

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-176390

(P2013-176390A)

(43) 公開日 平成25年9月9日 (2013.9.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 53 O L 外国語出願 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-107236 (P2013-107236)	(71) 出願人	593218462
(22) 出願日	平成25年5月21日 (2013.5.21)		インスティテュート・パスツール
(62) 分割の表示	特願2007-503308 (P2007-503308)		I N S T I T U T P A S T E U R
原出願日	平成17年3月18日 (2005.3.18)		フランス国、75724 パリ・セデュ・
(31) 優先権主張番号	04290741.0		15、リュウ・デュ・ドクトール・ルー、
(32) 優先日	平成16年3月18日 (2004.3.18)	(71) 出願人	506315871
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ジェンティセル
(特許庁注：以下のものは登録商標)			G E N T I C E L
1. フロッピー			フランス国、エフ-31682 ラベジュ
			・インノボル、ペペ 28262、リュ・
			ピエール・エ・マリー・キュリー・プロロ
			ーグ・バイオテク
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アデニル酸シクラーゼタンパク質またはその断片に挿入されたヒトパピローマウイルスエピトープを有する組換えタンパク質、およびその治療的使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染またはその悪性作用に対する治療手段の設計ために使用できる組換えタンパク質またはポリヌクレオチドを提供する。

【解決手段】 1個または数個のHPV抗原の1個または数個のエピトープを有する1個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質であって、アデニル酸シクラーゼ (CyaA) タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、該CyaA断片は、該アデニル酸シクラーゼが抗原提示細胞を標的化するという特性を保持している、前記組換えタンパク質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する 1 個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質であって、前記ポリペプチドは、アデニル酸シクラーゼ (C y a A) タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、前記 C y a A 断片は、抗原提示細胞を標的化するという前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持している、前記組換えタンパク質。

【請求項 2】

C y a A タンパク質断片は、C D 1 1 b / C D 1 8 抗原提示細胞を標的化するという前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持している、請求項 1 に記載の組換えタンパク質。

10

【請求項 3】

C y a A タンパク質断片は、標的化細胞のサイトゾルへの前記ポリペプチドのエピトープの転位または前記ポリペプチドの転位を可能とするという C y a A の特性を保持している、請求項 1 または 2 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 4】

C y a A タンパク質断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されている 1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドを含む請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組換えタンパク質であって、前記断片は、約 3 0 ~ 約 1 3 0 0 アミノ酸残基を含み、前記断片は、C y a A タンパク質のアミノ酸残基 1 2 0 8 ~ 1 2 4 3 または C y a A タンパク質のアミノ酸残基 1 1 6 6 ~ 1 2 8 1 を包含する、前記組換えタンパク質。

20

【請求項 5】

前記ポリペプチドおよび / または数個のポリペプチドが一緒になって、約 5 ~ 約 5 0 0 、または約 5 ~ 約 2 0 0 、または約 1 0 ~ 約 5 0 アミノ酸残基、または約 3 0 もしくは 5 0 ~ 2 0 0 アミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 6】

前記ポリペプチドに対する抗原特異的応答を誘起することのできる、請求項 5 に記載の組換えタンパク質。

30

【請求項 7】

1 個または数個のエピトープを有する少なくとも 1 個のポリペプチドが、発癌性 H P V に由来している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 8】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 6、H P V 1 8、H P V 3 1、H P V 3 3、H P V 3 5、H P V 4 5、H P V 5 2、または H P V 5 8 に由来している、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 9】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、L 1、L 2、E 1、E 2、E 4、および E 5 タンパク質から選択される H P V 抗原に由来している、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

40

【請求項 1 0】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 6 および / または H P V 1 8 の E 6 または E 7 タンパク質に由来している、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 1】

1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する複数のポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 2】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 6 の E 7 タンパク質に

50

由来している、請求項 9 または 11 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 13】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、HPV18 の E7 タンパク質に由来している、請求項 9 または 11 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 14】

前記ポリペプチドが、全長 E6 または E7 タンパク質である、請求項 9 または 11 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 15】

CyA 配列またはその断片の異なる許容部位に挿入されている複数のポリペプチドを含む、請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

10

【請求項 16】

複数のポリペプチドが、HPV16 の E7 タンパク質の残基 1 ~ 29 を含む断片もしくは残基 42 ~ 98 を含む断片、または両方の断片を包含し、前記ポリペプチドは、CyA タンパク質の異なる許容部位に挿入されている、請求項 15 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 17】

ポリペプチドが、アミノ酸配列

【表 10】

RAHYNIVTF (E7₄₉₋₅₇) 及び／又は

GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR (E7₄₃₋₇₇).

20

を有する断片を包含する、請求項 12 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 18】

前記ポリペプチドまたはポリペプチド群が、分断された天然 HPV 抗原に存在し、前記分断は、前記 HPV 抗原の酸性領域における 1 個または数個のアミノ酸残基の欠失、および／または、アデニル酸シクラーゼの少なくとも 2 箇所の許容部位への前記 HPV 抗原の少なくとも 2 個のポリペプチド断片の挿入からなる、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

30

【請求項 19】

1 個または数個の HPV 抗原の 1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、得られる組換えタンパク質の免疫原性を高めるために改変されている、請求項 1 ~ 13 または 18 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 20】

CyA タンパク質が、細菌性タンパク質である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 21】

CyA タンパク質が、Bordetella 属に由来する、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

40

【請求項 22】

CyA タンパク質が、Bordetella pertussis に由来する、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 23】

CyA タンパク質の酵素活性が不活性化されている、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 24】

CyA タンパク質の酵素活性が遺伝子的に不活性化されている、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 25】

50

C y a A タンパク質の酵素活性が、シクラーゼ活性に關与する C y a A のアミノ酸配列部位にジペプチドが挿入されている結果、不活性化されている、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 2 6】

哺乳動物宿主において細胞性免疫応答を誘起できる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 2 7】

哺乳動物宿主において体液性免疫応答を誘起できる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 2 8】

C y a A タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されている、様々な H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する数個のポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 2 9】

前記ポリペプチドが、それぞれ H P V 1 6 および H P V 1 8 に由来する全長 E 7 ポリペプチドであり、前記ポリペプチドは、C y a A タンパク質の異なる許容部位に挿入されている、請求項 2 8 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 3 0】

p T R A C E 5 - H P V 1 6 E 7 F U L L (C N C M I - 3 1 9 1) または p T R A C E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (C N C M I - 3 1 9 0) から選択されるプラスミドに含まれる挿入物によりコードされる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 3 1】

1 個または数個の抗原の 1 個または数個のエピトープを有する 1 個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質であって、前記ポリペプチドは、アデニル酸シクラーゼ (C y a A) タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、前記 C y a A 断片は、抗原提示細胞を標的化するという前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持しており、前記エピトープの少なくとも 1 個は、亜優性潜在性 T 細胞エピトープであり、前記組換えタンパク質は、前記ポリペプチドに対する抗原特異的応答を誘起できる、前記組換えタンパク質。

【請求項 3 2】

潜在性エピトープが、H P V のエピトープ、特に H P V の E 7 タンパク質のエピトープである、請求項 3 1 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 3 3】

潜在性エピトープは、H P V 1 8 E 7 タンパク質のエピトープ、特に配列 I D G V N H Q H L を有するエピトープである、請求項 3 2 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 3 4】

請求項 1 2 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

前記ポリヌクレオチドが、ベクター p T R A C E 5 - H P V 1 6 E 7 F U L L (C N C M I - 3 1 9 1) または p T R A C E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (C N C M I - 3 1 9 0) に含まれる、請求項 3 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 6】

請求項 3 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え発現ベクター。

【請求項 3 7】

細菌で発現させるのに適した請求項 3 6 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 8】

真核細胞、特に哺乳動物細胞での発現に適した請求項 3 6 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 39】

p T R A C E 5 - H P V 1 6 E 7 F U L L (C N C M I - 3 1 9 1) または p T R A C E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (C N C M I - 3 1 9 0) から選択される、請求項 36 に記載の組換えベクター。

【請求項 40】

請求項 34 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の組換え発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 41】

前記組換え宿主細胞が、I - 3190 または I - 3191 号で C N C M に寄託されている E . c o l i 細胞である、請求項 40 に記載の組換え宿主細胞。

10

【請求項 42】

生理的に許容されるビヒクル、賦形剤、担体、および / または希釈剤と共に、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または請求項 34 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、免疫原性組成物。

【請求項 43】

哺乳動物宿主において細胞性免疫応答を誘導する、請求項 42 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 44】

細胞媒介細胞溶解免疫応答を誘導する、請求項 43 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 45】

免疫応答が、体液性免疫応答を含む、請求項 42 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 46】

アジュバントおよび / または界面活性剤および / または免疫調節物質をさらに含む、請求項 42 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 47】

H P V 感染を予防または処置するための、請求項 42 ~ 46 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 48】

癌免疫療法のための請求項 42 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 49】

宿主における H P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続の予防または処置のための、請求項 42 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 50】

患者における H P V 感染の処置または予防のための、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または請求項 34 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のベクターの使用。

【請求項 51】

患者における H P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続に対する免疫療法のための請求項 50 に記載の使用。

【請求項 52】

宿主において細胞性および / または体液性免疫応答を誘起するのに適した、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または請求項 34 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、ワクチン組成物。

40

【請求項 53】

H P V 感染を予防または処置するための、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または請求項 34 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、薬物組成物。

【請求項 54】

宿主における H P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続の予防または処置のための、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または請求項 34 に記

50

載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む、
薬物組成物。

【請求項 5 5】

癌免疫療法のための、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質または
請求項 3 4 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のベ
クターを含む、薬物組成物。

【請求項 5 6】

請求項 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の組換えタンパク質または請求項 3 4 に記載のポリヌ
クレオチドまたは請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載のベクターを含む、H P V 感染の診
断キット、または H P V 感染を免疫モニタリングするためのキット。

10

【請求項 5 7】

- 哺乳動物、特にヒト患者から得られた T 細胞を、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載
の組換えタンパク質にさらすこと、
- T 細胞の活性化の改変を検出すること
を含む、H P V 感染をインビトロで診断する方法または免疫モニタリングする方法。

【請求項 5 8】

癌ウイルス感染の処置もしくは予防のための、または、このよう癌ウイルス感染に起因
する悪性作用の処置もしくは予防のための、1 個または数個の癌ウイルスの 1 個または数
個の抗原の 1 個または数個のエピトープの挿入により改変される、細菌性タンパク質また
はその断片を含む組換えタンパク質の使用。

20

【請求項 5 9】

細菌性タンパク質は、毒素または類毒素である、請求項 5 8 に記載の組換えタンパク質
の使用。

【請求項 6 0】

キメラ C y a A - ポリペプチドタンパク質に含まれるポリペプチド中の未知または亜優
性潜在性 T 細胞エピトープのスクリーニング方法であって、
ここで、C y a A は、請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに開示されているアデニル酸シクラーゼ
またはその断片であり、この方法は、

30

- 前記キメラタンパク質を動物宿主に投与すること、
- 前記宿主の T 細胞応答、特に C T L 応答を決定すること
を含む、前記スクリーニング方法。

【請求項 6 1】

前記ポリペプチドが、H P V 抗原、特に H P V 1 6 および / または H P V 1 8 E 7 タ
ンパク質に由来する、請求項 6 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、アデニル酸シクラーゼタンパク質またはその断片に挿入されたパピローマウ
イルスエピトープを有する組換えタンパク質に関する。

40

【0 0 0 2】

したがって、本発明は、アデニル酸シクラーゼ (C y a A) タンパク質がタンパク質ベ
クターとして作用して、パピローマウイルス抗原、特にヒトパピローマウイルス抗原に由
来するエピトープに対する免疫応答を誘起するような、組換えタンパク質に関する。

【0 0 0 3】

本発明は、特に、エピトープを、真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞、特にヒト細胞に
送達するための、このようにして得られたタンパク質性ベクターの使用に関する。

【0 0 0 4】

本発明はまた、本発明の組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、前記ポリ
ヌクレオチドを含むベクター、並びに、前記ポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主
細胞にも関する。

50

【 0 0 0 5 】

本発明はまた、宿主におけるヒトパピローマウイルス感染の処置または予防のための、並びに、宿主、特に哺乳動物宿主における、ヒトパピローマウイルス感染から生じる悪性作用の処置または予防のための、上記の組換えタンパク質またはポリヌクレオチドの適用にも関する。特定の実施形態において、本発明は、免疫療法、特にパピローマウイルスの腫瘍特異的抗原に対する免疫療法に適した化合物の設計に有用な手段を提供する。

【 0 0 0 6 】

数多くのヒトパピローマウイルス（HPV）タイプの中で、ハイリスクHPVと称されるものは、宿主において感染が持続した場合の上皮悪性疾患の発達に関連している（1）。世界中で2番目に最も広まっている婦人科癌である子宮頸部癌（1）では、大抵、HPV 16およびHPV 18 DNAが検出される（>99%）（2）。これらのウイルスの発癌能は、初期遺伝子、すなわち、E6およびE7遺伝子（その発現は、ウイルスの複製全周期において検出され、悪性形質転換の発症および存続に必要である）により発現される産物に起因する。しかし、これらのハイリスク発癌性HPVタイプによる肛門性器感染が高い頻度で起こることと、HPV関連悪性疾患を最終的に発症する個体の比率は低いこととは対照的であり、このことは、免疫応答によりハイリスクHPV感染が制御されていることを示唆する。いくつかの観察により、例えば、大半の悪性段階以前の病変の自発的減退（1）、CD4⁺T細胞およびマクロファージによる退行中の性器いぼの浸潤（1）、並びに、免疫抑制患者および免疫欠陥患者においてより多数の感染被験者が認められることなどにより（1）、この所説が強められた。さらに、HPV 16 - E6および/またはE7エピトープに対するCD4⁺およびCD8⁺T細胞応答が、HPV 16関連悪性疾患と診断された患者の血液（4～8）、並びに、健康個体の血液に（9、10）検出された。まとめると、これらの考察には、HPV 16のE6および/またはE7タンパク質に標的化する免疫療法の開発に対する強い根拠が含まれていた。

【 0 0 0 7 】

H-2D^b HPV 16 - E7₄₉₋₅₇ 拘束性エピトープに対する免疫応答を発生させることにより、C57BL/6マウスにおけるHPV 16 - E6および - E7陽性腫瘍原性細胞系の腫瘍増殖を予防するための、多くのワクチン戦略が開発されている。これらのワクチン接種アプローチは、プラスミドDNA、ウイルス性または細菌性ベクター、キメラウイルス様粒子、合成ペプチド、および組換えタンパク質を含んでいる（11）。残念なことに、該アプローチは、臨床的退行に関しては控えめに満足できる結果しかもたらさなかった（3）。したがって、細胞性応答を誘起するために、HPV - エピトープを免疫系に標的化させる新規ツールを評価することは依然として感心が高い。

【 0 0 0 8 】

したがって、宿主において前記抗原に対する体液性および/または細胞性免疫応答の誘起が可能である条件において、HPV抗原のエピトープを標的細胞に送達するのに適した新規ベクターが必要である。本発明者らは、アデニル酸シクラーゼタンパク質が、このようなベクターを設計する上で興味深いことを見出した。Bordetella pertussisのアデニル酸シクラーゼタンパク質を使用して様々な観察がなされ、これにより、このタンパク質が、このような効率的なベクターの設計に適した基盤となる可能性があるという結論が得られた。

【 0 0 0 9 】

Bordetella pertussisのアデニル酸シクラーゼ（CyA）は、その触媒ドメインを、真核細胞のサイトゾルへと送達することができる（12）。したがって、CyAの触媒部位に挿入されたCD4⁺およびCD8⁺T細胞エピトープは、抗原提示細胞（APC）の表面において、それぞれMHCクラスIIおよびI分子により処理され提示される（13）。さらに、CyAは、近年、 $\alpha_M\beta_2$ インテグリン（CD11b/CD18）に特異的に結合し（14、第WO02/22169号）、これにより、これらのT細胞エピトープをCD11b⁺樹状細胞亜個体群に標的化することが実証された（15）。マウスを、適切なエピトープを有する組換えCyAで免疫化すると、強力なCTL応答、致死的

