖および操作が比較的簡単であり、そしてインビトロおよびインビボでの広い宿主範囲を示す。溶解感染された細胞において、アデノウイルスは、宿主タンパク質合成を遮断し得、細胞の機構を多量のウイルスタンパク質合成の方に指向させ、そしておびただしい量のウイルスを产生し得る。

【0191】

ゲノムのE1領域は、E1AおよびE1Bを含み、これらは、ウイルスゲノムおよび少数の細胞遺伝子の転写制御を担うタンパク質をコードする。E2発現 (E2AおよびE2Bを含む)は、ウイルス複製機能（例えば、DNA結合タンパク質、DNAポリメラーゼ、および複製を開始する末端タンパク質）の合成を可能にする。E3遺伝子産物は、CTLおよび腫瘍壊死因子による細胞溶解を阻害し、そしてウイルス増殖のために重要であるようである。E4タンパク質に関連する機能は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞停止を含む。後期遺伝子産物は、ビリオンキャプシドタンパク質のほとんどを含み、そしてこれらは、主要後期プロモーターからの単一の一次転写物のプロセシングの大半が生じた後にのみ発現される。主要後期プロモーター (MLP) は、感染の後期の間、高い効率を示す (Stratford-PerricaudetおよびPerricaudet, 1991)。

10

20

30

40

50

【0192】

ウイルスゲノムの小部分のみがインシス (in cis) で必要であるようである (To oze, 1981) ので、アデノウイルス由来ベクターは、293細胞のような細胞株と共に使用された場合、大きなDNAフラグメントの置換のための優れた能力を提供する。Ad5形質転換ヒト胚性腎臓細胞株 (Graham, 1977) は、イントラ ns (in trans) で必須のウイルスタンパク質を提供するために開発されてきた。アデノウイルスこれらの特徴は、アデノウイルスは、インビオでの細胞の標的化における使用のための良好な候補とする (Grunthaus および Horwitz, 1992)。

【0193】

外来タンパク質を細胞に送達するためのアデノウイルス系の特定の長所としては、以下が挙げられる：(i) 外来DNAによって比較的大きなウイルスDNA片を置換する能力；(ii) 組換えアデノウイルスの構造的安定性；(iii) アデノウイルスのヒトに対する投与の安全性；および(iv) アデノウイルス感染と癌または悪性腫瘍との任意の既知の関連の欠如；(v) 高力価の組換えウイルスを得る能力；および(vi) アデノウイルスの高い感染性。

【0194】

一般に、アデノウイルス遺伝子移入系は、組換えの遺伝子操作されたアデノウイルスに基づいており、これはそのゲノムの一部（例えば、E1）の欠失によって複製不能にされ、感染のためのその能力をなお依然として保持する。比較的大きな外来タンパク質をコードする配列は、さらなる欠失がアデノウイルスゲノム中に作製された場合に、発現され得る。例えば、E1領域およびE3領域の両方を欠失したアデノウイルスは、10kbまでの外来DNAを保有し得、そして293細胞において高力価まで増殖し得る (Stratford-Perricaudet および Perricaudet, 1991)。驚いたことに、アデノウイルス感染後の導入遺伝子の持続的発現がまた、報告された。

【0195】

(c. AAVベクター)

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、本発明の細胞形質導入における使用のための魅力的なベクター系である。なぜなら、アデノ随伴ウイルスは高頻度の組込みを有し、非分裂細胞に感染し得、従って、アデノ随伴ウイルスは遺伝子を哺乳動物細胞（例えば、組織培養物）(Muzychuk, 1992) またはインビオで送達するために有用となるからである。AAVは、感染性について広い宿主範囲を有する (Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Laughlin, 1986; Tratschin, 1984)。rAAVベクターの生成および使用に関する詳細は、米国特許第5,139,941号および同第4,797,368号に記載され、各々は、参考として本明細書中に援用される。

【0196】

遺伝子送達におけるAAVの使用を示す研究としては、LaFaceら (1988) ; Zhouら (1993) ; Flotteら (1993) ; および Walshら (1994) が挙げられる。組換えAAVベクターは、マーカー遺伝子 (Kaplitt, 1994; Shelling および Smith, 1994; Yoder, 1994; Zhou, 1994; Samulski, 1989; Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Tratschin, 1985; Hermonat および Muzychuk, 1984) およびヒト疾患に関する遺伝子 (Luo, 1994; Walsh, 1994; Wei, 1994; Flotte, 1992; Ohi, 1990) のインピトロおよびインビオでの形質導入のために首尾よく使用された。最近、AAVベクターは、囊胞性線維症の処置のためのフェーズIヒト試験について認可された。

【0197】

AAVは、培養細胞中での増殖性感染を生じるために、別のウイルス（アデノウイルスかまたはヘルペスウイルスファミリーのメンバーのいずれか）と同時感染することを必要とするという点で依存性パルボウイルスである (Muzychuk, 1992)。ヘルパー

10

20

30

40

50

ウイルスと同時感染しない場合、野生型 AAV ゲノムは、その末端を介してヒト第 19 染色体に組込まれ、ここでこれはプロウイルスとして潜伏状態で存在する (Samulski, 1991; Kotin, 1990)。しかし、rAAV は、AAV Rep タンパク質もまた発現されなければ、組み込みについて、第 19 染色体に制限されない (Shelling および Smith, 1994)。AAV プロウイルスを保有する細胞がヘルパーウイルスで二重感染される場合、AAV ゲノムは、染色体からまたは組換えプラスミドから「レスキュー」され、正常な増殖性感染が確立される (Muzychuk, 1992; Kotin, 1990; Samulski, 1989; McLaughlin, 1988)。

【0198】

10

代表的には、組換え AAV (rAAV) ウィルスは、2つのAAV 末端反復 (McLaughlin, 1988; Samulski, 1989; 各々は、参考として本明細書中に援用される) が隣接した目的の遺伝子を含むプラスミドおよび末端反復のない野生型 AAV コード配列を含む発現プラスミド (例えば、pIM45) (McCartay, 1991; 参考として本明細書中に援用される) を同時トランスフェクトすることによって作製される。細胞はまた、アデノウイルス、または AAV ヘルパー機能に必要とされるアデノウイルス遺伝子を保有するプラスミド、で感染されるかまたはトランスフェクトされる。このような様式で作製された rAAV ウィルスストックは、アデノウイルスで汚染され、このアデノウイルスは、rAAV 粒子から (例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって) 物理的に分離されなければならない。あるいは、AAV コード領域を含むアデノウイルスベクターまたは AAV コード領域を含む細胞株およびアデノウイルスヘルパー遺伝子のいくつかまたは全てが使用され得る (Clark, 1995; Yang, 1994)。組込まれたプロウイルスとして rAAV DNA を保有する細胞株もまた、使用され得る (Follette, 1995)。

20

【0199】

30

(d. 発現構築物としての他のウイルスベクター)

他のウイルスベクターが、本発明において発現構築物として使用され得る。ウイルス (例えば、ワクシニアウイルス (Coupard, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal および Sugden, 1986)、およびヘルペスウイルス) に由来するベクターもまた、使用され得る。これらのウイルスは、種々の哺乳動物細胞に対していくつかの魅力的な特徴を提供する (Horwitz, 1990; Friedmann, 1989; Coupard, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal および Sugden, 1986)。

30

【0200】

40

欠損性 B 型肝炎ウイルスの最近の知見に伴う、新たな洞察が、異なるウイルス配列の構造 - 機能相関において得られた。インビトロ研究は、ウイルスゲノムの 80%までの欠失にも関わらず、そのウイルスがヘルパー依存性パッケージングおよび逆転写の能力を保持し得ることを示した (Horwitz, 1990)。これは、ゲノムの大部分が外来遺伝物質で置換され得ることを示唆する。肝臓向性および持続性 (組込み) は、肝臓指向性遺伝子移入のために特に魅力的な特徴であった。Chang (1991) は、最近、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を、アヒル B 型肝炎ウイルスゲノムのポリメラーゼコード配列、表面コード配列、およびプレ表面コード配列の代わりに導入した。これは、トリ肝細胞癌細胞株に野生型ウイルスと共に同時トランスフェクトされた。高力価の組換えウイルスを含む培養培地は、初期離アヒル肝細胞を感染するために使用された。安定な CAT 遺伝子発現は、トランスフェクション後、少なくとも 24 時間にわたり検出された (Chang, 1991)。

【0201】

50

(e. 非ウイルス移入法)

培養哺乳動物細胞への発現ベクターの移入のためのいくつかの非ウイルス法もまた、本発明によって企図される。これらとしては、リン酸カルシウム沈降法 (Graham および

50

Van Der Eb, 1973; Chen および Okayama, 1987; Ripp e, 1990)、DEAE-デキストラン法 (Gopal, 1985)、エレクトロポレーション法 (Tur-Kaspa, 1986; Potter, 1984)、直接マイクロインジェクション法 (Harland および Weintraub, 1985)、DNA 負荷リポソーム法 (Nicolaau および Sene, 1982; Fraley, 1979) およびリポフェクタミン-DNA 複合体法、細胞超音波処理法 (Fechheimer, 1987)、高速マイクロプロジェクタイル法を使用する遺伝子ボンバードメント法 (Yang, 1990)、ポリカチオン法 (Boussif, 1995)、およびレセプター媒介性トランスフェクション法 (Wu および Wu, 1988; Wu および Wu, 1987) が挙げられる。これらの技術のいくつかは、インビトロまたはエキソビトでの使用のために首尾よく適合され得る。
10

【0202】

(D. コロイド分散系)

コロイド分散系は、標的化送達ビヒクルを構成する。これらの分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および脂質ベースの系（水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む）が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系は、リポソームである。リポソームは、人工的な膜ベシクルであり、これは、インビトロおよびインビトにおける送達ベシクルとして有用である。大きな単一層ベシクル (LUV)（大きさが 0.2 ~ 4.0 μm にわたる）は、大きな高分子を含むかなりの割合の水性緩衝液をカプセル化し得ることが示された。RNA、DNA およびインタクトナビリオンは、水性の内部にカプセル化され得、そして生物学的に活性な形態で細胞に送達され得る (Fraley)。哺乳動物細胞に加えて、リポソームは、植物、酵母および細菌細胞において、ポリヌクレオチドの送達のために使用されている。リポソームが効率的な遺伝子移入ビヒクルであるために、以下の特徴が存在するべきである：（1）高度に目的の遺伝子のカプセル化をするが、その生物学的活性を損なわない；（2）非標的細胞に比べて標的細胞に優先的および実質的に結合する；（3）標的細胞細胞質へのベシクルの水性内容物の高効率での送達；ならびに（4）遺伝的情報の正確かつ効果的な発現 (Manningら、Biotechniques, 6: 682, 1988)。本発明のこの実施形態は、合成ペプチドがリポソームとして処方され得ることを提案する。リポソーム組成物は、通常、リン脂質（特に、高い相転移温度のリン脂質）の組み合わせであり、通常、ステロイド（特に、コレステロール）との組み合わせである。他のリン脂質または他の脂質もまた使用され得る。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。
20
30

【0203】

リポソーム生成において有用な脂質の例としては、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴリピド、セレブロシド、およびガングリオシドのようなホスファチジル化合物が挙げられる。ジアシルホスファチジルグリセロールが特に有用であり、ここでこの脂質部分は、14 ~ 18 炭素原子、特に 16 ~ 18 炭素原子を含み、飽和されている。例示的なリン脂質としては、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイロホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。
40

【0204】

リポソームの標的化は、解剖学的要因および機構的要因に基づいて分類され得る。解剖学的分類は、選択性（例えば、器官特異性、細胞特異性、およびオルガネラ特異性）のレベルに基づく。機構的標的化は、それが受動的であるか、能動的であるかに基づいて区別され得る。受動的標的化は、洞様毛細血管を含む器官における細網内皮系 (RES) の細胞へ分布するリポソームの天然の傾向を利用する。一方、能動的標的化は、天然で生じる局在化の部位ではない器官型および細胞型への標的化を達成するために、特異的なリガンド（例えば、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、またはタンパク質）へのリポソームの結合化によるか、またはリポソームの組成またはサイズを変えることによるリポソームの変質
50

を伴う。

【0205】

標的化送達系の表面は、種々の方法で改変され得る。リポソーム標的化送達系の場合、脂質基は、リポソーム二重膜との安定な結合に標的化リガンドを維持するために、リポソームの脂質二重膜中に組み込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドに連結するために、種々の連結基が使用され得る。

【0206】

(E. 薬学的組成物)

本発明は、薬学的組成物の形態での合成ペプチドの使用を企図する。一般的に、薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリア中に溶解または分散される1つ以上の有効量のタンパク質様配列、核酸または抗体あるいはさらなる因子を含有する。句「薬学的に受容可能な、または薬理学的に受容可能な」は、例えば、必要に応じて、ヒトのような動物に投与される場合、有害な(adverse)反応、アレルギー反応または他の有害(unintended)反応を生じさせない分子の実体または分子の組成物をいう。少なくとも1つのタンパク質様配列、核酸または抗体あるいはさらなる活性成分を含む薬学的組成物の調製は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、Mack Printing Company, 1990(本明細書中に参考として援用される)によって例示されるように、本開示に照らして当業者に知られる。さらに、動物(例えば、ヒト)投与について、調製物は、FDA Office of Biologics Standardによって要求されるように、無菌性基準、発熱性基準、一般の安全性基準および純度基準を満たすべきであることが理解される。

【0207】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、当業者に公知であるように、任意の、および全ての溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤(例えば、抗細菌剤、抗真菌剤)、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤沢剤、甘味剤、香料添加剤、色素、このような物質およびそれらの組合せを含む(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、Mack Printing Company, 1990, 1289-1329頁(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。任意の従来型キャリアが、この活性成分と不適合である範囲を除いて、治療組成物または薬学的組成物におけるその使用を企図される。

【0208】

タンパク質様配列、核酸または抗体は、それが固体形態投与されるのか、液体形態投与されるのか、またはエアロゾル形態で投与されるのか、およびそれが注射のような投与経路のために無菌であることを必要とするかどうかに依存して、異なる型のキャリアを含み得る。本発明は、当業者に公知であるような、エアロゾル、注射、注入、連続注入、標的細胞を直接浸ける局所還流、カテーテルを介して、洗浄を介して、クリームで、脂質組成物(例えば、リポソーム)で、あるいは他の方法または前述の任意の組合せのよって、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、臍内に、直腸に、局所的に(topically)、腫瘍内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、経口で、局所的に(topically)、局部的に(locally)投与され得る(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、Mack Printing Company, 1990(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

【0209】

動物患者に投与される、本発明の組成物の実際の投薬量は、物理的要因および生理学的要因(例えば、体重、状態の重篤度、処置される疾患の型、以前の治療的介入または併用している治療的介入、患者の特発症および投与経路)によって決定され得る。投与を担う医師は、任意の事象において、組成物中の活性成分の濃度および個々の被験体に対する適切

な用量を決定する。

【0210】

特定の実施形態において、薬学的組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化合物を含み得る。他の実施形態において、活性化合物は、例えば、単位重量の約2%～約75%の間、または約25%～約60%の間、およびそれらの中で導き出される任意の範囲を含み得る。他の限定的でない例において、用量はまた、1回の投与あたり約1 μ g/kg/体重、約5 μ g/kg/体重、約10 μ g/kg/体重、約50 μ g/kg/体重、約100 μ g/kg/体重、約200 μ g/kg/体重、約350 μ g/kg/体重、約500 μ g/kg/体重、約1mg/kg/体重、約5mg/kg/体重、約10mg/kg/体重、約50mg/kg/体重、約100mg/kg/体重、約500mg/kg/体重～約1000mg/kg/体重までか、またはそれ以上、およびそれらの中で導き出される任意の範囲を含み得る。本明細書中に列挙される数値から導き出される任意の範囲の限定的でない例において、約5mg/kg/体重～約100mg/kg/体重の範囲、約5 μ g/kg/体重～約500mg/kg/体重の範囲などが、上記の数値に基づいて投与され得る。

【0211】

任意の場合において、この組成物は、1つ以上の成分の酸化を遅らせるために、種々の抗酸化剤を含み得る。さらに微生物の作用の防止が、種々の抗細菌剤および抗真菌剤のような保存剤（パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールまたはそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない）によってもたらされ得る。

【0212】

タンパク質様配列、核酸または抗体は、遊離塩基形態、中性形態または塩形態で組成物中に処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（例えば、タンパク質様組成物の遊離アミノ基と共に形成される酸付加塩）が挙げられか、あるいは酸付加塩は、例えば、塩酸もしくはリン酸のような無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸のような有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第2鉄のような無機塩基；あるいはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンまたはプロカインのような有機塩基から誘導され得る。

【0213】

この組成物が液体形態にある実施形態において、キャリアは、溶媒または分散媒（水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、脂質（例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム）およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって；例えば、液体ポリオールまたは脂質のようなキャリア中の分散による所望の粒子サイズの維持によって；例えば、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤の使用によって；またはこのような方法の組合せによって維持され得る。多くの場合、例えば、糖、塩化ナトリウムまたはそれらの組合せのような等張剤を含むことが好ましい。

【0214】

他の実施形態において、本発明では、点眼、鼻用溶液または鼻用スプレー、エアロゾルまたは吸入剤を使用し得る。このような組成物は、一般的に、標的組織型に適合性であるように設計される。限定的でない例において、鼻用溶液は、たいてい、液滴またはスプレーで鼻腔に投与されるように設計された水溶液である。鼻用溶液は、多くの観点で鼻の分泌液と類似するように調製され、その結果、正常な纖毛作用が維持される。故に、好ましい実施形態において、水性の鼻用溶液は通常、等張性であるか、または約5.5～約6.5のpHに維持するためにわずかに緩衝化される。さらに、所望であれば、眼用調製物において使用されるものと同様の抗菌保存剤、薬物、または適切な薬物安定剤が、処方物中に含有され得る。例えば、種々の市販の鼻用調製物が公知であり、そして抗生物質または抗

10

20

30

40

50

ヒスタミン剤のような薬物を含有する。

【0215】

特定の実施形態において、タンパク質様配列、核酸または抗体は、経口摂取のような経路による投与用に調製される。これらの実施形態において、固体組成物としては、例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸薬、カプセル（例えば、硬い殻で覆われたゼラチンカプセルまたは軟らかい殻で覆われたゼラチンカプセル）、持続放出処方物、口腔組成物、トローチ、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハー、またはそれらの組合せが挙げられ得る。経口組成物は、食事の食物とともに直接取り込まれ得る。経口投与に好ましいキャリアとしては、不活性な希釈剤、吸収可能な食用キャリアまたはそれらの組合せが挙げられる。本発明の他の局面において、経口組成物は、シロップまたはエリキシル剤として調製され得る。シロップまたはエリキシル剤は、例えば、少なくとも1つの活性成分、甘味剤、保存剤、香料添加剤、色素、保存剤、またはそれらの組合せを含み得る。

【0216】

特定の好ましい実施形態において、経口組成物は、1つ以上の結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、香料添加剤、およびそれらの組合せを含有し得る。特定の実施形態において、組成物は、以下のうちの1つ以上を含有し得る：結合剤（例えば、トラガカントゴム、アカシア、コーンスターク、ゼラチン、またはそれらの組合せ）；賦形剤（例えば、リン酸二カルシウム、マンニトール、ラクトース、スターク、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムまたはそれらの組合せ）；崩壊剤（例えば、コーンスターク、ジャガイモデンプン、アルギン酸またはそれらの組合せ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム）；甘味剤（例えば、スクロース、ラクトース、サッカリンまたはそれらの組合せ）；香料添加剤（例えば、ペパーミント、ウインターグリーン油、チェリー香味料、オレンジ香味料など）；あるいは前述のものの組合せ。投薬単位形態がカプセルである場合、それは、上記の型の物質に加えて、脂質キャリアのようなキャリアを含み得る。種々の他の物質がまた、コーティングとしてか、または、そうでなく投薬単位の物理的形態を改変するために存在し得る。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセルは、セラック、糖または両方でコーティングされ得る。

【0217】

投与の他の様式に適切なさらなる処方物としては、坐薬が挙げられる。坐薬は、直腸、陰道または尿道への挿入のための、通常、薬用の、種々の重量および種々の形の固体投薬形態である。挿入後、坐薬は、軟らかくなり、腔体液中に融解または溶解する。一般的に、坐薬のための伝統的なキャリアとしては、例えば、ポリアルキレングリコール、トリグリセリドまたはそれらの組合せが挙げられ得る。特定の実施形態において、坐薬は、例えば、約0.5%～約10%、および好ましくは約1%～約2%の範囲の活性成分を含む混合物から処方され得る。

【0218】

滅菌注射用溶液は、上記に列挙した種々の他の成分と共に、適切な溶媒中に活性成分を所望の量で組み込むことによって、分散物が調製される。一般的に、種々の滅菌された活性成分を基本的な分散媒および/または他の成分を含む滅菌ビヒクル中に組み込むことによって、分散物が調製される。滅菌注射用溶液、懸濁液またはエマルジョンの調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい様式は、真空乾燥技術または凍結乾燥技術（これらは、前もって濾過滅菌された、それらの液体媒体から活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じさせる）である。この液体媒体は、必要であれば、適切に緩衝化されるべきであり、そしてこの液体希釈剤は、注射の前に十分な生理食塩水またはグルコースで、まず等張にされるべきである。直接の注射のための高濃縮組成物の調製がまた企図され、ここで溶媒としてのDMSOの使用が、極めて迅速な浸透（小さい領域に高濃度の活性薬剤を送達する）を生じるように、構想される。

【0219】

この組成物は、製造および保存の条件下で安定であり、そして細菌および真菌のような微生物の混入する行為から保護されなければならない。エンドトキシンの混入が、安全なレ

10

20

30

40

50

ベル（例えば、0.5 ng / mg タンパク質より少ない）で最小限に保たれるべきであることが認識される。

【0220】

特定の実施形態において、注射用組成物の長期の吸収が、組成物中に吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンまたはそれらの組合せ）を使用することによって、もたらされ得る。

【0221】

ペプチドは、免疫療法として患者に投与され得るので、脂質ベースの組成物は、本発明に適切である。これらは、下記にさらに詳細に記載される。

【0222】

特定の実施形態において、本発明は、少なくとも1つのペプチドと結合した1つ以上の脂質を含有する新規の組成物に関する。脂質は、特徴として水に不溶性であり、そして有機溶媒で抽出可能な物質である。脂質としては、例えば、細胞質中に天然に存在する脂肪の液滴を含む物質、ならびに長鎖の脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体（例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒド）を含む、当該分野で周知の化合物のクラスが挙げられる。当然、当業者により脂質として理解される、本明細書中に具体的に記載される化合物以外の化合物もまた、本発明の組成物および方法によって含まれる。

【0223】

脂質は、天然に存在するか、または合成（すなわち、ヒトによって設計または生成される）であり得る。しかし、脂質は、通常、生物学的物質である。生物学的脂質は、当該分野で周知であり、そして例えば、天然脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾリピド、グリコスフィンゴリピド、糖脂質、スルファチド、エーテル連結された脂肪酸およびエステル連結された脂肪酸を有する脂質、および重合可能な脂質、ならびにそれらの組合せが挙げられる。

【0224】

（A. 脂質型）

中性脂肪は、グリセロールおよび脂肪酸を含み得る。代表的なグリセロール3炭素アルコールである。脂肪酸は、一般的に、鎖の末端に酸性部分（例えば、カルボン酸）を有する炭素鎖を含む分子である。脂肪酸の炭素鎖は、任意の長さであり得るが、炭素鎖の長さが、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29から、約30まで、またはより多い炭素原子、およびそれらの中で導き出される任意の範囲であることが好ましい。しかし、好ましい範囲は、脂肪酸の鎖部分において約14炭素原子～約24炭素原子であり、特定の実施形態において、約16炭素原子～約18炭素原子が特に好ましい。特定の実施形態において、脂肪酸炭素鎖は、奇数の炭素原子を含み得るが、鎖内の偶数の炭素原子が、特定の実施形態において好ましくあり得る。その炭素鎖内に単結合のみを含む脂肪酸は、飽和と呼ばれ、一方、その炭素鎖内に少なくとも1つの二重結合を含む脂肪酸は、不飽和と呼ばれる。

【0225】

具体的な脂肪酸としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、ステアリン酸、ラウリン酸、ミチスチン酸、アラキジン酸、パルミトレイン酸、アラキドン酸、リシノール酸、ツベルクロステアリン酸（tuberculosteric acid）、ラクトバシル酸。1つ以上の脂肪酸の酸性基は、グリセロールの1つ以上の水酸基と共有結合される。故に、モノグリセリドは、グリセロールおよび1つの脂肪酸を含み、ジグリセリドは、グリセロールおよび2つの脂肪酸を含み、トリグリセリドは、グリセロールおよび3つの脂肪酸を含む。

【0226】

リン脂質は、一般的に、グリセロール部分またはスフィンゴシン部分のいずれか、両親媒

10

20

30

40

50

性化合物を產生するためのイオン性リン酸基、および1つ以上の脂肪酸を含む。リン脂質の型としては、例えば、ホスホグリセリド（ここで、リン酸基は、ジグリセリドのグリセロールの第1の炭素と連結される）、およびスフィンゴリン脂質（例えば、スフィンゴミエリン）（ここで、リン酸基は、スフィンゴシンアミノアルコールにエステル化される）が挙げられる。スフィンゴリン脂質の別の例は、スルファチド（この分子を両親媒性にするイオン性硫酸基を含む）である。当然、リン脂質は、リン酸基に結合されたアルコールのようなさらなる化学基を含み得る。このようなアルコール基の例としては、セリン、エタノールアミン、コリン、グリセロールおよびイノシトールが挙げられる。故に、特定のホスホグリセリドとしては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールまたはホスファチジルイノシトールが挙げられる。他のリン脂質としては、ホスファチジン酸またはジアセチルリン酸が挙げられる。1つの局面において、ホスファチジルコリンとしては、以下が挙げられる：ジオレオイルホスファチジルコリン（カルジオリピンとしても公知）、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイロホスファチジルコリン、モノミリストイルホスファチジルコリン、モノパルミトイロホスファチジルコリン、モノステアロイルホスファチジルコリン、モノオレオイルホスファチジルコリン、ジブトロイルホスファチジルコリン、ジバレロイルホスファチジルコリン、ジカブロイルホスファチジルコリン、ジヘブタノイルホスファチジルコリン、ジカブリロイルホスファチジルコリンまたはジステアロイルホスファチジルコリン。

10

20

【0227】
糖脂質は、スフィンゴリン脂質に関与するが、リン酸基ではなく、スフィンゴシンの1級水酸基に結合された炭水化物基を含む。セレブロシドと呼ばれる糖脂質の型は、1級水酸基に結合された1つ以上の糖基（例えば、グルコースまたはガラクトース）を含む。糖脂質の別の例は、約2、約3、約4、約5、約6から約7程度までの糖基（1級水酸基に結合された分枝鎖であり得る）を含むガングリオシド（例えば、モノシアロガングリオシド、GM1）である。他の実施形態において、糖脂質は、セラミド（例えば、ラクトシルセラミド）である。

20

【0228】
ステロイドは、フェナントロリンの4員環系誘導体である。ステロイドは、しばしば、細胞、組織および生物（organism）における調節機能を有し、そして例えば、黄体ホルモン（例えば、プロゲステロン）ファミリー、糖質コルチコイド（例えば、コルチゾル）ファミリー、鉱質コルチコイド（例えば、アルドステロン）ファミリー、アンドロゲン（例えば、テストステロン）ファミリーおよびエストロゲン（例えば、エストロン）ファミリーにおけるホルモンおよび関連化合物が挙げられる。コレステロールは、ステロイドの別の例であり、そして一般的に、調節機能よりむしろ構造的機能に働く。ビタミンDは、ステロールの別の例であり、そして腸からのカルシウム吸収において関与する。

30

【0229】
テルペンは、1つ以上の5炭素イソプレン基を含む脂質である。テルペンは、種々の生物学的機能を有し、そして例えば、ビタミンA、補酵素Qおよびカロチノイド（例えば、リコ펜および-カロチン）が挙げられる。

40

【0230】
(B. 荷電脂質組成物および中性脂質組成物)
特定の実施形態において、組成物の脂質成分は、荷電していないか、または主として荷電していない。1つの実施形態において、組成物の脂質成分は、1つ以上の中性脂質を含む。別の局面において、組成物の脂質成分は、特定のリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン）およびコレステロールのように、アニオン性脂質およびカチオン性脂質を実質的に含まなくてもよい。特定の局面において、荷電していない脂質組成物または主として荷電していない脂質組成物の脂質成分は、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%の荷電のない脂質、実質的に荷電していない脂質、および/または正電荷と負電荷とを等しい数有する脂質混合物を含む。

50

【0231】

他の局面において、脂質組成物は、荷電され得る。例えば、荷電リン脂質は、本発明に従って、脂質組成物の調製のために使用され得、そして正味の正電荷または正味の負電荷を有し得る。限定的でない例において、ジアセチルリン酸が、脂質組成物に負電荷を与えるために使用され得、そしてステアリルアミンが、脂質組成物に正電荷を与えるために使用され得る。

【0232】

(C. 脂質の作製)

当業者に公知であるように、脂質は、天然の供給源、商業的供給源から入手され得るか、または化学的に合成され得る。例えば、リン脂質は、天然の供給源（例えば、卵ホスファチジルコリンまたは大豆ホスファチジルコリン、脳ホスファチジン酸、脳ホスファチジルイノシトールまたは植物ホスファチジルイノシトール、心臓カルジオリビンおよび植物ホスファチジルエタノールアミンまたは細菌ホスファチジルエタノールアミン）由来であり得る。別の例において、本発明に従う使用に適切な脂質は、商業的供給源から入手され得る。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「D M P C」）は、Sigma Chemical Co. から入手され得、ジセチルリン酸（「D C P」）は、K & K Laboratories (Plainview, NY) から入手され；コレステロール（「Chol」）は、Calbiochem-Behring から入手され；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「D M P G」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipid, Inc. (Birmingham, Ala.) から入手され得る。特定の実施形態において、クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は、約 -20 で保存され得る。好ましくは、クロロホルムは、唯一の溶媒として使用される。なぜなら、クロロホルムは、メタノールよりも容易に揮発されるからである。

【0233】

(D. 脂質組成物構造)

本発明の好ましい実施形態において、ペプチドが、脂質と結合され得る。脂質と結合されたペプチドは、脂質を含む溶液中に分散され得、脂質で溶解され得、脂質で乳化され得、脂質と混合され得、脂質と組み合わされ得、脂質に共有結合され得、脂質中に懸濁液として含まれ得、ミセルもしくはリポソームに含まれるか、またはミセルもしくはリポソームと複合体化され得、あるいはそうでなく脂質または脂質構造と結合され得る。本発明の組成物と結合される脂質または脂質/キメラポリペプチドは、いかなる特定の構造にも制限されない。例えば、それらは、単に溶液中に分散され得る（おそらくサイズまたは形のいずれにおいても均一でない凝集体を形成する）。別の例において、それらは、ミセルとして、または「崩された」構造で、二重層構造で存在し得る。別の限定的でない例において、リポフェクトアミン (lipofectamine) (Gibco BRL) -キメラポリペプチド複合体またはSuperfect (Qiagen) -キメラポリペプチド複合体がまた、企図される。

【0234】

特定の実施形態において、脂質組成物は、約 1%、約 2%、約 3%、約 4%、約 5%、約 6%、約 7%、約 8%、約 9%、約 10%、約 11%、約 12%、約 13%、約 14%、約 15%、約 16%、約 17%、約 18%、約 19%、約 20%、約 21%、約 22%、約 23%、約 24%、約 25%、約 26%、約 27%、約 28%、約 29%、約 30%、約 31%、約 32%、約 33%、約 34%、約 35%、約 36%、約 37%、約 38%、約 39%、約 40%、約 41%、約 42%、約 43%、約 44%、約 45%、約 46%、約 47%、約 48%、約 49%、約 50%、約 51%、約 52%、約 53%、約 54%、約 55%、約 56%、約 57%、約 58%、約 59%、約 60%、約 61%、約 62%、約 63%、約 64%、約 65%、約 66%、約 67%、約 68%、約 69%、約 70%、約 71%、約 72%、約 73%、約 74%、約 75%、約 76%、約 77%、約 78%、約 79%、約 80%、約 81%、約 82%、約 83%、約 84%、約 85%、約 86%、

10

20

30

40

50

約 87 %、約 88 %、約 89 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 100 %もしくはそれらの中で導き出される任意の範囲の特定の脂質成分、脂質型成分または非脂質成分（例えば、本明細書中に開示されるか、または当業者に公知の薬物、タンパク質、糖、核酸または他の物質）を含み得る。限定的でない実施形態において、脂質組成物は、約 10 %～約 20 %の中性脂質、および約 33 %～約 34 %のセレブロシド、および約 1 %のコレステロールを含み得る。別の限定的でない例において、リポソームは、約 4 %～約 12 %のテルペン（ここで、このミセルの約 1 %は詳細にはリコペンであり、このリポソームの約 3 %～約 11 %は、他のテルペンを含むものとして残す）；および約 10 %～約 35 %のホスファチジルコリンならびに約 1 %の薬物を含み得る。故に、本発明の脂質組成物は、脂質成分、脂質型成分または他の成分の任意のものを、任意の組合せまたは任意のパーセンテージ範囲で含み得ることが企図される。 10

【0235】

(1. 乳濁液)

脂質は、乳濁液中に含まれ得る。脂質乳濁液は、機械的攪拌によってまたは乳化剤として公知の少量のさらなる物質によって、通常は互いに溶け合わない、2種類以上の実質的に永久に不均一な脂質混合物である。脂質乳濁液の調製方法およびさらなる成分の添加方法は、当該分野で周知である（例えば、Modern Pharmaceutics, 1990, 参考として本明細書中に援用される）。 20

【0236】

例えば、1つ以上の脂質を、エタノールもしくはクロロホルムまたは任意の他の適切な有機溶媒に添加し、手または機械技術により攪拌する。次いで、混合物から溶媒をエバボレートして、乾燥した脂質薄膜を残す。この脂質を水性媒体（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）に再懸濁し、乳濁液を生じた。この混合物は、より均一なサイズ分布の乳濁化脂質の同種の人的分配を達成するために、従来の超音波破碎技術を用いて超音波処理され得、さらにミクロ流動化（例えば、Microfluidizer, Newton, Mass. を用いる）を用いて乳化され得、そして／または、Extruder Device (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) を用いて、高圧（例えば、600 psi）下で押し出され得る。 30

【0237】

(2. ミセル)

脂質は、ミセル中に含まれ得る。ミセルは、脂質化合物のクラスターまたは凝集体であり、一般的に脂質一重層の形態であり、そして当業者に公知の任意のミセル生成プロトコル（例えば、Canfield, 1990; El-Gorab, 1973; Shinoda, 1963；およびFendlerら, 1975；それぞれ、参考として本明細書中に援用される）を用いて調製され得る。例えば、代表的に、1種類以上の脂質を有機溶媒中で懸濁物とし、その溶媒をエバボレートし、脂質を水性媒体中に再懸濁し、超音波処理し、次いで遠心分離する。 30

【0238】

(3. リポソーム)

特定の実施形態において、脂質は、リポソームを構成する。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または脂質凝集体の生成によって形成される一重層および多重層の多様な脂質ビヒクルを含む、包括的な用語である。リポソームは、一般的にリン脂質を含む二重層の膜、および一般的に水性組成物からなる内部媒体を持つ小胞構造を有すると、特徴付けられ得る。 40

【0239】

多重層リポソームは、水性媒体によって隔てられる複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質を含む脂質を過剰量の水溶液中に懸濁すると、自然に形成される。この脂質成分は、閉鎖構造の形成前に、自己再配置を起こし、そして水および溶解した溶質を脂質二重層の間に閉じ込める（GhoshおよびBachhawat, 1991）。親油性分子また 50

は親油性領域を有する分子はまた、脂質二重層中に溶解し得るか、または脂質二重層と結合し得る。

【0240】

特定のそれほど好ましいわけではない実施形態において、好ましくは、天然供給源由来のリン脂質（例えば、卵または大豆のホスファチジルコリン、脳ホスファチジン酸、脳または植物のホスファチジルイノシトール、心臓カルジオリビンおよび植物または細菌のホスファチジルエタノールアミン）は、主な（すなわち、全ホスファチド組成物またはリポソームの50%以上を構成する）ホスファチドとしては用いられない。なぜなら、生じるリポソームの不安定性および漏れのためである。

【0241】

特定の実施形態において、脂質および／またはキメラポリペプチドは、例えば、リポソームの水性内部中にカプセル化され得るか、リポソームの脂質二重層内に分散され得るか、リポソームおよびキメラペプチドの両方と連結する結合分子を介してリポソームに連結し得るか、リポソーム中に封入され得るか、リポソームとの複合体を形成し得る、などである。

【0242】

（a. リポソームの作製）

本発明に従って用いられるリポソームは、当業者に公知のように、種々の方法で作製され得る。リン脂質は、水中に分散した場合、水に対する脂質のモル比に依存して、リポソーム以外の多様な構造を形成し得る。低い比率で、リポソームは、好ましい構造である。

【0243】

例えば、リン脂質（A v a n t i P o l a r L i p i d s , A l a b a s t e r , A L ）（例えば、中性リン脂質ジオレオイルホスファチジルコリン（D O P C ））を、t e r t - ブタノールに溶解する。次いで、その脂質をキメラポリペプチド、および／またはその他の成分と混合する。T w e e n 2 0 を、T w e e n 2 0 がの組成物の重量の約5%濃度となるように、脂質混合物に添加する。過剰量のt e r t - ブタノールを、t e r t - ブタノールの容量が、少なくとも95%となるように、この混合物に添加する。この混合物をボルテックスし、ドライアイス／アセトン浴中で凍結し、そして一晩凍結乾燥する。凍結乾燥調製物は-20で保存され、最高3ヶ月使用可能である。必要なときに、凍結乾燥リポソームを0.9%生理食塩水中で再構成する。キメラポリペプチドをカプセル化するためにT w e e n 2 0 を用いて得られる粒子の平均直径は、直径約0.7～約1.0μmである。

【0244】

あるいは、リポソームは、容器（例えば、ナシ型ガラスフラスコ）内の溶媒中に脂質を混合することにより、調製され得る。この容器は、リポソームの予想される懸濁物の容量より10倍大きい容量を有すべきである。ロー・タリー・エバポレーターを用いて、約40、陰圧下で、溶媒を除去する。溶媒は、リポソームの所望の容量に依存して、通常約5分～2時間以内に通常除去される。この組成物は、減圧下のデシケーターにおいて、さらに乾燥され得る。一般的に、この乾燥脂質は、約1週間後に廃棄される。なぜなら、時間と共に変質する傾向にあるからである。

【0245】

乾燥脂質は、全ての脂質フィルムが再懸濁するまで浸透することにより、発熱物質を含まない水中で、約25～50mMのリン脂質濃度にて、水和され得る。次いで、水性リポソームをアリコートに分け、各々をバイアルに入れ、凍結乾燥しそして減圧下でシールし得る。

【0246】

他の代替方法において、リポソームを、他の公知の実験室手順（例えば、B a n g h a m , 1 9 6 5 ; G r e g o r i a d i s , 1 9 7 9 ; D e a m e r およびU s t e r 1 9 8 3 , S z o k a およびP a p a h a d j o p o u l o s , 1 9 7 8 を参照のこと、それぞれ、関連する部分で、参考として本明細書中に援用される）に従って調製し得る。こ

10

20

30

40

50

れらの方法は、それぞれの水性物質封入能力および水性スペースと脂質とのそれとの比率において異なる。

【0247】

上記に記載されるように調製した乾燥脂質または凍結乾燥リポソームは、脱水され得、阻害ペプチドの溶液中で再構成され得、そして適切な溶媒（例えば、D P B S）で適切な濃度まで希釈され得る。次いで、この混合物を、ボルテックスミキサーで激しく攪拌する。カプセル化されないさらなる物質（例えば、ホルモン、薬物、核酸構築物などが挙げられるが、これらに限定されない薬剤）を、29,000×gでの遠心分離によって、そしてリポソームのペレットを洗浄する。洗浄したリポソームを、適切な総リン脂質濃度（例えば、約50～200mM）で再懸濁する。カプセル化されたさらなる物質または活性薬剤の量を、標準的な方法に従って決定し得る。リポソーム調製物中にカプセル化されたさらなる物質または活性薬剤の量の決定の後、リポソームを適切な濃度に希釈し得、そして使用するまで4で保存し得る。リポソームを含む薬学的組成物は、通常、滅菌した、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤（例えば、水または生理食塩水の溶液）を含む。