なウイルス攻撃に対する完全な防御、並びに効率的な予防的および治療的抗腫瘍免疫が誘導された(16、17)。アデニル酸シクラーゼ(Cy a A)タンパク質は特徴づけられており、組換えDNA技術によるその調製に関して、特に第WO93/21324号または第WO02/22169号に開示されている。第WO02/22169号には、Cy a が包含する残基373~1706の断片は、CD11b/CD18受容体との相互作用に実質的に必要とされる構造を含むことが記載されている。

【0010】

より具体的には、残基1166からアミノ酸残基1281の範囲のアミノ酸配列は、CD11b/CD18受容体との相互作用のための決定基を含み、より特定すると、残基1208から残基1243の範囲のアミノ酸配列は、毒素とCD11b/CD18の相互作用に重要であることが後記されている(第EP03291486、3および45)。

10

【0011】

本発明者らは、今回、HPV抗原のエピトープを、宿主(HPV感染およびその悪性形質転換に罹患している宿主を含む)の標的細胞、特に抗原提示細胞(APC)に送達できる、該エピトープを有する、すなわち含む、組換えCy a Aタンパク質の作成のための条件を決定し評価した。

【0012】

したがって、本発明は、特に、1個または数個のHPV抗原の1個または数個のエピトープを有する1個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質に関し、該ポリペプチドは、アデニル酸シクラーゼ(Cy a A)タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、該Cy a A断片は、APC、特にCD11b/CD18細胞、例えば樹状細胞などのCy a Aの標的細胞に標的化させるという、該アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持している。特定の実施形態において、この断片はまた、そこに挿入されたエピトープまたは該エピトープを含むポリペプチドの、標的細胞のサイトゾルへの転位を可能とするようなCy a Aの特性を保持している。標的細胞のサイトゾルへのエピトープまたは該エピトープを含むポリペプチドの転位は、Cy a A断片が、その触媒ドメインの転位を可能とするタンパク質ドメインを保持している場合に許容される。

20

【0013】

本発明の組換えタンパク質は、組換え技術を頼りにして調製できる。それはまた、合成、特に化学合成によっても得ることができる。したがって、「組換えタンパク質」なる語句は、キメラ形態のタンパク質を意味する。

30

【0014】

組換えタンパク質のCD11b/CD18細胞への標的化能は、特に、第EP03291486、3および(45)または第WO02/22169号に開示された方法にしたがってアッセイできる。さらに、組換えタンパク質の、該エピトープまたは該エピトープ含有ポリペプチドを標的細胞のサイトゾルへと転位する能力は、第WO02/22169号に記載の方法を適用することによりアッセイできる。

【0015】

特定の実施形態において、Cy a A断片は、天然ではCy a A中で連続していない、Cy a Aの2個の異なる部分から構成されることができる。一例として、Cy a Aの触媒ドメイン、すなわち、Cy a AのN末端部分の400アミノ酸残基、および、CD11b/CD18抗原提示細胞の標的化に必要とされるアミノ酸残基1208~1243を含む断片を挙げることができる。

40

【0016】

先の定義において、「ポリペプチド」なる表現は、翻訳後修飾を受けたアミノ酸配列、特に、少なくとも6個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列、および、特に5~500残基または約5~約100、または約5~約200、または約10~約50残基、または約30もしくは約50~200残基、または約100~約210、または約100~約200残基を有するアミノ酸配列を含む任意のアミノ酸配列(ただし、該アミノ酸配列は少なくとも1個のエピトープを含む)、すなわち、標的細胞、有利には宿主、特に哺乳動物宿

50

主の標的細胞に送達した後に免疫応答を発生させることのできるアミノ酸配列を記載する。したがって、この定義によるポリペプチドは、エピトープ、さらには独特なエピトープに限定されても、または、数個の異なるもしくは同じエピトープを含んでいても、または、病原体の、すなわちヒトパピローマウイルスの全長抗原を包含していてもよい。本発明のエピトープは、体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答、特にT細胞免疫応答に關与するアミノ酸配列を包含する。したがって、本発明の組換え分子のポリペプチド中のエピトープは、宿主においてAPC（抗原提示細胞）により処理されるもの、特に、クラスII MHC（主要組織適合性複合体）分子と会合して認識されるもの、例えば標的細胞がCD8⁺Tリンパ球であるエピトープ、またはクラスII MHC分子と会合して認識されるエピトープ、例えば標的細胞がCD4⁺Tリンパ球細胞であるものが挙げられる。

10

【0017】

特定の実施形態において、エピトープを有するポリペプチドは、様々な抗原に由来する、特に様々なHPV株の1タイプの抗原に由来する、または、様々なHPV株の数タイプの抗原に由来する、数個のエピトープを含む。したがって、HPV抗原に由来するポリペプチドは、多価、特に二価または三価であることができ、すなわち、数個の抗原に対する免疫応答が可能となる。

【0018】

本発明によれば、HPV抗原（これから1個または数個のエピトープを有するポリペプチドを設計できる）は、好ましくは、特にHPV感染後の悪性作用の発症および/または存続に關与するタンパク質に由来するものであり、いわゆる腫瘍抗原、すなわち、宿主において免疫応答を誘起し、宿主において抗体またはT細胞と特異的に反応できる、HPV感染に関連した腫瘍発達に関連した抗原を包含する。

20

【0019】

本発明に記載のエピトープを有するポリペプチドは、HPVの天然または成熟抗原から得られることができ、これには、抗原完全体を使用することにより、あるいは、全タンパク質ではなくむしろ、断片、特に抗原性断片、特に該抗原のエピトープを選択することにより、あるいは、特に、組換え分子中のCyAタンパク質と会合させた場合に、宿主における免疫応答を誘導または誘起する能力を高めるために、該抗原またはその選択された抗原部分またはエピトープを改変することによることが含まれる。したがって、このようなエピトープの様々な可能な改変を説明するために、これらのポリペプチドは、抗原（これからエピトープが得られる）の天然または非天然フランキング配列によりフランキングされたエピトープを包含し、また、その免疫特性を高めるために化学的に改変されているエピトープまたはエピトープを含むアミノ酸配列を包含する。これらの改変は、CyAタンパク質に関連して得られるポリペプチドの有効性を向上するために有益である可能性がある。

30

【0020】

いくつかの特定の改変が、本明細書で以後に例として開示されており、特に追加の陽性荷電のアミノ酸残基の挿入によるポリペプチド荷電の変化を包含する改変が含まれる。

【0021】

したがって、本発明のポリペプチドはまた、半合成または合成ポリペプチドも包含する。

40

【0022】

特定の実施形態によれば、HPV抗原に由来するポリペプチドは、各々または一緒になって、約5～約500、または約5～約100、または約5～約200、例えば約10～約50アミノ酸残基、または約30もしくは約50～約200アミノ酸残基、または約100～約210、または約100～約200アミノ酸残基を含む。

【0023】

ポリペプチドは、特に、本発明の組換えタンパク質中で組換えられた場合に、抗原特異的応答を誘起できるように選択される。

【0024】

50

本発明の組換えタンパク質は、特に、分断された天然 H P V 抗原に存在するポリペプチドまたは数個のポリペプチドを含むように設計することができ、ここで、該分断は、該 H P V 抗原の酸性領域にける 1 個または数個のアミノ酸残基の欠失、および / または、アデニル酸シクラーゼの少なくとも 2 箇所の許容部位における該 H P V 抗原の少なくとも 2 個のポリペプチド断片の挿入からなる。

【 0 0 2 5 】

この定義に包含される特定の分断は、アデニル酸シクラーゼの少なくとも 2 箇所の許容部位への、天然 H P V 抗原の少なくとも 2 個の断片の挿入により得られ、ここで、これらの少なくとも 2 個の断片は、天然抗原におけるその天然の位置と比べて逆であり、すなわち、天然抗原においてより N 末端側である断片は、C y a A タンパク質またはその断片に挿入されると、より C 末端側となり、その逆もある。

10

【 0 0 2 6 】

アミノ末端断片およびカルボキシ末端断片の逆転は、E 7 _Δ 断片（すなわち、E 7 抗原の断片）で示されるように、特に癌免疫療法において、強力で長く続く防御免疫を誘導する際により効果的である可能性があることが観察されている。

【 0 0 2 7 】

本発明によれば、アデニル酸シクラーゼ（C y a A）は、先に開示したように、全長タンパク質として、またはその断片として使用される。

【 0 0 2 8 】

有利には、C y a A タンパク質またはその断片は、細胞、特に組換え細胞における、c y a A 遺伝子および c y a C 遺伝子の両方の同時発現の結果である、タンパク質またはその断片である。実際に、標的細胞に対する侵襲性特性を有するために、C y a A は、c y a A 遺伝子および c y a C 遺伝子の両方の発現により可能となる翻訳後修飾を受けている必要があることが示されている（第 W O 9 3 / 2 1 3 2 4 号）。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の特定の実施形態において、C y a A タンパク質の断片は、少なくとも約 3 0 個のアミノ酸残基を有する断片であり、約 1 3 0 0 個まで、特に約 5 0 0 個までのアミノ酸残基、好ましくは約 5 0 ~ 約 1 5 0 個のアミノ酸残基を有することができ；該断片は、特定の実施形態において、C D 1 1 b / C D 1 8 標的細胞との相互作用のために、C y a A のアミノ酸残基 1 1 6 6 ~ 1 2 8 1、または、C y a A タンパク質のアミノ酸残基 1 2 0 8 ~ 1 2 4 3 を含む。したがって、1 個の具体的な断片は、天然タンパク質の C 末端部分の全部または一部を包含し、この部分は、細胞膜および / または C D 1 1 b / C D 1 8 受容体を標的化するための該タンパク質の結合に、および、細胞サイトゾルへのポリペプチド群に含まれるエピトープのその後の送達に関与している（1 2）。本発明に記載の C y a A タンパク質の 1 個の具体的な断片は、C y a A タンパク質のアミノ酸残基 3 7 2 ~ 1 7 0 6 を含む。別の具体的な断片は、アミノ酸残基 2 2 5 ~ 2 3 4 が欠失しており、これにより 1 ~ 2 4 4 および 2 3 5 ~ 1 7 0 6 を含む C y a A 断片を与えるような、C y a A タンパク質に相当するものである。

30

【 0 0 3 0 】

本発明の特定の実施形態において、アデニル酸シクラーゼタンパク質は、細菌性タンパク質である。好ましい実施形態において、C y a A タンパク質は、Bordetella 種に由来している。

40

【 0 0 3 1 】

本発明に記載の対象の Bordetella 種の中で、その 1 つが、Bordetella pertussis である。他の対象の Bordetella 株は、Bordetella parapertussis または Bordetella bronchiseptica の株である。B. parapertussis の C y a A タンパク質の配列は、特にアクセッション番号 N C 0 0 2 9 2 8 . 3（1 7 4 0 アミノ酸の配列として）および Parkhill J. ら（Nat. Genet. DOI、10(2003)）に開示されており、B. bronchiseptica については、Betsou F ら（Gen e 1995、8月30日；162(1):165-6）に開示されている。

【 0 0 3 2 】

50

*Bordetella pertussis*は、百日咳の原因物質であり、とりわけ、細菌の決定的な病原性因子であり、*B.pertussis*感染に対して防御性作用のある抗原の1つである、公知の百日咳毒素 (PT) およびアデニル酸シクラーゼ毒素 (Cy a A) を含む数種の毒素を分泌している。

【0033】

*Bordetella pertussis*のアデニル酸シクラーゼタンパク質は、400アミノ酸残基のN末端触媒ドメインと、毒素が標的細胞膜に結合することとその後の細胞サイトゾルへの触媒部分の送達に関与している1306残基のC末端部分とを含む、1706残基の二機能性タンパク質として記載されている毒素である(12)。

【0034】

10

Cy a Aタンパク質は、不活性プロ毒素として合成され、これは、2個の内部リジン残基(リジン860および983)の翻訳後パルミトイル化により活性毒素へと変換される。この翻訳後修飾は、cy a A遺伝子と共に、アクセサリー遺伝子、すなわち、*B.pertussis*染色体上のcy a Aの近くに位置するcy a Cの発現が必要とされる。

【0035】

*Bordetella pertussis*のcy a Aは、Glaser, P.ら、1988、*Molecular Microbiology*2(1)、19-30により、アミノ酸配列およびヌクレオチド配列として記載されている。したがって、*B.pertussis*のCy a Aタンパク質のアミノ酸残基もしくは配列またはヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列が本発明において引用される場合、その位置は、Glasserら、1988の該刊行物に開示された配列を参考にして示されている。

20

【0036】

本発明に記載の組換えタンパク質では、1個または数個のHPV抗原の1個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、Cy a Aタンパク質の1個または数個の許容部位に挿入されている。

【0037】

本発明では、「許容部位」は、実質的にCy a Aタンパク質の機能特性に影響を及ぼすことなく、特に実質的に細胞の標的化に、特にCy a AによるAPCの標的化に影響を及ぼすことなく(実質的にCD11b-CD18受容体への特異的結合に影響を及ぼすことなく、有利には、実質的に、標的細胞へのエピトープの転位の過程に関与するタンパク質のドメインに影響を及ぼすことなくを含む)、ポリペプチドを挿入できる、Cy a Aタンパク質の配列部位である。

30

【0038】

Cy a A触媒ドメインの転位を可能とし、これによりこのような許容部位に挿入されたエピトープの転位を可能とする、*Bordetella pertussis*アデニル酸シクラーゼの許容部位には、残基137~138(V a l - A l a)、残基224~225(A r g - A l a)、残基228~229(G l u - A l a)、残基235~236(A r g - G l u)、および残基317~318(S e r - A l a)が挙げられるがこれに限定されない((44)Seboら、1995)。以下の追加の許容部位もまた、本発明の実施形態に含まれる：残基107~108(G l y - H i s)、残基132~133(M e t - A l a)、残基232~233(G l y - L e u)、335~336(G l y - G l n)および336~337(43)。

40

【0039】

他の*Bordetella*種における対応する許容部位は、配列の比較および対応する残基の決定により定義できる。

【0040】

別の実施形態によれば、該ポリペプチドは、追加的にまたは代替的に、Cy a Aタンパク質またはその断片の一端および/または他の末端に挿入してもよい。

【0041】

本発明の目的のために使用するCy a Aタンパク質の特定の断片は、1300個までのアミノ酸または約30~約500個のアミノ酸残基、有利には約50~約150個のアミ

50

ノ酸残基を含むもの、特に、天然 C y a A タンパク質のアミノ酸残基 1 1 6 6 ~ 1 2 8 1、有利には天然 C y a A タンパク質の 1 2 0 8 ~ 1 2 4 3 を包含するような断片である。

【 0 0 4 2 】

したがって、本発明によれば、「ハイブリッドタンパク質」とも呼ばれるいわゆる組換えタンパク質をもたらす C y a A タンパク質へのポリペプチドの「挿入」は、特に、利用可能な D N A 技術による遺伝子的挿入を包含する。または、「挿入」はまた、非遺伝子的挿入も包含され、これには、例えば C y a A もしくはその断片の一端において実施する共有結合、または非共有結合などの化学的挿入が含まれる。非遺伝子的挿入は、挿入するポリペプチドが合成または半合成である場合には特に関心が高い可能性がある。薬物をポリペプチドに結合させる方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、N - ビリジルスルホニル活性化スルフヒドリルを使用するなどのジスルフィド連結が含まれる。

10

【 0 0 4 3 】

特に、インビボで、C y a の標的細胞へ、例えば A C P、例えば C D 1 1 b / C D 1 8 細胞、特に該細胞のサイトゾルへと標的化させるために、化学的連結または遺伝子的挿入により、本発明のポリペプチドを特に含む分子を、C y a A に融合させることが可能である。実際に、所与の C D 8 + T 細胞エピトープに相当する分子を、解毒した C y a A の触媒ドメインに、ジスルフィド結合または遺伝子的挿入により結合させると、遺伝子工学された分子は、インビボで特異的 C T L 応答を誘起することができ、これにより、該 C D 8 + T 細胞エピトープは、C D 1 1 b 発現細胞のサイトゾルへと転位されたことが示される。

20

【 0 0 4 4 】

特定の実施形態において、タンパク質性ベクターの製造に使用される組換えアデニル酸シクラーゼは、ジスルフィド結合により、該アデニル酸シクラーゼの触媒ドメイン内に位置する遺伝子的に挿入されたシステイン残基に化学的に結合されている本発明のポリペプチドを特に含む、システイン残基含有の 1 個以上の分子の挿入により特に改変されている、C y a A またはその断片である。

【 0 0 4 5 】

実際に、本発明のポリペプチドを特に含む複数の分子を、ジスルフィド結合により、触媒ドメイン内の様々な許容部位に位置する様々なシステイン残基に化学的に結合させることができる。

30

【 0 0 4 6 】

宿主において免疫応答、特に細胞性免疫応答を誘起できる製品の設計に適した組換えタンパク質を提案するために、また特に、H P V に感染した宿主に観察される悪性作用に対する免疫応答を誘起できるような製品を設計するために、本発明者らは、高度に発癌性の H P V 株、特に H P V 1 6、H P V 1 8、H P V 3 1、H P V 3 3、H P V 3 5、H P V 4 5、H P V 5 2、または H P V 5 8 から選択される株に由来する抗原に由来するエピトープを有するポリペプチドを得ることを提案した。

【 0 0 4 7 】

これらの株の中で、H P V 1 8 および H P V 1 6 が特に関心が高い。H P V 1 6 は、特に、哺乳動物宿主、特にヒトにおける子宮頸部癌の発症に関連しているために、H P V に感染した宿主の処置のための特定の標的である。

40

【 0 0 4 8 】

これらの H P V 株から出発して、本発明者らは、L 1、L 2、E 1、E 2、E 4、および E 5 タンパク質から選択される抗原に由来するエピトープを有するポリペプチドを得ることを提案する。

【 0 0 4 9 】

代替的にまたは組み合わせて、本発明者らはまた、H P V の E 6 または E 7 タンパク質に由来するエピトープを有する該ポリペプチドを得ることを提案する。

【 0 0 5 0 】

本発明の特定の実施形態において、H P V 1 6 の E 6 もしくは E 7 タンパク質または H

50

P V 1 8 の E 6 もしくは E 7 タンパク質が、エピトープを有するポリペプチドの設計に使用される。

【 0 0 5 1 】

H P V 抗原に由来するポリペプチドの設計のために言及できる特定の H P V タンパク質は、H P V の E 7 タンパク質、特に H P V 1 6 または H P V 1 8 の E 7 タンパク質である。本発明の実施形態によれば、該ポリペプチドは、様々な H P V 株、特に H P V 1 6 および H P V 1 8 の数個の E 7 タンパク質から得られる。例えば、該ポリペプチドは、H P V 1 6 および H P V 1 8 の全長 E 7 タンパク質、または、H P V 1 6 もしくは H P V 1 8 の各々の E 7 タンパク質の 1 個もしくは数個の断片（該断片の多量体、特に二量体を含む）から得られる。

10

【 0 0 5 2 】

これらの H P V タンパク質およびそのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、H P V 1 6 については Seedorf, K ら（ヒトパピローマウイルスタイプ 1 6 D N A 配列、Virology、145 :181-185、1985）、Cole S.T.、Danos O.（ヒトパピローマウイルスタイプ 1 8 ゲノムのヌクレオチド配列および比較解析。パピローマウイルスの系統発生並びに E 6 および E 7 遺伝子産物の反復構造、J.Mol.Biol.193:599-606(1987)）または Fernando GJ ら（子宮頸部癌に関連したヒトパピローマウイルスタイプ 1 8（H P V 1 8）の E 7 形質転換タンパク質の T ヘルパーエピトープ、Virus Res.1995 Apr.36(1):1-13）に開示されている。

【 0 0 5 3 】

E 6 および E 7 タンパク質は、ウイルスの複製全周期を通じて特に H P V 1 6 または H P V 1 8 により発現されている癌タンパク質であり、H P V 株による感染後の宿主細胞の悪性形質転換の発症および存続に必要とされることが示されている。それ故、これらの両方の腫瘍特異的抗原が、養子 C T L 媒介免疫療法の可能性ある標的と考えられている。

20

【 0 0 5 4 】

本発明の特定の実施形態によれば、該組換えタンパク質は、複数のポリペプチドを含み、その各々が、1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する。

【 0 0 5 5 】

例えば、このような複数のポリペプチドは、1 個の H P V 株、特に H P V 1 6 または H P V 1 8 の E 6 および E 7 タンパク質から得ることができる。別の例によれば、これらの複数のポリペプチドは、H P V 1 6 および H P V 1 8 の両方に由来する、E 6 または E 7 タンパク質から得られるエピトープを包含することができる。

30

【 0 0 5 6 】

複数のポリペプチドはまた、対象の C y a A タンパク質の異なる許容部位に挿入された、1 個のタンパク質、例えば E 7 または E 6 タンパク質の断片群を有する様々なエピトープからなることができる。

【 0 0 5 7 】

先の定義に記載の別の特定の組換えタンパク質は、エピトープを有する複数のポリペプチドが、H P V 1 6 の E 7 タンパク質の残基 1 ~ 2 9 を含む断片、すなわち残基 1 ~ 2 9 からなる断片、または残基 4 2 ~ 9 8 を含む断片、すなわち残基 4 2 ~ 9 8 からなる断片を包含するか、あるいは、複数のポリペプチドが、C y a A タンパク質の異なる許容部位に挿入された両方の断片を含むかまたはからなる、C y a A 組換えタンパク質である。

40

【 0 0 5 8 】

本発明に記載の別の組換えタンパク質は、複数のポリペプチドが、アミノ酸配列

【表 1】

RAHYNIVTF (E7₄₉₋₅₇) 及び／又は

GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR (E7₄₃₋₇₇).

を有する断片を包含するようなタンパク質である。

50

【 0 0 5 9 】

C y a A タンパク質の許容部位に挿入されたポリペプチドのアミノ酸残基の数は、全長抗原、特に H P V の全長 E 6 または E 7 タンパク質からなるポリペプチドを、C y a A タンパク質またはその断片に挿入できるようなものである。

【 0 0 6 0 】

本発明の特定の実施形態によれば、組換え C y a A に含まれるポリペプチドは、C y a A のコドン 2 2 4 と 2 3 5 の間または C y a A のコドン 3 1 9 と 3 2 0 の間に挿入された、E 7 タンパク質、特に H P V 1 6 の E 7 タンパク質である。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態において、本発明の組換えタンパク質は、複数のポリペプチド（そのいくつかは、1 個または数個の H P V の 1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドである）および他の病原体のエピトープを有する他のポリペプチドを含む。

10

【 0 0 6 2 】

別の特定の実施形態において、本発明の組換えタンパク質はさらに、異なる病原性物質から派生した 1 個または数個のエピトープを含む。Chlamydia または H I V レトロウイルス、または H P V、H B V、H C V、アデノウイルス E B V、ヘルペスウイルス、H T L V、1 ウイルスおよび C M V から派生したエピトープと、H P V から派生したエピトープとの会合は、特に関心が高い場合がある。

【 0 0 6 3 】

本発明の別の特定の実施形態によれば、エピトープを有するポリペプチドは、例えば、配列内の負に荷電したアミノ酸残基の数を減少させるために、その天然アミノ酸配列と比べて改変されている。このような改変は、これらの負に荷電したアミノ酸残基のいくつかを除去することにより、または、いくつかの正に荷電したアミノ酸残基を、特にエピトープのフランキング残基として付加することによっても得ることができる。このようにより少ない数の負に荷電した残基を含むポリペプチドは、標的細胞のサイトゾルへの C y a A タンパク質の触媒ドメインの転位に好ましくあり得る。

20

【 0 0 6 4 】

エピトープを有するポリペプチドはまた、C y a A に挿入される場合に折りたたまれないようにするように設計でき、これにより、標的細胞への組換え C y a A タンパク質の内部移行の効率が向上する。その含有アミノ酸の結果として折りたたみを受けたポリペプチド中のこのような折りたたみ解除は、例えば、システイン残基を除去または置き換えて、ポリペプチドの折りたたみに関与している可能性があるジスルフィド結合の形成を避けることにより達成することができる。いくつかの場合において、インビボでの再折りたたみを回避することのできる還元剤の存在下でそれらを調製することによりポリペプチドの折りたたみを防ぐことが可能である。

30

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態において、エピトープを有するポリペプチドは、潜在性エピトープであってもよい。

【 0 0 6 6 】

本発明の特定の態様において、本発明者らは、実際に、(i) 先に開示した定義に記載のアデニル酸シクラーゼ (C y a A) またはその断片と、(i i) 1 個または数個の抗原の 1 個または数個の抗原性断片を有するポリペプチドとを含む組換えタンパク質からなる、キメラタンパク質構造物は、組換え構造物における該抗原の潜在性エピトープを、それを提示する結果、免疫原性となることができると決定された。特に、特に治療目的（ワクチン接種目的を含む）のための、本発明に定義した C y a A またはその断片と対象の抗原から得られたポリペプチドとを含む該キメラ構造物は、免疫原性となることができ、特に、宿主における T 細胞応答、特に C T L 応答を発生させることのできる、抗原の潜在性エピトープを含むことができる。

40

【 0 0 6 7 】

したがって、本発明はまた、1 個または数個の抗原の 1 個または数個のエピトープを有

50

する１個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質に関し、該ポリペプチドは、アデニル酸シクラーゼ（C y a A）またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、該C y a A断片は、抗原提示細胞を標的化するという該アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持しており、該エピトープの少なくとも１個は、亜優性潜在性T細胞エピトープ（subdominant cryptic T-cell epitope）であり、該組換えタンパク質は、該ポリペプチドに対する抗原特異的応答を誘起できる。

【0068】

特に、潜在性エピトープは、HPV抗原、特にHPV16および/またはHPV18抗原、特にE7抗原内に含まれる。

【0069】

このように定義した組換えタンパク質は、特に、HPV18E7タンパク質から得られたペプチド、すなわち、アミノ酸配列IDGVNHQHLを有するペプチドを含む。

【0070】

特定の実施形態によれば、潜在性エピトープは改変でき、例えば、最初の２箇所の位置において置換を有することができ、例えば配列ASGVNHQHLを有することができる。

【0071】

本発明は、特に、ペプチドIDGVNHQHLに関する。

【0072】

本発明はまた、この配列に置換を有するペプチド、特に１位および/または２位に置換を有するペプチド、特に配列ASGVNHQHLを有するペプチドに関する。

【0073】

本発明はまた、免疫原性特性を有する限り、特にT細胞を誘起できる限り、特にCTL応答を誘起できる限りにおいて、該ペプチドの変種を含む。

【0074】

有利には、本発明の組換えタンパク質を調製するために、C y a Aタンパク質の酵素活性、すなわち、ATPからcAMPへと変換する能力は、不活性化されている。このような不活性化は、遺伝子不活性化の結果として得ることができる。一例として、遺伝子不活性化は、ジペプチドを、触媒部位の一部であるC y a Aのアミノ酸配列の部位（例えば188と189の間）に導入する結果として得ることができる。このような不活性化C y a Aタンパク質は、以下の実施例に実例を示す。

【0075】

本発明の組換えタンパク質は、有利には、細胞性免疫応答を誘起できる。該応答は、CTLおよびTh、特にTh1応答（CD4⁺T細胞応答および/またはCD8⁺T細胞応答を含む）を含む。

【0076】

組換えタンパク質がこの細胞性免疫応答を誘起できる能力は、特に、インビボにおいて腫瘍増殖を抑止するのにまたはさらには動物における腫瘍減退を可能とするのに十分であることが示された。

【0077】

本発明はまた、先に定義した組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドにも関する。

【0078】

本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入して、本発明の組換えタンパク質の発現に適した組換え発現ベクターを提供できる。このような発現ベクターには、プラスミド、コスミド、ファージミド、ウイルスベクターが挙げられる。

【0079】

組換えベクターは、原核細胞、特に細菌における発現に適したものでも、または、真核細胞、特に哺乳動物細胞、有利にはヒト細胞における発現に適した発現ベクターでもよい。

10

20

30

40

50

【0080】

本発明は、特に、本発明に記載の組換えタンパク質をコードするプラスミドからなるベクターに関する、例えば：2004年3月18日にCNCM I - 3191号でCNCM（パリ、フランス）に寄託されたpTRACE5-HPV16E7_{FULL}（CyAE5-HPV16E7_{FULL}とも称される）；2004年3月18日にCNCM I - 3190号でCNCM（パリ、フランス）に寄託されたpTRACE5-HPV16E7_{Δ30-42}（CyAE5-HPV16E7_{Δ30-42}とも称される）、または構造物pTRACE5-HPV16E7₄₉₋₅₇。

【0081】

本発明はまた、本発明に記載のポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換された、宿主細胞、特に原核細胞、または真核細胞、例えば哺乳動物細胞（ヒト細胞を含む）を含む。

10

【0082】

本発明は、特に、アクセッション番号CNCM I - 3190号およびアクセッション番号CNCM I - 3191号でCNCMに寄託された宿主細胞に関する。

【0083】

本発明はまた、活性物質として、先に定義した組換えタンパク質または先に定義したポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む、免疫原性組成物に関する。免疫原性組成物の該活性物質は、宿主への投与に適した生理的に許容されるビヒクル、賦形剤、担体、もしくは希釈剤と共に、またはその組合せと共に製剤化できる。

20

【0084】

免疫原性組成物は、有利には、哺乳動物宿主において、細胞性免疫応答、特にT細胞媒介免疫応答を誘導するように設計されている。好ましくは、細胞媒介細胞溶解免疫応答CTL、特にCD8+を誘導できる。

【0085】

本発明に記載の別の免疫原性組成物は、体液性免疫応答を誘導できるものである。

【0086】

本発明の免疫組成物が免疫応答を誘導する能力を高めるために、活性物質を、アジュバントおよび/または界面活性剤および/または免疫調節物質（例えばサイトカインまたはケモカイン）と合わせることは興味深い。

30

【0087】

アジュバントは、例えば、水層を含むエマルションの形態で一般に使用される、リポソーム、油層、例えばフロイントタイプのアジュバント、または、水不溶性無機塩、例えば水酸化アルミニウム、硫酸亜鉛、コロイド状水酸化鉄、リン酸カルシウム、または塩化カルシウムを含むことができる。

【0088】

本発明に記載の免疫原性組成物は、有利には、特に免疫療法のために、免疫応答を抗原刺激および/またはブーストすることにより、宿主の免疫応答を誘導するために使用されている。特に、本発明の免疫原性組成物は、宿主におけるHPV感染に起因する悪性形質転換の発症または存続の予防のために、あるいは、HPV感染、特にHPV-16またはHPV-18感染に起因する悪性形質転換に罹患する患者の処置のために興味深い。

40

【0089】

このような免疫治療組成物は、腫瘍誘発性状態をもたらす宿主における制御されていない細胞増殖の治療に、特に癌免疫療法に、特にHPV感染に関連した子宮頸部癌免疫療法において特に興味深い。それ故、それは、癌ウイルス感染に起因する悪性状態（腫瘍状態を含む）の処置に特に適した治療ワクチンの設計のための手段を提供する。

【0090】

本発明に使用する場合、「処置」または「治療処置」なる表現は、処置を受けている患者に有益な効果をもたらす、本出願で開示された化合物の効果を包含し、該効果は、細胞レベルまたは臨床レベルで観察され、処置の結果、患者の容態の改善もしくは寛解状態、

50

または健康状態の回復が含まれる。処置する悪性状態が、制御されていない細胞増殖または腫瘍の発生もしくは持続である場合、有益な効果は、制御されていない増殖の安定化を含み得、あるいは、好ましくは、その予防、停止もしくは反転、または腫瘍の減退を含み得る。

【0091】

先に記載した悪性状態の処置を目的とした組成物は、有利には、約1～約1000 μ gの組換えタンパク質、好ましくは約10～約500 μ gの組換えタンパク質の量に対応する用量の活性物質を含むことができる。該組成物が活性物質として本発明の組換えタンパク質を含む場合、用量は、約0.05～約10 μ gの組換えタンパク質、好ましくは約0.1～約1 μ gのタンパク質を含むことができる。

10

【0092】

処置する状態に応じて、該組成物は、病変レベルで局所的に、1回または数回、例えば数日間の規則的な間隔で、例えば5～10日間投与できる。また全身投与してもよい。

【0093】

本発明はまた、好ましくはヒト宿主における、先の定義に記載の組換えタンパク質、または、先に定義したポリヌクレオチド、または、該ポリヌクレオチドを含むベクター、および、適宜、免疫応答（細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答を含む）を誘起するための薬学的に許容されうるビヒクルを含む、ワクチン組成物、特に哺乳動物宿主、好ましくはヒトへの投与のために製剤化された組成物に関する。