【0248】

リポソームのサイズは、合成方法に依存して変化する。本発明におけるリポソームは、多様なサイズであり得る。特定の実施形態において、リポソームは小さい（例えば、外部直径が、約100nmより小さい、約90nmより小さい、約80nmより小さい、約70nmより小さい、約60nmより小さい、または約50nmより小さい）。このようなリポソームの調製において、本明細書中に記載される任意のプロトコル、または当業者に公知の任意のプロトコルが使用され得る。リポソーム調製のさらなる非限定的の例は、米国特許第4,728,578号、米国特許第4,728,575号、米国特許第4,737,323号、米国特許第4,533,254号、米国特許第4,162,282号、米国特許第4,310,505号および米国特許第4,921,706号；国際出願PCT/US85/01161およびPCT/US89/05040；英国特許出願GB 2193095 A；Mayerら, 1986；Hopeら, 1985；Mayhewら, 1987；Mayhewら, 1984；Chengら, 1987；ならびにGregoriaidis, 1984（それぞれ、参考として本明細書中に援用される）に記載される。

【0249】

一般的に、水溶液中に懸濁されたリポソームは、脂質二重層分子の1つ以上の同円状層を有する、球状小胞の形状である。各々の層は、式XYによって表される分子の平行な並びからなり、ここでXは親水性部分であり、Yは疎水性部分である。水性懸濁物において、同心円状層は、親水性部分が水相と接し続ける傾向にあるように、そして疎水性領域が自己会合する傾向にあるように配置される。例えば、水相がリポソームの内側および外側の両方に存在する場合、脂質分子は、ラメラとして公知である、XY-YX配置の二重層を形成し得る。脂質の配置は、1を超える脂質分子の親水性部分および疎水性部分が互いに会合し始めると、脂質の凝集体が形成され得る。これらの凝集体のサイズおよび形状は、多くの種々の変動要因（例えば、溶媒の性質および溶液中の他の化合物の存在）に依存する。

【0250】

脂質処方物の生成は、しばしば、以下の後、リポソーム混合物の超音波処理または連続的な押し出しを伴う：（I）逆相エバボレーション、（II）脱水-再水和、（III）界面活性剤透析および（IV）薄膜水和。1つの局面において、特定の実施形態における、意図されるリポソーム調製方法は、脂質の加熱、超音波処理、および孔径が徐々に小さくなるサイズのフィルターまたは膜を通した連続的な押し出しであり、それにより、小さく、安定したリポソーム構造体が形成される。この調製は、構造的に安定でありかつ最大の活性を生じる、適切かつ均一なサイズのものののみの、リポソームのノキメラのポリペプチドまたはリポソームを生成する。そのような技術は、当業者に周知である（例えば、Martin, 1990を参照のこと）。

【0251】

10

20

30

40

50

一旦製造されると、脂質構造体は、循環で毒性（例えば、化学療法剤）であるかまたは不安定（例えば、核酸）である化合物をカプセル化するのに用いることが可能である。リポソームの物理学的特徴は、pH、イオン強度、および／または二価の陽イオンの存在に依存する。リポソームは、イオン物質および／または極性物質に対して、低い透過性を示し得るが、上昇した温度で、透過性が顕著に変化する層転移が起こる。この層転移は、ゲル状態として公知である、ぎっしり詰まった規則正しい構造から、流体状態として公知である、ゆるく詰まったそれほど規則正しくない構造への変化を含む。これは、特徴的な層転移温度で生じ、そして／またはイオン、糖および／または薬物に対する透過性の上昇を生じる。リポソームのカプセル化は、そのような化合物についての、より低い毒性およびより長い血清半減期を生じた（Gabilzonら, 1990）。

10

【0252】

リポソームは細胞と相互作用し、4つの異なる機構を介して、薬剤を送達する：細網内皮性系（の食細胞例えば、マクロファージおよび／または好中球）によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水性の力および／もしくは静電気力、ならびに／または細胞表面成分との特異的な相互作用のいずれかによる、細胞表面への吸着；同時にリポソーム内容物を細胞質に放出する、リポソームの脂質二重層の原形質膜への挿入による、原形質細胞膜との融合；ならびに／またはリポソーム内容物との一切の会合なしでの、リポソーム脂質の細胞膜および／または細胞内膜への移行、ならびに／またはその逆移行。一度に1を超える機構が有効であり得るとはいえ、リポソーム処方物を変化させることによって、どの機構が有効であるかが変化し得る。

20

【0253】

多くの疾患処置は、脂質ベースの遺伝子移入ストラテジーを使用して、従来の治療を増強しているかまたは新規の治療（特に、過剰増殖疾患を処置する治療法を確立している。リポソーム処方物の進歩は、インビボでの遺伝子移入効率を改善しており（Templetonら, 1997）、リポソームがこれらの方法によって調製されることが意図される。核酸送達のための脂質ベースの処方物の代替調製方法が記載される（WO 99/18933）。

20

【0254】

別のリポソーム処方物において、溶媒希釈マイクロキャリア（SDMC）と呼ばれる両親媒性ビヒクルは、脂質ビヒクルの二重層への特定の分子の組み込みを可能にする（米国特許第5,879,703号）。このSDMCは、リポ多糖体、ポリペプチド、核酸などの送達に用いられ得る。もちろん、リポソーム調製の他のあらゆる方法を当業者が使用して、本発明における所望のリポソーム処方物を得ることが可能である。

30

【0255】

（b）標的化リガンド）

標的化リガンドは、複合体の疎水性部分に固着し得るか、または複合体の親水性部分の反応性末端基に結合し得るかの、いずれかである。標的リガンドは、親水性ポリマーの遠位末端上の反応性基への結合を介して、リポソームに結合し得る。好ましい反応性基としては、アミノ基、カルボキシル基、ヒドラジド基、およびチオール基が挙げられる。標的化リガンドの親水性ポリマーへのカップリングは、当業者に公知である有機化学の標準的な方法で実施され得る。特定の実施形態において、標的化リガンドの層濃度は、約0.01%mol～約10%molであり得る。

40

【0256】

標的化リガンドは、標的化領域の特徴的な成分に対して特異的な、任意のリガンドである。好ましい標的化リガンドとしては、タンパク質（例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、抗体フラグメント、またはキメラ抗体、酵素、あるいはホルモン）、あるいは糖（例えば、単糖、オリゴ糖および多糖）が挙げられる（Heathら, 1986を参照のこと）。例えば、ジシアロガングリオシドGD2は、神経外胚葉性起源の腫瘍（例えば、神経芽腫、黒色腫、小細胞肺癌（carcнома）、神経膠腫および特定の肉腫）（Mujoоら, 1986, Schulzら, 1984）において同定された

50

腫瘍抗原である。抗ジシアロガングリオシド G D 2 モノクローナル抗体を含むリポソームは、この腫瘍抗原を発現している細胞に対するリポソームの標的化を助けるために用いられている (Montaldoら, 1999; Paganら, 1999)。別の非限定的な例において、乳癌抗原および婦人科学的癌抗原に特異的な抗体は、参考として本明細書中に援用される米国特許第5,939,277号に記載される。さらなる非限定的な例において、前立腺癌特異抗体は、参考として本明細書中に援用される米国特許第6,107,090号に開示される。従って、本明細書中に記載されるかまたは当業者に公知である抗体は、特定の組織および細胞型を標的化するための本発明の組成物および方法と組合せて用いられ得ることが意図される。本発明の特定の実施形態において、意図されるの標的化リガンドは、インテグリン、プロテオグリカン、糖タンパク質、レセプターまたはトランスポーターと相互作用する。適切なリガンドとしては、標的器官の細胞または局所的病状(例えば、腫瘍)の結果として循環に曝される標的器官の構造に特異的な任意のリガンドが挙げられる。

10

20

30

40

【0257】

本発明の特定の実施形態において、細胞の形質導入を促進するために、標的細胞の形質導入を増やすために、または望ましくない細胞の形質導入を制限するために、抗体または環状ペプチド標的化部分(リガンド)を、脂質複合体と会合させる。そのような方法が、当該分野で公知である。例えば、哺乳類中枢神経系の細胞を特異的に標的とするリポソームが、さらに記載されている(米国特許第5,786,214号、参考として本明細書中に援用される)。このリポソームは、本質的にN-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、コレステロールおよびオレイン酸から構成され、ここで神経膠に特異的なモノクローナル抗体が、リポソームに結合している。モノクローナル抗体または抗体フラグメントは、動物における特定の細胞、組織または器官(例えば、脳、心臓、肺、肝臓など)へと送達を標的化するために使用され得ることが意図される。

【0258】

なおさらに、キメラポリペプチドを、レセプター媒介性送達および/または脂質もしくはリポソームを含む標的化ビヒクルを介して、標的細胞に送達し得る。これらは、標的細胞内で起こるレセプター媒介性エンドサイトーシスによる高分子の選択的取込みを利用する。多様なレセプターの細胞型特異的分布という点からみて、この送達方法は、別の程度の特異性を本発明に加える。

【0259】

従って、本発明の特定の局面において、リガンドは、標的細胞集団で特異的に発現されるレセプターに対応するように選択される。細胞特異的キメラポリペプチド送達および/または標的化ビヒクルは、リポソームと組合せて、特異的な結合リガンドを含み得る。送達されるべきキメラポリペプチドは、リポソーム内に収容され、特異的結合リガンドは、リポソーム膜内に機能的に取込まれる。従って、このリポソームは、標的細胞のレセプターに特異的に結合し、その内容物を細胞に送達する。このような系は、系(例えば、上皮成長因子(EGF)が、EGFレセプターのアップレギュレーションを示す細胞への核酸のレセプター媒介性送達において用いられる系)を用いて機能的であることが示されている。

【0260】

特定の実施形態において、レセプター媒介性送達および/または標的化ビヒクルは、細胞レセプター特異的リガンドおよびペプチドを含む。他には、送達されるペプチドが機能的に結合している細胞レセプター特異的リガンドを含む。例えば、いくつかのリガンドは、レセプター媒介性遺伝子移入に対して用いられており(WuおよびWu, 1987; Wagnerら, 1990; Peralelsら, 1994; Myers, EPO 0273085)、これは、この技術の作動性を確立する。別の例において、別の哺乳動物細胞型に関連する特定の送達について記載されている(WuおよびWu, 1993; 参考として本明細書中に援用される)。

【0261】

50

なおさらなる実施形態において、特定の結合リガンドは、細胞特異的結合を指示する1つ以上の脂質または糖タンパク質を含み得る。例えば、ガラクトース末端アシアロガングリオシド(*asial ganglioside*)であるラクトシルセラミドは、リポソームに組み込まれており、肝細胞によるインスリン遺伝子の取込みの増加が観察されている(Nicola, 1987)。末端ガラクトシル残基を含むアシアロ糖タンパク質である、アシアロフェチュイン(*asialofetuin*)はまた、肝臓に対してリポソームを標的化することが実証されている(SpanjérおよびScherphof, 1983; Hara, 1996)。ポリペチド骨格に結合した場合、糖(マンノシルグルコサミン、フコーシルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン)は、高親和性マンノース(*mannose*)レセプターと結合する(米国特許第5,432,260号,特にその全体が参考として本明細書中に援用される)。本発明の細胞特異的形質転換構築物または組織特異的形質転換構築物が、同様の方法で特異的に標的細胞または標的組織に送達され得ることが意図される。

【0262】

別の例において、ラクトシルセラミド、およびLDLレセプター関連タンパク質(例えば、アポリポタンパク質E3(「アポE」)を標的とするペプチドは、肝臓に対するリポソームの標的化において有用である(SpanjérおよびScherphof, 1983; WO 98/0748)。

【0263】

フォレートおよび葉酸レセプターはまた、細胞標的化に関して有用であると記載されている(米国特許第5,871,727号)。この例において、葉酸ビタミンは、複合体に結合される。葉酸レセプターは、そのリガンドに対して高親和性を有し、肺腫瘍、乳房腫瘍および脳腫瘍を含むいくつかの悪性細胞系株の表面上に過剰発現される。抗葉酸剤(例えば、メトトレキセート)はまた、標的化リガンドとして用いられ得る。トランスフェリン媒介性送達系は、トランスフェリンレセプターを発現する広い範囲の複製中の細胞を標的とする(Gillilandら, 1980)。

【0264】

(c. リポソーム/核酸の組み合わせ)

特定の実施形態において、リポソーム/キメラポリペプチドは、核酸(例えば、オリゴヌクレオチド構築物、ポリヌクレオチド構築物または核酸構築物物(例えば、発現ベクター))を含み得る。真核生物細胞にトランスフェクトさせるべきDNA構築物中で細菌プロモーターを用いる場合、リポソーム内に適切な細菌ポリメラーゼを含むこともまた望ましい。

【0265】

リポソーム/キメラポリペプチド組成物が細胞特異的核酸または組織特異的核酸を含む場合、この技術は、本発明における適用性を有し得ることが考えられる。特定の実施形態において、脂質をベースとする非ウイルス性処方物は、ウイルス遺伝子治療に対する代替物を提供する。多くの細胞培養研究は、脂質をベースとする非ウイルス性遺伝子移入を証明しているとはいえ、脂質ベースの処方物を介した全身性遺伝子送達は限定されている。非ウイルス性の脂質ベースの遺伝子送達の主な制限は、非ウイルス性の送達ビヒクルを含むカチオン性脂質の毒性である。リポソームのインビボでの毒性は、インビトロでの遺伝子移入の結果とインビボでの遺伝子移入の結果との間の矛盾を部分的に説明する。この矛盾するデータの一因となる別の要因は、血清タンパク質の存在下と非存在との、リポソーム安定性の違いである。リポソームと血清タンパク質との間の相互作用は、リポソームの安定的特性に対して劇的な影響を有する(YangおよびHuang, 1997)。カチオン性リポソームは、負に荷電した血清タンパク質を誘引し、そして結合する。血清タンパク質によってコートされたリポソームは、誘導するマクロファージによって溶解されるかまたは吸収されるかのいずれかであり、それらは循環から除去されることになる。最新の、インビボでのリポソームの送達方法は、循環におけるカチオン性脂質と関連する毒性および安定性の問題を避けるために、エアゾール化、皮下注射、皮内注射、腫瘍内注射、

10

20

30

40

50

または頭蓋内注射注射を用いる。リポソームおよび血漿タンパク質の相互作用は、インビでの効率 (F e l g n e r ら, 1987) とインビボでの遺伝子移入 (Z h u ら, 1993; P h i l i p ら, 1993; S o l o d i n ら, 1995; L i u ら, 1995; T h i e r r y ら, 1995; A k s e n t i j e v i c h ら, 1996) との間の相違における大きな要因である。

【0266】

(d. 脂質投与)

患者に投与される脂質組成物 (例えば、リポソーム - キメラポリペプチド) の実際の投与量は、身体的要因および生理学的要因 (例えば、体重、状態の重篤度、患者の突発性疾患および投与の経路により決定され得る。これら考慮すべき事項を、処置の特定の被験者および / または経路のための脂質組成物の投薬量を、容易に決定し得る。

10

【0267】

本発明は、静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜腔内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、膣内に、直腸表面に、腫瘍内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、小嚢内に、粘膜に、心膜内に、口腔に、表面に、局所的に、および / またはエアゾール、注射、注入、継続的な注入、直接またはカテーテルおよび / もしくは洗浄液を介して標的細胞を浸す限局的な灌流を用いて投与され得る。

【0268】

(IX. キット)

本発明の特定の実施形態は、診断用または治療用のキットに関連する。ペプチドは、H P Vを患う患者の中での前癌増殖または癌増殖の発達または再発の可能性を決定するためのキットの形態で用いられ得る。このキットは、T細胞リンパ球増殖の刺激および / またはTヘルパー1サイトカイン産生の増加を決定し得る。多様なキットの構成要因は、適切な容器手段中で保存され得る。一般的に、この容器手段は、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリングまたは他の容器手段を備え、その中には、ペプチド処方物が配置され、好ましくは、適切に配分されている。このキットはまた、滅菌した、薬学的に受容可能な緩衝液または他の希釀剤を含むための、他の第2の容器手段を備え得る。本発明のキットはまた、代表的に、市販のために厳密に閉じ込めた状態でバイアルを含む所望のバイアルを保持するための手段を備え得る (例えば、注射出成型または譜き込み形成されたプラスチック容器)。

20

【0269】

このキットは、サンプルと抗体との間の相互作用を検出するための試薬 (検出試薬) を含み得る。提供された試薬は、放射標識、蛍光標識または酵素学的標識であり得る。このキットは、細胞媒介性免疫応答を検出および / または測定させる抗体と結合し得るかまたは相互作用し得る公知の放射標識薬剤を含み得る。一般的に、これらの方法は、始めに、このようなタンパク質、ペプチドまたは抗体を含む疑いにあるサンプルを得る工程、場合に応じて、免疫複合体の形成を可能にするに効果的な条件下で、本発明に従う抗体またはペプチドとこのサンプルとを接触させる工程、次いで免疫複合体の存在を検出する工程を包含する。

30

【0270】

いくつかの実施形態において、1つ以上のE6ペプチドおよび / またはE7ペプチドは、適切な容器に含まれる。サンプルは、ペプチドと接触させられ得るか、またはインキュベートされ得、次いで、サンプルは、ペプチドに対する細胞媒介性免疫応答についてアッセイされ得る。従って、いくつかの実施形態において、キットは、反応しない構造体を含む。いくつかの実施形態において、反応しない構造体は、プラスチックまたは何らかの他の合成材料であり得る。反応しない構造体は、サンプルを維持する一種の容器の型 (例えば、ウェルを有する容器) であり得る。複数のウェルを有する容器もまた、本発明の一部として含まれる。いくつかの場合において、この構造体は、膜で内側が覆われているか、または結合している。膜で内側を覆われたウェルは、E6ペプチドまたはE7ペプチドとインキュベートされ得、次いで同じ容器を使用して細胞媒介性免疫応答についてアッセイさ

40

50

れ得ることが意図される。これは、細胞媒介性免疫応答を検出するために使用され得る抗体を用いることによってなされ得る。このような抗体としては、T H 1 サイトカインに対する抗体またはT H 2 サイトカインに対する抗体、サイトカインレセプターに対する抗体または細胞媒介性免疫応答の指標であるT細胞上の任意の他のレセプターに対する抗体が挙げられる。検出試薬もまた、キットに含まれ得る。

【0271】

キットの試薬は、液体溶液として、固体支持体に結合してまたは乾燥粉末として提供され得る。好ましくは、試薬が液体溶液中で提供される場合、液体溶液は、水溶液である。好ましくは、提供される試薬が、固体支持体に結合される場合、固体支持体は、クロマトグラフ、複数のウェルを有する試験プレートまたは顕微鏡用スライド媒体であり得る。提供される試薬が乾燥粉末である場合、この粉末は、提供され得る適切な溶媒の添加によって再構成され得る。

【0272】

一般的に、免疫複合体形成の検出は、当該分野において非常に周知であり、そして複数のアプローチの適用を介して達成され得る。例えば、本発明は、ELISA、RIA、免疫プロット（例えば、ドットプロット）、ELISPOT、間接的な免疫蛍光技術などの適用を意図する。一般的に、免疫複合体形成は、標識（例えば、放射標識または酵素タグ（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼなど））の使用を介して検出される。もちろん、二次結合リガンド（例えば、当該分野において公知であるような、二次抗体またはビオチン／アビジンリガンド結合取合せ）の使用を介してさらなる利点を見出しえる。

【0273】

アッセイする目的のために、場合に応じて、細胞媒介性免疫応答の可能性のある細胞を含む疑いのある実質的に任意のサンプルが用いられ得ることを提案する。サンプルとしては、以下が挙げられる：細胞、細胞上清、細胞懸濁液、細胞抽出物、酵素画分、タンパク質抽出物または細胞媒介性免疫応答の可能性のある細胞を含む疑いのある他の無細胞組成物。一般的に言えば、本発明に従うキットは、免疫検出試薬ならびに抗体、ペプチドおよび試薬を含む手段と一緒になった、少なくとも1つのE6ペプチドまたはE7ペプチドおよび細胞媒介性免疫応答と関連するタンパク質様組成物に対して指向される抗体を含む。免疫検出試薬は、代表的に、抗体または抗原と結合した、あるいは二次結合リガンドと結合した標識を含む。例示的なリガンドとしては、結合した標識を有する一次抗体または抗原に対して指向される二次抗体、あるいは結合した標識を有するビオチンリガンドまたはアビジン（またはストレプトアビジン）リガンドが挙げられ得る。もちろん、上記のように、多数の例示的標識は、当該分野で公知であり、そして全てのこのような標識は、本発明と関連して用いられ得る。

【0274】

この容器は、一般的に、抗体、抗原または検出試薬が配置され得、好ましくは適切にアリコートに分けられ得る、バイアルを含む。本発明のキットはまた、代表的に、市販のために厳密に閉じ込められた状態で抗体、抗原および試薬容器を含むための手段を含む。このような容器は、所望のバイアルが保持される射出成形または吹き込み成形されたプラスチック容器を含み得る。

【0275】

1つの実施形態において、診断用キットは、核酸検出方法で、使用するためのプローブまたはプライマーを含む。生物学的サンプル中のペプチドマーカーを検出するために必要な全ての必須の材料および試薬は、キット中で一緒に構築され得る。一般的に、これは、特定のマーカーについて予め選択されたプライマーを含む。増幅のための必要な反応混合物を提供するための、核酸を増幅するのに適切な酵素（様々なポリメラーゼ（RT、Taqなど）を含む）、デオキシヌクレオチドおよび緩衝液もまた含まれ得る。

【0276】

このようなキットは、一般的に、適切な手段において、各個々の試薬および酵素のための

10

20

30

40

50

異なる容器、ならびに各マーカーのプライマー対のための異なる容器を含む。核酸を増幅するための好ましいプライマー対は、配列番号1～19またはその相補体に特異的な配列を増幅するように選択される。

【0277】

別の実施形態において、このようなキットは、配列番号1～19で指定される配列またはその相補体に対応するペプチドについて特異的なハイブリダイゼーションプローブを含む。このようなキットは、一般的に、適切な手段において、各個々の試薬および酵素のための異なる容器、ならびに各ハイブリダイゼーションプローブのための異なる容器を含む。

【0278】

他の実施形態において、本発明は、上記の免疫検出方法で、使用するための免疫検出キットに関する。一般的に、ペプチドはタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドであるので、ペプチドは、好ましくはキットに含まれる。従って、免疫検出キットは、適切な容器手段において、ペプチドおよび必要に応じて免疫検出試薬を含む。

【0279】

このキットの免疫検出試薬は、所定の抗体に会合、または連結した検出可能な標識を含む、様々な形態のうちのいずれか1つを取り得る。二次結合リガンドに会合かまたは連結した検出可能な標識もまた、意図される。例示的な二次リガンドは、一次抗体に対する結合親和性を有する二次抗体である。

【0280】

このキットは、検出アッセイのための標準曲線を作成するために使用され得るように、標識されているかまたは標識されていなかにかかわらず、野生型または変異体のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの適切にアリコートに分けられた組成物をさらに含み得る。このキットは、完全な結合体化形態においてか、中間体の形態において、またはキットの使用者によって結合体化されるべき別個の部分として抗体標識結合体を含み得る。このキットの成分は、水溶性媒体中に、または凍結乾燥された形態で梱包され得る。

【0281】

本発明の治療的キットは、配列番号1～19のペプチドを含むキットである。一般的にこのようなキットは、適切な容器手段において、ポリペプチド、ペプチド、生物学的機能等価物、免疫学的フラグメント、ドメイン、インヒビター、抗体、遺伝子、ポリヌクレオチド、核酸、補体または上記のいずれかを発現するベクターの薬学的に受容可能な処方物を薬学的に受容可能な処方物中に含む。このキットは、单一容器手段を有し得るか、または各化合物のための異なる容器手段を有し得る。

【0282】

キットの成分が、1つ以上の液体溶液中に提供される場合、液体溶液は、水溶液であり、滅菌した水溶液が特に好ましい。ペプチド組成物はまた、注射可能な組成物であるように処方され得る。この場合、容器手段自体はシリンジ、ピペットまたは他の同様の装置であり得、ここから、処方物が身体の感染領域に適用され得るか、動物へと注射され得るか、またはキットの他の成分に適用されて混合されさえし得る。

【0283】

しかし、キットの成分は、乾燥粉末として提供され得る。試薬または成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は、適切な溶媒の添加によって再構築され得る。この溶媒はまた、他の容器手段中に提供され得ることが想定される。

【0284】

このキットの容器手段としては、一般的に、抗体が配置され得る（好ましくは適切にアリコートに分けられ得る）、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたは他の容器手段が挙げられる。ポリペプチドもしくはペプチド、または二次結合リガンドもしくは三次結合リガンド、またはさらなる成分が提供される場合、このキットはまた、一般的に、このリガンドまたは成分が配置され得る、第2の容器、第3の容器または他のさらなる容器を含む。本発明のキットはまた、市販のために厳密に閉じ込められた状態で、代表的に、抗体、抗原および任意の他の試薬容器を含むための手段を含む。こ

10

20

30

40

50

のような容器は、所望のバイアルが維持される、射出成形または吹き込み成形されたプラスチック容器を含み得る。

【0285】

容器の数とも種類とも関係なく、本発明のキットはまた、動物の体内での最終的なペプチドの注射 / 投与または配置を補助するための機器を含み得るか、またはそれらと共に梱包され得る。このような機器は、シリンジ、ピペット、ピンセットまたは任意のこのような医療的認可送達ビヒクルであり得る。

【実施例】

【0286】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために挙げられる。以下に示す実施例に開示された技術は、本発明の実施において十分に機能することが発明者によって発見された技術を示し、従って、その実施のための好ましい形態を構成するとみなされ得る当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示を考慮し、開示される特定の実施形態において多くの変更がなされ得、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様のまたは類似の結果をなお得ることを認識すべきである。

【0287】

(実施例1)

(材料および方法)

(患者)

本発明の実施形態は、The University of Texas M. D. Anderson Cancer Centerのコルポスコピー診療で診察を受けた患者から選択された研究集団を含む。インフォームドコンセントを患者から得て、そして全ての手段を、Institutional Review Boardにより承認されたプロトコルに従って行なった。女性は17歳以上であり、そして免疫障害の病歴がなく妊娠していないかった。女性の4つグループを、これらの研究のために特定した。グループ1は、CINの細胞学的診断も組織学的診断も有さず、そしてHPVネガティブ試験を有する(CIN(-) / HPV(-))6人の女性から構成された。グループ2は、CINの組織学的診断およびHPVポジティブ試験(CIN(+) / HPV(+))有する31人の女性を含んだ。グループ3および4は、研究の少なくとも6ヶ月前にコルポスコピー診療でCINについての切除(ablative)処置または切除(excisional)処置を受けた女性から選択された。グループ3および4の女性は、CIT処置の前に(CIN(+) / HPV(+))であった。しかし、登録時(CIN処置の最少で6ヶ月後であった)に、女性を、疾患状態のみについて評価した。グループ3は、CINの再発の証拠がない(再発(-))22人の女性から構成され、そしてグループ4は、再発CINの組織学的診断を有する(再発(+))10人を含む。HPV陽性を、Virapapp/Viratypeアッセイ(Technologies Inc., Gaithersburg, MD)を使用して決定した。このプロトコルにおいて、HPV RNAのドットプロットハイブリダイゼーションを、頸部スワブで得られた剥離された頸部上皮細胞を用いて行う。このアッセイ方法は、³²P標識化DNAプローブセット(これらは、HPV型: 6/11、16/18および31/33/35を同定する)の使用を含む。細胞を、製造者の指示書に従って単離し、そして処理した。研究の時点で、この試験を、コルポスコピー診療で標準的な看護プログラムの一部として使用した。HPV陽性を、以前に記載されたように(Tingingら、1990; Schiffmannら、1991)、パラフィン包埋生検物質から抽出されたDNAを使用して、PCRによってさらに確認した。PCR分析のために使用したコンセンサスなプライマーは、パピローマウイルスのL1オープンリーディングフレームに由来した(MY11, GCMCAGGGWCATAAYAATGG(配列番号23)およびMY09, CGTCCMARRGGAWACTGATC(配列番号24);ここで、M=A+C、R=A+G、W=A+T、Y=C+T)。HPV-16陽性を、特定のオリゴヌクレオチドプローブ(CATACACCTCCAGCACCTA(配列番号25))を使用して確認した。研究被験体のHPV状態を含む臨床的特徴を

10

20

30

40

50

、表2に列挙する。

【0288】

(表2 研究被験体の特徴)

【0289】

【表2】

特徴	合計	グループ1	グループ2	グループ3	グループ4
患者の数	69	6	31	22	10
年齢の中間値	31	31	31	32	27
年齢の範囲	17-54	17-43	21-50	18-54	20-39
人種					
白人	52 (75.4%)	3 (50%)	26 (83.9%)	15 (68.2%)	8 (80%)
ラテン系 アメリカ人	8 (12.6%)	3 (50%)	1 (3.2%)	4 (18.2%)	0 (0%)
アフリカ系 アメリカ人	8 (12.6%)	0 (0%)	3 (9.7%)	3 (13.6%)	0 (0%)
アジア人	1 (1.4%)	0 (0%)	1 (3.2%)	0 (0%)	0 (0%)
HPV 状態					
ネガティブ	6 (8.7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ポジティブ	63 (91.3%)	0 (0%)	31 (100%)	22 (100%)	10 (100%)
HPV-16	57 (90.5%)	0 (0%)	31 (100%)	17 (77.3%)	9 (90%)
他の HPV 型	6 (9.5%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (22.7%)	1 (10%)
最初の診断 *					
ネガティブ	6 (8.7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CIN1	4 (5.8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (18.2%)	0 (0%)
CIN 2 &3	59 (85.5%)	0 (0%)	31 (100%)	18 (81.8%)	10 (100%)

* 注意：グループ3について、研究への採用時点での診断は、CINについてネガティブであったが、グループ4については、CIN2/3について陽性であった。

【0290】

(ペプチド)

HPV-16のE6腫瘍タンパク質およびE7腫瘍タンパク質に対応するペプチド配列を

50

、文献に記載される公知のT細胞エピトープに関連する両親媒性構造および情報に基づいて選択した。表3は、本発明の研究に使用したペプチドを列挙する。全てのペプチドを、Merrifield固相方法(Merrifield, 1963)を使用して、改変されたVega 250自動ペプチド合成機(Vega Biochemicals, Tucson, AZ)またはHoughten, 1985によって記載される「バッグ」方法のいずれかで、以前に報告されたように作製した(Sarkarら、1995)。多くの実験において、使用したペプチドの純度は、約70~80%であり、そしていくつかの実験において、95%より高い純度を示すペプチドを、同一の結果と共に、使用した。E6ペプチドおよびE7ペプチドに加えて、発明者らは、ネガティブコントロールとしてc-mosプロトオンコジーン由来のペプチド[aa 158-170, STRTPEDSN SLGT(配列番号22)]を使用した。ペプチドストック溶液を、PBS(pH7.0)中で調製し、そしてフィルター滅菌した。

【0291】

(T細胞増殖アッセイ)

ヘパリン処理した血液を、静脈穿刺によって研究参加者から回収した。PBMCを、Ficol 1-Hyque密度勾配(Histopaque-1073; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)で遠心分離によって単離した。PHA、c-mosペプチド、または個々のE6ペプチドおよびE7ペプチドを用いた刺激の後、異なる個体由来のPBMCの増殖応答(表4)を、以前に記載されたように(Neheleら、1996)、³[H]チミジン取りこみアッセイを使用して決定した。簡潔に言うと、各サンプルを、96ウェルマイクロタイプレート中に三連で播種し、そして加湿した5%CO₂霧囲気下で、37にて7日間インキュベートした。最後の16~18時間の間、1μCiの³[H]チミジン(6.7Ci/mmol; ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA)を添加した。この細胞を、³[H]チミジン取りこみを評価するためにフィルターストリップ上に回収した。種々の添加剤で処理した細胞の比放射活性を、培地単独で培養された細胞を用いて得られた1分あたりの計数(cpm)値を減算することによって各場合において計算した。予備実験からのデータは、5μg/mlで、各ペプチドが一貫したレベルの増殖を生じることを示した。個々のE6ペプチドおよびE7ペプチドに対するT細胞増殖応答の有意性(刺激指数[SI]での)は、ペプチドが添加されなかったコントロールよりも、ペプチドに曝露された細胞による³[H]チミジン取りこみの持続した増加として計算された。3.0以上のSI値(これは陽性応答とみなされる)を、増殖応答の有意性および関連する疾患のない状態または疾患再発状態を決定するための全ての統計分析のために使用した。全ての実験において、三連サンプルからのデータを、10%以下の標準誤差に匹敵した。試験された4つの研究グループにおける女性は、誰一人としてコントロールc-mosペプチドに対して特異的な増殖応答を示さなかった(SI < 2.0)。

【0292】

(表3 HPV-16に由来するE6ペプチドおよびE7ペプチドのアミノ酸配列)

【0293】

【表3】

10

20

30

40

ペプチド	残基	配列
E6 ペプチド		
K9L (配列番号 1)	(aa 18-26)	KLPQLCTEL
E10I (配列番号 2)	(aa 25-34)	ELQTTIHDI
C10R (配列番号 3)	(aa 37-46)	CVYCKQQLLR
Q15L (配列番号 4)	(aa 43-57)	QLLRREVYDFAFRDL
V10C (配列番号 5)	(aa 49-58)	VYDFAFRDLC
P9L (配列番号 6)	(aa 66-74)	PYAVCDKCL
P10I (配列番号 7)	(aa 102-111)	PLCDLLIRCI
Q20P (配列番号 8)	(aa 97-116)	QQYNKPLCDLLIRCINCQKP
R16R (配列番号 9)	(aa 131-146)	RWTGRCMSCCRSSLTR
G10S (配列番号 10)	(aa 141-150)	GRCMSCCRSS
E7 ペプチド		
T10Q (配列番号 11)	(aa 7-15)	TLHEYMLELQ
M9T (配列番号 12)	(aa 12-20)	MLDLQPETT
D9L (配列番号 13)	(aa 14-22)	DLQPETTDL
Q19D (配列番号 14)	(aa 44-62)	QAEPDRAHYNIVTFCCCKCD
R9F (配列番号 15)	(aa 49-57)	RAHYNIVTF
R9V (配列番号 16)	(aa 66-74)	RLCVQSTHV
L9V (配列番号 17)	(aa 82-90)	LLMGTLGIV
G10C (配列番号 18)	(aa 85-94)	GTLGIVCPIC
D20C (配列番号 19)	(aa 75-94)	DIRTLEDLLMGTGIVCPIC

10

20

30

40

a a 、 アミノ酸

(サイトカイン分析)

凍結保存した P B M C を、これらのアッセイのために使用した。 P B M C (1 × 1 0 5) を、 9 6 ウエルの丸底プレートの三組みウェルの R P M I - 1 6 4 0 培地 (1 0 % ウシ胎仔血清を含有する) 中で、様々な H P V ペプチドと共に 4 8 時間、 3 7 ℃ にて、インキュベートした。遠心分離後、上清 (1 0 0 μ l) を各ウェルから取り出し、そして別の 9 6 ウエルプレート中で - 7 0 ℃ で保存した。次いで、これらのプレートを解凍し、そして C y t o s c r e e n 免疫アッセイキット (B i o s o u r c e I n t e r n a t i o n a l , C a m a r i l l o , C A) を使用して、製造者の指示書に従って、上清を様々なサイトカイン (I F N - 、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 1 0 および I L - 1 2) についてアッセイした。

【 0 2 9 4 】

(統計学的分析)

患者グループの間での S I 値における差異を、 P e a r s o n χ^2 およびフィッシャーの直接確率検定によって評価した。統計学的アッセイの目的のために、有意な増殖応答を、 3 . 0 以上の S I として定義した。統計学的有意性は、 0 . 0 5 未満の p とした。

【 0 2 9 5 】

(実施例 2)

50

17～54歳（中央値31歳）の範囲の年齢の全部で69人の女性を、この研究に登録した。これらの69人のうちの52人は白人であり、各8人はアフリカ系アメリカ人およびラテンアメリカ人、そして1人はアジア人であった（表2）。これらの女性由来のPBM Cを、HPV-16（表3）のE6オンコタンパク質およびE7オンコタンパク質の抗原性配列に対応する合成ペプチドに対する増殖応答について分析した（図1A）。

【0296】

患者の4つの異なるグループの各々における様々なE6ペプチドおよびE7ペプチドに対して特異的な増殖応答の分析は、グループ3（再発（-））における患者の大部分が、試験した7つ全てのE6ペプチドおよび8つ中7つのE7ペプチドに対してポジティブな応答（S I 3.0）を示すことを明らかにした（図1A）。一方、グループ2（CIN⁺ / HPV⁺）における未処置の患者の31人中5人のみが試験したペプチドのいずれかに応答し、そしてグループ1（CIN⁻ / HPV⁻）および4グループ（再発⁺）においては誰も、試験したペプチドのいずれかに対する応答も示さなかった。これは、図1Bに要約される。

【0297】

グループ3およびグループ4における女性のE6ペプチドおよび/またはE7ペプチドに対する増殖応答と処置後の疾患状態との関係を、表4に示す。グループ4（再発（-））の患者の誰もが、試験したE6ペプチドまたはE7ペプチドに対してどんな応答も示さなかつたが、グループ3における患者の64%が、E6ペプチドに対する有意な増殖応答を有し（p = 0.001）、E7ペプチドの少なくとも1つに対して82%（p < 0.001）およびE6ペプチドまたはE7ペプチドの少なくとも一方に対して86%（p < 0.001）の増殖応答を有することを示した。グループ3とグループ4との間で、一般的なマイトジエン様PHAに対する増殖応答において差異はなく（p = 0.912、データは示さない）、このことは、これらの患者の不活性免疫状態において機能障害がないことを示唆する。これらの結果は、HPV-16のE6オンコタンパク質およびE7オンコタンパク質由来の合成ペプチドに対する増殖応答とCIN処置後の疾患のない状態との関係を、強く示唆する。

【0298】

発明者らは、E6（Q15LおよびV10C）およびE7（Q19DおよびR9F）由来の各2つのペプチドに対する高レベルな増殖応答を同定した。S I値に関して、グループ3およびグループ4における2人の患者由来の、E6オンコタンパク質由来の7つの合成ペプチドおよびHPV-16のE7オンコタンパク質由来の8つの合成ペプチドに対するそれぞれの増殖応答を、図2に示す。これらの4つのペプチドに対する増殖応答の比較は、グループ3とグループ4における女性の間で統計的有意差を示した（表5）。これらのペプチドに対する増殖応答は、グループ4で観察されなかつたが、グループ3において、11人全ての女性は、ペプチドQ15Lに対する応答を示し（p = 0.006）、ペプチドV10Cに対して10人（p = 0.006）、ペプチドQ19Dに対して13人（p = 0.002）、そしてペプチドR9Fに対して10人が応答を示した（p = 0.013）。表3に示されるように、E6ペプチドV10C中の10アミノ酸うちの9アミノ酸が、Q15Lペプチドのアミノ酸と重複する。同様に、E7ペプチドR9Fの9アミノ酸が、Q19Dペプチドのアミノ酸と重複する。これらの4つのペプチドに特異的な増殖応答と一緒に、グループ3（再発（-））において観察された全ての応答（22人中19人の女性）を説明し得る。これらの結果は、HPV特異的細胞性免疫応答に関して、HPV-16オンコタンパク質E6およびE7のQ15LペプチドおよびQ19Dペプチドのアミノ酸配列は、それぞれ免疫優性領域であり得ることを示唆する。

【0299】

発明者らまたは、研究集団のサブサンプルで、これらのペプチドがまた様々なTH1サイトカインおよびTH2サイトカインの生産を誘導するか否かを試験した。グループ3（再発（-））の8人の女性およびグループ4（再発（+））からの6人の女性由来の凍結保存したPBM Cを、インビトロでペプチドQ15LおよびペプチドQ19Dを用いて刺激

10

20

30

40

50

した。刺激されていない培養を調節した後の、培養上清における様々な TH1 サイトカイン (IL-2, IL-12 および IFN-) および TH2 サイトカイン (IL-4 および IL-10) の量を、図 3 に示す。グループ 3 (再発(-)) において 8 人中 7 人 (87.5%) および 8 人中 5 人 (62.5%) の女性由来の PBMC は、Q15L および Q19D の両方に対する応答において、それぞれ IFN- および IL-2 の生産を示した (表 6)。さらに、IL-12 産生は、このグループの 8 人中 3 人の女性由来の PBMC における Q15L に対する応答において観察されたが、IL-12 の Q19D 媒介性産生は 8 人中 6 人の女性において明らかであった。一方、このグループの女性由来の PBMC のどれ 1 つも、ペプチド Q15L またはペプチド Q19D を用いた刺激に対する応答において IL-4 を分泌せず、そして 3 人の女性のみが、これらのペプチドのいずれかに対する応答において IL-10 産生を示した。対照的に、グループ 3 (再発(-)) の女性、グループ 4 (再発(+)) の女性は、IL-10 産生を優勢に示した (Q15L を用いて 6 人中 5 人、Q19D を用いて 6 人中 6 人)。PBMC を試験された 2 つのペプチドのいずれかで刺激した場合、このグループの 6 人中 1 人の女性において、IL-4 産生が、観察された (表 6)。全体としては、これらの結果は、グループ 3 (再発(-)) の患者は TH1 サイトカイン産生 (IL-2, IFN- および IL-12) を優勢に示すが、グループ 4 の女性 (再発(+)) は、HPV ペプチドに対して指向された特異的増殖応答を示さないにもかかわらず、IL-10、TH2 サイトカインの産生を示したことを示した。