20

【0094】

本発明はまた、HPV感染を予防または処置するための、本発明の組換えタンパク質またはポリヌクレオチドまたはベクターおよび薬学的に許容されうるビヒクルを含む、薬物組成物にも関する。

【0095】

別の実施形態によれば、薬物組成物は、宿主におけるHPV感染に起因する悪性形質転換の発症または存続の予防または処置のための、本発明に記載の組換えタンパク質またはポリヌクレオチドまたはベクターを、薬学的に許容されうるビヒクルと共に含む。

【0096】

癌免疫療法のための、組換えタンパク質またはポリヌクレオチドまたはベクターおよび薬学的に許容されうるビヒクルを含む薬物組成物。

30

【0097】

本発明はまた、宿主における免疫応答、すなわち、体液性および/または細胞性免疫応答を誘起するためのベクターとして使用するに適した、細菌タンパク質、特に細菌毒素（好ましくはその類毒素形態）またはその断片を含む組換えタンパク質（該タンパク質またはその断片は、1種類の癌ウイルスによる感染の処置のために、1個または数個の癌ウイルスの1個または数個の抗原の1個または数個のエピトープの挿入により改変されている）の患者における使用に関する。このような組換えタンパク質は、特に、悪性作用、特にこのような癌ウイルスによる感染により引き起こされる腫瘍の処置に提案されている。

【0098】

癌ウイルスの抗原のエピトープを運ぶためのベクターとして適した細菌タンパク質の例は、クレブシエラのOmpAまたは以下の毒素シガ毒素（その β サブユニットを含む）（Haicher N.ら、J.Immunol.2000、165:3301-8）、炭素菌毒素（Goletz TJら、PNAS USA 1997、94:12059-64）、ジフテリア毒素（Stenmark H.ら、J.Cell.Biol.1991、113:1028-32）またはシュードモナス外毒素A（Donnelly JJ.ら、PNAS USA 1993、90:9530-4）である。細菌タンパク質への挿入のためのポリペプチドを調製するために抗原がエピトープを提供できる癌ウイルスには、HPV、HBV、HCV、アデノウイルスEBV、ヘルペスウイルス、HTLV、1ウイルス、およびCMVが挙げられる。

40

【0099】

CyA組換えタンパク質について先に示した活性物質としての使用の記述は、他の細菌タンパク質および癌ウイルス抗原にも応用できる。

50

【 0 1 0 0 】

本発明はまた、H P V 感染の診断のための、または、このような感染を免疫モニタリングするためのキットに関し、これには、本発明に記載の組換えタンパク質、ポリヌクレオチド、または発現ベクターが含まれる。

【 0 1 0 1 】

本発明はまた、患者におけるH P V 感染の処置または予防のための、上記の本発明の組換えタンパク質、ポリヌクレオチド、またはベクターの使用に関する。

【 0 1 0 2 】

本発明はまた、患者におけるH P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続に対する免疫療法のための、上記の本発明の組換えタンパク質、ポリヌクレオチド、またはベクターの使用に関する。

10

【 0 1 0 3 】

本発明はまた、H P V 感染をインビトロで診断する方法またはH P V 感染を免疫モニタリングする方法に関し、該方法は、哺乳動物、特にヒト患者から得られたT細胞を、本発明の組換えタンパク質にさらすこと、T細胞の活性化の改変を検出することを含む。

【 0 1 0 4 】

特定の実施形態において、該組換えタンパク質は、H P V 感染の予防、または、H P V 感染に罹患している宿主（このような感染に起因する腫瘍を有する宿主を含む）の処置のために使用できる。

20

【 0 1 0 5 】

本発明はまた、キメラC y a A - ポリペプチドタンパク質に含まれるポリペプチドにおける未知または亜優性潜在性T細胞エピトープのスクリーニング方法であって、ここで、C y a A は、先に開示されているアデニル酸シクラーゼまたはその断片であり、該方法は、該キメラタンパク質を動物宿主に投与すること、該宿主のT細胞応答、特にC T L 応答を決定することを含む。

30

【 0 1 0 6 】

本発明は、特に、本発明内で定義された組換えタンパク質に含まれるH P V 抗原のポリペプチド中の未知または亜優性または潜在性T細胞エピトープ（特にC D 8 ⁺ T細胞エピトープ）をスクリーニングする方法に関し、該方法は、該組換えタンパク質を動物宿主（非ヒト）に投与すること、該宿主のT細胞応答、特にC T L 応答を決定することを含む。

【 0 1 0 7 】

本発明を特徴づけるさらなる特徴を、以下の実施例および図面に開示し説明する。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 1 0 8 】

【 図 1 A 】 H P V 1 6 - E 7 組換えC y a A の作成および精製。（ A ） 関連する制限酵素部位および挿入配列が示されている、p T R A C E 5 のマップ図。（ B ） C y a A の酵素活性を阻害するジペプチドL Q の挿入部位を示すC y a A の図解。H P V 1 6 - E 7 タンパク質挿入断片の位置も示されている。H P V 1 6 - E 7 H - 2 ^b 拘束性エピトープには下線を付している。

【 図 1 B 】 H P V 1 6 - E 7 組換えC y a A の作成および精製。（ C ） H P V 1 6 - E 7 組換えC y a A のS D S - P A G E 解析。5 μ g の精製タンパク質を、4 ~ 1 5 % S D S ポリアクリルアミドゲル上で分離し、クーマシーブルーにより染色した。レーン 1 : 野生型C y a A ; レーン 2 : C y a A - E 7 _{4 9 ~ 5 7} ; レーン 3 : C y a A - E 7 _{F U 1 1}

50

；レーン4：C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2。 (D) H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A のウェスタンブロット解析。S D S - P A G E 後、精製タンパク質を、ニトロセルロース膜にエレクトロトランスファーし、続いてこれをマウスモノクローナル抗 H P V 1 6 - E 7 抗体でプローブした。レーン1、2：野生型 C y a A (それぞれ2および0.4 μ g)；レーン3、4、および5：それぞれ、C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7、C y a A - E 7 F U 1 1 および C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2、各々0.4 μ gのタンパク質。

【図2】組換え H P V 1 6 - E 7 C y a A による T 細胞応答の誘導。(A) C 5 7 B L / 6 (a、b、c)、T A P 1 - / - (d)、M H C クラス I I - / - (e)、および C D 4 0 - / - (f) マウスを、0日目に、50 μ gの C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 (a)、C y a A - E 7 F u 1 1 (b)、または C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (c、d、e および f) の静注により免疫化した。数日後、動物を屠殺し、脾臓細胞を、インビトロで、1 μ g / m l の H P V 1 6 - E 7 Δ 4 3 ~ 7 7 ペプチドを用いて、照射された同系脾臓細胞の存在下で5日間再刺激し、T C - 1 標的細胞 (普通の四角) または E L 4 (白抜きの四角) に対するエフェクターとして使用した。非関連エピトープ O V A Δ 2 5 7 ~ 2 6 4 を有する C y a A E 5 - c y s O V A で処置し、インビトロで1 μ g / m l の H P V 1 6 - E 7 Δ 4 3 ~ 7 7 ペプチドを用いて、照射された同系脾臓細胞の存在下で5日間再刺激したマウスの脾臓細胞も表示する (a、普通の三角)。標的溶解は、 51 C r 放出により評価した。データは、特異的溶解値の中間パーセンテージ (n = 動物の数を各グラフに示す) 並びに四分位範囲を示す。(B) 組換え H P V 1 6 - E 7 C y a A での免疫化後の H P V 1 6 - E 7 特異的 I F N - γ 産生細胞の検出。C 5 7 B L / 6 マウスを、A と同様に、C y a A E 5 - c y s O V A (丸)、C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 (四角)、C y a A - E 7 F u 1 1 (三角)、または C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (菱形) を用いて免疫化した。数日後、免疫化マウスから単離した脾臓細胞を、インビトロで、刺激せずに (すなわち、ペプチドなし、白抜きの記号)、または、1 μ g / m l の E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 ペプチド (普通の記号) を用いて刺激して、同系照射脾臓細胞の存在下で36時間培養した。データは、脾臓1個あたりの S F C の数として表現し、3回の独立した実験の個々のマウスの結果を、各群に対して示す。横棒は、各群の応答の中間値を示す。

【図3】組換え H P V 1 6 - E 7 C y a A は、H P V 1 6 E 7 特異的 T h 1 応答を誘導する。(A) C 5 7 B L / 6 マウスを、未処置のままにするか (四角)、または、50 μ g の C y a A E 5 - c y s O V A (丸)、C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 (三角)、C y a A - E 7 F u 1 1 (逆三角)、もしくは C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (菱形) を用いて静注により抗原刺激した。数日後、脾臓細胞を、インビトロで、10 μ g / m l の H i s - T a g - H P V 1 6 - E 7 タンパク質で刺激し、上清を、I F N - γ 含量について72時間後に試験した。4回の独立した実験の個々のマウスの結果を示し、2個の複製ウェルの上清に放出された I F N - γ の濃度として表現する。再刺激しなかった脾臓細胞で得られたバックグラウンドを差し引く。挿入図：1 μ g / m l の E 7 Δ 4 3 ~ 7 7 ペプチドを用いたインビトロでの刺激。横棒は、各群の応答の中間値を示す。(B) 上清を I L - 5 含有量について試験したこと以外は、(A) と同様。2回の独立した実験の個々のマウスの結果を示し、2個の複製ウェルの上清中に放出された I L - 5 の濃度として表現する。

【図4A】組換え H P V 1 6 - E 7 C y a A を用いた治療的ワクチン接種は、確立された腫瘍を根絶する。(実験 A) C 5 7 B L / 6 マウスを、0日目に、 5×10^4 個の T C - 1 腫瘍細胞を用いて移植した。10日目に、マウスを、C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 (C)、C y a A - E 7 F u 1 1 (D)、または C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (E) の1回の静注により処置した。未処置のままのマウス (A) または C y a A E 5 - c y s O V A を注射したマウス (B) を対照として採用した。腫瘍サイズが1000 mm³に達した時、または不必要な苦しみを避けるために動物の衛生状態により要求される場合にはいつでも (壊死腫瘍、20%を超える急速な体重減少)、マウスを屠殺した。後に進行性の腫瘍を発症した C y a A - E 7 F u 1 1 で処置した2匹のマウス (*) を、さらに調べるために屠殺した (図6参照)。

【図4B】組換え H P V 1 6 - E 7 C y a A を用いた治療的ワクチン接種は、確立された

腫瘍を根絶する。(実験B)実験設定については(実験A)と同様。+10および+17日目に、 $10\mu\text{g}$ のCy a A E 5 - C y s O V A (a、実線)または $10\mu\text{g}$ のCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (b)を用いて耳真皮に治療的ワクチン接種を実施した。各曲線は、1匹の動物における腫瘍増殖を示す。2匹の未処置の動物が含まれていた(a、点線)。各々の四分の一区の右上には(a、b)、屠殺動物の数と、含まれる動物の全数が示されている。これらのマウスの生存曲線を示す(c)。未処置(白抜きの三角)、Cy a A E 5 - C y s O V Aを用いたニセ処置(閉じた三角)、Cy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2を用いた処置(丸)。

【図5】組換えHPV16 - E 7 Cy a Aでの治療的ワクチン接種により、生存が延長される。治療的ワクチン接種は、図4に記載した通りに行なった。TC - 1腫瘍細胞の注射時に、マウス(1群あたり5~10匹)を、グラフに示されているように+1、+5、または+10日目にHPV16 - E 7組換えCy a Aで免疫化した。マウスを未処置のまま(普通の四角、実線)、Cy a A E 5 - c y s O V Aでニセ処置(白抜きの四角、点線)、またはCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (白抜きの三角)、Cy a A - E 7 F u l l (白抜きの丸)、もしくはCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (白抜きの菱形)で処置した。+5日目の治療実験において、Cy a A - E 7 F u l l およびCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 で処置した動物の生存曲線は、完全に重ね合わさることが特筆される。どの場合においても、組換えHPV16 - E 7 Cy a A処置動物の生存は、未処置またはニセ処置マウスと比べて有意に延びている($p < 0.05$)。

【図6】その後に増殖してきた腫瘍から外移植したTC - 1腫瘍細胞は、H - 2 D^b分子の発現を欠失している。腫瘍拒絶実験において、Cy a A - E 7 F u l l をワクチン接種した数匹の動物では、実験の時間経過中、後になって腫瘍が成長した(図4、*)。腫瘍を外移植するために、2匹の動物を屠殺した。これらの腫瘍細胞、TC - 1 A 1およびA 2並びに天然TC - 1細胞を、H - 2 D^b分子の発現レベルについてFACS(登録商標)により解析した(太線)。蛍光強度の中間値(M e d F i)を示す。アイソタイプ対照で得られた結果を示す(グレーの陰影)。

【図7】組換えHPV16 - E 7 Cy a Aで処置したマウスにおけるHPV16 - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 特異的CD8⁺T細胞の持続性。治療実験セットにおいて、Cy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (A)、Cy a A - E 7 F u l l (B)、またはCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (C)で免疫化し、TC - 1移植にも関わらず生存しているC57BL/6マウスを屠殺し、脾臓細胞を、インビトロで、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のHPV16 - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 ペプチドで、照射同系脾臓細胞の存在下で5日間再刺激した。標的溶解(TC - 1、普通の四角; EL 4、白抜きの四角)を、 ^{51}Cr 放出により評価した。データは、非特異的溶解の数値のパーセンテージの中間値(各群において $n = 6$)、並びに、四分位範囲を示す。エフェクターと標的の最大比において20%以上の特異的溶解により決定される対応する動物の数を、四分の一区の右上部分に示す。

【図8】組換えHPV16 - E 7 Cy a Aにより誘導されるTC - 1腫瘍増殖に対する長期防御。治療実験セットにおいて、TC - 1移植にも関わらず生存しているC57BL/6マウスに、100日目に、 5×10^4 個のTC - 1細胞を再移植した。年齢の適合した未処置マウスを、対照として採用した(A)。Cy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2、Cy a A - E 7 F u l l、およびCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 で最初に免疫化したマウスにおける腫瘍の増殖を示す(それぞれ、B、C、およびD)。腫瘍サイズが 1000mm^3 に達した時、または動物の衛生状態により要求される場合にはいつでも、マウスを屠殺した。(E)未処置(白抜きの四角);もしくはCy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (白抜きの三角); Cy a A - E 7 F u l l (白抜きの丸);もしくは、Cy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 (白抜きの菱形)で免疫化し、TC - 1細胞を再移植した(移植日を0とする)動物の生存曲線。いずれの場合においても、組換えHPV16 - E 7 Cy a A処置動物の生存は、未処置またはニセ処置マウスに比べて有意に延びた($p < 0.05$)。

【図9】Cy a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 治療活性と、CpG ODN1826アジュバントの添加されたHPV16 E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 の治療活性との比較。C57BL/6マウスに、

10

20

30

40

50

0 日目に、 5×10^4 個の TC-1 腫瘍細胞を皮下移植した。+ 10 および + 17 日目に、マウスに、 $10 \mu\text{g}$ の HPV16-E7₄₃₋₇₇ ($n = 5$ 、三角)、 $1 \mu\text{g}$ の CpG-ODN1826 ($n = 5$ 、四角)、 $10 \mu\text{g}$ の HPV16-E7₄₃₋₇₇ + $1 \mu\text{g}$ の CpG-ODN1826 ($n = 5$ 、菱形)、 $10 \mu\text{g}$ の CyA-CyOVA ($n = 3$ 、逆三角)、または $10 \mu\text{g}$ の CyA-E7 _{Δ 30-42} ($n = 7$ 、丸) を 1 回皮内注射して処置した。腫瘍サイズが 1000 mm^3 を超えた時、または動物の衛生状態により要求される場合にはいつでも、マウスを屠殺した。

【図 10】CyA-E7 _{Δ 30-42} の TC-1 腫瘍拒絶誘導能に対する、CyA に対する予備免疫の効果の解析。(A) C57BL/6 マウスは未処置のままとするか、または、90 もしくは 30 日前に、7 日間の間隔で $10 \mu\text{g}$ の CyAE5 を 2 回皮内注射することにより免疫化した。1 日前に、動物の採血をし、血清を個々に抗 CyAE5 IgG の存在について ELISA により評価した。結果は、希釈対 A₄₉₂ をプロットした線形回帰分析により計算した個々の抗体力価として表現する。横棒は、各群の応答の中間値を示す。(B) 未処置 (a、b)、30 日前に CyAE5 で免疫化 (c、d)、および 90 日前に CyAE5 で免疫化した (e、f) 動物に、0 日目に、 5×10^4 個の TC-1 腫瘍細胞を移植し、+ 10 および + 17 日目に、 $10 \mu\text{g}$ の CyA-CyOVA (a、c、e)、または $10 \mu\text{g}$ の CyA-E7 _{Δ 30-42} (b、d、f) を 1 回皮内注射することにより処置した。挿入図 (b、d、f) は、0 ~ 35 日間の期間のクローズアップであり、全ての動物が、ワクチン接種をした時点で触診できる腫瘍を有していたことを示す。各曲線は、1 匹の動物における腫瘍増殖を示す。腫瘍サイズが 1000 mm^3 を超えた時、または動物の衛生状態により要求される場合にはいつでも、マウスを屠殺した。各々の四分の一の右上には、屠殺動物の数と、含まれる動物の全数が示されている。

【図 11】HHDMouseにおける CyA-HPV16E7 _{Δ 30-42} による CTL 応答の誘導。EL4-HHD細胞へのペプチドの添加を、各グラフの上に示す。続く表には、カラムヘッダー Vacc の下で注入された CyA のタイプ (HPV17E7 または HPV18E7 に関する)、および、カラムヘッダー Stim の下でインビトロでの再刺激に使用されたペプチドが示されている。見てとれるように、CyA-HPV16E7 _{Δ 30-42} による免疫化後、本発明者らは、ペプチド # 253 のみに特異的な CTL を誘導することができた (右パネル)。インビトロでペプチド # 255 で再刺激した脾臓細胞は、ペプチド # 253 で被覆した EL4-HHD細胞に対して細胞毒性ではなかったため、この CTL 活性は特異的であった (右パネル)。2 個のその他の HLA-A2 拘束性ペプチドに対する CTL 特異的応答がないことは、異なる現象から生じている可能性がある：(i) ペプチド # 253 の免疫優性、(ii) EL4-HHD細胞のプロテアソームによりペプチド # 255 および # 258 が処理されないこと、(iii) ペプチド # 258 の溶解度が低く、このため本発明者らはアセトニトリル (50%) を使用しなければならず、これは細胞に対して毒性である可能性がある。最も興味深いことには、CyA-HPV18E7 _{Δ 32-42} の同時注射は、CyA-HPV16E7 _{Δ 30-42} の CTL 誘導能を妨害しなかった (右パネル)。

【図 12】HHDMouseにおける CyA-HPV18E7 _{Δ 32-42} による CTL 応答の誘導。EL4-HHD細胞へのペプチドの添加を、各グラフの上に示す。以下の表には、カラムヘッダー Vacc の下で注入された CyA のタイプ (HPV16E7 または HPV18E7 に関する)、および、カラムヘッダー Stim の下でインビトロでの再刺激に使用されたペプチドが示されている。見てとれるように、CyA-HPV16E7 _{Δ 30-42} による免疫化後、本発明者らは、ペプチド # 251 のみに特異的な CTL を誘導することができた (左パネル)。インビトロでペプチド # 257 で再刺激した脾臓細胞は、ペプチド # 251 で被覆した EL4-HHD細胞に対して細胞毒性ではなかったため、この CTL 活性は特異的であった (左パネル)。HPV16E7 HLA-A2 拘束性ペプチドと同様に、HPV18E7 # 257 HLA-A2 拘束性ペプチドに対する CTL 特異的応答がないことは、異なる現象から生じている可能性がある：(i) ペプチド #

251の免疫優性、(ii)EL4-HHD細胞のプロテアソームによりペプチド#257が処理されないこと、(iii)ペプチド#257の溶解度が低く、このため本発明者らはアセトニトリル(50%)を使用しなければならず、これは細胞に対して毒性である可能性がある。最も興味深いことには、CyaA-HPV16E7 Δ_{30-42} の同時注射は、CyaA-HPV18E7 Δ_{32-42} のCTL誘導能を妨害しなかった(左パネル)。

【図13】pTRACE5-E7HPV18の作成。

【図14A】pTRACE5-E7 Δ HPV16+18の作成。3つのプラスミド調製ステップを開示する。

【図14B】pTRACE5-E7 Δ HPV16+18の作成。3つのプラスミド調製ステップを開示する。

【図14C】pTRACE5-E7 Δ HPV16+18の作成。3つのプラスミド調製ステップを開示する。

【図15】CyaA-HPV18E7_{Fu11}; CyaA-HPV18E7 Δ_{32-42} ; CyaA-HPV16+18E7_{Fu11}; CyaA-HPV16+18E7 Δ ;をコードするポリヌクレオチドのマップ。

【図16】C57BL/6マウスにおけるHPV18E7を有する組換えCyaAによるCTLの誘導。

【図17】C57BL/6マウスにおけるHPV18E7を有する組換えCyaAによるCTLの誘導。寄託されている材料(I-3190およびI-3191)は、E.coli株BLRに含まれ、ルリアブロス(LB)培地中で増殖させることができ、100 μ g/mlのアンピシリンを含むLBに接種し、175rpmで振とうし照射しながら空气中で30でインキュベートできる。7~10%DMSOを含むLB中での一晩の保存が可能である。

【0109】

実施例

実施例1

ここで、本発明者らは、HPV16のE7タンパク質の全長配列またはこのポリペプチドの垂断片(特に、H-2D^b拘束性エピトープに対応するE7の残基49~57およびHPV16-E7残基43~98と1~29を包含するペプチド)を含む、組換えCyaAを作成した。本発明者らは、C57BL/6マウスに注入した場合、これらのHPV16-E7組換えCyaAは、IFN- γ の分泌により特徴づけられる特異的CTLおよびTh1応答を誘導できることを示した。さらに、治療的に試験した場合、これらの構造物は、TC-1細胞の皮下移植に対して100%以下の防御を提供できた。この研究は、初めて、インビボでの、ヒト腫瘍特異的抗原に対するCyaAにより媒介される抗腫瘍治療活性の実証を示した。

【0110】

材料および方法

マウスおよび細胞系

特定の病原体を含まない6~10週令の雌C57BL/6マウスを、CER Janvier(Le Gesnet St-Isle、フランス)またはチャールズリバー(L'Arbresle、フランス)から得た。C57BL/6バックグラウンドへと育成したTAP1^{-/-}(18)、MHCクラスII^{-/-}(19)およびCD40^{-/-}(20)もこの研究に使用した。動物を、水と食料が自由にとれ、病原体の存在しない条件下で、パスツール研究所動物施設で飼った。動物の関与する実験は、動物の世話の施設ガイドラインにしたがって実施した。HPV16E6およびE7タンパク質を発現しているT細胞(21)およびマウス胸腺EL4細胞(17)を、ATCCから得た。細胞を、10%の熱不活性化FCS、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、0.4mg/mlのジェネティシン(TC-細胞に対してのみ)、および5 $\times$ 10⁻⁵Mの2-メルカプトエタノール(ギブコBRL、Cergy-Pointoise、フランス)を補充したグルタマックスを含むRPMI16

40中に維持した。

【0111】

ペプチド

HPV16-E7 H2-D^b拘束性エピトープ(22)に対応する合成ペプチドE7₄₉₋₅₇(RAHYNIVTF、一文字でアミノ酸をコード)並びにE7₄₉₋₅₇CTLエピトープ(天然ランキング配列およびThエピトープ(太線)を含む)(23)に対応するE7₄₃₋₇₇

【表2】

(GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR)

10

を、Neosystem(ストラスブール、フランス)から購入した。CpG ODN1826は、PROLIGO(パリ、フランス)から購入した。

【0112】

HPV16-E7エピトープを有する組換えB.pertussisアデニル酸シクラーゼの作成および精製

本文書で使用する組換えアデニル酸シクラーゼは、酵素的に不活性なCy a AをコードするプラスミドpTRACE5の誘導体(図1A)を使用することにより、E. coliにおいて発現させた(24)(25)。プラスミドpTRACE5は、酵素的に不活性で、それ故に細胞毒性であるB.pertussisCy a Aの変種のための発現ベクターである。それはまた、Cy a Aの翻訳後のアシル化に必要とされるB.pertussisCy a Cタンパク質も発現する。このプラスミドは、以前に記載されているpTRACGプラスミドの誘導体である(Gmiraら、2001、Res.Mic.152:889)。それは、cy a A DNA配列の5'部分内に位置するEcoRV部位へのヘキサヌクレオチドCTGCAGの挿入により得られた。これにより、触媒部位の不可欠な部位内のAsp188とIle189の間に、ジペプチドLeu-Glnが枠内に挿入された(Guermonprezら、2000、Meth.Enzymol.326:527)。

20

【0113】

プラスミドpTRACE5は、ColE1複製起点とアンピシリン耐性マーカートを有する。このプラスミドでは、cy a Cおよび改変されたcy a A遺伝子が、λファージPrプロモーターの制御下で同じ転写単位に入れられている。pTRCAGプラスミドはまた、32より低い温度でλPrプロモーターにおける遺伝子転写を強力に抑制する熱感受性λリプレッサーcI⁸⁵⁷をコードしている。

30

【0114】

E. coli株のXL1-Blue(ストラタジーン、ラホーヤ、CA州)を、標準的なプロトコルにしたがって実施した全てのDNA操作において使用した(Maniatisら)。

【0115】

Cy a A-E7₄₉₋₅₇は、Cy a Aのコドン224と235の間に挿入された9アミノ酸長のポリペプチド配列(RAHYNIVTF)を含む。Cy a A-E7₄₉₋₅₇の発現プラスミドは、以下のように作成した。2つの合成オリゴヌクレオチド(MWG、Courtaboeuf、フランス)

40

【表3】

BTP1 (5'-CTA GCC GTG CCC ATT ACA ATA TTG TAA CCT TTG GTA C-3'

コード鎖) 及び BTP2 (5'-CAA AGG TTA CAA TAT TGT AAT GGG CAC

GG-3' 非コード鎖)

をアニーリングし、NheIおよびKpnIで消化したpTRACE5にライゲートした

50

。C y a A - E 7 _{F u l l} は、H P V 1 6 - E 7 タンパク質の全配列、すなわち、酵素的に不活性なC y a Aの同じ2 2 4 位に挿入された9 8 アミノ酸を含む。E 7 タンパク質をコードするD N A 配列を、特異的プライマー

【表 4】

BTP3, (5'-GGG CGC TAG CAT GCA TGG AGA TAC ACC TAC-3'), 及び BTP4
(5'-GGG CGG TAC CTG GTT TCT GAG AAC AGA TGG G-3').

を使用して、H P V 1 6 D N A (先のSeedorf Kら) から増幅した。得られたP C R 産物をN h e I およびK p n I で消化し、N h e I およびK p n I で切り出したp T R A C E 5 にライゲートした。アニーリングしたオリゴヌクレオチド並びにH P V 1 6 - E 7 の全配列に存在するS s p I 部位により、挿入変異体の迅速な同定が可能となった。C y a A - E 7 _{Δ 3 0 ~ 4 2} は、C y a A のコドン3 1 9 と3 2 0 の間に挿入されたH P V 1 6 - E 7 の最初の2 9 アミノ酸残基、並びに、C y a A のコドン2 2 4 と2 3 5 の間に挿入されたH P V 1 6 - E 7 の残基4 3 ~ 9 8 を含む。C y a A - E 7 _{Δ 3 0 ~ 4 2} のための発現プラスミドは、2 ステップで作成した。H P V 1 6 - E 7 (のアミノ酸残基1 ~ 2 9) をコードする第一のD N A 断片を、標的D N A として合成H P V 1 6 - E 7 遺伝子 (E . c o l i における産生に最適化され、GTP Technologyにより設計、Labège、フランス) およびプライマー

【表 5】

BTP5 (5'-GGG CAC CGG TAA ACG TAT GCA CGG CGA TAC TCC G-3'), 及び
BTP6 (5'-CGT GAG CAT CTG GCT TTC ACT AGT ACG TTT GTT CAG CTG
CTC GTA GCA-3').

を使用してP C R 増幅した。C y a A のコドン3 2 0 ~ 3 7 2 をコードする第二のD N A 断片を、標的D N A としてp T R A C E 5、および、プライマー

【表 6】

BTP7 (5'-GGG CAC TAG TGA AAG CCA GAT GCT CAC GCG CGG G-3'), 及び
BTP8 (5'-AGT ACA TCC GGC GAG AAC-3').

を使用してP C R 増幅した。これらの2 個のD N A 断片 (一部重複する) を精製し、3 回目のP C R でプライマーB T P 5 およびB T P 8 と合わせ、2 9 4 b p 長のD N A 断片を増幅した。この断片を、A g e I およびB s t B I により消化し、p T R A C E 5 の対応する部位の間に挿入して、プラスミドp T R A C E 5 - E _{1 ~ 2 9} を得た。その後、H P V 1 6 - E 7 のアミノ酸残基4 3 ~ 9 8 をコードするD N A 断片を、標的D N A としての合成H P V 1 6 - E 7 遺伝子、および、プライマー

【表 7】

BTP9 (5'-GGG CGC TAG CGG TCA AGC AGA ACC GGA C-3') 及び BTP10
(5'-GGG CGG TAC CAG GTT TTT GAG AGC AAA TCG GAC AAA CAA
TCC CCA GAG TAC CCA TC-3').

を使用してP C R 増幅した。精製P C R 断片をN h e I およびK p n I により消化し、同じ制限酵素により消化したプラスミドp T R A C E 5 - E _{1 ~ 2 9} にライゲートした。

【0 1 1 6】

全ての組換えアデニル酸シクラーゼが、前記のように(26)、エシェリヒア・コリ株 B L R (ノバゲン、W I 州マジソン)において産生された。組換えタンパク質を、前記のように(26)、D E A E - セファロースおよびフェニル - セファロースクロマトグラフィーを含む2ステップ手順により封入体から均一に近くなるまで精製した(図1B)。フェニル - セファロースクロマトグラフィーに加えて、20 mM H e p e s - N a、p H 7.5中の60%イソプロパノールを用いてのさらなる洗浄ステップを行ない、大半の混入 L P S を排除した。L P S 含量は、キット Q C L - 1000 (Biowhittaker、Walkersville、M D 州)を使用して決定した。精製組換えタンパク質を、S D S - ゲル分析により分析した。タンパク質濃度は、分子吸光係数 $142,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用して280 nmにおける吸光度から分光学的に決定した。

10

【0117】

組換え H P V 16 - E 7 タンパク質の作成および精製。

リクエストにより入手可能な H P V 16 - E 7 タンパク質 (GTP technology) の D N A 配列をコードする E . c o l i 最適化 c D N A を、p I V E X 2 . 4 b ベクター (ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ、Meylan、フランス) の N c o I と X h o I 制限部位の間にサブクローニングした。その後、得られたプラスミドを、E . c o l i 株 B L 2 1 λ D E 3 (ノバゲン) に形質転換した。0.5 mM のイソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド (Euromedex、Souffelweyersheim、フランス) で誘導すると H i s - T a g - H P V 16 - E 7 タンパク質が発現され、N i - N T A アガロース (キアゲン、ヒルデン、ドイツ) を用いて製造業者の指示にしたがって精製した。L P S 混入を除去するために、記載の通りに(27)イソプロパノールによる洗浄を使用した。

20

【0118】

イムノプロット

タンパク質を S D S - P A G E により分離し、マウスモノクローナル抗 H P V 16 E 7 抗体 (Zymed、C A 州サンフランシスコ) または C 5 7 B L / 6 マウスにおいて調製したポリクローナル抗 E . c o l i B L R 血清でプローブした、ニトロセルロース膜 (0.45 μ、バイオラッド、Marnes la Coquette、フランス) にエレクトロトランスファーした。アルカリホスファターゼにコンジュゲートさせたヤギ抗マウス免疫グロブリン (Chemicon、Temecula、CA) を用いて免疫複合体が検出され、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート / ニトロブルーテトラゾリウム (B C I P / N B T) (シグマ、M O 州セントルイス) を用いて明確にした。