10

20

【0300】

(表 4 HPV-16 オンコタンパク質 E6 および / または E7 の全ての合成ペプチドに対する増殖応答と CIN 処置後の疾患状態との関係)

【0301】

【表 4】

増殖応答	グループ3 (疾患なし)	グループ4 (再発)	有意性
E6ペプチド			
Yes ^a	14 (64%)	0	
No ^b	8 (36%)	10 (100%)	p = 0.001
E7ペプチド			
Yes ^a	18 (82%)	0	
No ^b	4 (18%)	10 (100%)	p < 0.001
E6 または E7 のいずれかのペプチド			
Yes ^a	19 (86%)	0	
No ^b	3 (14%)	10 (100%)	p < 0.001

^aSI ≥ 3.0^bSI < 3.0

30

40

(表 5 HPV-16 オンコタンパク質 E6 および / または E7 の特定の合成ペプチドに対する増殖応答と CIN 処置後の疾患状態との関係)

【0302】

【表 5】

増殖応答	グループ 3(疾患なし)(n=22)	グループ 4(再発)(n=10)	有意性
E6ペプチド			
Q15L	Yes ^a No ^b	11 (50%) 11 (50%)	0 10 (100%) P = 0.006
V10C	Yes ^a No ^b	11 (50%) 11 (50%)	0 10 (100%) P = 0.006
E7ペプチド			
Q19D	Yes ^a No ^b	13 (59%) 9 (41%)	0 10 (100%) P = 0.002
R9F	Yes ^a No ^b	10 (46%) 12 (54%)	0 10 (100%) P = 0.013

^aSI ≥ 3.0

20

^bSI < 3.0

(表6 HPV-16^aのE6およびE7オンコタンパク質由来合成ペプチドを用いた刺激に対する応答におけるグループ3およびグループ4の患者由来のPBM Cのサイトカイン生産)

【0303】

【表6】

サイトカイン ^b	グループ3 (n=8)		グループ4 (n=6)	
	Q15L ^c	Q19D ^d	Q15L	Q19D
IFN-γ	7/8	7/8	0/6	0/6
IL-2	5/8	5/8	0/6	0/6
IL-12	3/8	6/8	0/6	1/6
IL-4	0/8	0/8	1/6	1/6
IL-10	3/8	3/8	5/6	6/6

^a ポジティブな患者の数 / 試験した数。

40

【0304】

^b サイトカイン生産の陽性は、pg/ml : IL-2 = 8.7、IFN- = 4.0、IL-12 = 1.0、IL-4 = 2.0 および IL-10 = 5.0 に関してに関する各サイトカインに使用される試験キットの上記の感受性の値に基づく。

【0305】

^c HPV-16のE6オンコタンパク質由来のQ15Lペプチド。

【0306】

^d HPV-16のE7オンコタンパク質由来のQ19Dペプチド。

【0307】

50

本明細書中に開示されそして要求される全ての組成物および方法は、本開示にかんが見て、過度の実験をせすになされ、そして実施され得る。本発明の組成物および方法が好ましい実施形態に関して記載されるが、バリエーションが組成物および方法、ならびに本発明のコンセプト、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される方法の工程または工程の順序に適用され得ることは、当業者に明らかである。より詳細には、化学的および生理学的の両方に関連する特定の試薬が、本明細書中に記載される試薬に置換され得るが、同様または類似の結果が達成されることは明らかである。全てのこののような類似の置換および改変が、添付される特許請求の範囲によって定義されるような本発明の精神、範囲およびコンセプト内であるとみなされることは、当業者に明らかである。

(参考文献)

10

以下の参考文献は、詳細に、本明細書中に参考として援用される。

【0308】

【表7】

米国特許第 3,817,837 号	
米国特許第 3,850,752 号	
米国特許第 3,939,350 号	
米国特許第 3,996,345 号	
米国特許第 4,162,282 号	
米国特許第 4,275,149 号	10
米国特許第 4,277,437 号	
米国特許第 4,310,505 号	
米国特許第 4,533,254 号	
米国特許第 4,683,195 号	
米国特許第 4,683,202 号	
米国特許第 4,728,575 号	
米国特許第 4,728,578 号	
米国特許第 4,737,323 号	20
米国特許第 4,797,368 号	
米国特許第 4,800,159 号	
米国特許第 4,883,750 号	
米国特許第 4,921,706 号	
米国特許第 5,028,592 号	
米国特許第 5,139,941 号	
米国特許第 5,279,721 号	
米国特許第 5,432,260 号	30
米国特許第 5,786,214 号	
米国特許第 5,840,317 号	
米国特許第 5,840,873 号	
米国特許第 5,843,640 号	
米国特許第 5,843,651 号	
米国特許第 5,843,663 号	
米国特許第 5,846,708 号	40

【 0 3 0 9 】

【 表 8 】

米国特許第 5,846,717 号	
米国特許第 5,846,726 号	
米国特許第 5,846,729 号	
米国特許第 5,849,481 号	
米国特許第 5,849,486 号	
米国特許第 5,849,487 号	
米国特許第 5,851,772 号	10
米国特許第 5,853,990 号	
米国特許第 5,853,992 号	
米国特許第 5,853,993 号	
米国特許第 5,856,092 号	
米国特許第 5,861,244 号	
米国特許第 5,863,732 号	
米国特許第 5,863,753 号	20
米国特許第 5,866,331 号	
米国特許第 5,871,727 号	
米国特許第 5,879,703 号	
米国特許第 5,882,654 号	
米国特許第 5,900,481 号	
米国特許第 5,905,024 号	
米国特許第 5,910,407 号	
米国特許第 5,912,124 号	30
米国特許第 5,912,145 号	
米国特許第 5,919,626 号	
米国特許第 5,919,630 号	
米国特許第 5,925,517 号	
米国特許第 5,928,862 号	
米国特許第 5,928,869 号	
米国特許第 5,929,227 号	40
米国特許第 5,932,413 号	
米国特許第 5,935,791 号	
米国特許第 5,939,277 号	
米国特許第 6,107,090 号	

【 0 3 1 0 】

【 表 9 】

米国特許第 6,135,965 号
 米国特許第 6,214,874 号
 米国特許第 6,238,659 号
 米国特許第 6,245,568 号
 米国特許第 6,258,576 号
 欧州特許出願公開番号 320,308
 欧州特許出願公開番号 329,822
 EPO 0273085
 10
 英国出願番号 No. 2202328
 英国出願番号 No. 2193095 A
 PCT 出願番号 No. PCT/US85/01161
 PCT 出願番号 No. PCT/US87/00880
 PCT 出願番号 No. PCT/US89/01025
 PCT 出願番号 No. PCT/US89/05040;
 20
 PCT 出願番号 WO 88/10315
 PCT 出願番号 WO 89/06700
 WO 90/07641
 WO 98/0748
 WO 99/18933

Abbondanzo, *et al.*, Am J Clin Pathol., 93(5):698-702, 1990.

30
 Abe, *et al.*, Neurosci Res., 38(4):325-9, 2000.

Aichele, *et al.*, J Exp Med., 171(5):1815-20, 1990.

Aksentijevich *et al.*, Hum Gene Ther., 7(9):1111-22, 1996.

Allred, *et al.*, Arch Surg. 1990 Jan;125(1):107-13. Review.

Altman *et al.*, Science, 274:94-96, 1996.

Baichwal *et al.*, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: *Gene Transfer*, Kucherlapati, R., ed.,

40
 Bajorin, *et al.*, J Clin Oncol., 6(5):786-92, 1988.

Bangham, *et al.*, J. Mol. Biol., 13:238-252, 1965.

【 0 3 1 1 】

【 表 1 0 】

Barany, *et al.*, "Solid-Phase Peptide Synthesis," *In: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meinhofer, eds., Academic Press, New York, pp. 3-284, 1980.

Bevan, *et al.*, *Nature*, 342(6249):478-9, 1989.

Birner, *et al.*, *Mod. Pathol.*, 14(7):702-9, 2001.

Boussif *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92:7297-7301, 1995.

Brinton, *et al.*, *In: N. Munoz, F.X. Bosch, K.V. Shah, and A. Meheus (eds.), The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus (IARC Scientific Publications, 119)*, pp. 3-23. Lyon: Oxford University Press, 1992.

10

Brown, *et al.*, *Am J Vet Res.*, 51(9):1476-80, 1990.

Canfield *et al.*, *Methods in Enzymology*, 189, 418-422, 1990.

Capaldi, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

Casement, *et al.*, *Virology*, 211(1):261-7, 1995

20

Cason, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 50: 349-355, 1992.

Chang *et al.*, *Hepatology*, 14:134A, 1991.

Chen, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

Cheng, *et al.*, *Investigative Radiology*, vol. 22, pp. 47-55 (1987).

Clark *et al.*, *Human Gene Therapy*, 6:1329-1341.1995

Clave, *et al.*, *Diagn. Mol. Pathol.*, 9(3) 145-150, 2000.

30

Clerici, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 245-250, 1997.

Coffin, *In: Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.

Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.

Crowe, *et al.*, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 3(2):135-45, 1987.

da Costa, *et al.*, *Biocell*, 23(1): 65-72, 1999.

40

De Gruijl, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 77, 2183-2191, 1996.

De Jager, *et al.*, *Semin Nucl Med*. 1993 Apr;23(2):165-79. Review.

Deamer, *et al.*, in *Liposomes* (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (1983), pp. 27-52.

【 0 3 1 2 】

【 表 1 1 】

Deres, *et al.*, *Nature*, 1989 Nov 30;342(6249):561-4.

Doolittle, *et al.*, *Methods Mol Biol*. 1999;109:215-37. Review

el Gorab, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 306(1):58-66, 1973.

Fechheimer *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.

Felgner *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7413-7, 1987.

Feltkamp, *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23: 2242-2249, 1993.

Fendler *et al.*, *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975.

Flotte *et al.*, *Gene Therapy*, 2:29-37, 1995.

Flotte, *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7:349-356, 1992.

Fraley *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

Fraley, *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, 1981

Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.

Frohman, *PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1990.

Fujishima, *et al.*, *Cytometry*, 24(4):382-9, 1996.

Gabizon *et al.*, *Cancer Res.*, 50(19):6371-8, 1990.

Ghosh, *et al.*, In: Wu G. Wu C ed., *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, New York: Marel Dekker, pp. 87-104, 1991.

Gilliland *et al.*, *Cancer Res.*, 40(10):3564-9, 1980.

Gloeckner, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 252(1-2):131-8, 2001.

Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.

Graham, *et al.*, *Virology*, 52:456-467, 1973.

Gregoriadis, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 89(4):1287-1293, 1979.

10

20

30

40

【 0 3 1 3 】

【 表 1 2 】

- Gregoriadis, G., ed., *Liposome Technology*, vol. I, pp. 30-35, 51-65 and 79-107, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1984.
- Grunhaus, *et al.*, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Gulbis, *et al.*, *Hum Pathol.* 1993 Dec;24(12):1271-85. Review.
- Hamsikova, *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 170: 1424-1431, 1994
- Hara *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1278(1):51-8, 1996 10
- Harland, *et al.*, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Heath, *et al.*, *Chem. Phys. Lipids*, 40:347, 1986.
- Hermonat, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Hope *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 55-65, 1985.
- Horwich *et al.* *J. Virol.*, 64:642-650, 1990. 20
- Irie, *et al.*, *Lancet*, 1(8641):786-7, 1989.
- Irie, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(22):8694-8, 1986.
- Jha, *et al.*, *Lancet*, 341: 1116-1118, 1993.
- Kadish, *et al.*, *J. Natl. Cancer. Inst.* 89:1285-1293, 1997.
- Kaplitt *et al.*, *Nature Genetics*, 8:148-154, 1994
- Kast, *et al.*, *Immunol Lett.*, 30(2):229-32, 1991. 30
- Kast, *et al.*, *J. Immunotherapy*, 14: 115-120, 1993.
- Kotin *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:2211-2215, 1990.
- Koutsky, *et al.*, *N Engl J Med.* 327(18):1272-8, 1992
- Kurman, *et al.*, *JAMA*, 271:1866-1869, 1994.
- Kurman, *et al.*, The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag. pp,30-43, 1994. 40
- Kwack, *et al.*, *Mol Cells*, 10(5):575-8, 2000.
- LaFace *et al.*, *Virology*, 162:483-486, 1988.

【 0 3 1 4 】

【 表 1 3 】

- Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60:515-524, 1986.
- Lebkowski, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996, 1988.
- Liu *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1240(2):277-84, 1995.
- Lorenzato *et al.*, *J. Pathol.*, 194(2):171-6, 2001.
- Lorincz, *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 79: 328-337, 1992.
- Lukacher, *et al.*, *J Exp Med.*, 160(3):814-26, 1984.
- Luo *et al.*, *Blood*, 82:suppl. 1:303A, 1994.
- Manning, *et al.*, *Biotechniques*, 6:682, 1988.
- Martin *et al.*, *Nature*, 345(6277):739-743, 1990.
- Mayer *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 858, pp. 161-168, 1986.
- Mayhew *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 775, pp. 169-174, 1984.
- Mayhew *et al.*, *Methods in Enzymology*, vol. 149, pp. 64-77, 1987.
- McCarty *et al.*, *J. Virol.*, 65:2936-2945, 1991.
- McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1988.
- Mitchell, *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.*, 690:153-66, 1993.
- Mitchell, *et al.*, *J Clin Oncol.*, 8(5):856-69, 1990.
- Morrison, *et al.*, *Int J Cancer*, 49(1):6-13, 1991
- Morton, *et al.*, *Ann Surg.*, 216(4):463-82, 1992.
- Morton, *et al.*, *CA Cancer J Clin.*, 46(4):225-44, 1996.
- Munger, *et al.*, *J. Virol.*, 63: 4417-4421, 1989.
- Munoz, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 52: 743-749, 1992.
- Muzyczka, N., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.
- Nakagawa, *et al.*, *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 3: 205-210, 1996.
- Nakagawa, *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 175: 927-931, 1997.
- Nehete *et al.*, *J. Clin. Immunol.*, 16:115-124, 1996.

Nehete, *et al.*, *Cell Immunol.*, 160(2):217-23, 1995.

Nicolas, *et al.*, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 494-513, 1988.

Nicolau *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Ohi *et al.*, *Gene*, 89:279-282, 1990.

Park, *et al.*, *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 18: 171-175, 1992.

10

Parkin, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 84:827-841, 1999.

Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.

Plenum Press, New York, pp. 117-148, 1986.

Poijak, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 37:796-797, 1999.

Potter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

20

Ravindranath, *et al.*, *Int Rev Immunol*, 7(4):303-29, 1991.

Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*., Rodriguez R.L., Denhardt D.T., eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 467-492, 1988.

Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Rosenberg, *et al.*, *N Engl J Med.*, 319(25):1676-80, 1988.

Rosser, *et al.*, *J Immunol.*, 135(5):3289-97, 1985.

30

Roux *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.

Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Harbor, N.Y., 1989.

Samulski *et al.*, *EMBO J.*, 10:3941-3950, 1991.

Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 63:3822-3828, 1989.

Sarkar, *et al.*, *Viral Immunol.*, 8: 165-174, 1995.

40

Sastry, *et al.*, *Vaccine*., 12(14):1281-7, 1994.

Sastry, *et al.*, *Virology*, 188: 502-509, 1992.

【 0 3 1 6 】

【 表 1 5 】

Seedorf, *et al.*, *EMBO J.*, 6: 139-144, 1987.

Shelling, *et al.*, *Gene Therapy*, 1:165-169, 1994.

Shepherd, *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 73: 1269-1274, 1992.

Shinoda *et al.*, *Colloidal Surfactant*, Academic Press, especially "The Formation of Micelles", Ch. 1, 1-96, 1963.

Solodin *et al.*, *Biochemistry*, 34(41):13537-44, 1995.

10

Spanjer *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 734(1):40-7, 1983.

Stauss, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7871-7875, 1992.

Strang, *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 71: 423-431, 1990.

Stratford-Perricaudet, *et al.*, In: *Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenauer and M. Boiron, eds., John Libbey Eurotext, France, p. 51-61, 1991.

Szoka, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75:4194-4198, 1978.

20

Tam, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.

Templeton *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(7):647-52, 1997.

Thierry *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(21):9742-6, 1995.

Tindle, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5887-5891, 1991.

Tobery, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 254(1-2):59-66, 2001.

Tooze, J., ed., *Molecular Biology of DNA Tumor Viruses*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1991.

30

Townsend, *et al.*, *Cell*, 44:949-968, 1986.

Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.

Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:32581-3260, 1985.

Tsukui, *et al.*, *Cancer Res.*, 56: 3967-3974, 1996.

Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

40

Unanue, *et al.*, *FASEB J.*, 13:2496-502, 1989.

Von Knebel Doeberitz, *et al.*, *Cancer Res.*, 48: 3780-3786, 1988.

【 0 3 1 7 】

【 表 1 6 】

Wagner *et al.*, *Mol. Cell* 40: 281-286, 1999.

Wallace, *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9:879, 1981

Walsh *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:7257-7261, 1994.

Wei *et al.*, *Gene Therapy*, 1:261-268, 1994.

Wettstein, *et al.*, In: H. Pfister (ed.), *Papillomaviruses and Human Cancer*, pp. 145. Florida: CRC Press, 1990.

Wu, *et al.*, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.

Wu, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.

Yang *et al.*, *J. Virol.*, 68:4847-4856, 1994.

Yoder *et al.*, *Blood*, 82:suppl. 1:347A, 1994.

Zhou *et al.*, *Exp. Hematol. (NY)*, 21:928-933, 1993.

Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:1867-1875, 1994.

Zhu *et al.*, *Chin J Biotechnol*, 9(4):257-61, 1993.

Zur Hausen, *et al.*, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 186:131-156, 1994.

10

20

40

40

50

【図面の簡単な説明】

【0318】

以下の図は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに実証するため 30 に含まれる。本発明は、本明細書中にある特定の実施形態の詳細な記載と組み合わせて、これらの図の1つ以上を参照することによってよりよく理解され得る。

【図1A】4つの異なる研究群中の女性からのPBM Cによる、異なるE6およびE7の合成ペプチドに対する増殖応答。1群中の女性は、正常(CIN(-)/HPV(-)、n=6)であり、2群中はHPV関連CIN(CIN(+) / HPV(+)、n=31)であることが新たに診断され、3群は疾患なしの処置後(Recur(-)、n=22)であり、そして4群は疾患の再発を有した(Recur(+)、n=10)。4つの異なる群中の女性からのPBM Cを、HPV-16のE6癌タンパク質またはE7癌タンパク質由来のペプチドに対する増殖応答について試験した。A. 各々のペプチドに対して試験された、各々の患者についての、培地コントロールに対するペプチド処理されたサンプル中の³[H]チミジン取り込みの倍数増加として計算された刺激指標(SI)値を示した。

【図1B】4つの異なる研究群中の女性からのPBM Cによる、異なるE6およびE7の合成ペプチドに対する増殖応答。1群中の女性は、正常(CIN(-)/HPV(-)、n=6)であり、2群中はHPV関連CIN(CIN(+) / HPV(+)、n=31)であることが新たに診断され、3群は疾患なしの処置後(Recur(-)、n=22)であり、そして4群は疾患の再発を有した(Recur(+)、n=10)。4つの異なる群中の女性からのPBM Cを、HPV-16のE6癌タンパク質またはE7癌タンパク質由来のペプチドに対する増殖応答について試験した。B. 各々の群による、E6ペプチド、E7ペプチド、または両方のペプチドに対するポジティブな応答の概要。群の数を×

軸に示し、一方、ポジティブな応答のパーセントをy軸に示す。

【図2】図2 A ~ D。HPV-16のE6癌タンパク質またはE7癌タンパク質由来の合成ペプチドに対する、群3(Recur⁽⁻⁾)および群4(Recur⁽⁺⁾)の患者由来のPBM Cの増殖応答。コントロールペプチド(コントロール)、HPV16のE6癌タンパク質またはE7癌タンパク質それぞれ由来のペプチド7およびペプチド8の各々に対する増殖応答について、これらの群中の女性由来のPBM Cを試験した。群3(パネルAおよびB)ならびに群4(パネルCおよびD)からの2人の患者各々由来のSI値を示す代表的なデータを示す。

【図3】選択されたE6ペプチドおよびE7ペプチドでの刺激に応答した群3中の女性由来のPBM CによるTH1サイトカインの产生。群3(Recur⁽⁻⁾)および群4(Recur⁽⁺⁾)中の女性由来のPBM Cを、E6ペプチドQ15LおよびE7ペプチドQ19Dの存在下で2日間培養し、そして各場合の上清の流体を、ELISAによって、種々のTH1サイトカイン(IL-2、IFN- γ 、IL-12)およびTH2サイトカイン(IL-4、IL-10)の存在について分析した。群3および群4由来の試験された患者の各々について、產生された各々のサイトカインの量を、コントロール培地に対して調整した後に、示した。

10

【図1A】

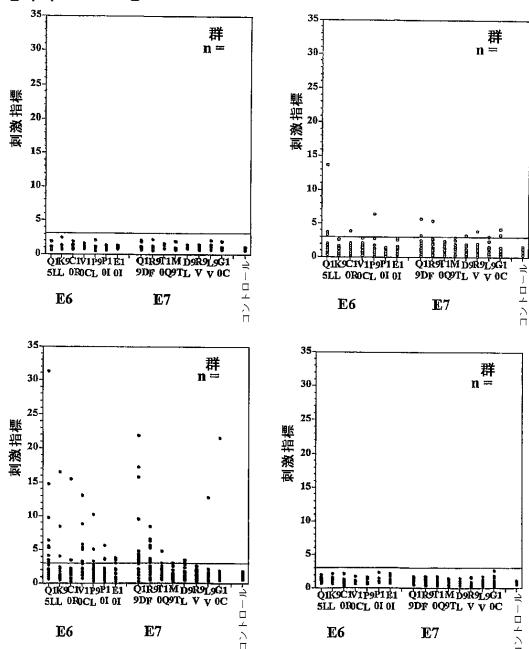


FIG. 1 A

【図1B】

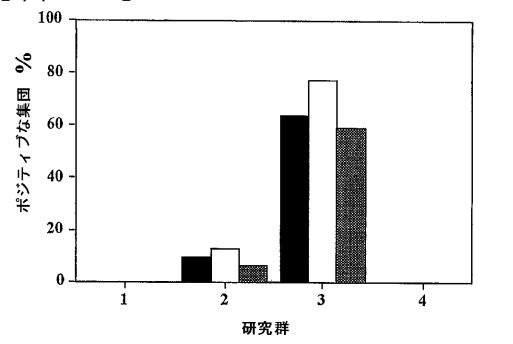


FIG. 1 B

【図2】

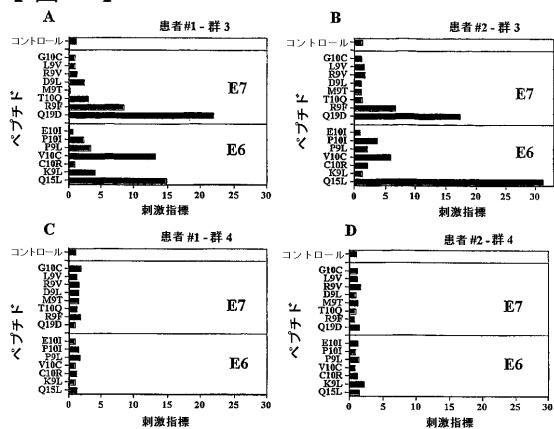


FIG. 2

【図3】

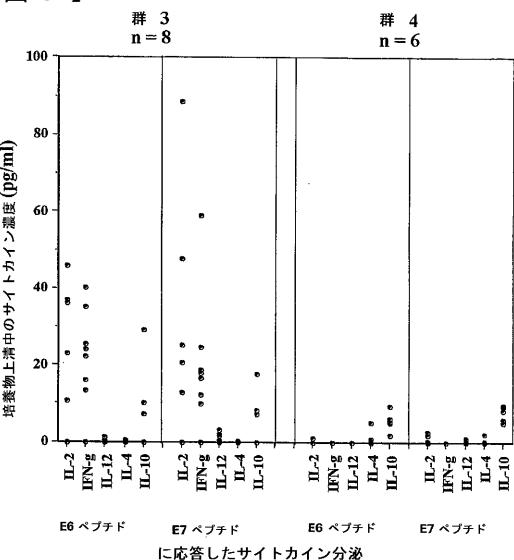


FIG. 3

【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
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/008649 A1(51) International Patent Classification⁵: C12Q 1/70, C07K 1/100, C12N 7/00, A61K 39/395

(21) International Application Number: PCT/US02/23198

(22) International Filing Date: 19 July 2002 (19.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/306,809 20 July 2001 (20.07.2001) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:

US 60/306,809 (CON) Filed on 20 July 2001 (20.07.2001)

(71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SASTRY, K., Jagannatha [US/US]; 400 Mamalu Drive, Bastrop, TX 78602 (US); TORTOLERO-LUNA, Guillermo [—/US]; 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX 77030 (US); FOLLEN, Michele [US/US]; 907 Kirby, Houston, TX 77017 (US).

(74) Agent: SHISHIMA, Gina, N.; Fulbright & Jaworski LLP, Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, H, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, 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, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BJ, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:

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

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



WO 03/008649 A1

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO HPV-ASSOCIATED PRE-CANCEROUS AND CANCEROUS GROWTHS, INCLUDING CIN

(57) Abstract: The present invention concerns the use of L6 and/or L7 peptides from human papilloma virus (HPV) to evaluate a cell-mediated response in a patient infected with HPV to determine the prognosis for that patient with respect to the development or recurrence of pre-cancerous or cancerous growths, including cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

WO 03/008649

PCT/US02/23198

DESCRIPTION**METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO HPV-ASSOCIATED
PRE-CANCEROUS AND CANCEROUS GROWTHS, INCLUDING CIN****BACKGROUND OF THE INVENTION**

5

This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/306,809 filed on July 20, 2001, which is hereby incorporated by reference in its entirety. The U.S. government may own rights in the present invention pursuant to grant number CA65561 and CA77378 from the National Cancer Institute and grant 10 number CA 16672 from the National Institutes of Health. . .

1. Field of the Invention

15 The present invention relates generally to the fields of immunology, virology, and oncology. More particularly, it concerns diagnostic and therapeutic methods related to the development and recurrence of pre-cancerous and cancerous growths or lesions, including cervical intraepithelial neoplasia (CIN), caused by human papilloma virus (HPV).

20 2. Description of Related Art

Cervical cancer is the second most common malignancy in women worldwide, accounting for 15% of all cancers diagnosed in women (Parkin *et al.*, 1993). In the United States, cervical cancer is one of the most common neoplasm of the female genital tract. Laboratory and epidemiological research has focused on the etiological 25 role of some types of human papilloma virus (HPV) in the pathogenesis of cervical neoplasia (Brinton, 1992; Munoz *et al.*, 1992). Overall, HPV DNA has been detected in more than 79% of specimens of women with definite cervical disease. The most prevalent HPV type is HPV 16, which is detected in high-grade squamous intraepithelial lesions and cancer (Lörincz *et al.*, 1992). Results from epidemiological 30 studies support an association between cervical neoplasia and HPV, which is markedly stronger with HPV type 16 (Morrison *et al.*, 1991; Koutsyk *et al.*, 1992; and Munoz *et*

al., 1992). Neoplasia is characterized by abnormal growth of cells, which often results in the invasion of normal tissues, *e.g.*, primary tumors or the spread to distant organs, *e.g.*, metastasis.

5 The E6 and E7 genes of HPV 16 are frequently co-expressed and are most abundant viral transcripts in biopsies from HPV 16 positive cervical carcinoma (Wettstein, 1990; Seedorf *et al.*, 1987). There is a strong evidence that co-expression of both E6 and E7 open reading frames is necessary and sufficient for efficient malignant transformation of a variety of mammalian cells (Munger *et al.*, 1989). Furthermore, 10 continued expression of the E6 and E7 regions of the viral genome appears to be required to maintain the malignant phenotype (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1988).

While some HPV infected patients develop cervical neoplasia, others do not. Also there is a high rate of spontaneous regression observed indicating the role of host 15 immune responses. The induction of a cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response constitutes a significant defense mechanism against viral infections; occasionally, a virus-specific CTL response can render full protection without a concomitant antibody response (Sastry *et al.*, 1992; Bevan, 1989; Lukacher, 1984). Based on reports in the literature describing a relation between increased prevalence of anti-HPV antibodies, in 20 particular those directed against the E 7 oncoprotein, with severity of the cervical disease (Cason *et al.*, 1992; Hamsikova *et al.*, 1994; Jha *et al.*, 1993), it has been suggested that HPV-specific humoral response may not play a protective role against HPV-associated cervical neoplasia (Nakagawa *et al.*, 1996). On the other hand, it has been reported that individuals with defects in CMI have an increased prevalence of 25 HPV-associated cervical neoplasia, indicating that T cells participate in the control of HPV-associated neoplasia in humans (Nakagawa *et al.*, 1996; Tsukui *et al.*; 1996; Feltkamp *et al.*, 1993 and Clerici *et al.*, 1997). Decreased IL-2 production and proliferative responses to mitogens such as PHA and concanavalin-A have been observed in patients with invasive cervical carcinoma (Park *et al.*, 1992). A number of 30 *in vitro* and *in vivo* strategies have been described to identify peptides from HPV-16 E6, E7, and L1 proteins that induce T-cell activity in mice and humans (Feltkamp *et al.*, 1993; Strang *et al.*, 1990; Tindel *et al.*, 1991; Shepherd *et al.*, 1992; Stauss *et al.*, 1992; Kast *et al.*, 1993). Typically, induction of virus-specific CTLs can be effected by

WO 03/008649

PCT/US02/23198

3

infection with a virus or recombinant virus that expresses a viral gene product. The viral gene product is processed and presented as a peptide on the surface of infected cells in association with an MHC class I molecule for recognition by the CTL (Unanue, 1989).

5

Additionally, research efforts have concentrated on identifying and characterizing HIV peptides that elicit a viral-specific CTL response. Townsend *et al.* illustrated the concept of using T-cell epitopes in proteins as vaccine candidates when their group demonstrated the use of short synthetic peptides from influenza nucleoprotein as epitopes for CTL responses (Townsend *et al.*, 1986). The inventors and others have reported using synthetic peptides to generate virus-specific CTLs *in vivo* (Kast *et al.*, 1991; Aichele *et al.*, 1990; Deres *et al.*, 1989; Sastry *et al.*, 1992; Sastry *et al.*, 1994; Casement *et al.*, 1995) against influenza, lymphocytic choriomeningitis, Sendai virus and HIV.

15

Over 90% of cervical carcinomas express human papillomavirus (HPV) E6 and E7 proteins. These unique antigens are ideal targets for the development of cytotoxic T-lymphocytes (CTL) for antitumor immunotherapy. Synthetic peptides have been identified corresponding with the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 that were effective in including HPV-specific CTL responses *in vivo* (Sarkar *et al.*, 1995). Recently, Nakagawa *et al.* reported that systemic T-cell proliferative responses and CTL responses to HPV-16 peptides and proteins were detectable in many virgin as well as sexually active women without cervical lesions but not in those with active disease (Nakagawa *et al.*, 1997). Similarly, Tsukui *et al.* reported that TH lymphocyte response, particularly IL-2 production, to HPV antigens was greater among cytologically normal women than in women with different degrees of progressive cervical neoplasia (Tsukui *et al.*, 1996). Also, Clerici *et al.* observed that production of TH1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) which potentially enhances CMI, to be defective in women with extensive HPV infection and that progression to CIN to be associated with a shift from TH1 to TH2 cytokine production (Clerici *et al.*, 1997). Employing a long term *in vitro* stimulation protocol for determining the TH activity Kadish *et al.* reported that lymphoproliferative responses to specific HPV peptides were associated with HPV

clearance and regression to CIN (Kadish *et al.*, 1997). On the other hand, de Gruijil *et al.* reported that T-cell proliferative responses to HPV16 E7 peptides correlated with persistence of HPV infection, but antigen-specific IL-2 production was associated with both virus clearance as well as progression of cervical lesions (de Gruijil *et al.*, 1996).

5

A common clinical management strategy for CIN patients includes excisional or ablative treatment. However, follow-up studies indicate that a significant number of patients experience recurrence. At present no clear understanding exists regarding the development of pre-cancerous or cancerous growths, their recurrence, or disease-free 10 status in the patients who have undergone ablative or excisional treatment for CIN. Better and improved strategies for effective diagnostics of HPV-associated pre-cancerous or cancerous growths and lesions is needed.

SUMMARY OF THE INVENTION

15

The present invention is based on the observation that a cell-mediated immune (CMI) response by patients infected with human papilloma virus (HPV) against E6 and/or E7 peptides of HPV is correlated with their prognosis. A cell-mediated immune response is indicative of a reduced risk for the development of pre-cancerous or 20 cancerous growths in the genitourinary tract, particularly the cervix, than the risk for a patient who does not exhibit a cell-mediated immune response; in other words, a patient who exhibits a positive cell-mediated immune response to particular E6 and/or E7 peptides has a good prognosis with respect to the development of HPV-associated pre-cancerous or cancerous growths. Alternatively, a patient who exhibits no or a low CMI 25 response to an E6 or E7 proteinaceous compound of HPV has a greater risk of a bad prognosis with respect to physiological effects as a result of HPV infection. Thus, the present invention encompasses compositions and methods for identifying patients at risk for HPV-related hyperproliferative conditions, including warts, CIN, and malignant growths or other pre-cancerous or cancerous growths; the invention is particularly 30 suited to evaluating patients for recurrence of a hyperproliferative condition. As used herein, the terms "growth" and "lesion" are used interchangeably. Also, the term "pre-cancerous or cancerous growth" refers to HPV-associated growths. In addition to pre-

WO 03/008649

PCT/US02/23198

5

cancerous or cancerous growths or lesions on the cervix, such growths or lesions may occur throughout the urogenital tract and they include perineal, vulvar and penile growths or lesions. Patients for whom the methods may be applied include any mammals capable of HPV infection; in some embodiments, the patient is specifically 5 contemplated to be a human, either male or female.

In some embodiments the present invention encompasses methods for determining the possibility of the development or recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth in a patient infected with human papilloma virus. In some cases, the 10 patient has been treated for the growth. The methods involve employing the following steps: obtaining a sample from the patient; incubating the sample with at least one E6 or E7 peptide of HPV; and assaying the sample for a cell-mediated immune (CMI) response against the peptide. A cell-mediated immune response against an E6 or E7 peptide, or a combination thereof indicates a reduced risk of recurrence as compared to 15 a person who does not exhibit such a response. A pre-cancerous growth frequently observed with the development of cervical cancer is cervical intraepithelial neoplasia or CIN. In some embodiments of the invention, the method of the invention is used with respect to patients who have or had CIN of any stage (CIN 1, CIN 2, or CIN 3 or squamous intraepithelial lesions (SIL), low grade-SIL (L-SIL) and high grade SIL (H-SIL)). Furthermore, in other embodiments, the methods may be implemented with 20 patients who have or had more severe stages of hyperproliferative growth than CIN, such as a malignancy or cancerous growth. As used in this application, the term "recurrence" refers to the appearance of a pre-cancerous or cancerous growth, or a re-appearance of the first growth, or evidence thereof, after a first pre-cancerous or 25 cancerous growth was reduced, eliminated, or treated. As used herein, the term "incubating" refers to exposing or contacting the sample with a composition that includes a peptide.

The claimed methods have applicability to human papilloma virus infections. 30 The human papilloma virus may be a high grade or high risk type, such as HPV 16, 18, 31, 45, 56, or 58. In some embodiments, the human papilloma virus is HPV 16. In other embodiments, the human papilloma virus is a intermediate risk type, such as HPV 33, 35, 37, 51, 52, 59, 66, or 68. In still further embodiments the HPV is a low risk or

low grade type associated with warts, such as type 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 55, 62, or 66.

- The sample will include cells that give rise to a cell-mediated immune response.
- 5 In some embodiments, the sample is a blood sample or serum sample, while in other embodiments, the sample is obtained by lavage, smear, or swab of the area suspected of infection or known to be infected, such as in the vaginal, cervical, or penile area. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) can render a cell-mediated immune response and any sample containing such cells can also be employed in methods of the
- 10 invention. In some embodiments, it is contemplated that cells from a sample are incubated in media after they have been obtained but before they are assayed. It is contemplated that the sample may be incubated up to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 or more hours and up to 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7 days, and up to 1, 2, 3, 4, or 5 or more weeks and up to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 months in media prior to assaying.
- 15 It is also contemplated that the cells may be incubated in media and/or stored under conditions of sub-zero degrees centigrade prior to assaying. The cells themselves or the cell culture supernatant (media, not intact cells) may be used for subsequent assays for a cell-mediated immune response. In some embodiments, the cells are incubated between 2 and 8 hours—in some cases for 6 hours—in media prior to performing intracellular cytokine analysis by flow cytometry. In other embodiments, the cells are incubated in media between 2 days and 20 days—in some cases 15 days—in media prior to performing chromium release assays to determine cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity.
- 20
- 25 Methods of the present invention involve determining whether a patient exhibits a cell-mediated immune response against HPV peptides. In several embodiments, the peptides are E6 or E7 peptides meaning they have an amino acid sequence that is at least 90% identical over its length to a contiguous amino acid sequence in an E6 or E7 polypeptide. Specifically contemplated is the use of a peptide comprising 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, or more contiguous amino acids of SEQ ID NO:19 (E6 from HPV 16) or SEQ ID NO:20 (E7 from HPV 16). It is contemplated that in some embodiments that peptides of only one sequence
- 30

are tested—for example, an E6 peptide or in another example, an E7 peptide—while in other embodiments, multiple sequences may be tested. In one embodiment, an E6 and an E7 peptide are employed in methods of the invention. In other embodiments, at least two E6 peptides (referring to at least two different E6 sequences), at least two E7 peptides (referring to at least two different E7 sequences), or both may be implemented. It is contemplated that 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 or more E6 or E7 peptides may be employed, as well as any combination of E6 or E7 peptides thereof. In still further embodiments the E6 peptide is K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, P10I, Q20P, R16R, or G10S, or a combination thereof. In specific embodiments, the following E6 peptides are employed individually or as a cocktail that includes one or more of the following peptides: K9L, E10I, C10R, Q15L, or V10C. While in other embodiments, an E7 peptide is T10Q, M9T, D9I, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C, or D20C, or a combination thereof. In certain embodiments, the following E7 peptides are employed individually or as a cocktail Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C. Furthermore, a cocktail that includes at least one E6 peptide and one E7 peptide from the following is contemplated: K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, Q19D, R9F, R9V, L9V, or G10C. In some embodiments, it is specifically contemplated that one or more peptides in the cocktails described above be excluded. It is also specifically contemplated that compositions discussed with respect to diagnostic methods of the invention may also be applied to preventative or therapeutic methods of the invention.

Methods of the invention concern a cell-mediated immune (CMI) response against human papilloma virus. There are different ways of identifying and evaluating a cell-mediated immune response (distinguished from a serum or antibody-mediated immune response). In one embodiment of the invention, T cell proliferation is measured. T-cell proliferation may be assayed by measuring incorporation of tritiated thymidine. A proliferative response of equal to or greater than 2.0 using an SI scale to at least one E6 or E7 peptide is considered positive and is indicative a patient with a reduced risk of recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth or lesion. A proliferative response of equal to or greater than 3.0 using an SI scale to at least one E6 or E7 peptide is indicative of a cell mediated response, and thus, identifies a patient with a improved prognosis with respect to the development of pre-cancerous or cancerous growths. Alternatively, a patient who has an SI of less than 2.0, including an

SI of zero, would be considered to have a low or no cell-mediated immune response to the E6 or E7 peptide(s) and would be considered as having an increased risk for the development or recurrence of pre-cancerous or cancerous growths.