30

【0119】

マウス免疫化および腫瘍拒絶実験

動物を、P B S (ギブコ B R L) に希釈した $50 \mu\text{g}$ の対照もしくは H P V 16 - E 7 組換え C y a A を1回静注するか、または、2回 (各回 $10 \mu\text{g}$) 皮内注射することにより免疫化した。皮内注射は、耳真皮に行なった(47)。インビトロでの解析のために、長期の応答の解析を除いて (このためにこの手順は、注射の3ヶ月後に行なった)、注射の7日後に、麻酔した動物 (C O₂) の脾摘除を行なった。腫瘍拒絶実験のために、マウスは、皮下に 5×10^4 個の T C - 1 細胞を投与され、腫瘍接種の1日後、5日後、または10日後に H P V 16 - E 7 組換え C y a A により処置した。T C - 1 腫瘍増殖を、キャリパーを使用してモニタリングし、式 $V = (L \times w^2) / 2$ (L:長さ、w:幅) を使用して立方ミリメートルで表現した(48)。

40

【0120】

インビトロでの細胞毒性アッセイ

免疫化マウスの脾臓細胞を、インビトロで、同系の照射し無処置の脾臓細胞の存在下で、完全培地 (10%の熱で不活性化された F C S、 $100 \text{ U} / \text{ml}$ のペニシリン、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ のストレプトマイシン、および $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ の2 - メルカプトエタノールを補充したグルタマックスを含む R P M I 1640) 中で、5日間、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の E 7₄₉₋₅₇ または E 7₄₃₋₇₇ ペプチドで刺激した。これらのエフェクター細胞の細胞毒性活性を、T C - 1 細胞の5時間の $^{51} \text{Cr}$ 放出アッセイで試験した。放射標識を以下の

50

ように行なった：7.5% CO₂ 雰囲気中 37℃ で培養した指数関数的に増殖している TC-1 細胞を、素早くトリプシン処理し（トリプシン - EDTA、ギブコ BRL）、100 μCi の ⁵¹Cr と共に 37℃ で 1 時間インキュベートした。様々な E : T 比を使用し、全てのアッセイを二重に行なった。各ウェルの上清に放出された放射能を測定した。特異的溶解率は、 $100 \times (\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})$ として計算した。最大放出は、10% トリトン X-405 を標的細胞に加えることにより得、自発的放出は、完全培地のみの中でインキュベートした標的細胞を用いて得られた。最も高い E : T 比で少なくとも 20% の特異的溶解が観察された場合にマウスをレスポnder と判断した。結果は、1 群あたりのレスポnder マウスの中間値 ± 四分位範囲として表現した。

10

【0121】

分泌細胞のための、単一の IFN-γ 産生細胞の酵素結合免疫スポットアッセイ

マルチスクリーンろ過プレート（96 ウェル；ミリポア、Molshein、フランス）を、1 ml あたり 4 μg のラット抗マウス γ インターフェロン（IFN-γ）抗体（クローン R4-6A2；ファーマーゲン、CA 州サンディエゴ）を用いて室温で一晩かけて被覆した。その後、プレートを洗浄し、完全培地で遮断した。免疫化マウスの脾臓細胞の連続 2 倍希釈液を、 5×10^5 個の γ 照射された（2,500 rad）同系支持細胞と共に加えた。細胞を、1 μg/ml の E7₄₉₋₅₇ ペプチドと共にまたはその非存在下で 36 時間インキュベートした。十分に洗浄した後、プレートを、1 ml あたり 5 μg のビオチニル化ラット抗マウス IFN-γ 抗体（クローン XMG1.2；ファーマーゲン）と共にインキュベートし、その後、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ（ファーマーゲン）と共にインキュベートすることにより明確にした。最後に、基質として BCIP/NBT を使用してスポットを明確にした。IFN-γ 産生細胞の数を、各ウェルにおけるスポット形成細胞（SFC）の数を計測することにより決定し（Bioreader、Karben、ドイツ）、結果を、脾臓 1 個あたりの SFC の全数として表現した（17）。

20

【0122】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）

空のベクター CyA E5 により皮内免疫化したマウスから、30 または 90 日後に採血し、個々のマウス血清を、ELISA により抗体応答について試験した。マイクロプレート（Nunc、Roskilde、デンマーク）を、PBS 中の空のベクター CyA E5（3 μg/ml）を用いて一晩かけて被覆した。PBS-tween 20（0.1%）中で洗浄した後、希釈した血清を、ウェルに加え、37℃ で 1 時間インキュベートした。PBS-tween 20 中で洗浄した後、プレートを、ヤギ抗マウス IgG ペルオキシダーゼコンジュゲート（シグマ）と共に 37℃ で 1 時間インキュベートした。プレートを、o-フェニレンジアミンおよび過酸化水素（シグマ）を使用して展開した。硫酸を用いて反応を停止し、プレートを、ELISA 読取機（Dynatech、Marnes la Coquette、フランス）を用いて 492 nm で解析した。結果は、希釈と A₄₉₂ をプロットした線形回帰分析により計算した抗体力価として表現した。力価は、1/100 に希釈されたプール対照血清の吸光度の 2 倍をもたらす最も高い希釈度の log₁₀ であると計算された。

30

【0123】

サイトカイン産生

免疫化マウスの脾臓細胞を、インビトロで、完全培地中で、10 μg/ml の HisTag-HPV16-E7 タンパク質または 1 μg/ml の E7₄₃₋₇₇ ペプチドを用いて 72 時間かけて刺激した。IFN-γ および IL-5 産生は、培養上清中で、前記のように（28）、サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）により決定された。全てのアッセイは、対応する組換えネズミサイトカイン（ファーマーゲン）を用いて標準化した。

40

【0124】

FACS（登録商標）解析

TC-1 細胞は、特異的な FITC-コンジュゲートモノクローナル抗体（クローン K

50

H 9 5、ファーマンゲン、Le Pont de Claix、フランス)を使用するフローサイトメトリによるMHCクラスI分子H - 2 D^bの発現レベルの解析についていずれかに記載されているように(29)処理した。

【0125】

統計的解析

様々な試料の量が少ないことを考慮して、ソフトウェアStatXact4(Cytel社、MA州ケンブリッジ)を使用するノンパラメトリック統計試験(30)を適用した。生存曲線を、Prismソフトウェア(GraphPadソフトウェア社、CA)を使用してプロットし、ソフトウェアのビルトインのlogランク検定を用いて比較した。データは、 $p < 0.05$ で有意差があると判断した。

10

【0126】

結果

HPV16-E7エピトープを有する組換えアデノウイルスシクラーゼの作成および特徴づけ

Cy a AのHPV16-E7特異的T細胞応答誘導能を試験するために、本発明者らは、3個の異なる組換え分子を作成した。Cy a A-E7₄₉₋₅₇は、酵素的に不活性な(したがって無毒性な)Cy a Aのコドン224と235の間に挿入された、以前に記載されたH-2D^b拘束性CTLエピトープ(22)に対応する、9アミノ酸長のポリペプチド配列(RAHYNIVTF)を含む。Cy a A-E7_{FU11}は、酵素的に不活性なCy a Aの同じ224位に挿入されたHPV16-E7タンパク質の全配列(98アミノ酸)を含む。Cy a A-E7_{Δ30-42}は、酵素的に不活性なCy a Aのコドン319と320の間に挿入されたHPV16-E7の最初の29アミノ酸残基、並びに、コドン224と235の間に挿入されたHPV16-E7の残基43~98を含む。インビトロおよびインビボでのアッセイを可能とするために、Cy a A構造物が産生され、精製されてほぼ均一とした(図1B)。LPS排除手順を精製プロトコル(26)に導入し、50 μgあたり100単位未満の内毒素を含む組換えタンパク質を得た。Cy a A-E7_{FU11}およびCy a A-E7_{Δ30-42}におけるE7タンパク質の存在は、特異的なモノクローナル抗体(Zymed)を使用してウェスタンブロットにより確認された(図1C)。これに対し、H-2D^b拘束性エピトープのみを含むCy a A-E7₄₉₋₅₇は、抗HPV16-E7抗体により認識されなかった。3個の組換えCy a Aの全体的な生化学的特性は、改変されておらず、これらの分子は、野生型アデニル酸シクラーゼと類似した溶血特性を示した(17)。

20

30

【0127】

HPV16-E7組換えCy a Aでの免疫化は、E7特異的CTL応答を誘導した。

Cy a Aが、HPV16-E7エピトープに対するCTL応答を誘導できるかを試験するために、C57BL/6マウスに、50 μgの様々なHPV16-E7組換えCy a Aを1回静注することにより免疫化した。脾臓細胞を収集し、インビトロで、1 μg/mlのE7₄₃₋₇₇ペプチドで刺激した。TC-1細胞を溶解する能力を、5日後に、⁵¹Cr放出アッセイを使用して決定した。図2Aに示されているように、C57BL/6マウスにHPV16-E7組換えCy a Aを1回静注して免疫化することにより、TC-1細胞に対する強力で特異的なCTL応答が誘導された。完全なHPV16-E7タンパク質(図2A、b)を含むCy a Aまたはその欠失形態であるCy a A-E7_{Δ30-42}(図2A、c)で免疫化することにより、最小のH-2D^b拘束性エピトープ(図2A、a)のみを含むCy a A-E7₄₉₋₅₇により誘導されるものと比べてより高い最大CTL活性が得られたが、本発明者らは、本発明者らのデータから統計学的有意性を実証できなかった。ペプチドE7₄₉₋₅₇をインビトロでの再刺激に使用した場合にも、類似の結果が得られた(データは示さず)。関連性のないエピトープ(OVA₂₅₇₋₂₆₄)を有する組換えCy a Aでワクチン接種し、インビトロで、1 μg/mlのE7₄₃₋₇₇ペプチドで再刺激したマウスの脾臓細胞には、弱く非特異的なTC-1細胞溶解しか認められなかった(図2A、a)。インビボで、Cy a Aにより、OVA CD8⁺細胞

40

50

エピトープ (S I I N F E K L) を M H C クラス I 分子に送達することは、T A P 1 機能に依存していることが以前に示されている (15)。本発明者らは、これが C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 を使用しても当てはまるかどうかを試験した。図 2 A、d に示されているように、静注によりワクチン接種された T A P 1 $^{-/-}$ マウスに由来するインビトロで刺激された脾臓細胞は、T C - 1 細胞を溶解できなかった。本発明者らはまた、インビボでの H P V 1 6 E 7 含有組換え C y a A による、C T L 応答の刺激における、C D 4 $^{+}$ T 細胞による支持の必要性を試験した。以前の観察と一致して (15)、本発明者らは、C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 を使用した M H C クラス I I $^{-/-}$ マウスの静注ワクチン接種により、T C - 1 細胞に対する高いレベルの特異的 C T L 応答が誘導されることを観察した (図 2 A、e)。これに対し、本発明者らは、このモデルにおいて、C D 4 0 $^{-/-}$ マウスにおける T C - 1 細胞に対する C T L 応答のレベルが低いことを観察したので (図 2 A、f)、C D 4 0 シグナル伝達への幾分の依存性を観察した。

10

【0128】

生体外での組換え C y a A で免疫化したマウスにおける H P V 1 6 - E 7 特異的脾臓細胞の発生頻度を推定するために、インビトロでの H P V 1 6 - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 ペプチドでの刺激に应答して I F N - γ を産生する細胞の数を、酵素結合イムノスポット (E L I S P O T) により定量した。図 2 B は、C y a E 5 - C y s O V A で免疫化したマウスから得られた I F N - γ を特異的に産生している I F N - γ 産生脾臓細胞の数は、C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 で免疫化したものと比べて、僅かな差異しかなかったことを示す。これに対し、得られた I F N - γ 産生脾臓細胞は、完全な H P V 1 6 - E 7 タンパク質またはその欠失形態を含む H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A でワクチン接種したマウスにおいて、はるかに多いであった (p < 0.05)。観察された応答は、エピトープ特異的であった。なぜなら、H P V 1 6 - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 ペプチドにより刺激しない場合、これらのマウスの非常に僅かな脾臓細胞しか、I F N - γ を産生しなかったからである (図 2 B)。これらの結果は、C y a A が、処理および M H C クラス I 経路へと提示するために、インビボにおいて、H P V 1 6 - E 7 タンパク質の免疫優性 C D 8 $^{+}$ H - 2 D b 拘束性 T 細胞エピトープを、免疫担当性細胞のサイトゾルへと送達でき、これにより強力な C T L 応答を誘起できることを示す。以前の観察によれば (25、31)、本発明者らは、完全な H P V 1 6 - E 7 タンパク質またはその欠失形態および反転形態を有する C y a A もまた、強力な C T L 応答を誘導できたので、C y a A は、大きなポリペプチド断片の挿入に耐えられることを確認した。本発明者らのデータはまた、これらの後者の分子は、マウスにおいて、有意により高い発生頻度の H P V 1 6 - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 特異的応答を誘導したことを実証した。

20

30

【0129】

H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A での免疫化は、H P V 1 6 - E 7 特異的 T h 1 応答を誘導した。

T h 1 応答は、細胞内病原体および腫瘍発達に対する防御において重要な役割を果たす (32、33)。それ故、本発明者らは、H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A により誘導される T 細胞応答のタイプを特徴づけた。C 5 7 B L / 6 マウスに、50 μ g の 3 種の異なる H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A を 1 回静注することにより免疫化し、インビトロで脾臓細胞を 10 μ g / ml の精製 H i s - T a g H P V 1 6 - E 7 タンパク質で刺激した後に、サイトカインの合成を決定した。図 3 に示されているように、完全な H P V 1 6 - E 7 タンパク質またはその欠失形態を有する C y a A での免疫化により、高いレベルの I F N - γ の産生および検出可能なレベルの I L - 5 が存在しないことにより特徴づけられる、T h 1 に似たプロファイルが得られた。この応答は特異的であった。なぜなら、C y a A - E 7 F U 1 1 または C y a A - E 7 Δ 3 0 ~ 4 2 で免疫化した後に得られた I F N - γ レベルは、C y a A E 5 - C y s O V A で二重免疫化したマウスで得られたものよりも有意に高かったからである (p < 0.05)。しかし、これは、C y a A - E 7 Δ 4 9 ~ 5 7 で免疫化したマウスの脾臓細胞には当てはまらなかった。1 μ g / ml の E 7 Δ 4 3 ~ 7 ペプチドを用いて再刺激した場合に、類似の結果が得られた (図 3 A、挿入図)。

40

50

【0130】

合わせて考えると、これらの結果により、本発明者らの条件では、クラス I I H - 2^b 拘束性 T 細胞エピトープを含む完全 H P V 1 6 - E 7 タンパク質を有する C y a A で得られたレベルは、クラス 1 H - 2 D^b 拘束性エピトープしか含まない C y a A - E 7₄₉₋₅₇ で得られたレベルよりもはるかに高いので、C D 4⁺ T 細胞は、I F N - γ の分泌において重要な役割を果たしていることが示された。

【0131】

H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A での免疫化は、確立された H P V 1 6 を発現している腫瘍の減退を誘導した。

強い免疫応答が得られたことを考慮して、その後、本発明者らは、インビボにおいて、H P V 1 6 - E 6 および E 7 タンパク質 H - 2^b 腫瘍原性細胞系 (T C - 1 細胞) (これは C 5 7 B L / 6 マウスの皮下に注射される) からなる前臨床モデルにおいて、H P V 1 6 - E 7 C y a A の治療活性を評価した。このモデルにおいては、腫瘍拒絶は、排他的に、E 7₄₉₋₅₇ 特異的 C D 8⁺ T 細胞により媒介されることが以前に示された (2 1、2 2、3 4、3 5)。したがって、 5×10^4 個の T C - 1 細胞を、C 5 7 B L / 6 マウスの右側腹に皮下注射し、5 0 μ g の C y a A E 5 - H P V 1 6 - E 7₄₉₋₅₇、- E 7_{F u l l}、または - E 7_{Δ 30-42} を、1、5、または 1 0 日後にマウスに静注した。図 4 は、腫瘍移植の 1 0 日後に治療処置したマウスにおける腫瘍増殖を示す。特に、これらの条件において、1 0 0 % の動物が、ワクチン接種を行なう時点までに、触診可能な腫瘍を発達させた。不必要な苦しみを避けるために、腫瘍サイズが 1 0 0 0 m m³ に到達した場合には動物を屠殺した。全ての非処置動物並びにニセ C y a A E - c y s O V A で処置したマウスは、最大 4 9 日間以内に、そのサイズ (> 1 0 0 0 m m³) の腫瘍を発達させた。極めて対照的には、H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A で処置した動物の大半が、実験期間中を通じて腫瘍がない状態を維持した (図 4、C、D、E)。図 5 は、T C - 1 細胞を移植し、3 つの異なる治療プロトコル (組換え C y a A を、T C - 1 移植の 1、5、または 1 0 日後に注射した) を行なった、動物の生存プロットを示す。非処置またはニセ処置動物の生存時間の中間値は、3 1 ~ 4 0 日間であった。これに対し、H P V 1 6 - E 7 抗原を有する C y a A でワクチン接種したマウスの生存は、対照動物よりも有意に優れていた (p < 0 . 0 5)。様々な構造物の防御活性の差異は確立できたが、統計学的有意性は確立できなかった。なぜなら、様々な試料のサイズが小さいからであった。C y a A - E 7₄₉₋₅₇ および - E 7_{F u l l} により付与される腫瘍減退率が、認められる程には区別できなくても、C y a A - E 7_{Δ 30-42} は、腫瘍減退および増殖阻害の点において明らかに優れていた。なぜなら、3 つ全ての治療スキームにおいて、防御率は、常に、9 0 % よりも高かったからである。

【0132】

C y a A - E 7₄₉₋₅₇ および C y a A - E 7_{F u l l} でワクチン接種した何匹かの動物は、実験の経過中、より後で腫瘍を発達させるようであった (図 4 (*)、データは示していない)。この現象は腫瘍エスケープ機序を反映する可能性があることを心に置き、本発明者らは、これらの動物から増殖中の腫瘍を外移植し、H - 2 D^b 発現について、F A C S 解析により、T C - 1 A 1 および T C - 1 A 2 という名称のこれらの細胞系を解析した。図 6 に示されているように、その天然対応物に比べて、より後で増殖してくる腫瘍から外移植した T C - 1 A 1 および A 2 細胞は、H - 2 D^b の発現を欠失しており、したがって、E 7₄₉₋₅₇ 特異的 C D 8⁺ T 細胞により検出されることができなくなっている可能性が高い。T C - 1 細胞は、インビボにおいて、選択のための抗生物質の負荷がない環境で増殖させたので、本発明者らはまた、T C - 1 A 1 および A 2 細胞において H P V 1 6 - E 7 の発現についてウェスタンプロットにより確認した。本発明者らは、T C - 1 および T C - 1 A 1 および A 2 細胞の間にこのタンパク質の発現の差異を全く見出すことができなかった (データは示さず)。

【0133】

合わせて考えると、これらの結果により、前臨床モデルにおいて H P V 1 6 を発現して

いる腫瘍の減退を誘導するために適した治療ワクチンとしての、アデニル酸シクラーゼベクターの有効性が実証された。

【0134】

本発明者らは、臨床的に関心の高い別の注射経路を試験した。したがって、 $10\mu\text{g}$ のCy a A - E7_{Δ30~42}を、TC - 1移植の10日後から始めて7日間間隔で2回皮内注射した。興味深いことに、全ての非処置およびニセ処置動物が腫瘍を発達させたが、本発明者らは、Cy a A - E7_{Δ30~42}で処置した動物の全ての動物において腫瘍減退を観察した(図4B、a、b)。この治療的免疫化により、90日目においてCy a A - E7_{Δ30~42}処置マウスの100%の生存率が得られ、一方、非処置およびニセ処置動物の生存率の中間値は、それぞれ30日および32日であった(図4、c)。

10

【0135】

Cy a A免疫化により誘導されるHPV16 - E7_{49~57}特異的CD8⁺T細胞の長期持続性

HPV16 - E7組換えCy a Aにより誘導される免疫応答の持続性を評価するために、3ヵ月後も治療実験にも関わらず生存しているマウスを屠殺し、その脾臓細胞を、インビトロで、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のE7_{43~77}ペプチドで5日間かけて刺激した。その後、TC - 1細胞を溶解する能力を、⁵¹Cr放出アッセイにより決定した。図7に示されているように、HPV16 - E7_{43~77}ペプチドに対する特異的CTL応答が、依然として、3ヵ月前に免疫化した動物の脾臓細胞から実証された。30:1のエフェクター:標的の比での特異的溶解の最大パーセンテージに基づいて、免疫応答は、Cy a A - E7_{Δ30~42}で処置した動物においてより強力であるようであるが、これらのデータから統計学的有意性は実証できなかった。このような長く続く免疫原性の生理的関連性を評価するために、残りの動物に、100日目に 5×10^4 個のTC - 1細胞を用いて皮下に再攻撃した。このような条件下で、全ての未処置の年齢一致対照動物が腫瘍を発達させ、37.5日間という生存時間の中間値を示した(図8)。これに対し、HPV16 - E7組換えCy a Aで3ヶ月前に免疫化したマウスは、腫瘍発達から非常に有意に防御された。先に観察されているように、Cy a A E - HPV16 - E7_{Δ30~42}でワクチン接種した動物が、高いレベルの防御を示した。しかし、今回、最初のセットの治療実験で得られた結果の変動では、Cy a A - E7_{49~57}で処置した動物と、Cy a A - E7_{FU1}で処置した動物の間には顕著な防御の差異があり、後者の方が好ましいが、試料のサイズが小さいので、統計的有意性を明確に実証することはできなかった。これらの観察により、このモデルでは、完全なHPV16 - E7タンパク質を有するCy a Aにより提供されるT細胞の支持は、TC - 1細胞に対する効果的で長期に持続する応答には重要であることが示唆された。

20

30

【0136】

合わせて考えると、本発明者らの結果により、HPV16 - E7タンパク質のヘルパーエピトープ(DRAHYNI VTF)を有する $50\mu\text{g}$ の組換えCy a Aの1回の静注は、少なくとも6ヶ月の期間におよび、2回のTC - 1腫瘍細胞攻撃に対する防御を付与できる、長期に持続するE7_{49~57}特異的CD8⁺T細胞を誘導するのに十分であった。

40

【0137】

Cy a A - E7_{Δ30~42}の治療効力は、CpG - ODN1826と共に投与されたペプチドの治療効力に匹敵した。

抗原送達システムとしてのCy a Aの効力をより良く評価するために、本発明者らは、Cy a A - E7_{Δ30~42}の治療効力を、CpG - ODN1826を補充したHPV16 - E7_{43~77}ペプチドの治療効力と比較した(37)。それ故、マウスに、 5×10^4 個のTC - 1細胞を皮下注射し、10および17日後、皮内経路により、 $10\mu\text{g}$ のCy a A - E7_{Δ30~42}で、または、 $1\mu\text{g}$ のCpG - ODN1826と共に投与される $10\mu\text{g}$ のHPV16 - E7_{43~77}ペプチドで、治療処置した。生存率は、これらの2つの群において類似していたが(図9)、Cy a A - E7_{Δ30~42}で得られた

50

結果は、C p G - O D N 1 8 2 6 と混合された H P V 1 6 - E 7₄₃₋₇₇ ペプチドで得られた結果よりも僅かに良好であったが、統計学的に差異はなかった。特に、この結果は、モル基準で、C y a A - E 7_{Δ30-42} に比べて 5 0 倍多い H P V 1 6 - E 7₄₃₋₇₇ ペプチドを使用して得られた。単独で使用した場合、ペプチド H P V 1 6 - E 7₄₃₋₇₇ は、T C - 1 腫瘍増殖に対して全く効果がなかった。

【 0 1 3 8 】

C y a A ベクターに対する事前免疫は、C y a A - E 7_{Δ30-42} の治療効力に僅かにしか影響を及ぼさなかった。

臨床の場面では、効果的な細胞性免疫応答を得るために、病変を有する患者に、複数回のブースター投与をおそらく行なわなければならない。それ故、C y a A ベクターに対する予備免疫が、腫瘍拒絶を引き起こす能力を損なわないことを実証することが不可欠であった。そうするためには、本発明者らは、 5×10^4 個の T C - 1 細胞を皮下注射する 9 0 または 3 0 日前に、7 日間間隔で 2 回 $10 \mu\text{g}$ の空ベクター C y a A E 5 でマウスを皮内免疫化した。7 日間間隔の 2 回の $10 \mu\text{g}$ の C y a A - E 7_{Δ30-42} の注射による治療処置を 1 0 日目に設定した。抗体応答の解析により、空ベクターで免疫化されたマウスは、T C - 1 注射時に C y a A に対して免疫があることが示された (図 1 0 A)。その後、本発明者らは、年齢の一致した未処置動物および C y a A 免疫動物において腫瘍拒絶を誘導する、C y a A - E 7_{Δ30-42} 処置の能力を比較した。C y a A に対するその免疫状態はどうであれ、C y a A - E 7_{Δ30-42} で処置したマウスの大半が、実験を通じて腫瘍がないままであった (図 1 0 B)。3 0 日目の免疫マウス群の中で 1 匹のみ、9 0 日目の免疫マウス群において 2 匹のみが、腫瘍を発達させた (図 1 0 B b、d、f)。これに対し、ニセ感染動物の 1 0 0 % が腫瘍を発達させ、屠殺された (図 1 0 B、a、c、e)。本発明者らは、抗 C y a A 抗体力価レベルと、T C - 1 腫瘍の発達の間の相関は全く観察しなかった (データは示さず)。さらに、C y a A - E 8_{Δ30-42} 処置マウスの生存曲線 (図 1 0 B、b、d、f) は、統計学的に差異はなかった ($p = 0.324$)。

【 0 1 3 9 】

それ故、これらのデータにより、C y a A に対する既存免疫は、このベクターがその後外来の所与の抗原に対する効果的な応答を誘導する能力に対して、殆ど作用を及ぼさないことが示された。

【 0 1 4 0 】

考察

以前の研究により、Bordetella pertussis のアデニル酸シクラーゼは、インビボにおいて、C D 4⁺ および C D 8⁺ T 細胞エピトープを、樹状細胞の M H C - クラス I I および I 提示経路に送達するための強力なツールであることが実証された。実験ネズミモデルにおいて、このシステムは、抗ウイルスおよび抗腫瘍防御をもたらす効果的な T h 1 および C T L 応答を引き起こすために使用されている (3 6)。H P V 1 6 関連の子宮頸部悪性疾患の処置のためのヒトにおける C y a A の可能性ある適用の評価として、本発明者らは、このベクターが、インビボにおいて、H P V 1 6 の E 7 タンパク質のエピトープを効果的に送達することを実証し続けた。

【 0 1 4 1 】

本発明者らは、H P V 1 6 の完全な E 7 タンパク質またはこのポリペプチドの垂断片 (特に、残基 4 9 ~ 5 7 に対応する H - 2 D^b 拘束性最小 C T L エピトープを含む) を含む様々な H P V 1 6 組換え C y a A を作成した。本発明者らは、これらの異なる組換えタンパク質が、C 5 7 B L / 6 マウスに注射された時に、特異的かつ強力な C T L 応答を抗原刺激できることを示した。本発明者らのデータにより、本発明者らは T A P 1^{-/-} マウスにおいて C y a A - E 7_{Δ30-42} の注射により C T L を刺激することができなかつたので、C y a A による C T L エピトープの送達には、完全に機能的なクラス I 提示経路が必要であることが確認された (1 5)。C y a A により媒介される C T L 刺激は、以前の結果と一致して、M H C クラス I I^{-/-} マウスで得られた効果的な C T L 応答により

10

20

30

40

50

示されるように、CD4⁺T細胞の存在とは独立していた(15)。ワクチンベクターとしてのこのCyAの特徴は、CD4⁺T細胞数の変化を提示する免疫抑制患者または免疫欠陥患者のワクチン接種を考慮した場合に非常に重要である。しかし、CD40^{-/-}マウスではCTL応答は低く、このことは、CTL刺激が、一部、CD40シグナル伝達に依存していることを示す。これらの観察により、HPV16-E7組換えCyAは、プロフェッショナルAPCの直接刺激により、MHCクラスI拘束性CTLを直接的に誘起することが示唆された。それにも関わらず、CTL応答の最適な刺激を得るためには、CD40-CD40L相互作用が必要とされる。

【0142】

本発明者らは、HPV16-E7の最小H-2D^b拘束性CTLEピトープの免疫原性を、おそらくとりわけ記載されたヘルパーエピトープDRAHYNI VTFを含む、完全もしくはΔ30~42E7タンパク質の免疫原性と比較した。CTL刺激並びにCyA-E7_{FU11}およびCyAE-E7_{Δ30~42}により誘導されるHPV16-E7特異的脾臓細胞の発生頻度は、CTLEピトープE_{49~57}のみを有するCyA-E7_{49~57}により誘導されるものよりも優れていた。これらの観察により、CyAによりCTLおよびThエピトープを同時に送達することにより、より強力なCTL応答がもたらされることが示された。これは、他のモデルにおいて、前臨床(37)および臨床レベル(38)で以前に公表されたデータと一致した。組換えCyAによるHPV16-E7Thエピトープの送達は、さらに、インビトロで組換えHisTag-HPV16-E7タンパク質またはE7_{43~77}ペプチドで再刺激したHPV16-E7特異的脾臓細胞により産生されるサイトカインの解析により証明された。実際に、本発明者らは、Thエピトープを含む組換えHPV16-E7CyAでワクチン接種したマウスのみにて、IFN-γの特異的合成を観察した。本発明者らが、CyA-E7_{FU11}およびCyA-E7_{Δ30~42}の1回静注により免疫化した後に観察した、IFN-γレベルが高いことおよびIL-5が全く分泌されないことにより特徴づけられる典型的なTh1プロファイルは、腫瘍免疫療法におけるこのベクターの関心の高さを強調する。

【0143】

これは、皮下で確立された腫瘍原性TC-1細胞に基づいた腫瘍拒絶モデルで試験した(21)。HPV16-E7組換えCyAの免疫原性を実証する本発明者らのデータによれば、本発明者らは、これらの組換えタンパク質が、確立されたTC-1腫瘍の減退を誘導できることを観察した。CyA-E7_{Δ30~42}は、90日間の期間におよび、生存の点で、CyA-E7_{49~57}およびCyAE5-HPV16-E7_{FU11}よりも優れていた。完全およびΔ30~42E7タンパク質を有するCyAは、CTL刺激能力、HPV16-E7_{49~57}特異的脾臓細胞の発生頻度、およびIFNγ産生の点で、匹敵する結果を与えたので、本発明者らは、生存の点で、CyA-E7_{FU11}は、CyA-E7_{49~57}よりも優れていると期待した。より多くの数の試験動物が、この一見した矛盾を除外してくれるのに役立つ可能性が高い。しかし、CyAの生化学に関する2つの側面をここで考察すべきである。第一に、CyAの224~235の領域の負に荷電したアミノ酸の存在は、真核細胞のサイトゾルへのCyAの触媒ドメインの転位を阻害することが示された(39)。これに関して、酸性E7タンパク質(pK_i=4.17)が、DCのサイトゾルへのCyAのN末端ドメインの効率的な転位を妨害する可能性があった。CyA-E7_{Δ30~42}は、DCへの送達に好ましいように、30~42残基に位置する負に荷電したアミノ酸のストレッチ(DSSEEDIEDGPA)を除去するように特別に設計され、さらに、2個の正に荷電したアミノ酸(KR)を、HPV16-E7の挿入されたN末端ドメインの各側に導入した。第二に、Gmiraら(25)は、CyA内に挿入された異種タンパク質の折りたたみ解除は、組換えタンパク質が標的細胞へと内部移行するために必須であることを実証した。E7ポリペプチドの2個の異なる断片を、CyA-E7_{Δ30~42}の2個の異なる許容部位へ挿入することにより、E7の再折りたたみが防がれ、したがって、標的細胞へのその転位は促進されるはずである。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 4 】