5 A cell mediated response can also be measured using non-radioactive means such as an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) dye or reduction assay, which is a colorimetric assay for live cells (T cell proliferation) (daCosta *et al.*, 1999), or the alamar Blue assay, another colorimetric assay that measures IL-2-responding cells (Gloeckner *et al.*, 2001; Kwack *et al.*, 2000).

10

In another embodiment of the invention, assaying for a cell-mediated immune response involves measuring TH1 or TH2 cytokine amounts. Even if a patient does not exhibit a CMI response by a T-cell proliferation assay, an increased risk of recurrence may be associated with the production of a TH2 cytokine, such as IL-10. A reduced 15 risk of recurrence is observed with a patient who exhibits production of a TH1 cytokine such as IFN- γ and IL-2 in response to an E6 and/or E7 peptide. In some examples, the amount of a TH1 cytokine is measured, such as IL-2, interferon (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , or TNF- β , IL-3, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, or IL-18. In a specific embodiment, the amount of IL-18 is measured. In additional examples, the amount of a 20 TH2 cytokine is measured, such as IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13 or IL-14.

Measuring a CMI response may be accomplished by an immunoassay, such as 25 ELISA or a radioimmunoassay, or by flow-cytometry. In embodiments of the invention, a sample may be assayed more than once either as duplicate samples or by different assays. In some embodiments, more than one sample is obtained from the patient. The multiple samples may be the same type, for example, multiple blood samples, or they may be different types, for example, a blood sample and a vaginal swab.

30

Patients for whom the methods of the invention have applicability include patients not yet diagnosed with HPV but suspected of having HPV, patients once infected with HPV but no longer showing signs of HPV infection, patients known to be

infected with HPV, patients with a pre-cancerous or cancerous growth on or around the cervix or other genitourinary area who may or may not know she is infected with HPV, patients whose pre-cancerous or cancerous growth(s) have been treated successfully or unsuccessfully, and patients who have had at least one recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth(s). A pre-cancerous or cancerous growth or lesion refers to a hyperproliferative cells whose growth is not controlled, and includes pre-neoplasias, such as CIN and neoplasias—benign and malignant—involved squamous epithelial cells and atypical squamous cells of uncertain significance (ASCUS). It is contemplated that a patient have more than one growth or lesion. Treatment for any growths may involve surgery—ablative or excisional—as well as conventional cancer therapy and treatment against HPV. Such treatments include chemotherapy, radiation therapy, hormonal therapy, immunotherapy, administration of foscarnet, Thiovir, thiovir analogs (BioKeys), podofilox, podophyllin, trichloracetic acid (TCA), or 5-fluorouracil (5-FU), intralesional or intranasal interferon, Imiquimod cream. Ablative techniques include the use of liquid nitrogen, electrocautery or electrodisssection, surgical excision, or laser technology. A successful treatment refers to treatment that completely removes any signs of a growth, while a partially successful treatment refers to a treatment that affects the growth by reducing its size or growth rate, or preventing its enlargement, or reducing the number of growths if there is more than one. Patients once infected with HPV may at later times not exhibit signs of an HPV infection. However, it is believed such patients may still experience recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth, like patients who have signs of continued HPV infection.

In some methods of the invention, the patient is evaluated to determine whether he/she is infected with HPV. In further embodiments, a serotyping of HPV is also included or is part of the initial determination of infection. In still further embodiments, the patient is evaluated to determine whether she has a pre-cancerous or cancerous growth, and if it is cancerous, whether the growth is benign or malignant.

Methods of the invention include embodiments in which the sample is obtained from the patient at least one month after treatment for a pre-cancerous or cancerous growth. The patient may have undergone treatment for at least one pre-cancerous or cancerous growth, such as by some form of ablation.

The present invention also includes therapeutic methods that may be employed with the diagnostic methods of the invention. In some embodiments of the invention, a patient is identified as having an increased risk for the development of recurrence of pre-cancerous or cancerous growths. A course of action that was not previously considered prior to the patient being identified as having that increased risk may be undertaken. In some embodiments, a patient who would not otherwise be treated is administered preventative treatment against pre-cancerous or cancerous growths or examined more frequently, or both. Preventative treatments are treatments administered in the absence of physiological signs of pre-cancerous or cancerous growths, "therapeutic treatment" encompasses medical treatment of a physiological condition that the patient exhibits. These preventative treatments include the use of therapeutic treatments for both HPV infection and HPV-associated pre-cancerous and cancerous growths, as described above.

15

In some embodiments, a preventative method to protect against or reduce the risk of the development of pre-cancerous and cancerous growths involves immunotherapy with HPV E6 and E7 peptides disclosed herein. If a patient is identified as having a low or no cell-mediated immune response against a particular E6 or E7 peptide, or against a combination of such peptides, a peptide or peptides of E6 or E7 sequence may be administered to the patient to elicit a CMI response. Such peptides include any E6 or E7 peptide, specifically including all or part of the peptides of Table 3. Also, peptides from an E6 or E7 polypeptide, such as those discussed with respect to diagnostic methods of the invention, may be employed in preventative methods as well. It is contemplated that the patient may be administered a composition containing one or more peptide sequences, and in some embodiments, with an adjuvant, liposome-based compound, or both. In further embodiments, the patient is administered peptides more than one time.

20

In some embodiments, there is a method for preventing recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth, such as CIN, in a patient infected with HPV and treated for the growth by identifying a patient at risk for recurrence of an HPV-associated growth using methods disclosed herein; and, treating the patient to prevent or treat any

25

30

recurrence. Treatment options may involve surgery—ablative or excisional—as well as conventional cancer therapy and treatment against HPV, as described above. In some embodiments, the treatment is the immunotherapy treatment involving at least one E6 or E7 peptide from HPV described above.

5

Furthermore, the present invention also encompasses kits for determining the possibility of recurrence of a pre-cancerous or cancer growth in a patient once infected with HPV and treated for the growth comprising, in a suitable container means, at least one E6 or E7 peptide from HPV and an antibody that allows the detection of a cell-mediated immune response against the peptide. In some embodiments, the antibody is attached to a non-reacting structure on which a sample can be applied, such as a plate with wells. In further embodiments, the non-reacting structure has membrane, which can be affixed or attached to the structure. In some embodiments, the kit can be used in an Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay to detect, and in some embodiments, quantitate, cytokine secreting cells. In still further embodiments, the kit includes an antibody against a TH1 or TH2 cytokine disclosed herein. Other embodiments include a detection reagent to detect the included antibody. A detection reagent is any compound that allows the detection of another compound, including reagents that allow detection visually, such as by a colorimetric detection reagent.

10

The use of the word “a” or “an” when used in conjunction with the term “comprising” in the claims and/or the specification may mean “one,” but it is also consistent with the meaning of “one or more,” “at least one,” and “one or more than one.”

15

Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating specific embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

20

25

30

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be 5 better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

FIG. 1A-B. Proliferative responses to different E6 and E7 synthetic peptides by PBMC from women in four different study groups. Women in group 1 were normal 10 (CIN⁽⁻⁾/HPV⁽⁰⁾, n = 6), in group 2 were freshly diagnosed to be HPV-associated CIN (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾, n = 31), group 3 were disease-free post-treatment (Recur⁽⁻⁾, n = 22) and group 4 were with disease recurrence (Recur⁽⁺⁾, n = 10). PBMC from women in the 15 four different groups were tested for proliferative responses to peptides from the E6 or E7 oncoproteins of HPV-16. **A.** The stimulation index (SI) values calculated as fold increase in ³ [H] thymidine incorporation in peptide-treated samples over medium controls were shown for each patient for each of the peptides tested. **B.** A summary of positive responses to E6, E7, or both peptides by each group. Group numbers are indicated on the x-axis, while the percentage of positive responders is indicated on the y-axis.

FIG. 2A-D. Proliferative responses of PBMC from patients in groups 3 (Recur⁽⁻⁾) and 4 (Recur⁽⁺⁾) to synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16. PBMC from women in these groups were tested for proliferative responses to a control peptide (control), and 7 and 8 peptides each from the E6 and E7 oncoproteins, respectively, of 20 HPV-16. Representative data showing SI values from two patients each from group 3 (panels A and B) and group 4 (panels C and D) are shown.

FIG. 3. Production of TH1 cytokines by PBMC from women in group 3 in response to 30 stimulation with selected E6 and E7 peptides. PBMC from women in groups 3 (Recur⁽⁻⁾) and 4 (Recur⁽⁺⁾) were cultured in the presence of the E6 peptide Q15L and E7 peptide Q19D for two days and the supernatant fluid in each case was analyzed for the presence of various TH1 (IL-2, IFN- γ , IL-12) and TH2 (IL-4, IL-10) cytokines by ELISA. The

amount of each cytokine produced, after adjusting to medium controls was shown for each of the patient tested from groups 3 and 4.

DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS

5

Human Papilloma Virus (HPV) infection is a major risk factor for cervical cancer, and there is an association between strong HPV-specific cell mediated immunity and less severe stages of CIN. A common clinical management strategy for CIN patients includes excisional or ablative treatment but, follow up studies indicate 10 that a significant number of patients experience recurrence. At present no clear understanding exists regarding disease recurrence or disease free status in these patients. Prognostics and treatment or preventative therapies against CIN in both infected, uninfected and persons who undergo a recurrence of the disease are critical. Many treatment therapies have been tested and implemented but they have yet to 15 eliminate the disease or prevent the recurrence of the disease. Significant number of patients experience recurrence of CIN but there are no means available to test the possibility and probability of recurrence.

20 The present invention provide a methods for determining the possibility of recurrence of CIN as a prognostic or biomarker in a patient infected by HPV and treated for CIN. The method involves the assay and analysis of a cell mediated immune response against peptides of HPV oncoproteins such as E6 and E7. The method also helps in identifying an HPV-infected patient at risk for recurrence of CIN. The present invention, further, makes use of targeted delivery systems, kits and immunotherapeutic 25 measures to prevent the recurrence of CIN and to diagnose a patient with high risk of CIN.

I. HPV

30 Human papillomavirus (HPV) has been identified previously as an important cofactor in the development of stages of cervical neoplasia and cancer. Infection with HPV is however insufficient to cause cervical cancer. Not all women infected with HPV develop cervical cancer. Women are often treated for dysplastic cervical disease detected at the annual Pap Smear. Despite the existence of Pap smear screening,

epidemiological investigations continue to implicate HPV as the single greatest risk factor for progression to cervical neoplasia and cancer. Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) is a type of cervical cancer caused by Human Papilloma Virus (HPV). HPV is associated with development of cervical cancer, specifically HPV types 16, 18, 5 31, 45, 56 and 58. These comprise the High Grade Type/ High Risk type of HPV. Intermediate grade/risk type include HPV 33, 35, 37, 51, 52, 59, 66, and 68. Other Low Grade Types / Low Risk Type associated with warts are types 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 10 53, 54, 55, 62, and 66. These low grade types are not malignant in nature. The HPV genome is presented in an episomal (nonintegrated, circular) form in CIN, whereas the 15 genome is often integrated into host DNA in invasive cervical carcinoma. The E6 and E7 oncoproteins, expressed by high-risk types of HPV, appear critical to the malignant transformation of cervical squamous epithelium, as a consequence of their ability to bind and then inactivate two important tumor suppressor genes, p53 and retinoblastoma gene (Rb). The inactivation of these tumor suppressor proteins appears to be a critical component of the oncogenic potential of HPV.

A. Diagnosis and treatment of cervical cancer

Human Papillomavirus has been identified previously to be associated with the development of cervical carcinoma, a malignant condition which appears to be preceded by several stages of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Despite the existence of Pap smear screening, epidemiological investigations continue to implicate HPV as the single greatest risk factor for progression to CIN, many investigations continue to search for host and/or viral markers that will help identify women infected with HPV who are at risk for CIN. Equally important is the possibility of recurrence of 20 CIN in patients who have been treated. Follow up studies in patients who have undergone excisional or ablative treatment indicate that a significant number of patients experience recurrence. Therefore, it is very important to be able to evaluate the 25 possibility of recurrence of CIN. A prognosis of recurrence would allow a doctor to consider preventative options or therapy options.

30

Since the first reports linking HPV with cervical cancer appeared in the early 1980s (zur Hausen, 1994), it has become generally accepted that high-risk HPV types contribute to the initiation and progression of preinvasive intraepithelial lesions to

carcinoma. Indeed, it has been noted that HPV infection culminates in a distinctive cytopathology in Pap smears, characterized by perinuclear clearing with associated nuclear atypia (Kurman *et al.*, 1994). These HPV changes have been combined with mild dysplasia into the designation LSIL in the revised Bethesda terminology (Kurman 5 and Solomon, 1994). The usefulness of HPV testing is complicated by the fact that there is a need to distinguish between low-risk (L-SIL) and high-risk (H-SIL) HPV types (only the latter pose a significant risk of association with dysplasia → carcinoma progression), and the actual risk of progression. In the former case, a new hybrid capture test for HPV distinguishes high-risk HPV types (Sherman *et al.*, 1995; Pojark 10 *et al.*, 1999; Clavel *et al.*, 2000). DNA image cytometry may be employed in addition to the methods of the invention to diagnose patients at risk for cervical lesions (Lorenzato *et al.*, 2001).

1. Pap Smear

15 Over the last fifty years, Papanicolaou Smear ("Pap Smear") has become the cornerstone of efforts to reduce cervical cancer mortality. Pap Smear is effective because it identifies the earliest stages of cervical cancer. Current estimates are that 60-70 million Pap Smears are done in the U.S. each year. Pap Smear has thus become a norm in the detection of cervical cancer. In spite of its broad acceptance in the medical 20 community, studies indicate that Pap Smear screenings will fail to detect from 50%-80% of low grade cancerous lesions, and even 15%-30% of high grade cancerous lesions.

25 The first step of any cytological diagnostic method is obtaining suitable Pap smear cells for review. In a conventional Pap smear test, a cytologist examines an exfoliative cell specimen, obtained by scraping some cells from the lining of the cervix, smearing the cells onto a slide and staining with Papanicolaou stain. The cytologist examines the stained smears for the presence of abnormal-looking cells that indicate the presence of a malignant condition. The term "malignant condition" refers to the 30 presence of dysplasia including adenocarcinoma in situ (AIS), invasive carcinoma (CA), neoplastic, malignant or tumor cells or the like.

In the method of the invention an exfoliative cell specimen is obtained from a patient, who may or may not harbor a malignant condition. The specimen may be obtained by rotating a cervical sampling device, such as a swab, spatula, or cytobrush along a portion of cervix or vaginal mucosa to obtain a cell sample. A suitable specimen will contain endocervical cells with squamous and/or glandular cells.

The exfoliative cell specimen is generally smeared on the slide to provide a thin layer of the specimen on the surface of the slide. However, the manual observation of cellular abnormalities or the automated analysis of cytological material can be optimized by preparing "monolayers" of cells on the specimen slides. A "monolayer" is defined as substantially two-dimensional layer of uniformly distributed cellular material, predominantly made up of single cells and small clusters of cells.

When conducting Pap Smear screenings, a gynecologist collects exfoliated cells from the surface of the cervix and places them on slides that are sent to cytologists for further examination. Cytologists then review the cells placed on the slides and look for abnormal cells. If abnormal cells are found, the Pap Smear is considered to be positive. If no abnormal cells are found, the Pap Smear is considered to be negative. Pap Smear screening is generally recognized as a practical and economical procedure for the early detection of cervical cancer. In the present invention HPV positivity was determined by Virapap/Viratype assay (Technologies Inc., Gaithersburg, MD).

2. Colposcopy

While the Pap Smear process is designed for initial screening, colposcopy and related procedures are generally used to confirm Pap Smear abnormalities and to grade cancerous and potential cancerous lesions. Since its introduction in 1925, colposcopy has acquired wide recognition as a follow-up clinical procedure for patients identified by Pap Smear screening as having possible cervical abnormalities. It is generally recognized that colposcopy is highly effective in evaluating patients with abnormal Pap Smears and has therefore become the standard of medical care in the Western world for this circumstance. It is estimated that approximately 4 million colposcopy examinations are currently performed in the U.S. each year.

3. Fluorescence spectroscopy

Another method for detecting pre-cancerous and cancerous growths or lesions involves fluorescence spectroscopy, which has the capability to quickly, non-invasively and quantitatively probe the biochemical and morphological changes that occur as tissue becomes neoplastic. The altered biochemical and morphological state of the neoplastic tissue is reflected in the spectral characteristics of the measured fluorescence. U.S. Patents 6,258,576 and 6,135,965 discuss diagnosis of cervical squamous intraepithelial (CIN) lesions and are specifically incorporated by reference.

10 4. Treatment of precancerous and cancerous growth

A treatment is intended to effect an elimination, reduction or retardation of the growth. The cancerous growths can be treated by excision or ablative procedures. In addition to the immunotherapy discussed in further detail below, the following treatments may be employed therapeutically or preventatively in methods of the invention.

i) Chemotherapy

Cancer therapies also include a variety of combination therapies with both chemical and radiation based treatments. Combination chemotherapies include, for example, cisplatin (CDDP), carboplatin, procarbazine, mechlorethamine, cyclophosphamide, camptothecin, ifosfamide, melphalan, chlorambucil, busulfan, nitrosurea, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, bleomycin, plicomycin, mitomycin, etoposide (VP16), tamoxifen, raloxifene, estrogen receptor binding agents, taxol, gemcitabien, navelbine, farnesyl-protein transferase inhibitors, transplatin, 5-fluorouracil, vincristine, vinblastine and methotrexate, or any analog or derivative variant of the foregoing.

ii) Radiotherapy

Other factors that cause DNA damage and have been used extensively include what are commonly known as γ -rays, X-rays, and/or the directed delivery of radioisotopes to tumor cells. Other forms of DNA damaging factors are also contemplated such as microwaves and UV-irradiation. It is most likely that all of these factors effect a broad range of damage on DNA, on the precursors of DNA, on the

replication and repair of DNA, and on the assembly and maintenance of chromosomes. Dosage ranges for X-rays range from daily doses of 50 to 200 roentgens for prolonged periods of time (3 to 4 wk), to single doses of 2000 to 6000 roentgens. Dosage ranges for radioisotopes vary widely, and depend on the half-life of the isotope, the strength and type of radiation emitted, and the uptake by the neoplastic cells.

5 The terms "contacted" and "exposed," when applied to a cell, are used herein to describe the process by which a therapeutic or diagnostic peptide or polynucleotide, or a chemotherapeutic or radiotherapeutic agent are delivered to a target cell or are placed in
10 direct juxtaposition with the target cell. To achieve cell killing or stasis, both agents are delivered to a cell in a combined amount effective to kill the cell or prevent it from dividing.

15 **iii) Genes**

In yet another embodiment, the secondary treatment is a gene therapy in which a therapeutic polynucleotide is administered before, after, or at the same time as a chimeric polypeptide of the present invention. Delivery of a chimeric polypeptide in conjunction with a second vector encoding one of the following gene products will have a combined anti-hyperproliferative effect on target tissues. Alternatively, a single
20 vector encoding both genes may be used. A variety of proteins are encompassed within the invention, including inducers of cell proliferation such as growth factor receptors, inhibitors of cellular proliferation such as tumor suppressors, and regulators of apoptosis.

25 **iv) Ablative Procedures**

A majority of persons with any cancer will generally undergo surgery of some type, which includes preventative, diagnostic or staging, curative and palliative surgery. Curative surgery is a pre-cancer or cancer treatment that may be used in conjunction with other therapies, such as the treatment of the present invention, chemotherapy,
30 radiotherapy, hormonal therapy, gene therapy, immunotherapy and/or alternative therapies.

Curative surgery includes resection in which all or part of pre-cancerous or cancerous tissue is physically removed, excised, and/or destroyed. Tumor resection refers to physical removal of at least part of a tumor. In addition to tumor resection, treatment by surgery includes laser surgery, cryosurgery, electrosurgery, and 5 microscopically controlled surgery (Mohs' surgery). It is further contemplated that the present invention may be used in conjunction with removal of superficial cancers, precancers, or incidental amounts of normal tissue.

Upon excision of part of all of cancerous cells, tissue, or tumor, a cavity may be 10 formed in the body. Treatment may be accomplished by perfusion, direct injection or local application of the area with an additional anti-cancer therapy. Such treatment may be repeated, for example, every 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7 days, or every 1, 2, 3, 4, and 5 weeks or every 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 months. These treatments may be of varying dosages as well.

15

v) Other agents

It is contemplated that other agents may be used in combination with the present invention to improve the therapeutic efficacy of treatment. These additional agents 20 include immunomodulatory agents, agents that affect the upregulation of cell surface receptors and GAP junctions, cytostatic and differentiation agents, inhibitors of cell adhesion, or agents that increase the sensitivity of the hyperproliferative cells to apoptotic inducers. Immunomodulatory agents include tumor necrosis factor, interferon alpha, beta, and gamma; IL-2 and other cytokines; F42K and other cytokine analogs; or MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, and other chemokines. It is further 25 contemplated that the upregulation of cell surface receptors or their ligands such as Fas / Fas ligand, DR4 or DR5 / TRAIL would potentiate the apoptotic inducing abilities of the present invention by establishment of an autocrine or paracrine effect on hyperproliferative cells. Increases intercellular signaling by elevating the number of GAP junctions would increase the anti-hyperproliferative effects on the neighboring 30 hyperproliferative cell population. In other embodiments, cytostatic or differentiation agents can be used in combination with the present invention to improve the anti-hyperproliferative efficacy of the treatments. Inhibitors of cell adhesion are contemplated to improve the efficacy of the present invention. Examples of cell

adhesion inhibitors are focal adhesion kinase (FAKs) inhibitors and Lovastatin. It is further contemplated that other agents that increase the sensitivity of a hyperproliferative cell to apoptosis, such as the antibody c225, could be used in combination with the present invention to improve the treatment efficacy.

5

Hormonal therapy may also be used in conjunction with the present invention or in combination with any other cancer therapy previously described. The use of hormones may be employed in the treatment of certain cancers such as breast, prostate, ovarian, or cervical cancer to lower the level or block the effects of certain hormones 10 such as testosterone or estrogen. This treatment is often used in combination with at least one other cancer therapy as a treatment option or to reduce the risk of metastases.

v) Anti-viral agents

A patient infected with HPV may be treated with anti-viral agents alone or in 15 combination with anti-cancer therapies. An "anti-viral agent" refers to a composition that prevents or inhibits viral infection; prevents or inhibits the progression of a viral infection; reduces the infectivity of the virus; prevent, inhibits, or reduces the physiological symptoms of viral infection; prevents or reduces the incidence of viral activation; inhibits a cell that is a viral host; induces a host cell to undergo apoptosis; 20 clears virus from all or part of the body; induces the virus to become inactive; or any combination of the above.

Agents used against HPV include administration of foscarnet, Thiovir, thiovir 25 analogs (BioKeys), podofilox, podophyllin, trichloracetic acid (TCA), or 5-fluorouracil (5-FU), intralesional or intranasal interferon, or Imiquimod cream. Other agents are disclosed in U.S. Patents 6,245,568, 6,238,659, and 6,214,874.

II. Proteins and Peptides Selection, Synthesis and Use

30 In the present invention, peptides are employed in diagnostic and treatment methods. These peptides correspond to HPV 16 oncoproteins.

A. Proteinaceous Compositions

In certain embodiments, the present invention concerns novel compositions comprising at least one proteinaceous molecule as can be seen in peptides with SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, 5 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 and in the polypeptides of SEQ ID NO: 20 and SEQ ID NO: 21. As used herein, a "proteinaceous molecule," "proteinaceous composition," "proteinaceous compound," "proteinaceous chain" or "proteinaceous material" generally refers, but is not limited to, a protein of greater than about 200 amino acids or the full length endogenous sequence translated from a gene; a polypeptide of greater than about 100 amino acids; and/or a peptide of from about 3 to about 100 amino acids. All the "proteinaceous" terms described above may be used interchangeably herein.

15

In certain embodiments the size of the at least one proteinaceous molecule may comprise, but is not limited to, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 20 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 or greater 25 amino molecule residues, and any range derivable therein. Peptides of the invention may comprise 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or up to 100 contiguous amino acids from SEQ ID NOS: 1-21, inclusive. SEQ ID NOS: 1 to 10 are peptides from the E6 polypeptide of HPV, while SEQ ID NOS: 11-19 are peptides from the E7 polypeptide of HPV. SEQ ID NOS: 20 and 21 are polypeptide sequences for 30 HPV oncoproteins E6 and E7 respectively. The GenBank accession number for E6 in HPV 16 is AF327851 (SEQ ID NO:26), while the number for E7 in HPV 16 is U76404 (SEQ ID NO:27), which are both specifically incorporated by reference. Based on

Table 3, it is understood that the peptides specifically contemplated as part of the invention include the following E6 peptides: K9L (aa 18-26 of SEQ ID NO:26), E10I (aa 23-34 of SEQ ID NO:26), C10R (aa 37-46 of SEQ ID NO:26), Q15L (aa 43-57 of SEQ ID NO:26), V10C (aa 49-58 of SEQ ID NO:26), P9L (aa 66-74 of SEQ ID NO:26), P10I (aa 102-111 of SEQ ID NO:26), Q20P (aa 97-116 of SEQ ID NO:26), R16R (aa 131-146 of SEQ ID NO:26), G10S (aa 141-150 of SEQ ID NO:26), or a combination thereof. Based on Table 3, it is further understood that the peptides specifically contemplated as part of the invention include the following E7 peptides: T10Q (aa 7-15 of SEQ ID NO:27), M9T (aa 12-20 of SEQ ID NO:27), D9L (aa 14-22 of SEQ ID NO:27), Q19D (aa 44-62 of SEQ ID NO:27), R9F (aa 49-57 of SEQ ID NO:27), R9V (aa 66-74 of SEQ ID NO:27), L9V (aa 82-90 of SEQ ID NO:27), G10C (aa 85-94 of SEQ ID NO:27), D20C (aa 75-94 of SEQ ID NO:27), or a combination thereof.

As used herein, an "amino molecule" refers to any amino acid, amino acid derivative or amino acid mimic as would be known to one of ordinary skill in the art. In certain embodiments, the residues of the proteinaceous molecule are sequential, without any non-amino molecule interrupting the sequence of amino molecule residues. In other embodiments, the sequence may comprise one or more non-amino molecule moieties. In particular embodiments, the sequence of residues of the proteinaceous molecule may be interrupted by one or more non-amino molecule moieties.

Accordingly, the term "proteinaceous composition" encompasses amino molecule sequences comprising at least one of the 20 common amino acids in naturally synthesized proteins, or at least one modified or unusual amino acid, including but not limited to those shown on Table 1 below.

TABLE 1 Modified and Unusual Amino Acids			
Abbr.	Amino Acid	Abbr.	Amino Acid
Aad	2-Amino adipic acid	EtAsn	N-Ethylasparagine
Baad	3- Amino adipic acid	Hyl	Hydroxylsine
Bala	β -alanine, β -Amino-propionic acid	AHyl	allo-Hydroxylsine
Abu	2-Aminobutyric acid	3Hyp	3-Hydroxyproline
4Abu	4- Aminobutyric acid, piperidinic acid	4Hyp	4-Hydroxyproline
Acp	6-Aminocaproic acid	lde	Isodesmosine
Ahe	2-Aminoheptanoic acid	Alle	allo-Isoleucine
Aib	2-Aminoisobutyric acid	MeGly	N-Methylglycine, sarcosine
Baib	3-Aminoisobutyric acid	Melle	N-Methylisoleucine
Apm	2-Aminopimelic acid	McLys	6-N-Methyllysine
Dbu	2,4-Diaminobutyric acid	MeVal	N-Methylvaline
Des	Desmosine	Nva	Norvaline
Dpm	2,2'-Diaminopimelic acid	Nle	Norleucine
Dpr	2,3-Diaminopropionic acid	Orn	Ornithine
EtGly	N-Ethylglycine		

5 In certain embodiments the proteinaceous composition comprises at least one protein, polypeptide or peptide. In further embodiments the proteinaceous composition comprises a biocompatible protein, polypeptide or peptide. As used herein, the term "biocompatible" refers to a substance which produces no significant untoward effects when applied to, or administered to, a given organism according to the methods and amounts described herein. Organisms include, but are not limited to, Such untoward or
10 undesirable effects are those such as significant toxicity or adverse immunological reactions. In preferred embodiments, biocompatible protein, polypeptide or peptide containing compositions will generally be mammalian proteins or peptides or synthetic

proteins or peptides each essentially free from toxins, pathogens and harmful immunogens.

Proteinaceous compositions may be made by any technique known to those of skill in the art, including the expression of proteins, polypeptides or peptides through standard molecular biological techniques, the isolation of proteinaceous compounds from natural sources, or the chemical synthesis of proteinaceous materials. The nucleotide and protein, polypeptide and peptide sequences for various genes have been previously disclosed, and may be found at computerized databases known to those of ordinary skill in the art. One such database is the National Center for Biotechnology Information's Genbank and GenPept databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The coding regions for these known genes may be amplified and/or expressed using the techniques disclosed herein or as would be known to those of ordinary skill in the art. Alternatively, various commercial preparations of proteins, polypeptides and peptides are known to those of skill in the art.

15

In certain embodiments a proteinaceous compound may be purified. Generally, "purified" will refer to a specific or protein, polypeptide, or peptide composition that has been subjected to fractionation to remove various other proteins, polypeptides, or peptides, and which composition substantially retains its activity, as may be assessed, for example, by the protein assays, as would be known to one of ordinary skill in the art for the specific or desired protein, polypeptide or peptide.

It is contemplated that virtually any protein, polypeptide or peptide containing component may be used in the compositions and methods disclosed herein. However, it is preferred that the proteinaceous material is biocompatible. In certain embodiments, it is envisioned that the formation of a more viscous composition will be advantageous in that will allow the composition to be more precisely or easily applied to the tissue and to be maintained in contact with the tissue throughout the procedure. In such cases, the use of a peptide composition, or more preferably, a polypeptide or protein composition, is contemplated. Ranges of viscosity include, but are not limited to, about 40 to about 100 poise. In certain aspects, a viscosity of about 80 to about 100 poise is preferred.

B. Peptides Selection, Synthesis and Use

Peptide sequences corresponding to E6 and E7 oncoproteins of HPV 16 are selected on the basis of the amphipathic structures and information related to known T-cell epitopes described in literature.

5

The peptides of the invention can be synthesized in solution or on a solid support in accordance with conventional techniques. Various automatic synthesizers are commercially available and can be used in accordance with known protocols. Small synthetic peptide sequences, typically less than 100 residues in length, are 10 conventionally prepared using stepwise solid-phase synthesis. Such solid phase synthesis makes use of an insoluble resin support for a growing oligomer. A sequence of subunits, destined to comprise a desired polymer, are reacted together in sequence on the support. A terminal amino acid is attached to the solid support in an initial reaction, either directly or through a keying agent. The terminal residue is reacted, in sequence, 15 with a series of further residues such as amino acids or blocked amino acid moieties to yield a growing oligomer attached to the solid support through the terminal residue. At each stage in the synthetic scheme, unreacted reactant materials are washed out or otherwise removed from contact with the solid phase. The cycle is continued with a pre-selected sequence of residues until the desired polymer has been completely 20 synthesized, but remains attached to the solid support. The polymer is then cleaved from the solid support and purified for use. The foregoing general synthetic scheme was developed by R.B. Merrifield for use in the preparation of certain peptides (Merrifield, 1986). These peptides can be synthesized either on a modified Vega 250 automatic peptide synthesizer (Vega Biochemicals, Tucson, AZ) or by the "bag method" as mentioned by Houghten (Houghten, 1985). Also see, for example, Stewart and Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); and Barany and Merrifield (1979), each 25 incorporated herein by reference.

Short peptide sequences, or libraries of overlapping peptides, usually from about 30 6 up to about 35 to 50 amino acids, which correspond to the selected regions described herein, can be readily synthesized and then screened in screening assays designed to

identify reactive peptides. Peptides with at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 or up to about 100 contiguous amino acid residues of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ

5 ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 and SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 are contemplated by the present invention.

10 The compositions of the invention may include a peptide that has been modified to enhance its activity or to render it biologically protected. Biologically protected peptides have certain advantages over unprotected peptides when administered to human subjects and, as disclosed in U.S. patent 5,028,592, incorporated herein by reference, protected peptides often exhibit increased pharmacological activity.

15 Compositions for use in the present invention may also comprise peptides that include all L-amino acids, all D-amino acids, or a mixture thereof. The use of D-amino acids may confer additional resistance to proteases naturally found within the human body and are less immunogenic and can therefore be expected to have longer biological

20 half lives.

III. Protein Purification

Peptides and proteins derived from HPV can be purified in many ways. Generally, "purified" will refer to a specific protein, polypeptide, or peptide composition that has been subjected to fractionation to remove various other proteins, polypeptides, or peptides, and which composition substantially retains its activity, as may be assessed, for example, by the protein assays, as described herein below, or as would be known to one of ordinary skill in the art for the desired protein, polypeptide or peptide.

30 Protein purification techniques are well known to those of skill in the art. These techniques involve, at one level, the crude fractionation of the cellular milieu to

polypeptide and non-polypeptide fractions. Having separated the polypeptide from other proteins, the polypeptide of interest may be further purified using chromatographic and electrophoretic techniques to achieve partial or complete purification (or purification to homogeneity). Analytical methods particularly suited to 5 the preparation of a pure peptide are ion-exchange chromatography, exclusion chromatography; polyacrylamide gel electrophoresis; isoelectric focusing. A particularly efficient method of purifying peptides is fast protein liquid chromatography or even HPLC.

10 Certain aspects of the present invention concern the purification, and in particular embodiments, the substantial purification, of an encoded protein or peptide, such as peptides derived from E6 and E7 oncoprotein. The term "purified protein or peptide" as used herein, is intended to refer to a composition, isolatable from other components, wherein the protein or peptide is purified to any degree relative to its 15 naturally-obtainable state. A purified protein or peptide therefore also refers to a protein or peptide, free from the environment in which it may naturally occur.

Generally, "purified" will refer to a protein or peptide composition, that has been subjected to fractionation to remove various other components, and which 20 composition substantially retains its expressed biological activity. Where the term "substantially purified" is used, this designation will refer to a composition in which the protein or peptide forms the major component of the composition, such as constituting about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 90%, about 95% or more of the 25 proteins in the composition.

25 Various methods for quantifying the degree of purification of the protein or peptide will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. These include, for example, determining the specific activity of an active fraction, or 30 assessing the amount of polypeptides within a fraction by SDS/PAGE analysis. A preferred method for assessing the purity of a fraction is to calculate the specific activity of the fraction, to compare it to the specific activity of the initial extract, and to thus calculate the degree of purity, herein assessed by a "fold purification number." The actual units used to represent the amount of activity will, of course, be dependent

upon the particular assay technique chosen to follow the purification and whether or not the expressed protein or peptide exhibits a detectable activity.

Various techniques suitable for use in protein purification will be well known to 5 those of skill in the art. These include, for example, precipitation with ammonium sulphate, PEG, antibodies and the like or by heat denaturation, followed by centrifugation; chromatography steps such as ion exchange, gel filtration, reverse phase, hydroxylapatite and affinity chromatography; isoelectric focusing; gel electrophoresis; and combinations of such and other techniques. As is generally known in the art, it is 10 believed that the order of conducting the various purification steps may be changed, or that certain steps may be omitted, and still result in a suitable method for the preparation of a substantially purified protein or peptide.

There is no general requirement that the protein or peptide always be provided 15 in their most purified state. Indeed, it is contemplated that less substantially purified products will have utility in certain embodiments. Partial purification may be accomplished by using fewer purification steps in combination, or by utilizing different forms of the same general purification scheme. For example, it is appreciated that a 20 cation-exchange column chromatography performed utilizing an HPLC apparatus will generally result in a greater “-fold” purification than the same technique utilizing a low pressure chromatography system. Methods exhibiting a lower degree of relative purification may have advantages in total recovery of protein product, or in maintaining the activity of an expressed protein.

25 It is known that the migration of a polypeptide can vary, sometimes significantly, with different conditions of SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). It will therefore be appreciated that under differing electrophoresis conditions, the apparent molecular weights of purified or partially purified expression products may vary.

30 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is characterized by a very rapid separation with extraordinary resolution of peaks. This is achieved by the use of very fine particles and high pressure to maintain an adequate flow rate. Separation can be accomplished in a matter of minutes, or at most an hour. Moreover, only a very

small volume of the sample is needed because the particles are so small and close-packed that the void volume is a very small fraction of the bed volume. Also, the concentration of the sample need not be very great because the bands are so narrow that there is very little dilution of the sample.

5

Gel chromatography, or molecular sieve chromatography, is a special type of partition chromatography that is based on molecular size. The theory behind gel chromatography is that the column, which is prepared with tiny particles of an inert substance that contain small pores, separates larger molecules from smaller molecules 10 as they pass through or around the pores, depending on their size. As long as the material of which the particles are made does not adsorb the molecules, the sole factor determining rate of flow is the size. Hence, molecules are eluted from the column in decreasing size, so long as the shape is relatively constant. Gel chromatography is unsurpassed for separating molecules of different size because separation is 15 independent of all other factors such as pH, ionic strength, temperature, etc. There also is virtually no adsorption, less zone spreading and the elution volume is related in a simple matter to molecular weight.

Affinity Chromatography is a chromatographic procedure that relies on the 20 specific affinity between a substance to be isolated and a molecule that it can specifically bind to. This is a receptor-ligand type interaction. The column material is synthesized by covalently coupling one of the binding partners to an insoluble matrix. The column material is then able to specifically adsorb the substance from the solution. Elution occurs by changing the conditions to those in which binding will not occur 25 (e.g., alter pH, ionic strength, and temperature.).

A particular type of affinity chromatography useful in the purification of carbohydrate containing compounds is lectin affinity chromatography. Lectins are a 30 class of substances that bind to a variety of polysaccharides and glycoproteins. Lectins are usually coupled to agarose by cyanogen bromide. Concanavalin A coupled to Sepharose was the first material of this sort to be used and has been widely used in the isolation of polysaccharides and glycoproteins other lectins that have been include lentil lectin, wheat germ agglutinin which has been useful in the purification of N-acetyl

5 glucosaminyl residues and *Helix pomatia* lectin. Lectins themselves are purified using affinity chromatography with carbohydrate ligands. Lactose has been used to purify lectins from castor bean and peanuts; maltose has been useful in extracting lectins from lentils and jack bean; N-acetyl-D galactosamine is used for purifying lectins from soybean; N-acetyl glucosaminyl binds to lectins from wheat germ; D-galactosamine has been used in obtaining lectins from clams and L-fucose will bind to lectins from lotus.

10 The matrix should be a substance that itself does not adsorb molecules to any significant extent and that has a broad range of chemical, physical and thermal stability.

15 The ligand should be coupled in such a way as to not affect its binding properties. The ligand also should provide relatively tight binding. And it should be possible to elute the substance without destroying the sample or the ligand. One of the most common forms of affinity chromatography is immunoaffinity chromatography. The generation of antibodies that would be suitable for use in accord with the present invention is discussed below.

IV. Nucleic acids

A. Screening of DNA

20 In the present invention, screening of nucleic acids may be employed not only for screening a sample for infection but also, for detecting the possibility of recurrence of the disease. Screening procedures which rely on nucleic acid hybridization make it possible to isolate any gene sequence from any organism, provided the appropriate probe is available. Oligonucleotide probes, which correspond to a part of the sequence encoding the protein in question, can be synthesized chemically. This requires that 25 short, oligopeptide stretches of amino acid sequence must be known. The DNA sequence encoding the protein can be deduced from the genetic code, however, the degeneracy of the code must be taken into account. It is possible to perform a mixed addition reaction when the sequence is degenerate. This includes a heterogeneous mixture of denatured double-stranded DNA. For such screening, hybridization is 30 preferably performed on either single-stranded DNA or denatured double-stranded DNA. Hybridization is particularly useful in the detection of cDNA clones derived from sources where an extremely low amount of mRNA sequences relating to the polypeptide of interest are present. In other words, by using stringent hybridization

conditions directed to avoid non-specific binding, it is possible, for example, to allow the autoradiographic visualization of a specific cDNA done by the hybridization of the target DNA to that single probe in the mixture which is its complete complement (Wallace *et al.*, 1981). The use of a probe or primer of between 13 and 100 nucleotides, 5 preferably between 17 and 100 nucleotides in length, or in some aspects of the invention up to 1-2 kilobases or more in length, allows the formation of a duplex molecule that is both stable and selective. Molecules having complementary sequences over contiguous stretches greater than 20 bases in length are generally preferred, to increase stability and/or selectivity of the hybrid molecules obtained. One will generally prefer to design nucleic 10 acid molecules for hybridization having one or more complementary sequences of 20 to 30 nucleotides, or even longer where desired. Such fragments may be readily prepared, for example, by directly synthesizing the fragment by chemical means or by introducing selected sequences into recombinant vectors for recombinant production.

15 Accordingly, the nucleotide sequences of the invention may be used for their ability to selectively form duplex molecules with complementary stretches of DNAs and/or RNAs or to provide primers for amplification of DNA or RNA from samples. Depending on the application envisioned, one would desire to employ varying conditions 20 of hybridization to achieve varying degrees of selectivity of the probe or primers for the target sequence.

For applications requiring high selectivity, one will typically desire to employ 25 relatively high stringency conditions to form the hybrids. For example, relatively low salt and/or high temperature conditions, such as provided by about 0.02 M to about 0.10 M NaCl at temperatures of about 50°C to about 70°C. Such high stringency conditions tolerate little, if any, mismatch between the probe or primers and the template or target strand and would be particularly suitable for isolating specific genes or for detecting specific mRNA transcripts. It is generally appreciated that conditions can be rendered more stringent by the addition of increasing amounts of formamide.

30 For certain applications, for example, site-directed mutagenesis, it is appreciated that lower stringency conditions are preferred. Under these conditions, hybridization may occur even though the sequences of the hybridizing strands are not perfectly

complementary, but are mismatched at one or more positions. Conditions may be rendered less stringent by increasing salt concentration and/or decreasing temperature. For example, a medium stringency condition could be provided by about 0.1 to 0.25 M NaCl at temperatures of about 37°C to about 55°C, while a low stringency condition could be 5 provided by about 0.15 M to about 0.9 M salt, at temperatures ranging from about 20°C to about 55°C. Hybridization conditions can be readily manipulated depending on the desired results.

In other embodiments, hybridization may be achieved under conditions of, for 10 example, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1.0 mM dithiothreitol, at temperatures between approximately 20°C to about 37°C. Other hybridization conditions utilized could include approximately 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, at temperatures ranging from approximately 40°C to about 72°C.

15 In certain embodiments, it will be advantageous to employ nucleic acids of defined sequences of the present invention in combination with an appropriate means, such as a label, for determining hybridization. A wide variety of appropriate indicator means are known in the art, including fluorescent, radioactive, enzymatic or other ligands, such as avidin/biotin, which are capable of being detected. In preferred embodiments, one may 20 desire to employ a fluorescent label or an enzyme tag such as urease, alkaline phosphatase or peroxidase, instead of radioactive or other environmentally undesirable reagents. In the case of enzyme tags, colorimetric indicator substrates are known that can be employed to provide a detection means that is visibly or spectrophotometrically detectable, to identify specific hybridization with complementary nucleic acid containing samples.

25 In general, it is envisioned that the probes or primers described herein will be useful as reagents in solution hybridization, as in PCR™, for detection of expression of corresponding genes, as well as in embodiments employing a solid phase. In 30 embodiments involving a solid phase, the test DNA (or RNA) is adsorbed or otherwise affixed to a selected matrix or surface. This fixed, single-stranded nucleic acid is then subjected to hybridization with selected probes under desired conditions. The conditions selected will depend on the particular circumstances (depending, for example, on the G+C content, type of target nucleic acid, source of nucleic acid, size of

hybridization probe, *etc.*). Optimization of hybridization conditions for the particular application of interest is well known to those of skill in the art. After washing of the hybridized molecules to remove non-specifically bound probe molecules, hybridization is detected, and/or quantified, by determining the amount of bound label.

5 Representative solid phase hybridization methods are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,843,663, 5,900,481 and 5,919,626. Other methods of hybridization that may be used in the practice of the present invention are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,849,481, 5,849,486 and 5,851,772. The relevant portions of these and other references identified in this section of the Specification are incorporated herein by reference.

10

B. Synthesis of DNA

The synthesis of DNA sequences is frequently the method of choice when the entire sequence of amino acid residues of the desired polypeptide product is known. When the entire sequence of amino acid residues of the desired polypeptides is not 15 known, the direct synthesis of DNA sequences is not possible and the method of choice is the synthesis of cDNA sequences. Among the standard procedures for isolating cDNA sequences of interest is the formation of plasmid- or phage-carrying cDNA libraries which are derived from reverse transcription of mRNA which is abundant in donor cells that have a high level of genetic expression. When used in combination 20 with polymerase chain reaction technology, even rare expression products can be cloned. In those cases where significant portions of the amino acid sequence of the polypeptide are known, the production of labeled single or double-stranded DNA or RNA probe sequences duplicating a sequence putatively present in the target cDNA may be employed in DNA/DNA hybridization procedures which are carried out on 25 cloned copies of the cDNA which have been denatured into a single-stranded form.

1. Biochips

Methods of isolating arrays of biomolecules on various supports, referred to as biochips, have been developed and have been employed in DNA synthesis, sequencing, 30 mutation studies, gene expression analysis and gene discovery. Biochips are useful in the present invention as it enables one to identify the markers for pathological states, in this case, HPV infection that may be of subsequent diagnostic value.

Use of a biochip involves the hybridization of a labeled molecule or pool of molecules to the targets immobilized on the biochip. The labeled molecules are normally cDNA copies of the mRNA content of a cell or tissue. In this instance the number of copies of each distinct type of cDNA reflects the number of copies of the corresponding mRNA species in the initial isolate. In general terms, the intensity of hybridization to the target immobilized on the biochip is proportional to the concentration of the cDNA and thus measurement of hybridization intensity enables the relative amount of the mRNA in the initial isolate to be deduced. A relative amount of the same mRNA in two different mRNA isolated can be determined by comparing the intensities of hybridization to the same target spot between two samples. These measurements can be used to identify markers for particular cell types or pathological states that can be of subsequent diagnostic value. Alternatively, sharp increases in the abundance of particular mRNAs in a given disease state can indicate a possible target for drug attack, thereby providing novel therapeutic targets.

15

C. Nucleic Acid Amplification Reaction

Nucleic acid molecules can be detected using a variety of techniques, including amplification reactions. The present invention contemplates using these amplification reactions for detecting cell mediated immune response or to identify a patient who is infected with HPV and/or have a precancerous or cancerous growth. For example, a cell-mediated immune response can be detected by RT-PCR of a TH1 or TH2 cytokine disclosed herein.

1. Polymerase Chain Reaction (PCR™)

25 Nucleic acid used as a template for amplification is isolated from cells contained in the biological sample, according to standard methodologies (Sambrook, 1989). The nucleic acid may be genomic DNA or fractionated or whole cell RNA. Where RNA is used, it may be desired to convert the RNA to a cDNA.

30 Pairs of primers that selectively hybridize to nucleic acids corresponding to a K_{ATP} channel protein or a mutant thereof are contacted with the isolated nucleic acid under conditions that permit selective hybridization. The term "primer," as defined herein, is meant to encompass any nucleic acid that is capable of priming the synthesis

of a nascent nucleic acid in a template-dependent process. Typically, primers are oligonucleotides from ten to twenty base pairs in length, but longer sequences can be employed. Primers may be provided in double-stranded or single-stranded form, although the single-stranded form is preferred.

5

Once hybridized, the nucleic acid:primer complex is contacted with one or more enzymes that facilitate template-dependent nucleic acid synthesis. Multiple rounds of amplification, also referred to as "cycles," are conducted until a sufficient amount of amplification product is produced.

10

Next, the amplification product is detected. In certain applications, the detection may be performed by visual means. Alternatively, the detection may involve indirect identification of the product via chemiluminescence, radioactive scintigraphy of incorporated radiolabel or fluorescent label or even via a system using electrical or thermal impulse signals (Affymax technology).

15

A number of template dependent processes are available to amplify the marker sequences present in a given template sample. One of the best known amplification methods is the polymerase chain reaction (referred to as PCR™) which is described in detail in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, and each incorporated herein by reference in entirety.

20

Briefly, in PCR™, two primer sequences are prepared that are complementary to regions on opposite complementary strands of the marker sequence. An excess of deoxynucleoside triphosphates are added to a reaction mixture along with a DNA polymerase, e.g., *Taq* polymerase. If the marker sequence is present in a sample, the primers will bind to the marker and the polymerase will cause the primers to be extended along the marker sequence by adding on nucleotides. By raising and lowering the temperature of the reaction mixture, the extended primers will dissociate from the marker to form reaction products, excess primers will bind to the marker and to the reaction products and the process is repeated.

25

30

A reverse transcriptase PCR™ (RT-PCR™) amplification procedure may be performed in order to quantify the amount of mRNA amplified or to prepare cDNA from the desired mRNA. Methods of reverse transcribing RNA into cDNA are well known and described in Sambrook *et al.*, 1989. Alternative methods for reverse 5 transcription utilize thermostable, RNA-dependent DNA polymerases. These methods are described in WO 90/07641, filed December 21, 1990, incorporated herein by reference. Polymerase chain reaction methodologies are well known in the art.

2. Other Nucleic Acid Amplification Reactions

10 Another method for amplification is the ligase chain reaction ("LCR"), disclosed in EPA No. 320 308, incorporated herein by reference in its entirety. In LCR, two complementary probe pairs are prepared, and in the presence of the target sequence, each pair will bind to opposite complementary strands of the target such that they abut. In the presence of a ligase, the two probe pairs will link to form a single unit. 15 By temperature cycling, as in PCR™, bound ligated units dissociate from the target and then serve as "target sequences" for ligation of excess probe pairs. U.S. Patent 4,883,750 describes a method similar to LCR for binding probe pairs to a target sequence.

20 Qbeta Replicase, described in PCT Application No. PCT/US87/00880, incorporated herein by reference, may also be used as still another amplification method in the present invention. In this method, a replicative sequence of RNA that has a region complementary to that of a target is added to a sample in the presence of an RNA polymerase. The polymerase will copy the replicative sequence that can then be 25 detected.

An isothermal amplification method, in which restriction endonucleases and ligases are used to achieve the amplification of target molecules that contain nucleotide 5'-[alpha-thio]-triphosphates in one strand of a restriction site may also be useful in the 30 amplification of nucleic acids in the present invention.

Strand Displacement Amplification (SDA) is another method of carrying out isothermal amplification of nucleic acids that involves multiple rounds of strand displacement and synthesis, *i.e.*, nick translation. A similar method, called Repair Chain Reaction (RCR), involves annealing several probes throughout a region targeted 5 for amplification, followed by a repair reaction in which only two of the four bases are present. The other two bases can be added as biotinylated derivatives for easy detection. A similar approach is used in SDA. Target specific sequences can also be detected using a cyclic probe reaction (CPR). In CPR, a probe having 3' and 5' 10 sequences of non-specific DNA and a middle sequence of specific RNA is hybridized to DNA that is present in a sample. Upon hybridization, the reaction is treated with RNase H, and the products of the probe identified as distinctive products that are released after digestion. The original template is annealed to another cycling probe and the reaction is repeated.

15 Still another amplification methods described in GB Application No. 2 202 328, and in PCT Application No. PCT/US89/01025, each of which is incorporated herein by reference in its entirety, may be used in accordance with the present invention. In the former application, "modified" primers are used in a PCR™-like, template- and enzyme-dependent synthesis. The primers may be modified by labeling with a capture 20 moiety (*e.g.*, biotin) and/or a detector moiety (*e.g.*, enzyme). In the latter application, an excess of labeled probes are added to a sample. In the presence of the target sequence, the probe binds and is cleaved catalytically. After cleavage, the target sequence is released intact to be bound by excess probe. Cleavage of the labeled probe signals the presence of the target sequence.

25 Other nucleic acid amplification procedures include transcription-based amplification systems (TAS), including nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and 3SR Gingeras *et al.*, PCT Application WO 88/10315, incorporated herein by reference. In NASBA, the nucleic acids can be prepared for amplification by 30 standard phenol/chloroform extraction, heat denaturation of a clinical sample, treatment with lysis buffer and minispin columns for isolation of DNA and RNA or guanidinium chloride extraction of RNA. These amplification techniques involve annealing a primer which has target specific sequences. Following polymerization, DNA/RNA hybrids are

digested with RNase H while double stranded DNA molecules are heat denatured again. In either case the single stranded DNA is made fully double stranded by addition of second target specific primer, followed by polymerization. The double-stranded DNA molecules are then multiply transcribed by an RNA polymerase such as T7 or SP6. In 5 an isothermal cyclic reaction, the RNA's are reverse transcribed into single stranded DNA, which is then converted to double stranded DNA, and then transcribed once again with an RNA polymerase such as T7 or SP6. The resulting products, whether truncated or complete, indicate target specific sequences.

10 Davey *et al.* (EPA No. 329 822, incorporated herein by reference in its entirety) disclose a nucleic acid amplification process involving cyclically synthesizing single-stranded RNA ("ssRNA"), ssDNA, and double-stranded DNA (dsDNA), which may be used in accordance with the present invention. The ssRNA is a template for a first primer oligonucleotide, which is elongated by reverse transcriptase (RNA-dependent 15 DNA polymerase). The RNA is then removed from the resulting DNA:RNA duplex by the action of ribonuclease H (RNase H, an RNase specific for RNA in duplex with either DNA or RNA). The resultant ssDNA is a template for a second primer, which also includes the sequences of an RNA polymerase promoter (exemplified by T7 RNA polymerase) 5' to its homology to the template. This primer is then extended by DNA 20 polymerase (exemplified by the large "Klenow" fragment of *E. coli* DNA polymerase I), resulting in a double-stranded DNA ("dsDNA") molecule, having a sequence identical to that of the original RNA between the primers and having additionally, at one end, a promoter sequence. This promoter sequence can be used by the appropriate RNA polymerase to make many RNA copies of the DNA. These copies can then re-enter the cycle leading to very swift amplification. With proper choice of enzymes, this 25 amplification can be done isothermally without addition of enzymes at each cycle. Because of the cyclical nature of this process, the starting sequence can be chosen to be in the form of either DNA or RNA.

30 Miller *et al.* (PCT Application WO 89/06700, incorporated herein by reference in its entirety) disclose a nucleic acid sequence amplification scheme based on the hybridization of a promoter/primer sequence to a target single-stranded DNA ("ssDNA") followed by transcription of many RNA copies of the sequence. This

scheme is not cyclic, *i.e.*, new templates are not produced from the resultant RNA transcripts. Other amplification methods include "RACE" and "one-sided PCR" (Frohman, 1990, incorporated by reference).

5 Methods based on ligation of two (or more) oligonucleotides in the presence of
nucleic acid having the sequence of the resulting "di-oligonucleotide", thereby
amplifying the di-oligonucleotide, may also be used in the amplification step of the
present invention.

10 **D. Detection of Nucleic Acids**

Following any amplification, it may be desirable to separate the amplification product from the template and/or the excess primer. The detection of nucleic acids may be useful in identifying a cell mediated immune response, a patient who is infected with HPV and/or a patient who has a precancerous or cancerous growth.

15 In one embodiment, amplification products are separated by agarose, agarose-acrylamide or polyacrylamide gel electrophoresis using standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). Separated amplification products may be cut out and eluted from the gel for further manipulation. Using low melting point agarose gels, the separated band may be
20 removed by heating the gel, followed by extraction of the nucleic acid.

25 Separation of nucleic acids may also be effected by chromatographic techniques known in art. There are many kinds of chromatography which may be used in the practice of the present invention, including adsorption, partition, ion-exchange, hydroxylapatite, molecular sieve, reverse-phase, column, paper, thin-layer, and gas chromatography as well as HPLC.

30 In certain embodiments, the amplification products are visualized. A typical visualization method involves staining of a gel with ethidium bromide and visualization of bands under UV light. Alternatively, if the amplification products are integrally labeled with radio- or fluorometrically-labeled nucleotides, the separated amplification products can be exposed to x-ray film or visualized under the appropriate excitatory spectra.

In one embodiment, following separation of amplification products, a labeled nucleic acid probe is brought into contact with the amplified marker sequence. The probe preferably is conjugated to a chromophore but may be radiolabeled. In another 5 embodiment, the probe is conjugated to a binding partner, such as an antibody or biotin, or another binding partner carrying a detectable moiety.

In particular embodiments, detection is by Southern blotting and hybridization with a labeled probe. The techniques involved in Southern blotting are well known to 10 those of skill in the art (see Sambrook *et al.*, 1989). One example of the foregoing is described in U.S. Patent No. 5,279,721, incorporated by reference herein, which discloses an apparatus and method for the automated electrophoresis and transfer of nucleic acids. The apparatus permits electrophoresis and blotting without external manipulation of the gel and is ideally suited to carrying out methods according to the 15 present invention.

HPV infection can also be detected by catalyzed signal amplified colorimetric DNA in situ hybridization (CSAC- ISH) (GenPoint system, DAKO) (Birner *et al.*, 2001).

20 Other methods of nucleic acid detection that may be used in the practice of the instant invention are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,840,873, 5,843,640, 5,843,651, 5,846,708, 5,846,717, 5,846,726, 5,846,729, 5,849,487, 5,853,990, 5,853,992, 5,853,993, 5,856,092, 5,861,244, 5,863,732, 5,863,753, 5,866,331, 5,905,024, 25 5,910,407, 5,912,124, 5,912,145, 5,919,630, 5,925,517, 5,928,862, 5,928,869, 5,929,227, 5,932,413 and 5,935,791, each of which is incorporated herein by reference.

V. Cell Mediated Immunity (CMI):

30 Some methods of the claimed invention take advantage of T-cell responses by using them as a prognostic indicator of recurrence or as a preventative therapy against the development of CIN. More particularly, the methods assay for CMI responses to synthetic peptides from E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. The E6 and E7 genes of HPV 16 are frequently co-expressed and are most abundant viral transcripts in biopsies

from HPV 16 positive cervical carcinoma (Wettstein, 1990; Seedorf *et al.*, 1987). There is a strong evidence that co-expression of both E6 and E7 open reading frames is necessary and sufficient for efficient malignant transformation of a variety of malignant transformation of a variety of mammalian cells (Munger *et al.*, 1989). Furthermore, 5 continued expression of the E6 and E7 regions of the viral genome appears to be required to maintain the malignant phenotype (von Knebel Doeberitz *et al.*, 1988).

Most viral infections in immune competent mammals result in a cell-mediated immune response against the virus infected cells, the net effect being lysis of the cells. 10 During viral infections, viral proteins are synthesized in the cell for inclusion into new viral particles. Some of those endogenous viral proteins also are degraded and transported into the class I antigen presentation pathway, where the foreign antigens associate with a class I MHC molecule. This peptide-MHC complex then is transported to the surface of the cells where the foreign peptide is presented, in the context of self 15 MHC, to cytotoxic T cells (CTLs).

CTLs are antigen-specific effector cells. Lymphocyte surface marker studies can be used to assay for the presence of such T-cell surface markers using various 20 procedures that are known to one of ordinary skill in the art, including the use of immunofluorescence and flow cytometry. Upon recognition of the antigen as foreign, the CTLs lyse the target cell either through molecular interactions that induce apoptosis, or through secretion of pore forming enzymes that create holes in the plasma membrane disrupting its integrity. Thus, the CTL-mediated immune response plays a significant role in the clearance of virally-infected cells.

25 The ability of CTL effector cells to lyse virus-infected target cells is regulated by genetic and antigenic restrictions. Target cells must carry a viral antigen that is the same or equivalent to that which originally induced the CTLs. The target cell and the induced CTL must also bear the same MHC class I molecule.

A. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Proliferative responses are obtained from PBMCs. There are a few methods by which one can isolate PBMCs.

5 Monocytes are separated from non-rosetting cells by adherence to glass or polyethylene tissue culture vessels with or without a collagen coating in RPMI 1640 with 20% fetal calf serum (FCS), determined to be free of endotoxin, by the limulus amebocyte lysis assay; alternatively, autologous serum, or 10% AB+ normal donor serum may be used as a serum source. Non-adherent cells are removed by gentle
10 washing. Using these methods, adherent cells are usually >90% monocytes. If histological analysis suggests that there is significant contamination with T cells, B cells, or NK cells, these contaminating cells were removed by treatment with a cocktail of monoclonal antibodies, including anti-leu 5b, anti-leu 12 and anti-leu11b and baby rabbit complement (Rossen *et al.*, 1985).

15

Monocytes are released after 1 hr or more adherence at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, for suspension culture in Teflon coated vessels (Crowe *et al.*, 1987). In the case of cells plated on collagen coated surfaces, 1 mg/ml collagenase type 1 is added to the medium. Cells are released by incubation, for 15 min or more in calcium
20 and magnesium free Dulbecco's phosphate buffered saline containing 5% FCS and EDTA. Incubations with EDTA are done on ice. A disposable cell scraper is used to help dislodge the cells. The dislodged cells are washed x2 in calcium and magnesium free Dulbecco's PBS and cultured in RPMI 1640 and 10% AB+ human serum in Teflon; jars as described by Crowe *et al.* (1987).

25

Second strategy for isolating peripheral blood monocytes is Percoll density gradients to enrich the monocyte concentration in the non-rosetting population, according to Hester and Walker (1981). The monocyte-enriched population is treated with the monoclonal antibody cocktail, described above, and complement, to remove
30 contaminating residual T cells, B cells and NK cells, as necessary. Monocytes are recovered by this method are cultured directly in Teflon coated vessels, without the 'activation' which necessarily occurs when monocytes become surface adherent.

However, it is possible that the Percoll density gradient step, and/or the exposure antibodies and complement may also 'activate' these cells, possibly in a different manner.

5 A third approach to isolating peripheral blood monocytes is to take advantage of the refractile properties of monocytes to sort them on the basis of forward angle light scatter, using the high speed cell sorter function of the flow cytometer. This alternative has the potential to produce highly purified cells, which have not been influenced by contact with antibody or complement.

10

B. T-cell responses

T-cell responses can be measured by a variety of protocols that are known to one of ordinary skill in the art. Some of these assays are described in fuller detail below.

15

1. ³[H]thymidine incorporation assay

The proliferative responses of PBMCs from different samples can be determined by the standard ³[H]thymidine incorporation assay as described in published articles (Nehete, 1996; Nehete, 1995). The significance of T-cell proliferative responses to the individual E6 and E7 peptides (in terms of stimulation index [SI]) can be calculated as the fold increase of ³[H] thymidine incorporation by cells exposed to the peptide over that by the control to which no peptide was added. An SI value of at least 2.0, including at least about 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0 or more, which are considered positive responses. Generally, 25 an SI value is calculated by measuring the amount of radioactivity (cpm) in media from cells incubated with the peptide(s) and dividing by the amount of radioactivity in media from cells not incubated with peptide(s) (media alone).

2. Lysis Using ⁵¹[Cr]

30 Cell-mediated lympholysis (CML) can be used as an indication of T-cell response. Target cells can be labeled with radioactive chromium-51 (⁵¹[Cr]) prior to

exposure to effector cells. The amount of ^{51}Cr released into the media is proportional to the level of cell-mediated lysis.

3. γ -Interferon Production

5 Interferon gamma (γ -interferon), also called type II or immune interferon, is produced by T cells and NK cells. It is critical for the development of helper T cells. Because it is the primary macrophage-activating factor, it is a strong cytokine in cell-mediated immunity. γ -interferon increases the levels of MHC class I and MHC class II expression, which improves antigen presentation and other cognitive reactions.
10 Furthermore, it amplifies the effects of TNF- α and raises expression levels of adhesion molecules on the surface of vascular endothelial cells, which leads to T cell adhesion and extravasation.

4. Tetramer Assay

15 Tetramer assays are well known to those of skill in the art. *See* Altman, 1996.

5. Cytokine Production

Cytokines are proteins that play important roles in the regulation of immune responses as well as in the differentiation pathways of different cell types. They have a
20 critical function in T cell regulation and development, and these include γ -interferon, interleukin 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, lymphotxin, MIF, TGF- β , TNF- α , and other chemotactic cytokines. The TH1 cytokines comprise IL-2, interferon (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , or TNF- β , IL-3, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, or IL-18. TH2 cytokines include IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13, IL-14 or IL-18. Assays for cytokines are well known in the art of which some are disclosed herein

6. Cytokine analysis

Measurement of TH1 and TH2 cytokines can be done by ELISA,
30 Radioimmunoassay (RIA) or Flow cytometry (FACS). The steps of various useful immunodetection methods have been described in the scientific literature, such as, *e.g.*,

Doolittle and Ben-Zeev, 1999; Gulbis and Galand, 1993; and De Jager *et al.*, 1993, each incorporated herein by reference.

7. Immunoassays

5 In still further embodiments, the present invention concerns immunodetection methods for binding, purifying, removing, quantifying and/or otherwise generally detecting biological components protein(s), polypeptide(s) or peptide(s). In some embodiments immunoassays are used to detect a cell mediated immune response to HPV peptides. Some immunodetection methods include enzyme linked immunosorbent
10 assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), immunoradiometric assay, fluoroimmunoassay, chemiluminescent assay, bioluminescent assay, and Western blot to mention a few. The steps of various useful immunodetection methods have been described in the scientific literature, such as, *e.g.*, Doolittle MH and Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B and Galand P, 1993; and De Jager R *et al.*, 1993, each incorporated herein by
15 reference.

In general, the immunobinding methods include obtaining a sample suspected of containing protein, polypeptide and/or peptide, and contacting the sample with an antibody in accordance with the present invention, as the case may be, under conditions effective to allow the formation of immunocomplexes. For example, in the present invention, E6 and/or E7 peptides may be used to challenge the cells to elicit a T-cell response. The antibodies may be directed to cytokines produced as an outcome of the cell mediated response or to cytokine receptors on T-cells. Alternatively, an antibody against CD69 or CD45, or both, may be employed.

25 These methods include methods for purifying a protein, polypeptide and/or peptide from organelle, cell, tissue or organism's samples. In these instances, the antibody removes the protein, polypeptide and/or peptide component from a sample. The antibody will preferably be linked to a solid support, such as in the form of a
30 column matrix, and the sample suspected of containing the protein, polypeptide and/or peptide antigenic component will be applied to the immobilized antibody. The unwanted components will be washed from the column, leaving the antigen immunocomplexed to the immobilized antibody to be eluted.

In terms of cytokine response detection, the biological sample analyzed may be any sample that is suspected of containing a cytokine, such as, for example, a tissue section or specimen, a homogenized tissue extract, a cell, an organelle, separated and/or 5 purified forms of any of the above antigen-containing compositions, or even any biological fluid that comes into contact with the cell or tissue, including blood and/or serum, although tissue samples or extracts are preferred.

Contacting the chosen biological sample with the antibody under effective 10 conditions and for a period of time sufficient to allow the formation of immune complexes (primary immune complexes) is generally a matter of simply adding the antibody composition to the sample and incubating the mixture for a period of time long enough for the antibodies to form immune complexes with, *i.e.*, to bind to, any antigens present. After this time, the sample-antibody composition, such as a tissue section, 15 ELISA plate, dot blot or western blot, will generally be washed to remove any non-specifically bound antibody species, allowing only those antibodies specifically bound within the primary immune complexes to be detected.

In general, the detection of immunocomplex formation is well known in the art 20 and may be achieved through the application of numerous approaches. These methods are generally based upon the detection of a label or marker, such as any of those radioactive, fluorescent, biological and enzymatic tags. U.S. Patents concerning the use of such labels include 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 25 4,275,149 and 4,366,241, each incorporated herein by reference. Of course, one may find additional advantages through the use of a secondary binding ligand such as a second antibody and/or a biotin/avidin ligand binding arrangement, as is known in the art.

The antigen antibody employed in the detection may itself be linked to a 30 detectable label, wherein one would then simply detect this label, thereby allowing the amount of the primary immune complexes in the composition to be determined. Alternatively, the first antibody that becomes bound within the primary immune complexes may be detected by means of a second binding ligand that has binding

affinity for the antibody. In these cases, the second binding ligand may be linked to a detectable label. The second binding ligand is itself often an antibody, which may thus be termed a "secondary" antibody. The primary immune complexes are contacted with the labeled, secondary binding ligand, or antibody, under effective conditions and for a 5 period of time sufficient to allow the formation of secondary immune complexes. The secondary immune complexes are then generally washed to remove any non-specifically bound labeled secondary antibodies or ligands, and the remaining label in the secondary immune complexes is then detected.

10 Further methods include the detection of primary immune complexes by a two step approach. A second binding ligand, such as an antibody, that has binding affinity for the antibody is used to form secondary immune complexes, as described above. After washing, the secondary immune complexes are contacted with a third binding ligand or antibody that has binding affinity for the second antibody, again under 15 effective conditions and for a period of time sufficient to allow the formation of immune complexes (tertiary immune complexes). The third ligand or antibody is linked to a detectable label, allowing detection of the tertiary immune complexes thus formed. This system may provide for signal amplification if this is desired.

20 One method of immunodetection designed by Charles Cantor uses two different antibodies. A first step biotinylated, monoclonal or polyclonal antibody is used to detect the target antigen(s), and a second step antibody is then used to detect the biotin attached to the complexed biotin. In that method the sample to be tested is first incubated in a solution containing the first step antibody. If the target antigen is 25 present, some of the antibody binds to the antigen to form a biotinylated antibody/antigen complex. The antibody/antigen complex is then amplified by incubation in successive solutions of streptavidin (or avidin), biotinylated DNA, and/or complementary biotinylated DNA, with each step adding additional biotin sites to the antibody/antigen complex. The amplification steps are repeated until a suitable level of 30 amplification is achieved, at which point the sample is incubated in a solution containing the second step antibody against biotin. This second step antibody is labeled, as for example with an enzyme that can be used to detect the presence of the

antibody/antigen complex by histoenzymology using a chromogen substrate. With suitable amplification, a conjugate can be produced which is macroscopically visible.

Another known method of immunodetection takes advantage of the immuno-PCR (Polymerase Chain Reaction) methodology. The PCR method is similar to the Cantor method up to the incubation with biotinylated DNA, however, instead of using multiple rounds of streptavidin and biotinylated DNA incubation, the DNA/biotin/streptavidin/antibody complex is washed out with a low pH or high salt buffer that releases the antibody. The resulting wash solution is then used to carry out a PCR reaction with suitable primers with appropriate controls. The method provides a useful means of identifying the population of women that are infected with HPV having cervical cancer or CIN.

Another means of determining whether a person infected by HPV has a precancerous growth or cancerous growth is by hybrid capture as shown in Birner *et al.* 2001 and Clavel *et al.*, 2000, both incorporated by reference.

The immunodetection methods of the present invention have evident utility in the diagnosis and prognosis of conditions such as various diseases wherein a specific is expressed, such as a cancer specific gene product, *etc.* Here, a biological and/or clinical sample suspected of being infected with HPV that could lead to CIN is used. However, these embodiments also have applications to non-clinical samples, such as in the titering of antigen or antibody samples, for example in the selection of hybridomas.

25 a. **ELISA**

As detailed above, immunoassays, in their most simple and/or direct sense, are binding assays. Certain preferred immunoassays are the various types of enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) and/or radioimmunoassays (RIA) known in the art. Immunohistochemical detection using tissue sections is also particularly useful. However, it will be readily appreciated that detection is not limited to such techniques, and/or western blotting, dot blotting, FACS analyses, and/or the like may also be used.

In one exemplary ELISA, the antibodies directed to the product of cell mediated immune response(that comprises the antigen), in the present invention, are immobilized onto a selected surface exhibiting protein affinity, such as a well in a polystyrene microtiter plate. Then, a test composition suspected of containing the antigen, such as a 5 clinical sample, is added to the wells. After binding and/or washing to remove non-specifically bound immune complexes, the bound antigen may be detected. Detection is generally achieved by the addition of another antibody that is linked to a detectable label. This type of ELISA is a simple "sandwich ELISA". Detection may also be achieved by the addition of a second antibody, followed by the addition of a third 10 antibody that has binding affinity for the second antibody, with the third antibody being linked to a detectable label.

In another exemplary ELISA, the samples suspected of containing the antigen are immobilized onto the well surface and/or then contacted with the antibodies 15 produced against the product of cell mediated immune response (that comprises the antigen). After binding and/or washing to remove non-specifically bound immune complexes, the bound antibodies are detected. Where the initial antibodies are linked to a detectable label, the immune complexes may be detected directly. Again, the immune complexes may be detected using a second antibody that has binding affinity for the 20 first antibody, with the second antibody being linked to a detectable label.

Another ELISA in which the antigens are immobilized, involves the use of antibody competition in the detection. In this ELISA, labeled antibodies against an antigen are added to the wells, allowed to bind, and/or detected by means of their label. 25 The amount of an antigen in an unknown sample is then determined by mixing the sample with the labeled antibodies against the antigen during incubation with coated wells. The presence of an antigen in the sample acts to reduce the amount of antibody against the antigen available for binding to the well and thus reduces the ultimate signal. This is also appropriate for detecting antibodies against an antigen in an 30 unknown sample, where the unlabeled antibodies bind to the antigen-coated wells and also reduces the amount of antigen available to bind the labeled antibodies.

Irrespective of the format employed, ELISAs have certain features in common, such as coating, incubating and binding, washing to remove non-specifically bound species, and detecting the bound immune complexes. These are described below.

5 In coating a plate with either antigen or antibody, one will generally incubate the wells of the plate with a solution of the antigen or antibody, either overnight or for a specified period of hours. The wells of the plate will then be washed to remove incompletely adsorbed material. Any remaining available surfaces of the wells are then "coated" with a nonspecific protein that is antigenically neutral with regard to the test 10 antisera. These include bovine serum albumin (BSA), casein or solutions of milk powder. The coating allows for blocking of nonspecific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by nonspecific binding of antisera onto the surface.

15 In ELISAs, it is probably more customary to use a secondary or tertiary detection means rather than a direct procedure. Thus, after binding of a protein or antibody to the well, coating with a non-reactive material to reduce background, and washing to remove unbound material, the immobilizing surface is contacted with the 20 biological sample to be tested under conditions effective to allow immune complex (antigen/antibody) formation. Detection of the immune complex then requires a labeled secondary binding ligand or antibody, and a secondary binding ligand or antibody in conjunction with a labeled tertiary antibody or a third binding ligand.

25 "Under conditions effective to allow immune complex (antigen/antibody) formation" means that the conditions preferably include diluting the antigens and/or antibodies with solutions such as BSA, bovine gamma globulin (BGG) or phosphate buffered saline (PBS)/Tween. These added agents also tend to assist in the reduction of nonspecific background.

30 The "suitable" conditions also mean that the incubation is at a temperature or for a period of time sufficient to allow effective binding. Incubation steps are typically from about 1 to 2 to 4 hours or so, at temperatures preferably on the order of 25°C to 27°C, or may be overnight at about 4°C or so.

Following all incubation steps in an ELISA, the contacted surface is washed so as to remove non-complexed material. A preferred washing procedure includes washing with a solution such as PBS/Tween, or borate buffer. Following the formation 5 of specific immune complexes between the test sample and the originally bound material, and subsequent washing, the occurrence of even minute amounts of immune complexes may be determined.

To provide a detecting means, the second or third antibody will have an 10 associated label to allow detection. Preferably, this will be an enzyme that will generate color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Thus, for example, one will desire to contact or incubate the first and second immune complex with a urease, glucose oxidase, alkaline phosphatase or hydrogen peroxidase-conjugated antibody for a period of time and under conditions that favor the 15 development of further immune complex formation (e.g., incubation for 2 hours at room temperature in a PBS-containing solution such as PBS-Tween).

After incubation with the labeled antibody, and subsequent to washing to remove unbound material, the amount of label is quantified, e.g., by incubation with a 20 chromogenic substrate such as urea, or bromocresol purple, or 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), or H₂O₂, in the case of peroxidase as the enzyme label. Quantification is then achieved by measuring the degree of color generated, e.g., using a visible spectra spectrophotometer.

25 **b. Immunohistochemistry**

The antibodies may also be used in conjunction with both fresh-frozen and/or 30 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks prepared for study by immunohistochemistry (IHC). The method of preparing tissue blocks from these particulate specimens has been successfully used in previous IHC studies of various prognostic factors, and/or is well known to those of skill in the art (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

Briefly, frozen-sections may be prepared by rehydrating 50 ng of frozen "pulverized" tissue at room temperature in phosphate buffered saline (PBS) in small plastic capsules; pelleting the particles by centrifugation; resuspending them in a viscous embedding medium (OCT); inverting the capsule and/or pelleting again by 5 centrifugation; snap-freezing in -70°C isopentane; cutting the plastic capsule and/or removing the frozen cylinder of tissue; securing the tissue cylinder on a cryostat microtome chuck; and/or cutting 25-50 serial sections.

Permanent-sections may be prepared by a similar method involving rehydration 10 of the 50 mg sample in a plastic microfuge tube; pelleting; resuspending in 10% formalin for 4 hours fixation; washing/pelleting; resuspending in warm 2.5% agar; pelleting; cooling in ice water to harden the agar; removing the tissue/agar block from the tube; infiltrating and/or embedding the block in paraffin; and/or cutting up to 50 serial permanent sections.

15

c. Fluorescent Assorted Cell Spectroscopy:

Proteins may also be detected by flow cytometry as described in Fujishima et al, 1996. In the practice of the method, the cells are fixed and then incubated with a monoclonal antibody against the expressed protein to be detected. The bound antibodies 20 are then contacted with labeled anti-IgG for example for detection. A typical label is FITC. The fluorescent intensity may then be measured by flow cytometer such as Ortho Cytron, Ortho diagnostics, or FACScan; Becton Dickinson.

FACS permits the separation of sub-populations of cells initially on the basis of 25 their light scatter properties as they pass through a laser beam. The forward light scatter (FALS) is related to cell size and the right angle light scatter to cell density, cell contour and nucleo-cytoplasmic ratio. Since cells are tagged with fluorescent labeled antibody they can then be further characterized by fluorescence intensity and positive and negative windows set on the FACS to collect bright fluorescence and low fluorescence cells. Cells 30 are sorted at a flow rate of about 3000 cells per second and collected in positive and negative cells.

d. Western Blots

The compositions of the present invention may find use in immunoblot or western blot analysis. The peptides may be used to challenge the cells to produce cytokines. The antibodies of the present invention may be used as high-affinity primary reagents for the identification of proteins immobilized onto a solid support matrix, such as 5 nitrocellulose, nylon or combinations thereof. In conjunction with immunoprecipitation, followed by gel electrophoresis, these may be used as a single step reagent for use in detecting antigens against which secondary reagents used in the detection of the antigen cause an adverse background. This is especially useful when the antigens studied are immunoglobulins (precluding the use of immunoglobulins 10 binding bacterial cell wall components), the antigens studied cross-react with the detecting agent, or they migrate at the same relative molecular weight as a cross-reacting signal.

15 Immunologically-based detection methods for use in conjunction with Western blotting include enzymatically-, radiolabel-, or fluorescently-tagged secondary antibodies against the protein moiety are considered to be of particular use in this regard.

20 **VIII. Immunotherapy**

Immunotherapy, as an approach to infection or cancer treatment, is based on the premise that tumor cells bear antigens provoking the production of specific antibodies and/or cytotoxic T lymphocytes (CTL).

25 **A. Types of Immunotherapies:**

Immunotherapies of cancer can broadly be classified as adoptive, passive and active, as described in the following sections.

1. **Passive Immunotherapy**

30 A number of different approaches for passive immunotherapy exist. They may be broadly categorized into the following: injection of antibodies alone; injection of antibodies coupled to toxins or chemotherapeutic agents; injection of antibodies

coupled to radioactive isotopes; injection of anti-idiotype antibodies; and finally, purging of tumor cells in bone marrow.

Preferably, human monoclonal antibodies, are employed in passive immunotherapy, as they produce few or no side effects in the patient. However, their application is somewhat limited by their scarcity and have so far only been administered intralesionally. Human monoclonal antibodies to ganglioside antigens have been administered intralesionally to patients suffering from cutaneous recurrent melanoma (Irie & Morton, 1986). Regression was observed in six out of ten patients, following, daily or weekly, intralesional injections. In another study, moderate success was achieved from intralesional injections of two human monoclonal antibodies (Irie *et al.*, 1989).

It may be favorable to administer more than one monoclonal antibody directed against two different antigens or even antibodies with multiple antigen specificity. Treatment protocols also may include administration of lymphokines or other immune enhancers as in Bajorin *et al.* (1988). The development of human monoclonal antibodies is described in further detail elsewhere in the specification.

20 2. Active Immunotherapy

In active immunotherapy, an antigenic peptide, polypeptide or protein, or an autologous or allogeneic tumor cell composition or "vaccine" is administered, generally with a distinct bacterial adjuvant (Ravindranath & Morton, 1991; Morton & Ravindranath, 1996; Morton *et al.*, 1992; Mitchell *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1993). 25 In melanoma immunotherapy, those patients who elicit high IgM response often survive better than those who elicit no or low IgM antibodies (Morton *et al.*, 1992). IgM antibodies are often transient antibodies and the exception to the rule appears to be anti-ganglioside or anticarbohydrate antibodies.

30 3. Adoptive Immunotherapy

In adoptive immunotherapy, the patient's circulating lymphocytes, or tumor infiltrated lymphocytes, are isolated *in vitro*, activated by lymphokines such as IL-2 or transduced with genes for tumor necrosis, and readministered (Rosenberg *et al.*, 1988;

1989). To achieve this, one would administer to an animal, or human patient, an immunologically effective amount of activated lymphocytes in combination with an adjuvant-incorporated antigenic peptide composition as described herein. The activated lymphocytes will most preferably be the patient's own cells that were earlier isolated 5 and from a blood or tumor sample and activated (or "expanded") *in vitro*. This form of immunotherapy has produced several cases of regression of melanoma and renal carcinoma, but the percentage of responders were few compared to those who did not respond.

10 **B. Vaccination**

15 The invention includes the use of immunotherapy using E6 and E7 peptides from HPV to induce or improve a cell-mediated immune response. This has particular significance for a patient who exhibits no or a low CMI response to E6 and/or E7 peptides from HPV. Peptides or polypeptides that comprises all or part of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 to 19 may be clinically very important as an effective vaccine for both the treatment and prevention of HPV-infection, including the prevention of HPV-associated pre-cancerous or cancerous growths, in inducing cell-mediated immune responses in patients.

20 Once produced, synthesized and/or purified, the peptides and polypeptides of the present invention may be prepared as a vaccine for administration to a patient. It also is contemplated that the peptides, polypeptides and vaccines of the invention may be combined with other vaccines or vaccine components, such as other additional 25 antigens, to stimulate an immune response to the antigens. In this embodiment, preferred additional antigens are those implicated as being specific or preferentially expressed in cancers and hyperproliferative conditions. Additional antigens and vaccines that are contemplated for combination with the peptides, polypeptides and vaccines of the present invention included those described in U.S. patents 5,840,317 and 5,882,654, incorporated herein by reference.

30

One of ordinary skill in the art would be able to envision an array of potential therapeutic agents and delivery protocols for testing. For example, the potential anti-HPV and anti-tumor agents may be natural products or synthetic molecules of human

design. Moreover, the model provides a vehicle for selection of effective agents from among a battery of known and novel compounds. The dosage and delivery mode of any particular potential therapeutic agent can be determined on the basis of well established guidelines for preparing pharmaceutically active compositions. The test compounds 5 may be administered, for example, intravenously, intradermally, intramuscularly, topically, orally, or by any other pharmaceutically effective route. Using the animals produced by the method of the present invention, an investigator can now, for the first time, evaluate prophylactic and therapeutic agents against high risk human papillomavirus-induced disease, possibly including virus replication and transmission. 10 These may include, among others, chemical-type pharmaceuticals, genetic therapies, antisense inhibitory strategies, or prophylactic or therapeutic vaccination. Many methods of evaluating the results of laboratory tests of proposed therapeutics are known.

15 Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG 20 (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. In addition to use in immunotherapies of the invention, adjuvants may be used to enhance detection of a cell-mediated immune response in the context of the present invention.

C. Targeted Delivery Systems

25 To test for a virus-specific T cell response, in some embodiments of the claimed invention, HPV polypeptides or peptides can be delivered to target cells to express fragments of the viral protein on their surfaces for the purpose of eliciting a T-cell response. There are various methods of delivery including perfusion, transfection of an expression construct, viral vectors, and other means disclosed below.

30

1. Transfer by Perfusion

An embodiment of the claimed invention transfers peptides or a combination of peptides into cells via perfusion. Continuous perfusion of an expression construct or a

viral construct also is contemplated. The amount of construct or peptide delivered in continuous perfusion can be determined by the amount of uptake that is desirable. The present invention discloses an example of perfusion whereby a cell culture with an initial concentration of 10^6 cells/ml can first be labeled, washed, and then incubated with 100 μ g of synthetic peptide for two hours.

2. Expression Vectors

The delivery of therapeutic peptides can be accomplished using expression vectors. In the present embodiment of the invention, HPV polypeptides and peptides are delivered to target cells through the use of expression constructs. Throughout this application, the term "expression construct" is meant to include any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for an HPV polypeptide. A "viral vector" refers to an expression construct that is derived primarily from viral sequences. In order for the construct to effect expression, the polynucleotide encoding the HPV polynucleotide will be under the transcriptional control of a promoter. A "promoter" refers to a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the host cell, or by introduced synthetic machinery, that is required to initiate the specific transcription of a gene. The phrase "under transcriptional control" means that the promoter is in the correct location in relation to the polynucleotide to control RNA polymerase initiation and expression of the polynucleotide.

The term promoter will be used herein to refer to a group of transcriptional control modules that are clustered around the initiation site for RNA polymerase II. Much of the thinking about how promoters are organized derives from analyses of several viral promoters, including those for the HSV thymidine kinase (tk) and SV40 early transcription units. These studies, augmented by more recent work, have shown that promoters are composed of discrete functional modules, each consisting of approximately 7-20 bp of DNA, and containing one or more recognition sites for transcriptional activator or repressor proteins.

30

At least one module in each promoter functions to position the start site for RNA synthesis. The best known example of this is the TATA box, but in some promoters lacking a TATA box, such as the promoter for the mammalian terminal

deoxynucleotidyl transferase gene and the promoter for the SV40 late genes, a discrete element overlying the start site itself helps to fix the place of initiation.

Additional promoter elements regulate the frequency of transcriptional initiation. Typically, these are located in the region 30-110 bp upstream of the start site, although a number of promoters have recently been shown to contain functional elements downstream of the start site as well. The spacing between promoter elements frequently is flexible, so that promoter function is preserved when elements are inverted or moved relative to one another. In the *tk* promoter, the spacing between promoter elements can be increased to 50 bp apart before activity begins to decline. Depending on the promoter, it appears that individual elements can function either cooperatively or independently to activate transcription.

The particular promoter that is employed to control the expression of an HPV polynucleotide is not believed to be critical, so long as it is capable of expressing the polynucleotide in the targeted cell. Thus, where a human cell is targeted, it is preferable to position the polynucleotide coding region adjacent to and under the control of a promoter that is capable of being expressed in a human cell. Generally speaking, such a promoter might include either a human or viral promoter. The use of other viral or mammalian cellular or bacterial phage promoters, which are well-known in the art, to achieve expression of polynucleotides is contemplated as well, provided that the levels of expression are sufficient to induce a T-cell response.

By employing a promoter with well-known properties, the level and pattern of expression of a polynucleotide following transfection can be optimized. For example, selection of a promoter that is active in specific cells, such as tyrosinase (melanoma), alpha-fetoprotein and albumin (liver tumors), CC10 (lung tumor) and prostate-specific antigen (prostate tumor) will permit tissue-specific expression of HPV polynucleotides. Further, selection of a promoter that is regulated in response to specific physiologic signals can permit inducible expression of the HPV polypeptide construct.

Enhancers were originally detected as genetic elements that increased transcription from a promoter located at a distant position on the same molecule of

DNA. This ability to act over a large distance had little precedent in classic studies of prokaryotic transcriptional regulation. Subsequent work showed that regions of DNA with enhancer activity are organized much like promoters. That is, they are composed of many individual elements, each of which binds to one or more transcriptional 5 proteins.

The basic distinction between enhancers and promoters is operational. An enhancer region as a whole must be able to stimulate transcription at a distance; this need not be true of a promoter region or its component elements. On the other hand, a 10 promoter must have one or more elements that direct initiation of RNA synthesis at a particular site and in a particular orientation, whereas enhancers lack these specificities. Promoters and enhancers are frequently overlapping and contiguous, often seeming to have a very similar modular organization.

15 Additionally any promoter/enhancer combination (as per the Eukaryotic Promoter Data Base EPDB) could also be used to drive expression of an HPV polynucleotide construct. Use of a T3, T7 or SP6 cytoplasmic expression system is another possible embodiment. Eukaryotic cells can support cytoplasmic transcription from certain bacteriophage promoters if the appropriate bacteriophage polymerase is 20 provided, either as part of the delivery complex or as an additional genetic expression vector.

In certain embodiments of the invention, the delivery of an expression vector in 25 a cell may be identified *in vitro* or *in vivo* by including a marker in the expression vector. The marker would result in an identifiable change to the transfected cell permitting identification of expression. Usually, the inclusion of a drug selection marker aids in cloning and in the selection of transformants. Alternatively, enzymes such as herpes simplex virus thymidine kinase (tk) (eukaryotic) or chloramphenicol 30 acetyltransferase (CAT) (prokaryotic) may be employed. Immunologic markers also can be employed. The selectable marker employed is not believed to be important, so long as it is capable of being expressed along with the polynucleotide encoding an HPV polypeptide. Further examples of selectable markers are well known to one of skill in the art.

One will typically include a polyadenylation signal to effect proper polyadenylation of the transcript. The nature of the polyadenylation signal is not believed to be crucial to the successful practice of the invention, and any such sequence 5 may be employed. The inventor has employed the SV40 polyadenylation signal in that it was convenient and known to function well in the target cells employed. Also contemplated as an element of the expression construct is a terminator. These elements can serve to enhance message levels and to minimize read through from the construct into other sequences.

10

3. Viral Vectors

In some embodiments of the present invention, an expression construct comprises a virus or engineered construct derived from a viral genome. The ability of certain viruses to enter cells *via* receptor-mediated endocytosis and, in some cases, 15 integrate into the host cell chromosomes, have made them attractive candidates for gene transfer in to mammalian cells. However, because it has been demonstrated that direct uptake of naked DNA, as well as receptor-mediated uptake of DNA complexes (discussed below), expression vectors need not be viral but, instead, may be any plasmid, cosmid, or phage construct that is capable of supporting expression of encoded 20 genes in mammalian cells, such as pUC or BluescriptTM plasmid series.

a. Retroviruses

The retrovirus class is subdivided into three major groups: oncoviruses, such as murine leukemia virus; lentiviruses, and foamy viruses (spumaviruses). Retroviruses 25 are single-stranded RNA viruses characterized by an ability to convert their RNA to double-stranded DNA in infected cells by a process of reverse-transcription (Coffin, 1990). The resulting DNA then stably integrates into cellular chromosomes as a provirus and directs synthesis of viral proteins. The integration results in the retention of the viral gene sequences in the recipient cell and its descendants.

30 The retroviral genome contains three genes - *gag*, *pol*, and *env* - that encode capsid proteins, polymerase enzyme, and envelope components, respectively. A sequence found upstream from the *gag* gene, termed Ψ , functions as a signal for packaging of the genome into virions. Two long terminal repeat (LTR) sequences are

present at the 5' and 3' ends of the viral genome. These contain strong promoter and enhancer sequences and are also required for integration in the host cell genome (Coffin, 1990).

5 In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid encoding an HPV polypeptide is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. Alternatively, a mutated HPV virus that is incapable of leading to HPV infection can be used. In order to produce virions, a packaging cell line containing the *gag*, *pol* and *env* genes but without the LTR and Ψ components is constructed (Mann, 1983). When a recombinant plasmid containing a human cDNA, together with the retroviral LTR and Ψ sequences, is introduced into this cell line (by calcium phosphate precipitation for example), the Ψ sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media (Nicolas and Rubenstein, 1988; Mann, 1983).
10 The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are able to infect a broad variety of cell types. However, integration and stable expression require the division of host cells (Paskind, 1975).

15 20 A novel approach designed to allow specific targeting of retrovirus vectors was recently developed based on the chemical modification of a retrovirus by the chemical addition of lactose residues to the viral envelope. This modification could permit the specific infection of hepatocytes *via* sialoglycoprotein receptors.

25 30 A different approach to targeting of recombinant retroviruses was designed in which biotinylated antibodies against a retroviral envelope protein and against a specific cell receptor were used. The antibodies were coupled *via* the biotin components by using streptavidin (Roux, 1989). Using antibodies against major histocompatibility complex class I and class II antigens, they demonstrated the infection of a variety of human cells that bore those surface antigens with an ecotropic virus *in vitro* (Roux, 1989).

b. Adenoviruses

Human adenoviruses are double-stranded DNA tumor viruses with genome sizes of approximate 36 kb (Tooze, 1981). As a model system for eukaryotic gene expression, adenoviruses have been widely studied and well characterized, which makes them an attractive system for development of adenovirus as a gene transfer system. This group of viruses is relatively simple to grow and manipulate, and exhibits a broad host range *in vitro* and *in vivo*. In lytically infected cells, adenoviruses are capable of shutting off host protein synthesis, directing cellular machineries to synthesize large quantities of viral proteins, and producing copious amounts of virus.

10

The E1 region of the genome includes E1A and E1B, which encode proteins responsible for transcription regulation of the viral genome, as well as a few cellular genes. E2 expression, including E2A and E2B, allows synthesis of viral replicative functions, *e.g.* DNA-binding protein, DNA polymerase, and a terminal protein that primes replication. E3 gene products prevent cytolysis by CTLs and tumor necrosis factor and appear to be important for viral propagation. Functions associated with the E4 proteins include DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. The late gene products include most of the virion capsid proteins, and these are expressed only after most of the processing of a single primary transcript from the major late promoter has occurred. The major late promoter (MLP) exhibits high efficiency during the late phase of the infection (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991).

As only a small portion of the viral genome appears to be required *in cis* (Tooze, 1981), adenovirus-derived vectors offer excellent potential for the substitution of large DNA fragments when used in connection with cell lines such as 293 cells. Ad5-transformed human embryonic kidney cell lines (Graham, 1977) have been developed to provide the essential viral proteins *in trans*. The characteristics of adenoviruses render them good candidates for use in targeting cells *in vivo* (Grunhaus and Horwitz, 1992).

30

Particular advantages of an adenovirus system for delivering foreign proteins to a cell include (i) the ability to substitute relatively large pieces of viral DNA by foreign DNA; (ii) the structural stability of recombinant adenoviruses; (iii) the safety of

adenoviral administration to humans; and (iv) lack of any known association of adenoviral infection with cancer or malignancies; (v) the ability to obtain high titers of the recombinant virus; and (vi) the high infectivity of adenovirus.

5 In general, adenovirus gene transfer systems are based upon recombinant, engineered adenovirus that is rendered replication-incompetent by deletion of a portion of its genome, such as E1, and yet still retains its competency for infection. Sequences encoding relatively large foreign proteins can be expressed when additional deletions are made in the adenovirus genome. For example, adenoviruses deleted in both E1 and
10 E3 regions are capable of carrying up to 10 kilobases of foreign DNA and can be grown to high titers in 293 cells (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991). Surprisingly persistent expression of transgenes following adenoviral infection has also been reported.

15 **c. AAV Vectors**

Adeno-associated virus (AAV) is an attractive vector system for use in the cell transduction of the present invention as it has a high frequency of integration and it can infect nondividing cells, thus making it useful for delivery of genes into mammalian cells, for example, in tissue culture (Muzychka, 1992) or *in vivo*. AAV has a broad host
20 range for infectivity (Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Laughlin, 1986; Tratschin, 1984). Details concerning the generation and use of rAAV vectors are described in U.S. Patent No. 5,139,941 and U.S. Patent No. 4,797,368, each incorporated herein by reference.

25 Studies demonstrating the use of AAV in gene delivery include LaFace *et al.* (1988); Zhou *et al.* (1993); Flotte *et al.* (1993); and Walsh *et al.* (1994). Recombinant AAV vectors have been used successfully for *in vitro* and *in vivo* transduction of marker genes (Kaplitt, 1994; Shelling and Smith, 1994; Yoder, 1994; Zhou, 1994; Samulski, 1989; Lebkowski, 1988; McLaughlin, 1988; Tratschin, 1985; Hermonat and
30 Muzychka, 1984) and genes involved in human diseases (Luo, 1994; Walsh, 1994; Wei, 1994; Flotte, 1992; Ohi, 1990). Recently, an AAV vector has been approved for phase I human trials for the treatment of cystic fibrosis.

AAV is a dependent parvovirus in that it requires coinfection with another virus (either adenovirus or a member of the herpes virus family) to undergo a productive infection in cultured cells (Muzychka, 1992). In the absence of coinfection with helper virus, the wild type AAV genome integrates through its ends into human chromosome 5 where it resides in a latent state as a provirus (Samulski, 1991; Kotin, 1990). rAAV, however, is not restricted to chromosome 19 for integration unless the AAV Rep protein is also expressed (Shelling and Smith, 1994). When a cell carrying an AAV provirus is superinfected with a helper virus, the AAV genome is "rescued" from the chromosome or from a recombinant plasmid, and a normal productive infection is 10 established (Muzychka, 1992; Kotin, 1990; Samulski, 1989; McLaughlin, 1988).

Typically, recombinant AAV (rAAV) virus is made by cotransfected a plasmid containing the gene of interest flanked by the two AAV terminal repeats (McLaughlin, 15 1988; Samulski, 1989; each incorporated herein by reference) and an expression plasmid containing the wild type AAV coding sequences without the terminal repeats, for example pIM45 (McCarty, 1991; incorporated herein by reference). The cells are also infected or transfected with adenovirus or plasmids carrying the adenovirus genes required for AAV helper function. rAAV virus stocks made in such fashion are contaminated with adenovirus which must be physically separated from the rAAV 20 particles (for example, by cesium chloride density centrifugation). Alternatively, adenovirus vectors containing the AAV coding regions or cell lines containing the AAV coding regions and some or all of the adenovirus helper genes could be used (Clark, 1995; Yang, 1994). Cell lines carrying the rAAV DNA as an integrated provirus can also be used (Flotte, 1995).

25

d. Other Viral Vectors as Expression Constructs

Other viral vectors may be employed as expression constructs in the present invention. Vectors derived from viruses such as vaccinia virus (Coupar, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986), and herpes viruses may also be 30 employed. These viruses offer several attractive features for various mammalian cells (Horwitz, 1990; Friedmann, 1989; Coupar, 1988; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986).

WO 03/008649

PCT/US02/23198

65

With the recent recognition of defective hepatitis B viruses, new insight was gained into the structure-function relationship of different viral sequences. *in vitro* studies showed that the virus could retain the ability for helper-dependent packaging and reverse transcription despite the deletion of up to 80% of its genome (Horwitz, 1990). This suggested that large portions of the genome could be replaced with foreign genetic material. The hepatotropism and persistence (integration) were particularly attractive properties for liver-directed gene transfer. Chang (1991) recently introduced the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene into duck hepatitis B virus genome in the place of the polymerase, surface, and pre-surface coding sequences. It was cotransfected with wild-type virus into an avian hepatoma cell line. Culture media containing high titers of the recombinant virus were used to infect primary duckling hepatocytes. Stable CAT gene expression was detected for at least 24 days after transfection (Chang, 1991).

e. Non-viral Transfer Methods

Several non-viral methods for the transfer of expression vectors into cultured mammalian cells also are contemplated by the present invention. These include calcium phosphate precipitation (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe, 1990) DEAE-dextran (Gopal, 1985), electroporation (Tur-Kaspa, 1986; 20 Potter, 1984), direct microinjection (Harland and Weintraub, 1985), DNA-loaded liposomes (Nicolau and Sene, 1982; Fraley, 1979) and lipofectamine-DNA complexes, cell sonication (Fechheimer, 1987), gene bombardment using high velocity microprojectiles (Yang, 1990), polycations (Boussif, 1995), and receptor-mediated transfection (Wu and Wu, 1988; Wu and Wu, 1987). Some of these techniques may be 25 successfully adapted for *in vivo* or *ex vivo* use.

D. Colloidal dispersion systems

Colloidal dispersion systems constitute targeted delivery vehicles. These dispersion systems include macromolecule complexes, nanocapsules complexes, 30 nanocapsules, microspheres, beads, and lipid-based systems including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, and liposomes. The preferred colloidal system of this invention is a liposome. Liposomes are artificial membrane vesicles which are useful as delivery vehicles *in vitro* and *in vivo*. It has been shown that large

unilamellar vesicles (LUV), which range in size from 0.2-4.0 μm can encapsulate a substantial percentage of an aqueous buffer containing large macromolecules. RNA, DNA and intact virions can be encapsulated within the aqueous interior and be delivered to cells in a biologically active form (Fraley, *et al.*) In addition to mammalian cells, liposomes have been used for delivery of polynucleotides in plant, yeast and bacterial cells. In order for a liposome to be an efficient gene transfer vehicle, the following characteristics should be present: (1) encapsulation of the genes of interest at high exigency while not compromising their biological activity; (2) preferential and substantial binding to a target cell in comparison to non-target cells; (3) delivery of the aqueous contents of the vesicle to the target cell cytoplasm at high efficiency; and (4) accurate and effective expression of genetic information (Manning, *et al.*, *Biotechniques*, 6:682, 1988). The present embodiment of the invention propose that the synthetic peptides can be formulated as a liposome. The composition of the liposome is usually a combination of phospholipids, particularly high-phase-transition-temperature phospholipids, usually in combination with steroids, especially cholesterol. Other phospholipids or other lipids may also be used. The physical characteristics of liposomes depend on pH, ionic strength, and the presence of divalent cations.

Examples of lipids useful in liposome production include phosphatidyl compounds, such as phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, sphingolipids, cerebrosides, and gangliosides. Particularly useful are diacylphosphatidylglycerols, where the lipid moiety contains from 14-18 carbon atoms, particularly from 16-18 carbon atoms, and is saturated. Illustrative phospholipids include egg phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine and distearoylphosphatidylcholine.

The targeting of liposomes can be classified based on anatomical and mechanistic factors. Anatomical classification is based on the level of selectivity, for example, organ-specific, cell-specific, and organelle-specific. Mechanistic targeting can be distinguished based upon whether it is passive or active. Passive targeting utilizes the natural tendency of liposomes to distribute to cells of the reticuloendothelial system (RES) in organs which contain sinusoidal capillaries. Active targeting, on the other hand, involves alteration of the liposome by coupling the

liposome to a specific ligand such as a monoclonal antibody, sugar, glycolipid, or protein, or by changing the composition or size of the liposome in order to achieve targeting to organs and cell types other than the naturally occurring sites of localization.

5 The surface of the targeted delivery system may be modified in a variety of ways. In the case of a liposomal targeted delivery system, lipid groups can be incorporated into the lipid bilayer of the liposome in order to maintain the targeting ligand in stable association with the liposomal bilayer. Various linking groups can be used for joining the lipid chains to the targeting ligand.

10

E. Pharmaceutical Compositions:

The present invention contemplates the use of the synthetic peptides in the form of a pharmaceutical compositions. In general a pharmaceutical composition will comprise an effective amount of one or more proteinaceous sequence, nucleic acid or 15 antibody or additional agent dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier. The phrases "pharmaceutical or pharmacologically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to an animal, such as, for example, a human, as appropriate. The preparation of an pharmaceutical composition that contains at least 20 one proteinaceous sequence, nucleic acid or antibody or additional active ingredient will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure, as exemplified by Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporated herein by reference. Moreover, for animal (e.g., human) administration, it will be understood that preparations should meet sterility, 25 pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biological Standards.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, surfactants, antioxidants, preservatives (e.g., 30 antibacterial agents, antifungal agents), isotonic agents, absorption delaying agents, salts, preservatives, drugs, drug stabilizers, binders, excipients, disintegration agents, lubricants, sweetening agents, flavoring agents, dyes, such like materials and combinations thereof, as would be known to one of ordinary skill in the art (see, for

example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, incorporated herein by reference). Except insofar as any conventional carrier is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic or pharmaceutical compositions is contemplated.

5

The proteinaceous sequence, nucleic acid or antibody may comprise different types of carriers depending on whether it is to be administered in solid, liquid or aerosol form, and whether it need to be sterile for such routes of administration as injection. The present invention can be administered intravenously, intradermally, intraarterially, 10 intraperitoneally, intralesionally, intracranially, intraarticularly, intraprostaticaly, intrapleurally, intratracheally, intranasally, intravitreally, intravaginally, rectally, 15 topically, intratumorally, intramuscularly, intraperitoneally, subcutaneously, intravesicularly, mucosally, intrapericardially, orally, topically, locally, using aerosol, injection, infusion, continuous infusion, localized perfusion bathing target cells directly, via a catheter, via a lavage, in creams, in lipid compositions (e.g., liposomes), or by other method or any combination of the forgoing as would be known to one of ordinary skill in the art (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporated herein by reference).

20 The actual dosage amount of a composition of the present invention administered to an animal patient can be determined by physical and physiological factors such as body weight, severity of condition, the type of disease being treated, previous or concurrent therapeutic interventions, idiopathy of the patient and on the route of administration. The practitioner responsible for administration will, in any 25 event, determine the concentration of active ingredient(s) in a composition and appropriate dose(s) for the individual subject.

30 In certain embodiments, pharmaceutical compositions may comprise, for example, at least about 0.1% of an active compound. In other embodiments, an active compound may comprise between about 2% to about 75% of the weight of the unit, or between about 25% to about 60%, for example, and any range derivable therein. In other non-limiting examples, a dose may also comprise from about 1 microgram/kg/body weight, about 5 microgram/kg/body weight, about 10

microgram/kg/body weight, about 50 microgram/kg/body weight, about 100 microgram/kg/body weight, about 200 microgram/kg/body weight, about 350 microgram/kg/body weight, about 500 microgram/kg/body weight, about 1 milligram/kg/body weight, about 5 milligram/kg/body weight, about 10 milligram/kg/body weight, about 50 milligram/kg/body weight, about 100 milligram/kg/body weight, about 200 milligram/kg/body weight, about 350 milligram/kg/body weight, about 500 milligram/kg/body weight, to about 1000 mg/kg/body weight or more per administration, and any range derivable therein. In non-limiting examples of a derivable range from the numbers listed herein, a range of about 5 mg/kg/body weight to about 100 mg/kg/body weight, about 5 microgram/kg/body weight to about 500 milligram/kg/body weight, etc., can be administered, based on the numbers described above.

In any case, the composition may comprise various antioxidants to retard oxidation of one or more component. Additionally, the prevention of the action of microorganisms can be brought about by preservatives such as various antibacterial and antifungal agents, including but not limited to parabens (e.g., methylparabens, propylparabens), chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal or combinations thereof.

The proteinaceous sequence, nucleic acid or antibody may be formulated into a composition in a free base, neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts, include the acid addition salts, e.g., those formed with the free amino groups of a proteinaceous composition, or which are formed with inorganic acids such as for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric or mandelic acid. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as for example, sodium, potassium, ammonium, calcium or ferric hydroxides; or such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine or procaine.

In embodiments where the composition is in a liquid form, a carrier can be a solvent or dispersion medium comprising but not limited to, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycol, etc), lipids (e.g., triglycerides,

vegetable oils, liposomes) and combinations thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin; by the maintenance of the required particle size by dispersion in carriers such as, for example liquid polyol or lipids; by the use of surfactants such as, for example hydroxypropylcellulose; or combinations thereof such methods. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, such as, for example, sugars, sodium chloride or combinations thereof.

In other embodiments, one may use eye drops, nasal solutions or sprays, aerosols or inhalants in the present invention. Such compositions are generally designed to be compatible with the target tissue type. In a non-limiting example, nasal solutions are usually aqueous solutions designed to be administered to the nasal passages in drops or sprays. Nasal solutions are prepared so that they are similar in many respects to nasal secretions, so that normal ciliary action is maintained. Thus, in preferred embodiments the aqueous nasal solutions usually are isotonic or slightly buffered to maintain a pH of about 5.5 to about 6.5. In addition, antimicrobial preservatives, similar to those used in ophthalmic preparations, drugs, or appropriate drug stabilizers, if required, may be included in the formulation. For example, various commercial nasal preparations are known and include drugs such as antibiotics or antihistamines.

In certain embodiments the proteinaceous sequence, nucleic acid or antibody is prepared for administration by such routes as oral ingestion. In these embodiments, the solid composition may comprise, for example, solutions, suspensions, emulsions, tablets, pills, capsules (e.g., hard or soft shelled gelatin capsules), sustained release formulations, buccal compositions, troches, elixirs, suspensions, syrups, wafers, or combinations thereof. Oral compositions may be incorporated directly with the food of the diet. Preferred carriers for oral administration comprise inert diluents, assimilable edible carriers or combinations thereof. In other aspects of the invention, the oral composition may be prepared as a syrup or elixir. A syrup or elixir, and may comprise, for example, at least one active agent, a sweetening agent, a preservative, a flavoring agent, a dye, a preservative, or combinations thereof.

In certain preferred embodiments an oral composition may comprise one or more binders, excipients, disintegration agents, lubricants, flavoring agents, and combinations thereof. In certain embodiments, a composition may comprise one or

more of the following: a binder, such as, for example, gum tragacanth, acacia, cornstarch, gelatin or combinations thereof; an excipient, such as, for example, dicalcium phosphate, mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate or combinations thereof; a disintegrating agent, such as, for example, corn starch, potato starch, alginic acid or combinations thereof; a lubricant, such as, for example, magnesium stearate; a sweetening agent, such as, for example, sucrose, lactose, saccharin or combinations thereof; a flavoring agent, such as, for example peppermint, oil of wintergreen, cherry flavoring, orange flavoring, etc.; or combinations thereof the foregoing. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, carriers such as a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar or both.

15 Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories. Suppositories are solid dosage forms of various weights and shapes, usually medicated, for insertion into the rectum, vagina or urethra. After insertion, suppositories soften, melt or dissolve in the cavity fluids. In general, for suppositories, traditional carriers may include, for example, polyalkylene glycols, triglycerides or combinations thereof. In certain embodiments, suppositories may be formed from mixtures containing, for example, the active ingredient in the range of about 0.5% to about 10%, and preferably about 1% to about 2%.

25 Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and/or the other ingredients. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, suspensions or 30 emulsion, the preferred methods of preparation are vacuum-drying or freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered liquid medium thereof. The liquid medium should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic

prior to injection with sufficient saline or glucose. The preparation of highly concentrated compositions for direct injection is also contemplated, where the use of DMSO as solvent is envisioned to result in extremely rapid penetration, delivering high concentrations of the active agents to a small area.

5

The composition must be stable under the conditions of manufacture and storage, and preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. It will be appreciated that endotoxin contamination should be kept minimally at a safe level, for example, less than 0.5 ng/mg protein.

10

In particular embodiments, prolonged absorption of an injectable composition can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, such as, for example, aluminum monostearate, gelatin or combinations thereof.

15

Because peptides can be administered to a patient as an immunotherapy, lipid-based compositions are relevant to the invention. These are discussed in further detail below.

20

In certain embodiments, the present invention concerns a novel composition comprising one or more lipids associated with at least one peptide. A lipid is a substance that is characteristically insoluble in water and extractable with an organic solvent. Lipids include, for example, the substances comprising the fatty droplets that naturally occur in the cytoplasm as well as the class of compounds which are well known to those of skill in the art which contain long-chain aliphatic hydrocarbons and their derivatives, such as fatty acids, alcohols, amines, amino alcohols, and aldehydes. Of course, compounds other than those specifically described herein that are understood by one of skill in the art as lipids are also encompassed by the compositions and methods of the present invention.

25

30 A lipid may be naturally occurring or synthetic (*i.e.*, designed or produced by man). However, a lipid is usually a biological substance. Biological lipids are well known in the art, and include for example, neutral fats, phospholipids, phosphoglycerides, steroids, terpenes, lysolipids, glycosphingolipids, glycolipids,

sulphatides, lipids with ether and ester-linked fatty acids and polymerizable lipids, and combinations thereof.

A. Lipid Types

5 A neutral fat may comprise a glycerol and a fatty acid. A typical glycerol is a three carbon alcohol. A fatty acid generally is a molecule comprising a carbon chain with an acidic moiety (e.g., carboxylic acid) at an end of the chain. The carbon chain may of a fatty acid may be of any length, however, it is preferred that the length of the carbon chain be of from about 2, about 3, about 4, about 5, about 6, about 7, about 8, 10 about 9, about 10, about 11, about 12, about 13, about 14, about 15, about 16, about 17, about 18, about 19, about 20, about 21, about 22, about 23, about 24, about 25, about 15 26, about 27, about 28, about 29, to about 30 or more carbon atoms, and any range derivable therein. However, a preferred range is from about 14 to about 24 carbon atoms in the chain portion of the fatty acid, with about 16 to about 18 carbon atoms being particularly preferred in certain embodiments. In certain embodiments the fatty acid carbon chain may comprise an odd number of carbon atoms, however, an even number of carbon atoms in the chain may be preferred in certain embodiments. A fatty acid comprising only single bonds in its carbon chain is called saturated, while a fatty acid comprising at least one double bond in its chain is called unsaturated.

20 Specific fatty acids include, but are not limited to, linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, linolenic acid, stearic acid, lauric acid, myristic acid, arachidic acid, palmitoleic acid, arachidonic acid, ricinoleic acid, tuberculosteric acid, lactobacillic acid. An acidic group of one or more fatty acids is covalently bonded to one or more 25 hydroxyl groups of a glycerol. Thus, a monoglyceride comprises a glycerol and one fatty acid, a diglyceride comprises a glycerol and two fatty acids, and a triglyceride comprises a glycerol and three fatty acids.

30 A phospholipid generally comprises either glycerol or an sphingosine moiety, an ionic phosphate group to produce an amphipathic compound, and one or more fatty acids. Types of phospholipids include, for example, phosphoglycerides, wherein a phosphate group is linked to the first carbon of glycerol of a diglyceride, and

sphingophospholipids (e.g., sphingomyelin), wherein a phosphate group is esterified to a sphingosine amino alcohol. Another example of a sphingophospholipid is a sulfatide, which comprises an ionic sulfate group that makes the molecule amphipathic. A phospholipid may, of course, comprise further chemical groups, such as for example, an alcohol attached to the phosphate group. Examples of such alcohol groups include serine, ethanolamine, choline, glycerol and inositol. Thus, specific phosphoglycerides include a phosphatidyl serine, a phosphatidyl ethanolamine, a phosphatidyl choline, a phosphatidyl glycerol or a phosphatidyl inositol. Other phospholipids include a phosphatidic acid or a diacetyl phosphate. In one aspect, a phosphatidylcholine 5 comprises a dioleoylphosphatidylcholine (*a.k.a.* cardiolipin), an egg phosphatidylcholine, a dipalmitoyl phosphatidylcholine, a monomyristoyl phosphatidylcholine, a monopalmitoyl phosphatidylcholine, a monostearoyl phosphatidylcholine, a monooleoyl phosphatidylcholine, a dibutroyl phosphatidylcholine, a divaleroyl phosphatidylcholine, a dicaproyl phosphatidylcholine, a diheptanoyl phosphatidylcholine, a dicapryloyl phosphatidylcholine or a distearoyl phosphatidylcholine.

A glycolipid is related to a sphingophospholipid, but comprises a carbohydrate group rather than a phosphate group attached to a primary hydroxyl group of the sphingosine. A type of glycolipid called a cerebroside comprises one sugar group (e.g., a glucose or galactose) attached to the primary hydroxyl group. Another example of a glycolipid is a ganglioside (e.g., a monosialoganglioside, a GM1), which comprises about 2, about 3, about 4, about 5, about 6, to about 7 or so sugar groups, that may be in a branched chain, attached to the primary hydroxyl group. In other embodiments, the 20 glycolipid is a ceramide (e.g., lactosylceramide).

A steroid is a four-membered ring system derivative of a phenanthrene. Steroids often possess regulatory functions in cells, tissues and organisms, and include, for example, hormones and related compounds in the progestagen (e.g., progesterone), 25 glucocorticoid (e.g., cortisol), mineralocorticoid (e.g., aldosterone), androgen (e.g., testosterone) and estrogen (e.g., estrone) families. Cholesterol is another example of a steroid, and generally serves structural rather than regulatory functions. Vitamin D is another example of a sterol, and is involved in calcium absorption from the intestine.

A terpene is a lipid comprising one or more five carbon isoprene groups. Terpenes have various biological functions, and include, for example, vitamin A, coenzyme Q and carotenoids (e.g., lycopene and β -carotene).

5

B. Charged and Neutral Lipid Compositions

In certain embodiments, a lipid component of a composition is uncharged or primarily uncharged. In one embodiment, a lipid component of a composition comprises one or more neutral lipids. In another aspect, a lipid component of a composition may be substantially free of anionic and cationic lipids, such as certain phospholipids (e.g., phosphatidyl choline) and cholesterol. In certain aspects, a lipid component of an uncharged or primarily uncharged lipid composition comprises about 95%, about 96%, about 97%, about 98%, about 99% or 100% lipids without a charge, substantially uncharged lipid(s), and/or a lipid mixture with equal numbers of positive 10 and negative charges.

In other aspects, a lipid composition may be charged. For example, charged phospholipids may be used for preparing a lipid composition according to the present invention and can carry a net positive charge or a net negative charge. In a non-limiting 20 example, diacetyl phosphate can be employed to confer a negative charge on the lipid composition, and stearylamine can be used to confer a positive charge on the lipid composition.

C. Making Lipids

25 Lipids can be obtained from natural sources, commercial sources or chemically synthesized, as would be known to one of ordinary skill in the art. For example, phospholipids can be from natural sources, such as egg or soybean phosphatidylcholine, brain phosphatidic acid, brain or plant phosphatidylinositol, heart cardiolipin and plant or bacterial phosphatidylethanolamine. In another example, lipids suitable for use 30 according to the present invention can be obtained from commercial sources. For example, dimyristyl phosphatidylcholine ("DMPC") can be obtained from Sigma Chemical Co., dicetyl phosphate ("DCP") is obtained from K & K Laboratories

(Plainview, NY); cholesterol ("Chol") is obtained from Calbiochem-Behring; dimyristyl phosphatidylglycerol ("DMPG") and other lipids may be obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). In certain embodiments, stock solutions of lipids in chloroform or chloroform/methanol can be stored at about -20°C. Preferably, 5 chloroform is used as the only solvent since it is more readily evaporated than methanol.

D. Lipid Composition Structures

In a preferred embodiment of the invention, the peptide may be associated with 10 a lipid. A peptide associated with a lipid may be dispersed in a solution containing a lipid, dissolved with a lipid, emulsified with a lipid, mixed with a lipid, combined with a lipid, covalently bonded to a lipid, contained as a suspension in a lipid, contained or 15 complexed with a micelle or liposome, or otherwise associated with a lipid or lipid structure. A lipid or lipid/chimeric polypeptide associated composition of the present invention is not limited to any particular structure. For example, they may also simply 20 be interspersed in a solution, possibly forming aggregates which are not uniform in either size or shape. In another example, they may be present in a bilayer structure, as micelles, or with a "collapsed" structure. In another non-limiting example, a lipofectamine(Gibco BRL)-chimeric polypeptide or Superfect (Qiagen)-chimeric polypeptide complex is also contemplated.

In certain embodiments, a lipid composition may comprise about 1%, about 2%, 25 about 3%, about 4% about 5%, about 6%, about 7%, about 8%, about 9%, about 10%, about 11%, about 12%, about 13%, about 14%, about 15%, about 16%, about 17%, about 18%, about 19%, about 20%, about 21%, about 22%, about 23%, about 24%, about 25%, about 26%, about 27%, about 28%, about 29%, about 30%, about 31%, about 32%, about 33%, about 34%, about 35%, about 36%, about 37%, about 38%, about 39%, about 40%, about 41%, about 42%, about 43%, about 44%, about 45%, about 46%, about 47%, about 48%, about 49%, about 50%, about 51%, about 52%, about 53%, about 54%, about 55%, about 56%, about 57%, about 58%, about 59%, about 60%, about 61%, about 62%, about 63%, about 64%, about 65%, about 66%, about 67%, about 68%, about 69%, about 70%, about 71%, about 72%, about 73%,

about 74%, about 75%, about 76%, about 77%, about 78%, about 79%, about 80%, about 81%, about 82%, about 83%, about 84%, about 85%, about 86%, about 87%, about 88%, about 89%, about 90%, about 91%, about 92%, about 93%, about 94%, about 95%, about 96%, about 97%, about 98%, about 99%, about 100%, or any range 5 derivable therein, of a particular lipid, lipid type or non-lipid component such as a drug, protein, sugar, nucleic acids or other material disclosed herein or as would be known to one of skill in the art. In a non-limiting example, a lipid composition may comprise about 10% to about 20% neutral lipids, and about 33% to about 34% of a cerebroside, and about 1% cholesterol. In another non-limiting example, a liposome may comprise 10 about 4% to about 12% terpenes, wherein about 1% of the micelle is specifically lycopene, leaving about 3% to about 11% of the liposome as comprising other terpenes; and about 10% to about 35% phosphatidyl choline, and about 1% of a drug. Thus, it is contemplated that lipid compositions of the present invention may comprise any of the lipids, lipid types or other components in any combination or percentage range.

15

1. Emulsions

A lipid may be comprised in an emulsion. A lipid emulsion is a substantially permanent heterogenous liquid mixture of two or more liquids that do not normally dissolve in each other, by mechanical agitation or by small amounts of additional 20 substances known as emulsifiers. Methods for preparing lipid emulsions and adding additional components are well known in the art (e.g., *Modern Pharmaceutics*, 1990, incorporated herein by reference).

For example, one or more lipids are added to ethanol or chloroform or any other 25 suitable organic solvent and agitated by hand or mechanical techniques. The solvent is then evaporated from the mixture leaving a dried glaze of lipid. The lipids are resuspended in aqueous media, such as phosphate buffered saline, resulting in an emulsion. To achieve a more homogeneous size distribution of the emulsified lipids, the mixture may be sonicated using conventional sonication techniques, further 30 emulsified using microfluidization (using, for example, a Microfluidizer, Newton, Mass.), and/or extruded under high pressure (such as, for example, 600 psi) using an Extruder Device (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada).

2. Micelles

A lipid may be comprised in a micelle. A micelle is a cluster or aggregate of lipid compounds, generally in the form of a lipid monolayer, and may be prepared using 5 any micelle producing protocol known to those of skill in the art (e.g., Canfield *et al.*, 1990; El-Gorab *et al.*, 1973; Shinoda *et al.*, 1963; and Fendler *et al.*, 1975, each incorporated herein by reference). For example, one or more lipids are typically made into a suspension in an organic solvent, the solvent is evaporated, the lipid is resuspended in an aqueous medium, sonicated and then centrifuged.

10

3. Liposomes

In particular embodiments, a lipid comprises a liposome. A "liposome" is a generic term encompassing a variety of single and multilamellar lipid vehicles formed by the generation of enclosed lipid bilayers or aggregates. Liposomes may be 15 characterized as having vesicular structures with a bilayer membrane, generally comprising a phospholipid, and an inner medium that generally comprises an aqueous composition.

A multilamellar liposome has multiple lipid layers separated by aqueous 20 medium. They form spontaneously when lipids comprising phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh and Bachhawat, 1991). Lipophilic molecules or molecules with lipophilic regions may also dissolve in or associate with 25 the lipid bilayer.

In certain less preferred embodiments, phospholipids from natural sources, such 30 as egg or soybean phosphatidylcholine, brain phosphatidic acid, brain or plant phosphatidylinositol, heart cardiolipin and plant or bacterial phosphatidylethanolamine are preferably not used as the primary phosphatide, *i.e.*, constituting 50% or more of the total phosphatide composition or a liposome, because of the instability and leakiness of the resulting liposomes.

In particular embodiments, a lipid and/or chimeric polypeptide may be, for example, encapsulated in the aqueous interior of a liposome, interspersed within the lipid bilayer of a liposome, attached to a liposome *via* a linking molecule that is 5 associated with both the liposome and the chimeric polypeptide, entrapped in a liposome, complexed with a liposome, etc.

a. Making Liposomes

A liposome used according to the present invention can be made by different 10 methods, as would be known to one of ordinary skill in the art. Phospholipids can form a variety of structures other than liposomes when dispersed in water, depending on the molar ratio of lipid to water. At low ratios the liposome is the preferred structure.

For example, a phospholipid (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), such as for 15 example the neutral phospholipid dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), is dissolved in tert-butanol. The lipid(s) is then mixed with the chimeric polypeptide, and/or other component(s). Tween 20 is added to the lipid mixture such that Tween 20 is about 5% of the composition's weight. Excess tert-butanol is added to this mixture such that the 20 volume of tert-butanol is at least 95%. The mixture is vortexed, frozen in a dry ice/acetone bath and lyophilized overnight. The lyophilized preparation is stored at -20°C and can be used up to three months. When required the lyophilized liposomes are reconstituted in 0.9% saline. The average diameter of the particles obtained using Tween 20 for encapsulating the chimeric polypeptide is about 0.7 to about 1.0 μ m in diameter.

25

Alternatively, a liposome can be prepared by mixing lipids in a solvent in a container, *e.g.*, a glass, pear-shaped flask. The container should have a volume ten-times greater than the volume of the expected suspension of liposomes. Using a 30 rotary evaporator, the solvent is removed at approximately 40°C under negative pressure. The solvent normally is removed within about 5 min. to 2 hours, depending on the desired volume of the liposomes. The composition can be dried further in a

desiccator under vacuum. The dried lipids generally are discarded after about 1 week because of a tendency to deteriorate with time.

5 Dried lipids can be hydrated at approximately 25-50 mM phospholipid in sterile, pyrogen-free water by shaking until all the lipid film is resuspended. The aqueous liposomes can be then separated into aliquots, each placed in a vial, lyophilized and sealed under vacuum.

10 In other alternative methods, liposomes can be prepared in accordance with other known laboratory procedures (e.g., see Bangham *et al.*, 1965; Gregoriadis, 1979; Deamer and Uster 1983, Szoka and Papahadjopoulos, 1978, each incorporated herein by reference in relevant part). These methods differ in their respective abilities to entrap aqueous material and their respective aqueous space-to-lipid ratios.

15 The dried lipids or lyophilized liposomes prepared as described above may be dehydrated and reconstituted in a solution of inhibitory peptide and diluted to an appropriate concentration with an suitable solvent, e.g., DPBS. The mixture is then vigorously shaken in a vortex mixer. Unencapsulated additional materials, such as agents including but not limited to hormones, drugs, nucleic acid constructs and the like, are removed by centrifugation at 29,000 \times g and the liposomal pellets washed. The washed liposomes are resuspended at an appropriate total phospholipid concentration, e.g., about 50-200 mM. The amount of additional material or active agent encapsulated can be determined in accordance with standard methods. After determination of the amount of additional material or active agent encapsulated in the 20 liposome preparation, the liposomes may be diluted to appropriate concentrations and stored at 4°C until use. A pharmaceutical composition comprising the liposomes will usually include a sterile, pharmaceutically acceptable carrier or diluent, such as water or saline solution.

25 30 The size of a liposome varies depending on the method of synthesis. Liposomes in the present invention can be a variety of sizes. In certain embodiments, the liposomes are small, e.g., less than about 100 nm, about 90 nm, about 80 nm, about 70

nm, about 60 nm, or less than about 50 nm in external diameter. In preparing such liposomes, any protocol described herein, or as would be known to one of ordinary skill in the art may be used. Additional non-limiting examples of preparing liposomes are described in U.S. Patent Nos. 4,728,578, 4,728,575, 4,737,323, 4,533,254, 4,162,282, 5 4,310,505, and 4,921,706; International Applications PCT/US85/01161 and PCT/US89/05040; U.K. Patent Application GB 2193095 A; Mayer *et al.*, 1986; Hope *et al.*, 1985; Mayhew *et al.* 1987; Mayhew *et al.*, 1984; Cheng *et al.*, 1987; and Gregoriadis, 1984, each incorporated herein by reference).

10 A liposome suspended in an aqueous solution is generally in the shape of a spherical vesicle, having one or more concentric layers of lipid bilayer molecules. Each layer consists of a parallel array of molecules represented by the formula XY, wherein X is a hydrophilic moiety and Y is a hydrophobic moiety. In aqueous suspension, the concentric layers are arranged such that the hydrophilic moieties tend to remain in 15 contact with an aqueous phase and the hydrophobic regions tend to self-associate. For example, when aqueous phases are present both within and without the liposome, the lipid molecules may form a bilayer, known as a lamella, of the arrangement XY-YX. Aggregates of lipids may form when the hydrophilic and hydrophobic parts of more than one lipid molecule become associated with each other. The size and shape of these 20 aggregates will depend upon many different variables, such as the nature of the solvent and the presence of other compounds in the solution.

25 The production of lipid formulations often is accomplished by sonication or serial extrusion of liposomal mixtures after (I) reverse phase evaporation (II) dehydration-rehydration (III) detergent dialysis and (IV) thin film hydration. In one aspect, a contemplated method for preparing liposomes in certain embodiments is heating sonating, and sequential extrusion of the lipids through filters or membranes of decreasing pore size, thereby resulting in the formation of small, stable liposome structures. This preparation produces liposomal/chimeric polypeptide or liposomes 30 only of appropriate and uniform size, which are structurally stable and produce maximal activity. Such techniques are well-known to those of skill in the art (see, for example Martin, 1990).

Once manufactured, lipid structures can be used to encapsulate compounds that are toxic (e.g., chemotherapeutics) or labile (e.g., nucleic acids) when in circulation. The physical characteristics of liposomes depend on pH, ionic strength and/or the presence of divalent cations. Liposomes can show low permeability to ionic and/or polar substances, but at elevated temperatures undergo a phase transition which markedly alters their permeability. The phase transition involves a change from a closely packed, ordered structure, known as the gel state, to a loosely packed, less-ordered structure, known as the fluid state. This occurs at a characteristic phase-transition temperature and/or results in an increase in permeability to ions, sugars and/or drugs. Liposomal encapsulation has resulted in a lower toxicity and a longer serum half-life for such compounds (Gabizon *et al.*, 1990).

Liposomes interact with cells to deliver agents via four different mechanisms: Endocytosis by phagocytic cells of the reticuloendothelial system such as macrophages and/or neutrophils; adsorption to the cell surface, either by nonspecific weak hydrophobic and/or electrostatic forces, and/or by specific interactions with cell-surface components; fusion with the plasma cell membrane by insertion of the lipid bilayer of the liposome into the plasma membrane, with simultaneous release of liposomal contents into the cytoplasm; and/or by transfer of liposomal lipids to cellular and/or subcellular membranes, and/or *vice versa*, without any association of the liposome contents. Varying the liposome formulation can alter which mechanism is operative, although more than one may operate at the same time.

Numerous disease treatments are using lipid based gene transfer strategies to enhance conventional or establish novel therapies, in particular therapies for treating hyperproliferative diseases. Advances in liposome formulations have improved the efficiency of gene transfer *in vivo* (Templeton *et al.*, 1997) and it is contemplated that liposomes are prepared by these methods. Alternate methods of preparing lipid-based formulations for nucleic acid delivery are described (WO 99/18933).

30

In another liposome formulation, an amphipathic vehicle called a solvent dilution microcarrier (SDMC) enables integration of particular molecules into the bilayer of the lipid vehicle (U.S. Patent 5,879,703). The SDMCs can be used to deliver

lipopolysaccharides, polypeptides, nucleic acids and the like. Of course, any other methods of liposome preparation can be used by the skilled artisan to obtain a desired liposome formulation in the present invention.

5

b. Targeting Ligands

The targeting ligand can be either anchored in the hydrophobic portion of the complex or attached to reactive terminal groups of the hydrophilic portion of the complex. The targeting ligand can be attached to the liposome via a linkage to a reactive group, *e.g.*, on the distal end of the hydrophilic polymer. Preferred reactive groups include amino groups, carboxylic groups, hydrazide groups, and thio groups. The coupling of the targeting ligand to the hydrophilic polymer can be performed by standard methods of organic chemistry that are known to those skilled in the art. In certain embodiments, the total concentration of the targeting ligand can be from about 0.01 to about 10% mol.

15

Targeting ligands are any ligand specific for a characteristic component of the targeted region. Preferred targeting ligands include proteins such as polyclonal or monoclonal antibodies, antibody fragments, or chimeric antibodies, enzymes, or hormones, or sugars such as mono-, oligo- and poly-saccharides (see, Heath *et al.*, 1986) For example, disialoganglioside GD2 is a tumor antigen that has been identified neuroectodermal origin tumors, such as neuroblastoma, melanoma, small-cell lung carcinoma, glioma and certain sarcomas (Mujoo *et al.*, 1986, Schulz *et al.*, 1984). Liposomes containing anti-disialoganglioside GD2 monoclonal antibodies have been used to aid the targeting of the liposomes to cells expressing the tumor antigen (Montaldo *et al.*, 1999; Pagan *et al.*, 1999). In another non-limiting example, breast and gynecological cancer antigen specific antibodies are described in U.S. Patent No. 5,939,277, incorporated herein by reference. In a further non-limiting example, prostate cancer specific antibodies are disclosed in U.S. Patent No. 6,107,090, incorporated herein by reference. Thus, it is contemplated that the antibodies described herein or as would be known to one of ordinary skill in the art may be used to target specific tissues and cell types in combination with the compositions and methods of the present invention. In certain embodiments of the invention, contemplated targeting ligands

interact with integrins, proteoglycans, glycoproteins, receptors or transporters. Suitable ligands include any that are specific for cells of the target organ, or for structures of the target organ exposed to the circulation as a result of local pathology, such as tumors.

5 In certain embodiments of the present invention, in order to enhance the transduction of cells, to increase transduction of target cells, or to limit transduction of undesired cells, antibody or cyclic peptide targeting moieties (ligands) are associated with the lipid complex. Such methods are known in the art. For example, liposomes have been described further that specifically target cells of the mammalian central 10 nervous system (U.S. Patent 5,786,214, incorporated herein by reference). The liposomes are composed essentially of N-glutarylphosphatidylethanolamine, cholesterol and oleic acid, wherein a monoclonal antibody specific for neuroglia is conjugated to the liposomes. It is contemplated that a monoclonal antibody or antibody fragment may be used to target delivery to specific cells, tissues, or organs in the animal, such as for 15 example, brain, heart, lung, liver, *etc.*

Still further, a chimeric polypeptide may be delivered to a target cell via receptor-mediated delivery and/or targeting vehicles comprising a lipid or liposome. These take advantage of the selective uptake of macromolecules by receptor-mediated 20 endocytosis that will be occurring in a target cell. In view of the cell type-specific distribution of various receptors, this delivery method adds another degree of specificity to the present invention.

25 Thus, in certain aspects of the present invention, a ligand will be chosen to correspond to a receptor specifically expressed on the target cell population. A cell-specific chimeric polypeptide delivery and/or targeting vehicle may comprise a specific binding ligand in combination with a liposome. The chimeric polypeptide to be delivered are housed within a liposome and the specific binding ligand is functionally 30 incorporated into a liposome membrane. The liposome will thus specifically bind to the receptor(s) of a target cell and deliver the contents to a cell. Such systems have been shown to be functional using systems in which, for example, epidermal growth factor (EGF) is used in the receptor-mediated delivery of a nucleic acid to cells that exhibit upregulation of the EGF receptor.

In certain embodiments, a receptor-mediated delivery and/or targeting vehicles comprise a cell receptor-specific ligand and a peptide. Others comprise a cell receptor-specific ligand to which peptide to be delivered has been operatively attached.

5 For example, several ligands have been used for receptor-mediated gene transfer (Wu and Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, EPO 0273085), which establishes the operability of the technique. In another example, specific delivery in the context of another mammalian cell type has been described (Wu and Wu, 1993; incorporated herein by reference).

10

In still further embodiments, the specific binding ligand may comprise one or more lipids or glycoproteins that direct cell-specific binding. For example, lactosyl-ceramide, a galactose-terminal asialganglioside, have been incorporated into liposomes and observed an increase in the uptake of the insulin gene by hepatocytes

15 (Nicolau *et al.*, 1987). The asialoglycoprotein, asialofetuin, which contains terminal galactosyl residues, also has been demonstrated to target liposomes to the liver (Spanjer and Scherphof, 1983; Hara *et al.*, 1996). The sugars mannosyl, fucosyl or N-acetyl glucosamine, when coupled to the backbone of a polypeptide, bind the high affinity manose receptor (U.S. Patent 5,432,260, specifically incorporated herein by reference

20 in its entirety). It is contemplated that the cell or tissue-specific transforming constructs of the present invention can be specifically delivered into a target cell or tissue in a similar manner.

In another example, lactosyl ceramide, and peptides that target the LDL receptor

25 related proteins, such as apolipoprotein E3 ("Apo E") have been useful in targeting liposomes to the liver (Spanjer and Scherphof, 1983; WO 98/0748).

Folate and the folate receptor have also been described as useful for cellular targeting (U.S. Patent 5,871,727). In this example, the vitamin folate is coupled to the

30 complex. The folate receptor has high affinity for its ligand and is overexpressed on the surface of several malignant cell lines, including lung, breast and brain tumors. Antifolate such as methotrexate may also be used as targeting ligands. Transferrin mediated

delivery systems target a wide range of replicating cells that express the transferrin receptor (Gilliland *et al.*, 1980).

c. Liposome/Nucleic Acid Combinations

5 In certain embodiments, a liposome/chimeric polypeptide may comprise a nucleic acid, such as, for example, an oligonucleotide, a polynucleotide or a nucleic acid construct (e.g., an expression vector). Where a bacterial promoter is employed in the DNA construct that is to be transfected into eukaryotic cells, it also will be desirable to include within the liposome an appropriate bacterial polymerase.

10

It is contemplated that when the liposome/chimeric polypeptide composition comprises a cell or tissue specific nucleic acid, this technique may have applicability in the present invention. In certain embodiments, lipid-based non-viral formulations provide an alternative to viral gene therapies. Although many cell culture studies have 15 documented lipid-based non-viral gene transfer, systemic gene delivery *via* lipid-based formulations has been limited. A major limitation of non-viral lipid-based gene delivery is the toxicity of the cationic lipids that comprise the non-viral delivery vehicle. The *in vivo* toxicity of liposomes partially explains the discrepancy between *in vitro* and *in vivo* gene transfer results. Another factor contributing to this contradictory 20 data is the difference in liposome stability in the presence and absence of serum proteins. The interaction between liposomes and serum proteins has a dramatic impact on the stability characteristics of liposomes (Yang and Huang, 1997). Cationic liposomes attract and bind negatively charged serum proteins. Liposomes coated by serum proteins are either dissolved or taken up by macrophages leading to their removal 25 from circulation. Current *in vivo* liposomal delivery methods use aerosolization, subcutaneous, intradermal, intratumoral, or intracranial injection to avoid the toxicity and stability problems associated with cationic lipids in the circulation. The interaction of liposomes and plasma proteins is largely responsible for the disparity between the efficiency of *in vitro* (Felgner *et al.*, 1987) and *in vivo* gene transfer (Zhu *et al.*, 1993; 30 Philip *et al.*, 1993; Solodin *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Thierry *et al.*, 1995; Aksentijevich *et al.*, 1996).

d. Lipid Administration

The actual dosage amount of a lipid composition (e.g., a liposome-chimeric polypeptide) administered to a patient can be determined by physical and physiological factors such as body weight, severity of condition, idiopathy of the patient and on the 5 route of administration. With these considerations in mind, the dosage of a lipid composition for a particular subject and/or course of treatment can readily be determined.

The present invention can be administered intravenously, intradermally, 10 intraarterially, intraperitoneally, intralesionally, intracranially, intraarticularly, intraprostaticaly, intrapleurally, intratracheally, intranasally, intravitreally, intravaginally, rectally, topically, intratumorally, intramuscularly, intraperitoneally, subcutaneously, intravesicularily, mucosally, intrapericardially, orally, topically, locally 15 and/or using aerosol, injection, infusion, continuous infusion, localized perfusion bathing target cells directly or via a catheter and/or lavage.

IX. Kits

Certain embodiments of the present invention concerns diagnostic or therapeutic 20 kits. The peptides may be used in the form of a kit for determining the possibility of development or recurrence of a precancerous or cancerous growth in a patient with HPV. The kit may determine the stimulation of T-cell lymphocyte proliferation and/or 25 an increase in T-helper 1 cytokine production. The components of the various kits may be stored in suitable container means. The container means will generally include at least one vial, test tube, flask, bottle, syringe or other container means, into which the peptide formulation is placed, preferably, suitably allocated. The kits may also 30 comprise a second container means for containing a sterile, pharmaceutically acceptable buffer or other diluent. The kits of the present invention may also typically include a means for containing the vials in close confinement for commercial sale, such as, e.g., injection or blow-molded plastic containers into which the desired vials are retained.

The kit can contain reagents for detecting an interaction (detection reagent) between a sample and an antibody. The provided reagent can be radio-, fluorescently- or enzymatically-labeled. The kit can contain a known radiolabeled agent capable of binding or interacting with an antibody that allows a cell-mediated immune response to be detected and/or measured. In general, these methods will include first obtaining a sample suspected of containing such a protein, peptide or antibody, contacting the sample with an antibody or peptide in accordance with the present invention, as the case may be, under conditions effective to allow the formation of an immunocomplex, and then detecting the presence of the immunocomplex.

10

In some embodiments, one or more E6 and/or E7 peptides is includes in a suitable container. A sample can be contacted or incubated with the peptide(s) and then the sample can be assayed for a cell-mediated immune response against the peptide(s). Thus, in some embodiments, the kit contains a non-reacting structure. In some embodiments, the non-reacting structure may be plastic or some other synthetic material. The non-reacting structure can be a type of container to hold a sample, such as a container with a well. A container with multiple wells is also included as part of the invention. In some cases, the structure is lined with or has a membrane attached to it. It is contemplated that a well lined with a membrane can be incubated with an E6 or E7 peptide and then assayed using the same container for a cell-mediated immune response. This can be done by employing an antibody that can be used to detect a cell mediated immune response. Such antibodies include an antibody to a TH1 or TH2 cytokine, cytokine receptor, or any other receptor on a T cell that is indicative of a cell-mediated immune response. Detection reagents may also be included in the kit.

15

20 The reagent of the kit can be provided as a liquid solution, attached to a solid support or as a dried powder. Preferably, when the reagent is provided in a liquid solution, the liquid solution is an aqueous solution. Preferably, when the reagent provided is attached to a solid support, the solid support can be chromatograph media, a test plate having a plurality of wells, or a microscope slide. When the reagent provided is a dry powder, the powder can be reconstituted by the addition of a suitable solvent, that may be provided.

25

In general, the detection of immunocomplex formation is quite well known in the art and may be achieved through the application of numerous approaches. For example, the present invention contemplates the application of ELISA, RIA, immunoblot (e.g., dot blot), ELISPOT, indirect immunofluorescence techniques and the like. Generally, immunocomplex formation will be detected through the use of a label, such as a radiolabel or an enzyme tag (such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, or the like). Of course, one may find additional advantages through the use of a secondary binding ligand such as a second antibody or a biotin/avidin ligand binding arrangement, as is known in the art.

10

For assaying purposes, it is proposed that virtually any sample suspected of comprising a cell capable of a cell-mediated immune response, as the case may be, may be employed. Samples may include cells, cell supernatants, cell suspensions, cell extracts, enzyme fractions, protein extracts, or other cell-free compositions suspected of containing a cell capable of a cell-mediated immune response. Generally speaking, kits in accordance with the present invention will include at least one E6 or E7 peptide and an antibody directed against a proteinaceous composition that is associated with a cell-mediated immune response, together with an immunodetection reagent and a means for containing the antibody, peptide, and reagent. The immunodetection reagent will typically comprise a label associated with the antibody or antigen, or associated with a secondary binding ligand. Exemplary ligands might include a secondary antibody directed against the first antibody or antigen or a biotin or avidin (or streptavidin) ligand having an associated label. Of course, as noted above, a number of exemplary labels are known in the art and all such labels may be employed in connection with the present invention.

The container will generally include a vial into which the antibody, antigen or detection reagent may be placed, and preferably suitably aliquotted. The kits of the present invention will also typically include a means for containing the antibody, antigen, and reagent containers in close confinement for commercial sale. Such containers may include injection or blow-molded plastic containers into which the desired vials are retained.

In one embodiment, a diagnostic kit comprises probes or primers for use with the nucleic acid detection methods. All the essential materials and reagents required for detecting peptide markers in a biological sample may be assembled together in a kit. This generally will comprise preselected primers for specific markers. Also included 5 may be enzymes suitable for amplifying nucleic acids including various polymerases (RT, Taq, *etc.*), deoxynucleotides and buffers to provide the necessary reaction mixture for amplification.

Such kits generally will comprise, in suitable means, distinct containers for each 10 individual reagent and enzyme as well as for each marker primer pair. Preferred pairs of primers for amplifying nucleic acids are selected to amplify the sequences specified in SEQ ID NO: 1-19 or a complement thereof.

In another embodiment, such kits will comprise hybridization probes specific 15 for peptides corresponding to the sequences specified in SEQ ID NO: 1-19, or the complement thereof. Such kits generally will comprise, in suitable means, distinct containers for each individual reagent and enzyme as well as for each hybridization probe.

20 In other embodiments, the present invention concerns immunodetection kits for use with the immunodetection methods described above. As the peptides are generally proteins, polypeptides or peptides, the peptides will preferably be included in the kit. The immunodetection kits will thus comprise, in suitable container means, the peptide, and optionally, an immunodetection reagent.

25 The immunodetection reagents of the kit may take any one of a variety of forms, including those detectable labels that are associated with or linked to the given antibody. Detectable labels that are associated with or attached to a secondary binding ligand are also contemplated. Exemplary secondary ligands are those secondary 30 antibodies that have binding affinity for the first antibody.

The kits may further comprise a suitably aliquoted composition of the wild-type or mutant protein, polypeptide or polypeptide, whether labeled or unlabeled, as may be

used to prepare a standard curve for a detection assay. The kits may contain antibody-label conjugates either in fully conjugated form, in the form of intermediates, or as separate moieties to be conjugated by the user of the kit. The components of the kits may be packaged either in aqueous media or in lyophilized form.

5

Therapeutic kits of the present invention are kits comprising an peptide SEQIDNO: 1-19. Such kits will generally contain, in suitable container means, a pharmaceutically acceptable formulation of a polypeptide, peptide, biological functional equivalent, immunological fragment, domain, inhibitor, antibody, gene, polynucleotide, 10 nucleic acid, complement, or vector expressing any of the foregoing in a pharmaceutically acceptable formulation. The kit may have a single container means, or it may have distinct container means for each compound.

When the components of the kit are provided in one or more liquid solutions, 15 the liquid solution is an aqueous solution, with a sterile aqueous solution being particularly preferred. The peptide compositions may also be formulated into a syringeable composition. In which case, the container means may itself be a syringe, pipette, or other such like apparatus, from which the formulation may be applied to an infected area of the body, injected into an animal, or even applied to and mixed with the 20 other components of the kit.

However, the components of the kit may be provided as dried powder(s). When 25 reagents or components are provided as a dry powder, the powder can be reconstituted by the addition of a suitable solvent. It is envisioned that the solvent may also be provided in another container means.

The container means of the kits will generally include at least one vial, test tube, 30 flask, bottle, syringe or other container means, into which the antibody may be placed, and preferably, suitably aliquoted. Where, polypeptide or peptide, or a second or third binding ligand or additional component is provided, the kit will also generally contain a second, third or other additional container into which this ligand or component may be placed. The kits of the present invention will also typically include a means for containing the antibody, antigen, and any other reagent containers in close confinement

for commercial sale. Such containers may include injection or blow-molded plastic containers into which the desired vials are retained.

Irrespective of the number or type of containers, the kits of the invention may 5 also comprise, or be packaged with, an instrument for assisting with the injection/administration or placement of the ultimate peptide within the body of an animal. Such an instrument may be a syringe, pipette, forceps, or any such medically approved delivery vehicle.

10

EXAMPLES

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor 15 to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

20

EXAMPLE 1: Material and Methods

Patients

25 The present embodiment of the invention comprises a study population that was selected from patients seen at the colposcopy clinic of The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Informed consent was obtained from the patients, and all procedures were performed according to an Institutional Review Board-approved protocol. The women were 17 years of age or older and not pregnant with no medical 30 history of immune disorders. Four groups of women were identified for this study. Group 1 consisted of six women without cytological or histological diagnosis of CIN

and with an HPV negative test (CIN⁽⁻⁾/HPV⁽⁻⁾). Group 2 included 31 women with a histological diagnosis of CIN and HPV positive test (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾). Groups 3 and 4 were selected from women who had undergone ablative or excisional treatment for CIN at the colposcopy clinic at least 6 months before the study. The women in groups 3 and 5 4 were (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾) before CIN treatment. However, at the time of enrollment, which was a minimum of 6 months after CIN treatment, the women were only assessed for disease status. Group 3 consisted of 22 women without evidence of recurrence of CIN (Recur⁽⁻⁾), and group 4 included 10 with histological diagnosis of recurrent CIN (Recur⁽⁺⁾). HPV positivity was determined using the Virapap/Viratype assay 10 (Technologies Inc., Gaithersburg, MD). In this protocol, the dot blot hybridization for HPV RNA is performed using exfoliated cervical epithelial cells obtained with cervical swabs. The assay method involves using a ³²P-labeled DNA probe-set, which identifies HPV by type: 6/11, 16/18, and 31/33/35. Cells were isolated and processed according to the manufacturer's instructions. At the time of the study, this test was used as part of 15 the standard care program at the colposcopy clinic. HPV positivity was further confirmed by PCR using DNA extracted from paraffin-embedded biopsy material as previously described (Ting *et al.*, 1990; Schiffman *et al.*, 1991). The consensus primers used for the PCR analysis were derived from the L1 open reading frame of the papillomaviruses (MY11, GCMCAGGGWCATAAYAATGG (SEQ ID NO: 23) and 20 MY09, CGTCCMARRGGAACTGATC (SEQ ID NO: 24); where M = A+C, R = A+G, W = A+T, Y = C+T). The HPV-16 positivity was confirmed using a specific oligonucleotide probe CATACACCTCCAGCACCTAA (SEQ ID NO: 25). The clinical characteristics, including HPV status, of the study subjects are listed in Table 2.

Table 2
Characteristics of the study subjects

Characteristics	Total	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
No. of patients	69	6	31	22	10
Median age	31	31	31	32	27
Age range	17-54	17-43	21-50	18-54	20-39
Race					
White	52 (75.4%)	3 (50%)	26 (83.9%)	15 (68.2%)	8 (80%)
Hispanic	8 (12.6%)	3 (50%)	1 (3.2%)	4 (18.2%)	0 (0%)
African-American	8 (12.6%)	0 (0%)	3 (9.7%)	3 (13.6%)	0 (0%)
Asian	1 (1.4%)	0 (0%)	1 (3.2%)	0 (0%)	0 (0%)
HPV status					
Negative	6 (8.7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Positive	63 (91.3%)	0 (0%)	31 (100%)	22 (100%)	10 (100%)
HPV-16	57 (90.5%)	0 (0%)	31 (100%)	17 (77.3%)	9 (90%)
Other HPV	6 (9.5%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (22.7%)	1 (10%)
Types					
Initial					
Diagnosis*					
Negative	6 (8.7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CIN1	4 (5.8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (18.2%)	0 (0%)
CIN 2 &3	59 (85.5%)	0 (0%)	31 (100%)	18 (81.8%)	10 (100%)

*Note: For group 3 the diagnosis at the time of recruitment into study was negative for CIN, while that for group 4 was positive for CIN 2/3.

Peptides

Peptide sequences corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 were selected on the basis of the amphipathic structures and information related to known T-cell epitopes described in the literature. Table 3 lists the peptides used in the present study. All peptides were made as reported earlier (Sarkar *et al.*, 1995) using the Merrifield solid-phase method (Merrifield, 1963) either on a modified Vega 250 automatic peptide synthesizer (Vega Biochemicals, Tucson, AZ) or by the "bag" method as described by Houghten, 1985. In most of the experiments, the purity of the peptides used was approximately 70-80% and in some of the experiments, peptides exhibiting a purity > 95% were used with identical results. In addition to the E6 and E7 peptides, we used a peptide from the *c-mos* protooncogene [aa 158-170, STRTPEDSNSLGT (SEQ ID NO 22)] as a negative control. Stock solutions of peptides were prepared in PBS (pH 7.0) and filter sterilized.

15 T-Cell Proliferation Assay

Heparinized blood was collected from the study participants by venipuncture. PBMCs were isolated by centrifugation on a Ficoll-Hypaque density gradient (Histopaque-1073; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The proliferative responses of PBMC from different individuals after stimulation with PHA, *c-mos* peptide, or individual E6 and E7 peptides (Table 4) were determined using the [³H]thymidine incorporation assay as previously described (Nehete *et al.*, 1996). Briefly, each sample was seeded in triplicate in 96-well microtiter plates and incubated for 7 days at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. During the final 16-18 h, 1 μ Ci of [³H]thymidine (6.7 Ci/mmol; ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA) was added. The cells were harvested onto filter strips to estimate [³H]thymidine incorporation. The specific radioactivity of cells treated with various additions was calculated in each case by subtracting the counts per minute (cpm) values obtained with cells cultured in medium alone. Data from pilot experiments showed that at 5 μ g/ml, each peptide yields consistent levels of proliferation. The significance of T-cell proliferative responses to the individual E6 and E7 peptides (in terms of stimulation index [SI]) was calculated as the fold increase of [³H]thymidine incorporation by cells exposed to the peptide over that by the control to which no peptide was added. An SI value \geq 3.0, which was considered a positive

response, was used for all statistical analyses to determine the significance of proliferative responses and the association with disease-free or disease-recurrence status. In all the experiments, data from triplicate samples were comparable with a standard error of < 10%. None of the women in the four study groups tested showed 5 proliferative responses specific to the control c-mos peptide (SI < 2.0).

Table 3

Amino acid sequences of the E6 and E7 peptides from HPV-16

Peptide	Residues	Sequence
E6 peptides		
K9L (SEQ ID NO: 1)	(aa 18-26)	KLPQLCTEL
E10I (SEQ ID NO: 2)	(aa 25-34)	ELQTTIHDII
C10R (SEQ ID NO: 3)	(aa 37-46)	CVYCKQQLLR
Q15L (SEQ ID NO: 4)	(aa 43-57)	QLLRREVYDFAFRDL
V10C (SEQ ID NO: 5)	(aa 49-58)	VYDFAFRDLC
P9L (SEQ ID NO: 6)	(aa 66-74)	PYAVCDKCL
P10I (SEQ ID NO: 7)	(aa 102-111)	PLCDLLIRCI
Q20P (SEQ ID NO: 8)	(aa 97-116)	QQYNKPLCDLLIRCINCKP
R16R (SEQ ID NO: 9)	(aa 131-146)	RWTGRCMSCCRSSRTR
G10S (SEQ ID NO: 10)	(aa 141-150)	GRCMSCCRSS
E7 peptides		
T10Q (SEQ ID NO: 11)	(aa 7-15)	TLHEYMLELQ
M9T (SEQ ID NO: 12)	(aa 12-20)	MLDLQPETT
D9L (SEQ ID NO: 13)	(aa 14-22)	DLQPETTDL
Q19D (SEQ ID NO: 14)	(aa 44-62)	QAEPDRAHYNIVTFCCCKCD
R9F (SEQ ID NO: 15)	(aa 49-57)	RAHYNIVTF
R9V (SEQ ID NO: 16)	(aa 66-74)	RLCVQSTHV
L9V (SEQ ID NO: 17)	(aa 82-90)	LJMGTLGIV
G10C (SEQ ID NO: 18)	(aa 85-94)	GTLGIVCPIC
D20C (SEQ ID NO: 19)	(aa 75-94)	DIRTLEDLLMGTLGIVCPIC

aa, amino acid

Cytokine analysis

Cryopreserved PBMC were used for these assays. The PBMC (1×10^5) were incubated with various HPV peptides in RPMI-1640 medium (containing 10% fetal calf serum) in triplicate wells of 96-well round-bottom plates for 48 h at 37°C. Supernatants (100 μ l)

5 were removed from each well after centrifugation and stored frozen at -70°C in another 96-well plate. The plates were then thawed and the supernatants assayed for various cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and IL-12) using the Cytoscreen immunoassay kits (Biosource International, Camarillo, CA) according to the manufacturer's instructions.

10 **Statistical analysis**

Differences in the SI values between the patient groups were assessed by Pearson χ^2 and Fisher's exact tests. For the purpose of the statistical analysis, significant proliferative response was defined as $SI \geq 3.0$. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

15

EXAMPLE 2

A total of 69 women ranging in age from 17 to 54 years (median 31 years) were enrolled in the study. Of these 69 women, 52 were white, 8 each were African 20 American and Hispanic, and one was Asian (Table 2). PBMC from these women were analyzed for proliferative response to the synthetic peptides corresponding with antigenic sequences of the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 (Table 3) (FIG. 1A).

Analyses of proliferative responses specific to various E6 and E7 peptides in 25 each of the four different groups of patients revealed that the majority of patients in group 3 (Recur^(c)) exhibited positive responses ($SI \geq 3.0$) to all the seven E6 peptides and 7/8 E7 peptides tested (FIG. 1A). On the other hand, only 5/31 untreated patients in the group 2 (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾) and none in the groups 1 (CIN⁽⁺⁾/HPV⁽⁺⁾) and 4 (Recur^(c)) showed responses to any of the peptides tested. This is summarized in FIG. 1B.

30

The relationship between proliferative response to E6 and/or E7 peptides and post-treatment disease status in women in groups 3 and 4 are presented in Table 4.

Whereas none of the patients in group 4 (Recur⁽⁺⁾) showed response to any E6 or E7 peptide tested, in group 3 64% of patients had significant proliferative responses to the E6 peptides (p = 0.001), 82% to the E7 peptides (p < 0.001), and 86% to at least one of the E6 or E7 peptides (p < 0.001). There was no difference in proliferative response to 5 a common mitogen like PHA (p = 0.912, data not shown) between groups 3 and 4, suggesting that there is no impairment in the innate immune status of these patients. These results strongly suggest a relationship of proliferative responses to synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 and disease-free condition after CIN treatment.

10

The inventors identified higher levels of proliferative responses to two peptides each from the E6 (Q15L and V10C) and E7 (Q19D and R9F). Representative proliferative responses, in terms of SI values, from 2 patients in groups 3 and 4 to 7 synthetic peptides from the E6 oncoprotein and 8 from E7 oncoprotein of HPV-16 are 15 shown in FIG. 2. Comparison of proliferative responses to these four peptides showed statistically significant differences between women in groups 3 and 4 (Table 5). Whereas no proliferative responses to these peptides were observed in group 4, in group 3 a total of 11 women exhibited responses to peptide Q15L (p = 0.006), 10 to peptide V10C (p = 0.006), 13 to peptide Q19D (p = 0.002), and 10 to peptide R9F (p = 0.013). 20 As seen in Table 3, nine of the 10 amino acids in the E6 peptide V10C overlap with those of Q15L peptide. Similarly, the 9 amino acids of the E7 peptide R9F overlap with amino acids of the Q19D peptide. Proliferative responses specific to these four peptides together could account for all the responses (19/22 women) observed in group 3 (Recur⁽⁺⁾). These results suggest that, with respect to HPV-specific cellular immune 25 responses, the amino acid sequences for the Q15L and Q19D peptides within the HPV-16 oncoproteins E6 and E7, respectively, may be immunodominant regions.

The inventors also tested, on a subsample of the study population, whether these peptides will also induce production of various TH1 and TH2 cytokines. 30 Cryopreserved PBMC from 8 women in group 3 (Recur(-)), and 6 from group 4 (Recur⁽⁺⁾) were stimulated in vitro with peptides Q15L and Q19D. The amounts of various TH1 cytokines (IL-2, IL-12, and IFN- \square), and TH2 cytokines (IL-4 and IL-10) in the culture supernatants, after adjusting to unstimulated cultures were shown in FIG.

3. PBMC from 7 of 8 (87.5%), and 5 of 8 (62.5%) women in group 3 (Recur(-)) showed production of IFN- \square , and IL-2, respectively, in response to both Q15L and Q19D (Table 6). Additionally, IL-12 production was observed in response to Q15L in PBMC from 3 of 8 women in this group, whereas Q19D-mediated production of IL-12 was evident in 6 of 8 women. On the other hand, none of the PBMC from women in this group secreted IL-4 in response to stimulation with peptides Q15L or Q19D, and only 3 women showed IL-10 production in response to either of the peptides. In contrast to women in group 3 (Recur⁽⁻⁾), women in group 4 (Recur⁽⁺⁾) predominantly showed IL-10 production (5 of 6 with Q15L, and 6 of 6 with the Q19D). In 1 of the 6 women in this group, IL-4 production was observed when the PBMC were stimulated with either of the two peptides tested (Table 6). Overall, these results showed that patients in group 3 (Recur⁽⁻⁾) predominantly exhibited TH1 cytokine production (IL-2, IFN- γ , and IL-12), whereas women in group 4 (Recur⁽⁺⁾), despite not exhibiting specific proliferative responses directed against the HPV peptides, showed production of IL-10, a TH2 cytokine.

Table 4
Association between proliferative response to all synthetic peptides of
HPV-16 oncoproteins E6 and/or E7 and disease status following CIN treatment

Proliferative Response	Group 3 (Disease-free)	Group 4 (recurrence)	Significance
E6 peptides			
Yes ^a	14 (64%)	0	
No ^b	8 (36%)	10 (100%)	p = 0.001
E7 peptides			
Yes ^a	18 (82%)	0	
No ^b	4 (18%)	10 (100%)	p < 0.001
Any E6 or E7 peptide			
Yes ^a	19 (86%)	0	
No ^b	3 (14%)	10 (100%)	p < 0.001

20 ^aSI \geq 3.0

^bSI < 3.0

WO 03/008649

PCT/US02/23198

100

Table 5
Association between proliferative response to specific synthetic peptides of
HPV-16 oncoproteins E6 and/or E7 and disease status following CIN treatment

Proliferative Response	Group 3 (disease-free) (n=22)	Group 4 (recurrence) (n=10)	Significance
E6 peptides			
Q15L	Yes ^a No ^b	11 (50%) 11 (50%)	0 10 (100%) P = 0.006
V10C	Yes ^a No ^b	11 (50%) 11 (50%)	0 10 (100%) P = 0.006
E7 peptides			
Q19D	Yes ^a No ^b	13 (59%) 9 (41%)	0 10 (100%) P = 0.002
R9F	Yes ^a No ^b	10 (46%) 12 (54%)	0 10 (100%) P = 0.013

5 ^aSI ≥ 3.0^bSI < 3.0

Table 6
Cytokine production of PBMC from patients in groups 3 and 4 in response to
stimulation with synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16^a

Cytokine ^b	Group 3 (n = 8)		Group 4 (n = 6)	
	Q15L ^c	Q19D ^d	Q15L	Q19D
IFN-γ	7/8	7/8	0/6	0/6
IL-2	5/8	5/8	0/6	0/6
IL-12	3/8	6/8	0/6	1/6
IL-4	0/8	0/8	1/6	1/6
IL-10	3/8	3/8	5/6	6/6

^a Number of patients positive / number tested.

- ^b Positivity for cytokine production is based on values above the sensitivity of the test kit used for each cytokine in terms of pg/ml: IL-2 = 8.7, IFN- γ = 4.0, IL-12 = 1.0, IL-4 = 2.0, and IL-10 = 5.0.
- 5 ^c Q15L Peptide from the E6 oncoprotein of HPV-16.
- ^d Q19D Peptide from the E7 oncoprotein of HPV-16.

All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While 10 the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the compositions and methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents that are both 15 chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

REFERENCES

The following references are specifically incorporated herein by reference.

- 5 U.S. Patent 3,817,837
- U.S. Patent 3,850,752
- U.S. Patent 3,939,350
- U.S. Patent 3,996,345
- U.S. Patent 4,162,282
- 10 U.S. Patent 4,275,149
- U.S. Patent 4,277,437
- U.S. Patent 4,310,505
- U.S. Patent 4,533,254
- U.S. Patent 4,683,195
- 15 U.S. Patent 4,683,202
- U.S. Patent 4,728,575
- U.S. Patent 4,728,578
- U.S. Patent 4,737,323
- U.S. Patent 4,797,368
- 20 U.S. Patent 4,800,159
- U.S. Patent 4,883,750
- U.S. Patent 4,921,706
- U.S. Patent 5,028,592
- U.S. Patent 5,139,941
- 25 U.S. Patent 5,279,721
- U.S. Patent 5,432,260
- U.S. Patent 5,786,214
- U.S. Patent 5,840,317
- U.S. Patent 5,840,873
- 30 U.S. Patent 5,843,640
- U.S. Patent 5,843,651
- U.S. Patent 5,843,663
- U.S. Patent 5,846,708

WO 03/008649

PCT/US02/23198

103

U.S. Patent 5,846,717
U.S. Patent 5,846,726
U.S. Patent 5,846,729
U.S. Patent 5,849,481
5 U.S. Patent 5,849,486
U.S. Patent 5,849,487
U.S. Patent 5,851,772
U.S. Patent 5,853,990
U.S. Patent 5,853,992
10 U.S. Patent 5,853,993
U.S. Patent 5,856,092
U.S. Patent 5,861,244
U.S. Patent 5,863,732
U.S. Patent 5,863,753
15 U.S. Patent 5,866,331
U.S. Patent 5,871,727
U.S. Patent 5,879,703
U.S. Patent 5,882,654
U.S. Patent 5,900,481
20 U.S. Patent 5,905,024
U.S. Patent 5,910,407
U.S. Patent 5,912,124
U.S. Patent 5,912,145
U.S. Patent 5,919,626
25 U.S. Patent 5,919,630
U.S. Patent 5,925,517
U.S. Patent 5,928,862
U.S. Patent 5,928,869
U.S. Patent 5,929,227
30 U.S. Patent 5,932,413
U.S. Patent 5,935,791
U.S. Patent 5,939,277
U.S. Patent 6,107,090

WO 03/008649

PCT/US02/23198

104

- U.S. Patent 6,135,965
U.S. Patent 6,214,874
U.S. Patent 6,238,659
U.S. Patent 6,245,568
5 U.S. Patent 6,258,576
EPA No. 320,308
EPA No. 329,822
EPO 0273085
GB Application No. 2202328
10 GB Application No. 2193095 A
PCT Application No. PCT/US85/01161
PCT Application No. PCT/US87/00880
PCT Application No. PCT/US89/01025
PCT Application No. PCT/US89/05040;
15 PCT Application WO 88/10315
PCT Application WO 89/06700
WO 90/07641
WO 98/0748
WO 99/18933
20 Abbondanzo, *et al.*, Am J Clin Pathol., 93(5):698-702, 1990.
Abe, *et al.*, *Neurosci Res.*, 38(4):325-9, 2000.
25 Aichele, *et al.*, *J Exp Med.*, 171(5):1815-20, 1990.
Aksentijevich *et al.*, *Hum Gene Ther.*, 7(9):1111-22, 1996.
30 Allred, *et al.*, *Arch Surg.* 1990 Jan;125(1):107-13. Review.
Altman *et al.*, *Science*, 274:94-96, 1996.
35 Baichwal *et al.*, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: *Gene Transfer*, Kucherlapati, R., ed.,
Bajorin, *et al.*, *J Clin Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.
Bangham, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 13:238-252, 1965.

- Barany, *et al.*, "Solid-Phase Peptide Synthesis," *In: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meinhof, eds., Academic Press, New York, pp. 3-284, 1980.
- 5 Bevan, *et al.*, *Nature*, 342(6249):478-9, 1989.
- Birner, *et al.*, *Mod. Pathol.*, 14(7):702-9, 2001.
- Boussif *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92:7297-7301, 1995.
- 10 Brinton, *et al.*, *In: N. Munoz, F.X. Bosch, K.V. Shah, and A. Meheus (eds.), The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus* (IARC Scientific Publications, 119), pp. 3-23. Lyon: Oxford University Press, 1992.
- Brown, *et al.*, *Am J Vet Res.*, 51(9):1476-80, 1990.
- 15 Canfield *et al.*, *Methods in Enzymology*, 189, 418-422, 1990.
- Capaldi, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- 20 Casement, *et al.*, *Virology*, 211(1):261-7, 1995.
- Cason, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 50: 349-355, 1992.
- 25 Chang *et al.*, *Hepatology*, 14:134A, 1991.
- Chen, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Cheng, *et al.*, *Investigative Radiology*, vol. 22, pp. 47-55 (1987).
- 30 Clark *et al.*, *Human Gene Therapy*, 6:1329-1341.1995
- Clave, *et al.*, *Diagn. Mol. Pathol.*, 9(3) 145-150, 2000.
- Clerici, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 245-250, 1997.
- 35 Coffin, *In: Virology*, Fields *et al.*, eds., Raven Press, New York, pp. 1437-1500, 1990.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- 40 Crowe, *et al.*, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 3(2):135-45, 1987.
- da Costa, *et al.*, *Biocell*, 23(1): 65-72, 1999.
- De Gruijil, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 77, 2183-2191, 1996.
- 45 De Jager, *et al.*, *Semin Nucl Med.* 1993 Apr;23(2):165-79. Review.
- Deamer, *et al.*, in *Liposomes* (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York (1983), pp. 27-52.

- Deres, *et al.*, *Nature*, 1989 Nov 30;342(6249):561-4.
- Doolittle, *et al.*, *Methods Mol Biol*. 1999;109:215-37. Review
- 5 el Gorab, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 306(1):58-66, 1973.
- Fechheimer *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- 10 Felgner *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7413-7, 1987.
- Feltkamp, *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23: 2242-2249, 1993.
- 15 Fendler *et al.*, *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975.
- Flotte *et al.*, *Gene Therapy*, 2:29-37, 1995.
- 20 Flotte, *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7:349-356, 1992.
- Fraley *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Fraley, *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, 1981
- 25 Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frohman, *PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1990.
- 30 Fujishima, *et al.*, *Cytometry*, 24(4):382-9, 1996.
- Gabizon *et al.*, *Cancer Res.*, 50(19):6371-8, 1990.
- 35 Ghosh, *et al.*, In: Wu G. Wu C ed., *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, New York: Marel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Gilliland *et al.*, *Cancer Res.*, 40(10):3564-9, 1980.
- 30 Gloeckner, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 252(1-2):131-8, 2001.
- 40 Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- 45 Graham, *et al.*, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Gregoriadis, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 89(4):1287-1293, 1979.

- Gregoridis, G., ed., *Liposome Technology*, vol. I, pp. 30-35, 51-65 and 79-107, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1984.
- 5 Grunhaus, *et al.*, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Gulbis, *et al.*, *Hum Pathol*. 1993 Dec;24(12):1271-85. Review.
- Hamsikova, *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 170: 1424-1431, 1994
- 10 Hara *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1278(1):51-8, 1996
- Harland, *et al.*, *J. Cell Biol*, 101:1094-1099, 1985.
- 15 Heath, *et al.*, *Chem. Phys. Lipids*, 40:347, 1986.
- Hermonat, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Hope *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 55-65, 1985.
- 20 Horwitz *et al.* *J. Virol*, 64:642-650, 1990.
- Irie, *et al.*, *Lancet*, 1(8641):786-7, 1989.
- 25 Irie, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(22):8694-8, 1986.
- Jha, *et al.*, *Lancet*, 341: 1116-1118, 1993.
- Kadish, *et al.*, *J. Natl. Cancer. Inst.* 89:1285-1293, 1997.
- 30 Kaplitt *et al.*, *Nature Genetics*, 8:148-154, 1994
- Kast, *et al.*, *Immunol Lett.*, 30(2):229-32, 1991.
- Kast, *et al.*, *J. Immunotherapy*, 14: 115-120, 1993.
- 35 Kotin *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:2211-2215, 1990.
- Koutsky, *et al.*, *N Engl J Med*. 327(18):1272-8, 1992
- 40 Kurman, *et al.*, *JAMA*, 271:1866-1869, 1994.
- Kurman, *et al.*, The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Definitions, criteri and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag. pp,30-43, 1994.
- 45 Kwack, *et al.*, *Mol Cells*, 10(5):575-8, 2000.
- LaFace *et al.*, *Viology*, 162:483-486, 1988.

- Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60:515-524, 1986.
- Lebkowski, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996, 1988.
- 5 Liu *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1240(2):277-84, 1995.
- Lorenzato *et al.*, *J. Pathol.*, 194(2):171-6, 2001.
- 10 Lorincz, *et al.*, *Obstet. Gynecol.*, 79: 328-337, 1992.
- Lukacher, *et al.*, *J Exp Med.*, 160(3):814-26, 1984.
- Luo *et al.*, *Blood*, 82:suppl. 1:303A, 1994.
- 15 Manning, *et al.*, *Biotechniques*, 6:682, 1988.
- Martin *et al.*, *Nature*, 345(6277):739-743, 1990.
- Mayer *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 858, pp. 161-168, 1986.
- 20 Mayhew *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 775, pp. 169-174, 1984.
- Mayhew *et al.*, *Methods in Enzymology*, vol. 149, pp. 64-77, 1987.
- 25 McCarty *et al.*, *J. Virol.*, 65:2936-2945, 1991.
- McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1988.
- Mitchell, *et al.*, *Ann NY Acad Sci.*, 690:153-66, 1993.
- 30 Mitchell, *et al.*, *J Clin Oncol.*, 8(5):856-69, 1990.
- Morrison, *et al.*, *Int J Cancer*, 49(1):6-13, 1991.
- 35 Morton, *et al.*, *Ann Surg.*, 216(4):463-82, 1992.
- Morton, *et al.*, *CA Cancer J Clin.*, 46(4):225-44, 1996.
- Munger, *et al.*, *J. Virol.*, 63: 4417-4421, 1989.
- 40 Munoz, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 52: 743-749, 1992.
- Muzyczka, N., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.
- 45 Nakagawa, *et al.*, *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 3: 205-210, 1996.
- Nakagawa, *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 175: 927-931, 1997.
- Nehete *et al.*, *J. Clin. Immunol.*, 16:115-124, 1996.

- Nehete, *et al.*, *Cell Immunol.*, 160(2):217-23, 1995.
- 5 Nicolas, *et al.*, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- 10 Ohi *et al.*, *Gene*, 89:279-282, 1990.
- Park, *et al.*, *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 18: 171-175, 1992.
- Parkin, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 84:827-841, 1999.
- 15 Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Plenum Press, New York, pp. 117-148, 1986.
- Pojak, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 37:796-797, 1999.
- 20 Potter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Ravindranath, *et al.*, *Int Rev Immunol.*, 7(4):303-29, 1991.
- 25 Ridgeway, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez R.L., Denhardt D.T., eds., Butterworth, Stoneham, England, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- 30 Rosenberg, *et al.*, *N Engl J Med.*, 319(25):1676-80, 1988.
- Rosser, *et al.*, *J Immunol.*, 135(5):3289-97, 1985.
- 35 Roux *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Harbor, N.Y., 1989.
- 40 Samulski *et al.*, *EMBO J.*, 10:3941-3950, 1991.
- Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 63:3822-3828, 1989.
- Sarkar, *et al.*, *Viral Immunol.*, 8: 165-174, 1995.
- 45 Sastry, *et al.*, *Vaccine*, 12(14):1281-7, 1994.
- Sastry, *et al.*, *Virology*, 188: 502-509, 1992.

WO 03/008649

PCT/US02/23198

110

- Seedorf, *et al.*, *EMBO J.*, 6: 139-144, 1987.
- Shelling, *et al.*, *Gene Therapy*, 1:165-169, 1994.
- 5 Shepherd, *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 73: 1269-1274, 1992.
- Shinoda *et al.*, *Colloidal Surfactant*, Academic Press, especially "The Formation of Micelles", Ch. 1, 1-96, 1963.
- 10 Solodin *et al.*, *Biochemistry*, 34(41):13537-44, 1995.
- Spanjer *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 734(1):40-7, 1983.
- 15 Stauss, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7871-7875, 1992.
- Strang, *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 71: 423-431, 1990.
- 20 Stratford-Perricaudet, *et al.*, *In: Human Gene Transfer*, O. Cohen-Haguenauer and M. Boiron, eds., John Libbey Eurotext, France, p. 51-61, 1991.
- Szoka, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75:4194-4198, 1978.
- Tam, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- 25 Templeton *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(7):647-52, 1997.
- Thierry *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(21):9742-6, 1995.
- Tindle, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5887-5891, 1991.
- 30 Tobery, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 254(1-2):59-66, 2001.
- Tooze, J., ed., *Molecular Biology of DNA Tumor Viruses*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1991.
- Townsend, *et al.*, *Cell*, 44:949-968, 1986.
- 35 Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.
- 40 Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:32581-3260, 1985.
- Tsukui, *et al.*, *Cancer Res.*, 56: 3967-3974, 1996.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- 45 Unanue, *et al.*, *FASEB J.*, 13:2496-502, 1989.
- Von Knebel Doeberitz, *et al.*, *Cancer Res.*, 48: 3780-3786, 1988.

WO 03/008649

PCT/US02/23198

111

- Wagner *et al.*, *Mol. Cell* 40: 281-286, 1999.
- Wallace, *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9:879, 1981
- 5 Walsh *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89:7257-7261, 1994.
- Wei *et al.*, *Gene Therapy*, 1:261-268, 1994.
- 10 Wettstein, *et al.*, In: H. Pfister (ed.), *Papillomaviruses and Human Cancer*, pp. 145. Florida: CRC Press, 1990.
- Wu, *et al.*, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.
- 15 Wu, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Yang *et al.*, *J. Virol.*, 68:4847-4856, 1994.
- Yoder *et al.*, *Blood*, 82:suppl. 1:347A, 1994.
- 20 Zhou *et al.*, *Exp. Hematol. (NY)*, 21:928-933, 1993.
- Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:1867-1875, 1994.
- Zhu *et al.*, *Chin J Biotechnol*, 9(4):257-61, 1993.
- 25 Zur Hausen, *et al.*, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 186:131-156, 1994.

CLAIMS:

1. A method for determining the possibility of recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth in a patient infected with human papilloma virus (HPV) or suspected 5 of being infected with HPV, wherein the patient also has or had a pre-cancerous or cancerous growth on or around the cervix comprising:
 - a) incubating at least one E6 or E7 peptide of HPV with a sample from the patient; and
 - b) assaying the sample for a cell-mediated immune response against the 10 peptide.
2. The method of claim 1, wherein the sample is incubated with at least two E6 or at least two E7 peptides.
- 15 3. The method of claim 1, wherein the sample is incubated with an E6 peptide of HPV.
4. The method of claim 3, wherein the E6 peptide is K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, P10I, Q20P, R16R, or G10S.
- 20 5. The method of claim 4, wherein the E6 peptide is K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, or a combination thereof.
6. The method of claim 1, wherein the sample is incubated with an E7 peptide of 25 HPV.
7. The method of claim 6, wherein the E7 peptide is T10Q, M9T, D9L, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C, or D20C.
- 30 8. The method of claim 7, wherein the E7 peptide is Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C, or a combination thereof.

WO 03/008649

PCT/US02/23198

113

9. The method of claim 1, wherein the sample is incubated with at least one E6 peptide and at least one E7 peptide.
10. The method of claim 1, wherein the patient is known to be infected with HPV.
- 5 11. The method of claim 1, further comprising determining whether the patient is infected with HPV.
12. The method of claim 1, wherein the patient has or had a pre-cancerous growth.
- 10 13. The method of claim 12, wherein the pre-cancerous growth is cervical intraepithelial neoplasia (CIN).
14. The method of claim 1, wherein the patient no longer has the pre-cancerous or
- 15 cancerous growth.
15. The method of claim 14, wherein the patient no longer has a pre-cancerous growth.
- 20 16. The method of claim 15, wherein the pre-cancerous growth is CIN.
17. The method of claim 1, wherein the sample is blood.
18. The method of claim 1, wherein the sample is obtained by a vaginal swab,
- 25 19. The method of claim 1, wherein the sample comprises peripheral blood mononuclear cells.
20. The method of claim 1, further comprising incubating the sample in media after
- 30 obtaining the sample.
21. The method of claim 1, wherein the assaying comprises contacting the sample with the peptide and measuring the sample for T-cell proliferation.

22. The method of claim 21, wherein T-cell proliferation is assayed by measuring incorporation of tritiated thymidine.

5 23. The method of claim 22, wherein the sample has an SI value of 2.0 or greater, indicating a cell-mediated immune response.

24. The method of claim 23, wherein the sample has an SI value of 3.0 or greater, indicating a cell-mediated immune response.

10 25. The method of claim 1, wherein the assaying comprises measuring an amount of a TH1 or TH2 cytokine.

26. The method of claim 25, wherein the amount of a TH1 cytokine is measured.

15 27. The method of claim 26, wherein the TH1 cytokine is IL-2, IFN- γ , TNF- α , or TNF- β .

28. The method of claim 25, wherein the amount of a TH2 cytokine is measured.

20 29. The method of claim 28, wherein the TH2 cytokine is IL-4, IL-5, IL-10, or IL-13.

25 30. The method of claim 25, wherein the TH1 or TH2 cytokine is measured with an immunoassay.

31. The method of claim 30, wherein the immunoassay is ELISA or a radioimmunoassay.

30 32. The method of claim 25, wherein the TH1 or TH2 cytokine is measured by flow-cytometry.

33. The method of claim 1, wherein the sample is assayed more than once.

34. The method of claim 33, wherein the sample is assayed using different assays.

35. The method of claim wherein, further comprising obtaining a second sample
5 from the patient and assaying the second sample for a cell-mediated immune response
against at least one E6 or E7 peptide of HPV.

36. The method of claim 1, wherein the sample is obtained from the patient at least
one month after treatment for a pre-cancerous or cancerous growth.

10

37. The method of claim 1, wherein the patient has undergone ablative treatment of
a pre-cancerous or cancerous growth in the genitourinary tract.

15

38. A method of identifying an HPV-infected patient at risk for recurrence of a pre-
cancerous or cancerous growth comprising:

- a) incubating a blood sample from the patient with an E6 or E7 peptide;
- b) evaluating the sample for a cell-mediated immune response against the
peptide.

20

39. The method of claim 38, wherein the E6 or E7 peptide has the amino acid
sequence of K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, Q20P, P10I, R16R, G10S, T10Q,
M9T, D9L, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C, or D20C.

25

40. The method of claim 1, wherein the human papilloma virus is a high grade type.

41. The method of claim 40, wherein the human papilloma virus is HPV 16.

30

42. A method for preventing recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth in a
patient infected with HPV and treated for the growth comprising:

- a) identifying a patient at risk for recurrence of HPV-associated pre-
cancerous or cancerous growth; and

- b) administering to the patient an effective amount of at least one E6 or E7 HPV peptide to induce a cell-mediated immune response against the peptide.
- 5 43. A kit for determining the possibility of recurrence of a pre-cancerous or cancerous growth in a patient infected with HPV and treated for the growth comprising, in a suitable container means, at least one E6 or E7 HPV peptide, an antibody, and a detection reagent.
- 10 44. The kit of claim 43, wherein the kit comprises at least one E6 peptide.
45. The kit of claim 44, wherein the E6 peptide is K9L, E10I, C10R, Q15L, V10C, P9L, P10I, Q20P, R16R, or GS10S.
- 15 46. The kit of claim 43, wherein the kit comprises at least one E7 peptide.
47. The kit of claim 46, wherein the E7 peptide is T10Q, M9T, D9L, Q19D, R9F, R9V, L9V, G10C, or D20C.
- 20 48. The kit of claim 43, wherein the antibody is directed against a TH1 cytokine.
49. The kit of claim 43, wherein the antibody is directed against a TH1 cytokine receptor.

WO 03/008649

PCT/US02/23198

1/4

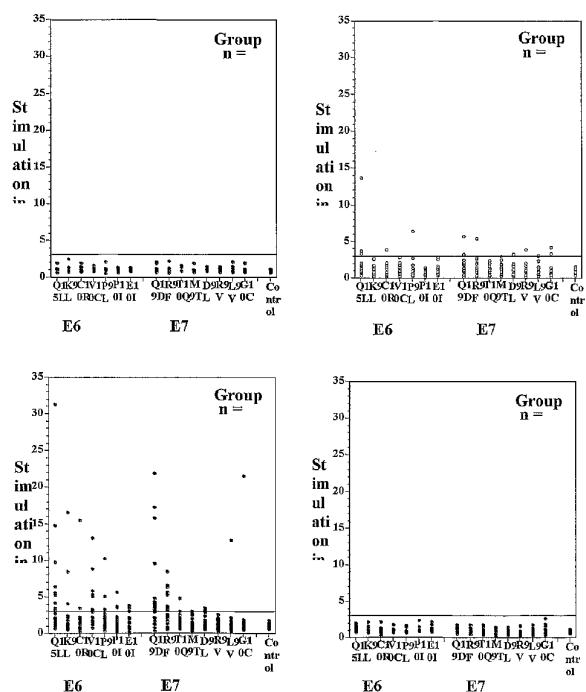


FIG. 1 A

WO 03/008649

PCT/US02/23198

2/4

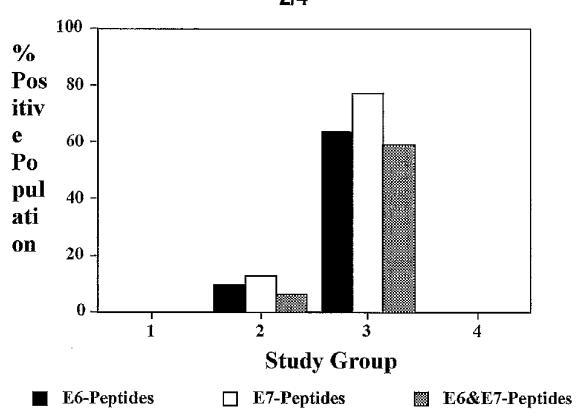


FIG. 1 B

WO 03/008649

PCT/US02/23198

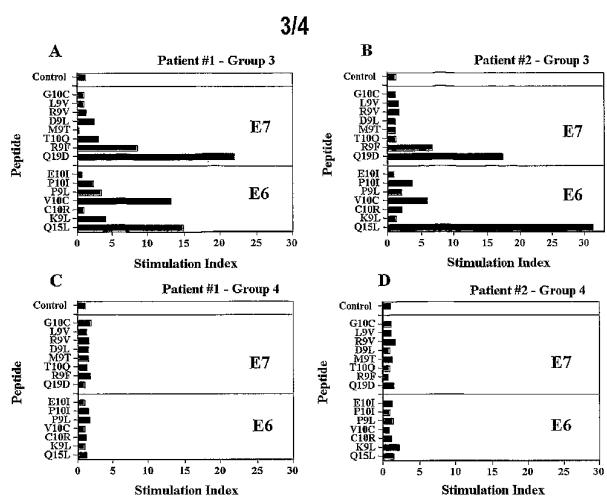


FIG. 2

WO 03/008649

PCT/US02/23198

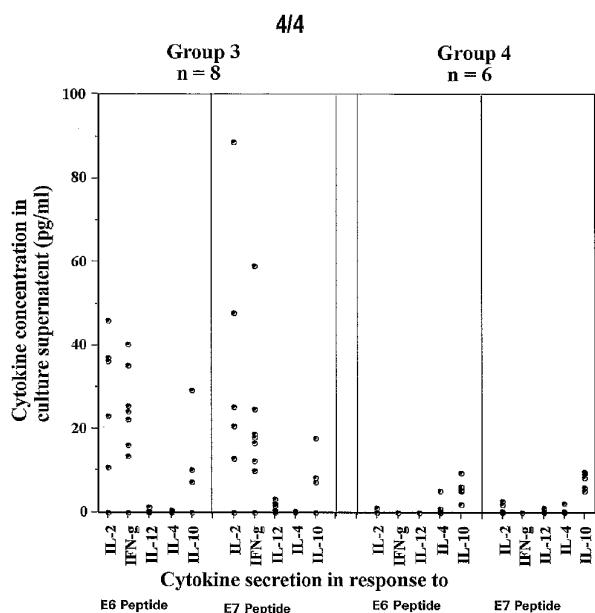


FIG. 3

WO 03/008649

PCT/US02/23198

1

SEQUENCE LISTING

<110> SASTRY, K. JAGANNADHA
TORTOLERO-LUNA, GUILLERMO
FOLLEN, MICHELE

<120> METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO HPV-ASSOCIATED
PRE-CANCEROUS AND CANCEROUS GROWTHS, INCLUDING CIN

<130> UTFC:560WO

<140> UNKNOWN
<141> 2002-07-19

<150> 60/306,809
<151> 2001-07-20

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 1
Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 2
Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 3
Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 4

WO 03/008649

PCT/US02/23198

2

Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 5
Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 6
Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 7
Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile
1 5 10

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 8
Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
1 5 10 15

Cys Gln Lys Pro
20

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 9
Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg
1 5 10 15

<210> 10

WO 03/008649

PCT/US02/23198

3

<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 10
Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 11
Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Glu Leu Gln
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 12
Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 13
Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu
1 5

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 14
Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
1 5 10 15

Lys Cys Asp

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 15

WO 03/008649

PCT/US02/23198

4

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 16
Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 17
Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 18
Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
1 5 10

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 19
Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
1 5 10 15

Cys Pro Ile Cys
20

<210> 20
<211> 151
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 20
Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

WO 03/008649

PCT/US02/23198

5

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
 35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
 50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
 85 90 95

Cys Asp Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
 100 105 110

Glu Glu Iys Gln Arg His Leu Asp Iys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
 115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
 130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150

<210> 21
<211> 590
<212> PRT
<213> Human papillomavirus

<400> 21
Met Ser Leu Pro Gly Gly Arg Gly Thr Val Lys Ile Glu Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Arg Ile Trp Val Arg Arg Val Asn Gly Glu Thr Gly Val Tyr Asp Thr
 20 25 30

Arg Ala Gly Ser Phe Glu Thr Val Ser Cys Gln Glu Phe Glu Ala Ala
 35 40 45

Ala Asp Thr Val Pro Ser Val Pro Val Phe Cys Asp Arg Cys Phe Gly
 50 55 60

Thr Ser Leu Tyr Glu Val Pro Leu Thr Gly Phe Gly Thr Phe Val Val
 65 70 75 80

Gly Thr Cys Cys Ile Phe Ser Pro Gly Asp Pro Val Asp Asp Pro Ser
 85 90 95

Ile Pro Ala His Met Arg Lys Tyr Gln Gln Pro Ile Glu Ala His Gln
 100 105 110

Thr Met Val Gln Val Ala Pro Gly Thr Leu Lys Tyr Ser His Gln Ile
 115 120 125

Pro Met Gly Lys Val Leu Gly Tyr Trp His Val His Met Glu Asp Arg
 130 135 140

WO 03/008649

PCT/US02/23198

6

Val Tyr Leu Asn Met Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ser Glu Asp Thr Gly
 145 150 155 160

Lys Arg Cys Val Glu Thr Phe Thr Glu Ala Asp Ile Pro Cys Ala Leu
 165 170 175

Ser Leu Gly Thr Leu Asp Val Gly Leu Asn Glu Val Ile Leu Glu Cys
 180 185 190

Ser Val Val Val Ile Pro Ala Arg Arg Gly Cys His Ala Lys Leu Phe
 195 200 205

Thr Arg Asp Thr Val Ser Asp Gly Leu Glu Lys Phe Cys Phe Gln Ser
 210 215 220

His Ala Thr Leu Pro Pro Thr Leu Leu Ala Ser Phe Gly Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Glu Ser Pro Glu Arg Lys Thr Phe Tyr Glu Ala His Val Asp Ala Leu
 245 250 255

Asn Asn Tyr Ile Lys Leu Leu Arg Thr Ile Tyr Ser His Lys Gly Glu
 260 265 270

Thr Glu Ile Glu Gln Tyr Leu Ile Glu Gly Ser Lys Leu Tyr Ser Glu
 275 280 285

Leu Ile Gly Glu Pro Ser Arg Val Leu Asp Ala Thr Met Lys Ala Ala
 290 295 300

Gln Ile Ala Glu Pro Gln Thr His Thr Gly Gly Ala Asp Arg Gln Arg
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Pro Asp Gly Ile Pro Tyr Ser Val Pro Asp Arg Phe Pro
 325 330 335

Met Thr Gly Tyr Pro Phe Ala Pro Gln Phe Cys Gly Asp Pro Gly Leu
 340 345 350

Val Ser His Tyr Asn Pro Phe Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Gln Gly
 355 360 365

Tyr Gly Pro Glu Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Pro Gln Pro Pro Asn Pro
 370 375 380

Tyr Val Leu Pro Ile Ser Tyr Gly Gln Gln Pro Tyr Pro Gly His Pro
 385 390 395 400

Gln Pro His Gly His His Gln Gln Arg Ser Gly Gly Asp Leu Lys
 405 410 415

Ala Glu Leu Ile Glu Thr Leu Gly Leu Ala Pro Lys Thr Asn Ala Val
 420 425 430

Gln Glu Ser Leu Lys Ser Phe Ile Ser Glu Ile Leu Glu Ser Glu Leu
 435 440 445

WO 03/008649

PCT/US02/23198

7

Lys Asn Cys Gly Ile Lys Arg Ala Ala Gly Asn Ile Glu Arg Asn Cys
 450 455 460

Asp Val Asp Glu Glu Pro Pro Arg Thr Lys Arg Ala Arg Pro Glu Pro
 465 470 475 480

Lys Thr Ala Val Glu Ala Ile Val Arg Ala Pro Tyr Gly Asp Phe Asp
 485 490 495

Ser Thr Ala Leu Thr Thr Lys Ile Gly Gln Val Ser Asp Thr Val Glu
 500 505 510

Lys Leu Asn Lys Val Ile Glu Thr Leu Leu Thr Gln Ser Ser Ala Gln
 515 520 525

Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Gln Ala Ala Pro Val Gln Pro Ser
 530 535 540

Leu Pro Gln Pro Val Pro Glu Pro Leu Ala Pro Gln Glu Pro Pro Pro
 545 550 555 560

Pro Gly Thr Ser Ala Pro Thr Leu Glu Ala Ser Leu Pro Gln Gln Lys
 565 570 575

Pro Val Val Ser Lys Gly Ala Phe Glu Thr Leu Met Asn Leu
 580 585 590

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 22
 Ser Thr Arg Thr Pro Glu Asp Ser Asn Ser Leu Gly Thr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Human papillomavirus

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> M = A, C, or G

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> W = A and T

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (15)
 <223> Y = C and T

WO 03/008649

PCT/US02/23198

8

<400> 23
gcgcgcggggwc ataayaatgg

20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Human papillomavirus<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> M = A, C, or R<220>
<221> modified_base
<222> (8)..(9)
<223> R = A and G<220>
<221> modified_base
<222> (13)
<223> W = A and T<400> 24
cggtccmarrg gawactgatc

20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Human papillomavirus<400> 25
catacacacctc cagcacctaa

20

<210> 26
<211> 99
<212> FRT
<213> Human papillomavirus type 16<400> 26
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15
Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Ser Asp Ser Ser
20 25 30
Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60
Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

WO 03/008649

PCT/US02/23198

9

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro

<210> 27
<211> 151
<212> PRT
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 27
Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr
20 25 30

Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
50 55 60

Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu
85 90 95

Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro
100 105 110

Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile
115 120 125

Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/28198																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/70; C07K 1/10; C12N 7/00; A61K 39/395 US CL : 435/6, 435, 435.1; 550/350, 557.1; 439/154.1 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) U.S. : 435/6, 435, 435.1; 550/350, 557.1; 439/154.1																				
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 practicable, search terms used) WEST, DERWENT, EPA, JPA, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, NPL search terms: Papillomavirus, early protein, cancer, cervIP, detect ² , K9L, E10L, C10C, Q1SL, V10C, P9L, P10L, Q20P, R16R, G10S																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,665,535 A (ORTH et al) 09 September 1997, see the claims.</td> <td style="padding: 2px;">1-49</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">EP 0 402 132 A2 (TAKARA SHUZO CO. LTD.) 12 December 1990, see the abstract.</td> <td style="padding: 2px;">1-49</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,876,922 A (ORTH et al) 02 March 1999, see the claims.</td> <td style="padding: 2px;">1-49</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">EP 0 520 994 B1 (AMOCO CORPORATION) 06 September 1995, see the claims.</td> <td style="padding: 2px;">1-49</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">MULLER et al. Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 proteins E4, E6, E7 and L1. Journal of General Virology. 1990, Vol. 71, pages 2709-2717, see the abstract.</td> <td style="padding: 2px;">1-49</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5,665,535 A (ORTH et al) 09 September 1997, see the claims.	1-49	Y	EP 0 402 132 A2 (TAKARA SHUZO CO. LTD.) 12 December 1990, see the abstract.	1-49	Y	US 5,876,922 A (ORTH et al) 02 March 1999, see the claims.	1-49	Y	EP 0 520 994 B1 (AMOCO CORPORATION) 06 September 1995, see the claims.	1-49	Y	MULLER et al. Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 proteins E4, E6, E7 and L1. Journal of General Virology. 1990, Vol. 71, pages 2709-2717, see the abstract.	1-49
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 5,665,535 A (ORTH et al) 09 September 1997, see the claims.	1-49																		
Y	EP 0 402 132 A2 (TAKARA SHUZO CO. LTD.) 12 December 1990, see the abstract.	1-49																		
Y	US 5,876,922 A (ORTH et al) 02 March 1999, see the claims.	1-49																		
Y	EP 0 520 994 B1 (AMOCO CORPORATION) 06 September 1995, see the claims.	1-49																		
Y	MULLER et al. Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 proteins E4, E6, E7 and L1. Journal of General Virology. 1990, Vol. 71, pages 2709-2717, see the abstract.	1-49																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may draw priority on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 05 SEPTEMBER 2002		Date of mailing of the international search report 18 DEC 2002																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-8280																				
Authorized officer J. R. SALIMI Telephone No. (703) 305-0196																				

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/28198
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAGAWA et al. Cytotoxic T Lymphocyte Responses to E6 and E7 Proteins of Human Papillomavirus Type 16: Relationship to Cervical Intraepithelial Neoplasia. <i>The Journal of Infectious Diseases</i> . April 1997, Vol. 175, pages 927-931, see the abstract.	1-49
Y	SEIHR et al. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. <i>Journal of Immunological Methods</i> . 01 July 2001, Vol. 253 (1-2), pages 153-162, see the abstract.	1-49
Y	CLERICI et al. Cytokin Production Patterns in Cervical Intraepithelial Neoplasia: Association With Human Papillomavirus Infection. <i>Journal of the National Cancer Institute</i> . 05 February 1997, Vol. 89, No. 3, pages 245-250, see the entire document.	1-49
Y	NINDL et al. Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. <i>Archives of Virology</i> . 1994, Vol. 137, pages 341-353, see the abstract.	1-49
Y	FISHER et al. The Association of Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Antibodies with Stage of Cervical Cancer. <i>Gynecologic Oncology</i> . 1996, Vol. 61, No. 0099, pages 73-78, see the entire document.	1-49
Y	SARKAR et al. Studies on in Vivo Induction of Cytotoxic T Lymphocyte Responses by Synthetic Peptides from E6 and E7 Oncoproteins of Human Papillomavirus Type 16. <i>Viral Immunology</i> . 1995, Vol. 8, No. 3, pages 165-174, see the abstract.	1-49
Y	LORENZATO et al. DNA image cytometry and human papillomavirus (HPV) detection help to select smears at high risk of high-grade cervical lesions. <i>Journal of Pathology</i> . 20 April 2001, Vol. 194, pages 171-176, see the entire document.	1-49
Y	SASAGAWA et al. Identification of Antibodies against Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins in Sera of Patients with Cervical Neoplasias. <i>Japanese Journal of Cancer Research</i> . July 1992, Vol. 83, pages 705-713, see the abstract.	1-49

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	P
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	A

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N 0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 サストリー, ジャガンナダ ケー.

アメリカ合衆国 テキサス 78602, バストロップ, ママル ドライブ 400

(72)発明者 トルトレーロ - ルーナ, ギレルモ

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ハウストン, ホルコム ブールヴァード 1515

(72)発明者 フォレン, マイケル

アメリカ合衆国 テキサス 77017, ハウストン, キルビー 907

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA32 CA04 CA05 CA06 CA09 GA18 HA08 HA12 HA14

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ10 QQ79 QR42 QR48 QR69

QR77 QS10 QS24 QS28 QS36 QX01 QX07

4C084 AA02 BA44 CA62 ZB262

4C085 AA03 BB11 CC08 EE01

专利名称(译)	与HPV相关的癌前生长和癌生长相关的方法和组合物，包括CIN		
公开(公告)号	JP2004535816A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2003514964	申请日	2002-07-19
申请(专利权)人(译)	校董局，得克萨斯大学体系		
[标]发明人	サストリージャ ガンナダ ケー トルトレーロルーナ ギレルモ フォレンマイケル		
发明人	サストリー、ジャ ガンナダ ケー。 トルトレーロ-ルーナ、ギレルモ フォレン、マイケル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 C07K14/025 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/525 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/005 C12N2710/20022 G01N33/505 G01N33/56983 G01N33/571 G01N33/6863 G01N2333/025		
FI分类号	C12Q1/70.ZNA A61K39/00.H A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.P G01N33/566 A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS10 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/EE01		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/306809 2001-07-20 US		
其他公开文献	JP2004535816A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及人乳头瘤病毒(HPV)的E6和/或E7肽在评估感染HPV的患者中评估细胞介导的反应以确定该患者预后的发展或复发的预后的用途。癌变或癌变，包括宫颈上皮内瘤变(CIN)。

表1 改变アミノ酸および通常でないアミノ酸	
Abbr.	アミノ酸
Aad	2-アミノジビン酸
Baaad	3-アミノジビン酸
Bala	β-アラニン, β-アミノ-プロピオン酸
Abu	2-アミノ酪酸
4Abu	4-アミノ酪酸, ピベリジン酸
Acp	6-アミノカプロン酸
Ahe	2-アミノヘプタン酸
Aib	2-アミノイソ酪酸
Baib	3-アミノイソ酪酸
Apdm	2-アミノビメリン酸
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸
Des	デスマシン
Dpm	2,2'-ジアミノビメリン酸
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸
EtGly	N-エチルグリシン
Abbr.	アミノ酸
EtAsn	N-エチルアスパラギン
Hyl	ヒドロキシリジン
AHyl	アロ-ヒドロキシリジン
3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Ide	イソデスマシン
Alle	アロ-イソロイシン
MeGly	N-メチルグリシン, サルコシン
Melle	N-メチルイソロイシン
MeLys	6-N-メチルリジン
MeVal	N-メチルバリン
Nva	ノルバリン
Nle	ノルロイシン
Orn	オルニチン