腫瘍拒絶実験の時間経過中に、何匹かのマウスは、確立された T C - 1 腫瘍を以前に拒絶した後、より後になって H P V 1 6 陽性腫瘍を増殖させ始めた。F A C S (登録商標) 解析により、これらの腫瘍の細胞は、H - 2 D^b 分子を発現していなかったことが判明した。この観察により、より著しく腫瘍細胞を根絶し、エスケープ機序による腫瘍の再発を防ぐために、組換え C y a A ワクチン接種の同様なブースター投与の可能性が考えられた。当該技術分野における他のチームのデータを心に置くと (3 7、4 0、4 1)、それは、注射された組換え H P V 1 6 - E 7 C y a A の全量を 1 0 0 μ g、すなわち 0 . 5 6 n m o l に上げた、マウスにおける C y a A ワクチン接種のブースター投与に関連していた。この後者の観察を試験するための実験、並びに、C y a A の様々な投与法を試験するための実験を実施した。

10

【 0 1 4 5 】

T C - 1 細胞で再攻撃した時、H P V 1 6 - E 7 組換え C y a A で免疫化した生存マウスは、選択的に防御された。これは、これらの動物の脾臓細胞中の H P V 1 6 - E 7₄₉ ~₅₇ C D 8⁺ T 細胞の存在に関連していた。この観察は、図 4 で観察される遅い再発は、腫瘍エスケープ機序に起因し、E 7 タンパク質に対する免疫が徐々に衰えていくことに起因するものではないということが強まった。T h エピトープを含む組換え C y a A で免疫化したマウスのより良好な生存率により、同じ抗原に対する T 細胞の支持が得られることにより、H P V 1 6 - E 7₄₉ ~₅₇ C D 8⁺ T 細胞が効果的に想起されることが示された。これに関して、C D 4⁺ T 細胞は、C D 4 0 L を通じて、エフェクター C D 8⁺ T 細胞に独特な分子的サインを刷り込む可能性があり、より向上した細胞機能を行なうための能力を付与する可能性があることが提唱された (4 2)。

20

【 0 1 4 6 】

H P V 関連新生物形成の処置のための新規免疫療法の試験のための確証されたモデルにおいて (2 1)、本発明者らは、C y a A が、確立腫瘍の減退を誘導し、並びに、長い期間におよぶ腫瘍原性攻撃に対する防御を与えるための、効率的なベクターであることを実証した。現在開発されている他のアプローチとは異なり (1 1)、C y a A を基礎とした免疫療法は、完全なタンパク質を挿入できるので、H L A 拘束性エピトープを選択する必要がなく、ウイルスベクターおよび / または発癌の可能性のある H P V D N A 配列の使用が回避された。さらに、本発明者らは、C y a A の 2 個の異なる許容部位に挿入された H P V - E 7 の 2 個の垂断片を含む C y a A を用いて最善の結果を得た。

30

【 0 1 4 7 】

この後者の構造物が、文献に記載の全ての H P V 1 6 - E 7 H L A クラス I およびクラス I I エピトープを含むという事実により (8、4 6)、ワクチン適用に C y a A - E 7_{Δ30-42} が選択されることが強まった。

【 0 1 4 8 】

ここに提示したデータに基づいて、本発明者らは、H P V 感染に関連した子宮頸部および肛門の異常形成を標的化した臨床試験において、H P V 1 6 - E 7 を含む C y a A の効力を試験する計画を立てた。

40

【 0 1 4 9 】

実施例 2

目的は、ヒトにおける H P V 1 6 および H P V 1 8 関連の悪性疾患を処置するための、H P V 1 6 および H P V 1 8 E 7 タンパク質の両方に標的化した二価治療ワクチンを製造することであった。それ故、C y a A E 5 - H P V 1 6 E 7_{Δ30-42} および C y a A E 5 - H P V 1 8 E 7_{Δ32-42} と呼ばれるワクチン候補を、設計し、作成し、産生し、精製した。H H D マウスは、H - 2 D^b の α 3 膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン (D) に連結した H L A * 0 2 0 1 の α 1 (H) および α 2 (H) ドメインを含む H H D 導入遺伝子を発現している H - 2 D^b / β 2 m^b / ダブルノックアウトマウスであった (α 1 ドメインは、ヒト β 2 - ミクログロブリンに連結している)。したがって、H H D マウスにより発現される M H C クラス I 分子のみが、改変された H L A * 0 2 0 1 分子

50

であった (Pascolo et Lemonnier)。

【 0 1 5 0 】

この実験の目標は、

1 組換え C y a A が、H P V 1 6 および H P V 1 8 E 7 タンパク質の H L A - A 2 拘束性エピトープを送達できること、

2 1 個の H P V 組換え c y a A が他を上回る免疫優性の現象はないことを実証することであった。

【 0 1 5 1 】

そうするために、H H D マウスに、5 0 μ g の C y a A E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ_{30-42} (3 匹のマウス)、C y a A E 5 - H P V 1 8 E 7 Δ_{32-42} (3 匹のマウス)、または C y a A E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ_{30-42} + C y a A E 5 - H P V 1 8 E 7 Δ_{32-42} (5 匹のマウス) を同じ (眼窩後の) 注射 (2 0 0 μ l 中 5 0 μ g) で静脈内にワクチン接種した。7 日後、プールした脾臓細胞を、インビトロで、文献に記載または S Y F P E I T H I ソフトウェアから推定される、H P V 1 6 E 7 または H P V 1 8 E 7 の H L A - A 2 ペプチドで再刺激した。

10

【 0 1 5 2 】

C T L 活性は、 ^{51}Cr 放出を使用して 5 日後にアッセイした。標的細胞は、異なる関連ペプチドをのせたまたはのせていない、H H D - E L 4 細胞であった。

【 0 1 5 3 】

結果により、C y a A E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ_{30-42} または C y a A E 5 - H P V 1 8 E 7 Δ_{32-42} でのワクチン接種は、インビトロでの自己ペプチドによる再刺激後に、H P V 1 6 E 7 または H P V 1 8 E 7 ペプチドをのせた E L 4 - H H D 細胞の特異的溶解を誘導したことが示された。

20

【 0 1 5 4 】

この結果によりまた、C y a A E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ_{30-42} を C y a A E 5 - H P V 1 8 E 7 Δ_{32-42} と共に注射することにより、関連ペプチドに対する類似の応答が観察されたので、いずれの H P V 組換え C y a A の免疫原性も損なわなかった。

【 0 1 5 5 】

この結果により、C y a A E 5 - H P V 1 6 E 7 Δ_{30-42} および C y a A E 5 - H P V 1 8 E 7 Δ_{32-42} は、インビボにおいて、それぞれの E 7 タンパク質のヒト H L A - A 2 拘束性エピトープに対する細胞毒性応答を誘導できることが実証された。

30

【 0 1 5 6 】

マウス

特定の病原体を含まない H H D マウスを、パスツール研究所で育成した。1 1 匹の 6 ~ 1 0 週令の雄を、この実験に使用した。

【 0 1 5 7 】

試薬および生物学的材料

試薬および緩衝液

R P M I 1 6 4 0 培地 - グルタマックス (インビトロジェン・ギブコ、参照番号 : 6 1 8 7 0 1 0)

40

エタノール 7 0 ° (Prolabo、参照番号 : M C 3 1 1 6 3 1)

ペニシリン - ストレプトマイシン (インビトロジェン・ギブコ、参照番号 : 1 5 1 4 0 1 2 2)

ウシ血清アルブミン (F B S) (PERBIO、参照番号 : C H 3 0 1 6 0 . 0 3)

βメルカプトエタノール (バイオラッド、参照番号 : 1 6 1 - 0 7 1 0)

熱分解水

ブルートリパン (シグマ、T - 8 1 5 4)

^{51}Cr

Trilux シンチラント (Wallac)

【 0 1 5 8 】

50

ペプチド

5 個の合成ペプチド (Neosystem、ストラスブール、フランス) を、 ^{51}Cr 放出アッセイの前の脾臓細胞のインビトロでの刺激に使用した:

HPV 16 - E7 HLA - A2 拘束性エピトープ (1) に対応する、E7₁₁₋₂₀ (YMLDLQPETT、一文字でアミノ酸をコード、#253)、

HPV 16 - E7 HLA - A2 拘束性エピトープ (1) に対応する、E7₈₂₋₉₀ (LLMGTLGIV、#258)、

HPV 16 - E7 HLA - A2 拘束性エピトープ (1) に対応する、E7₈₆₋₉₃ (TLGIVCPI、#255)

SYFPEITHI ソフトウェアにより予測される HPV 18 - E7 HLA - A2 拘束性エピトープに対応する、E7₇₋₁₅ (TLQDIVLHL、#251)、

HPV 18 - E7 HLA - A2 拘束性エピトープ (2) に対応する、E7₈₆₋₉₄ (FQQFLFLNTL、#257)。

【0159】

ペプチドは、無菌で無発熱原性の水 (#253、#255、#251) または無発熱原性の水、0.1 M NaHCO_3 ; アセトニトリル (50/50) (#257 および #258) で 1 mg/ml に希釈した。

【0160】

組換えアデニル酸シクラーゼ (Cy a A)

2 個の Cy a A をこの実験において試験した:

Cy a A - HPV 16 E7_{Δ30-42}

Cy a A - HPV 18 E7_{Δ32-42}。

【0161】

これらの Cy a A は、E. coli 株 BLR において、酵素的に不活性な Cy a A (Cy a AE5) をコードするプラスミド pTRACE5 の誘導体を使用することにより発現させた。プラスミドの作成、全ての組換えタンパク質の産生および精製は、HPV 16 - E7 エピトープを有する組換え B. pertussis アデニル酸シクラーゼの作成および精製に関する実施例 1 において先に記載したように製造したが、エピトープは、本実験で使用したものであった。

【0162】

8 M 尿素中にそれぞれ 1.22 mg/ml および 1.33 mg/ml の Cy a A を含むストック溶液 (-20 °C で保存) を解凍し、マウスに静注内投与する前に、PBS (ギブコ BRL) で 250 μg/ml に希釈した。したがって、尿素の最終濃度は、それぞれ、1.6 M から 1.5 M の間であった。

【0163】

細胞系

EL4 - HHD 細胞を、 ^{51}Cr CTL アッセイにおいて標的として使用した。これらの細胞を、完全培地中に維持した: 10% 熱不活性化 FCS、100 U/ml のペニシリン、100 μg/ml のストレプトマイシン、および 5×10^{-5} M の β2 -メルカプトエタノール (ギブコ BRL、Cergy-Pontoise、フランス) を補充したグルタマックスを含む RPMI 1640。

【0164】

方法

マウス免疫化

覚醒動物に、0.3 ml のインスリンシリンジ (テルモ) を用いて、(200 μl 中 50 μg の) Cy a AE5 - HPV 16 E7_{Δ30-42} および / または Cy a AE5 - HPV 18 E7_{Δ32-42} の 1 回の静脈内 (眼窩後の) 注射により免疫化した。

【0165】

実験計画

表 1 は、各群のマウスに投与するワクチン候補および処置を記載した。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 6 】

【 表 8 】

表1 実験群の定義：CTL誘導

CTL誘導（CTLアッセイ）		
マウスの数	CyaAE5	免疫化用量／容量／尿素濃度
3	CyaA-HPV16E7 _{Δ30-42}	50 μg / 200 μl / 1.6 M
3	CyaA-HPV18E7 _{Δ32-42}	50 μg / 200 μl / 1.5 M
5	CyaA-HPV16E7 _{Δ30-42} および CyaA-HPV18E7 _{Δ32-42}	200 μl / 3.1 M 各々 50 μg

10

【 0 1 6 7 】

CTLアッセイ

免疫化により誘導される細胞性免疫応答をインビトロで評価するために、麻酔した動物（C O₂）を、免疫化の7日後に脾摘除した。CTLアッセイの前に、各群の脾臓細胞をプールした。

20

【 0 1 6 8 】

- CTLの刺激（1個の脾臓あたり2個のフラスコT25を準備）
- 脾臓をサンプリングし、RPMI 1640 - グルタマックス1% Ab中でそれらを破粉した。
- デカント。
- 1200 rpmで10分間遠心分離。
- 細胞を、2 mlのRPMI 1640 - グルタマックス1% Ab - 10% FCS - 5 . 10 - 5 M β - メルカプトエタノール（完全培地：CM）に再懸濁。
- 各々のT25フラスコに、10 mlのCM
- 5 × 10⁷ 個のエフェクター細胞
- 10 μg / mlの最終濃度の関連ペプチド
- を入れた。
- フラスコを動かすことなく5日間インキュベート。

30

【 0 1 6 9 】

- 細胞毒性アッセイ
- 1) 標的細胞：
 - 前日、標的細胞を3分の1または2分の1に希釈して、指数関数的な増殖期のそれらを収集。
 - 15 mlのチューブに移す。
 - 1200 rpmで10分間遠心分離。
 - 1 mlのRPMI 1640 - 1% Ab中に再懸濁。
 - 数を数えた。
 - 2個のチューブを準備：1個はペプチドを含み、1個はペプチドを含まない。
 - 150 μl中に以下を再懸濁：
 - 2個の中の1個のチューブにペプチド（50 μmol）
 - 3 × 10⁶ 個の細胞につき100 μCiの⁵¹Cr（50 μl）。
 - 150 μlとするための培地。
 - 37 °Cの水浴中で1時間インキュベートし、15分毎に穏やかに振とう。

40

【 0 1 7 0 】

50

2) エフェクター細胞

- 約 5 ml の上清をパスツールピペットを用いて廃棄。
- ピペッティングにより細胞を完全に再懸濁。
- 1200 rpm で 10 分間遠心分離。
- 1 ml の CM に再懸濁。数を数えた。
- 10^7 個の細胞 / ml に調整。
- 次のエフェクター / 標的比：200 / 1、100 / 1、50 / 1、25 / 1、12 / 1、6 / 1 が得られるように希釈。
- 100 μ l / U 底マイクロタイタープレートのウェルで分配。
- 標的細胞の調製を完成する間、37 で 7.5% CO₂ 中でインキュベート。

10

【0171】

3) アッセイ：

- 標的細胞を、10 ml の RPMI 1640 - 1% Ab で洗浄。
- 再度 10 ml の CM で洗浄。
- 2 ml の CM に再懸濁。
- 数を数えた。
- 10^5 個の細胞 / ml に調整。
- 100 μ l / ウェルで分配。
- 自発的放出のための 6 個のウェルを準備 (CM 中 100 μ l に調整)。
- 最大放出のための 6 個のウェルを準備 (100 μ l の 20% トリトン X - 405 を添加)
- 37 で 7.5% CO₂ 中で 4 ~ 5 時間インキュベート。

20

【0172】

4) 計測：

- 2000 rpm で 5 ~ 10 分間遠心分離。
- 100 μ l の Trilux シンチラントを、フロッピー P96 マイクロタイタープレートに入れた。
- 50 μ l の上清をサンプリングし、それをフロッピープレートに移した。
- プレートを、プラスチックフィルムテープで封をした。
- wallac カウンターで次の日に計測した。

30

【0173】

HPV16E7CTL 特異的応答

Cy a A - HPV16E7 Δ_{30-42} により誘導される CTL 応答を図 11 に示した。

【0174】

HPV18E7CTL 特異的応答

Cy a A - HPV18E7 Δ_{32-42} により誘導される CTL 応答を図 12 に示した。

【0175】

結論

40

Cy a A - HPV16E7 Δ_{30-42} および Cy a A - HPV18E7 Δ_{32-42} の両方が、このキメラ HHD モデルにおいて、それぞれの HLA - A2 拘束性ペプチドに対して特異的な CTL を誘導できた。

【0176】

Cy a A - HPV16E7 Δ_{30-42} および Cy a A - HPV18E7 Δ_{32-42} の同時注射により、各々の個々の Cy a A がそれぞれの特異的 HLA - A2 拘束性ペプチドに対する CTL を誘導する能力は妨害されなかった。これにより、1つの構造物が他の構造物よりも上回る免疫優性を示す現象はなかったことが示された。これには、二価ワクチンの製造戦略に関する、重要な観察が含まれていた。

【0177】

50

実施例 3

HPV 18 の E7 タンパク質並びに HPV 16 および HPV 18 の E7 タンパク質を含む組換えアデニル酸シクラーゼの作成および免疫学的評価

肛門生殖管の癌は、女性における全ての癌の 12% 近くを占め、子宮頸部癌 (C x C a) は世界中で二番目に最も頻繁に起こる婦人科の癌となっている。ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が C x C a の原因である可能性があるという重要な観察は、その後、疫学的な研究により確認された。C x C a に関連する最も広まっている HPV のタイプは、HPV 16 および HPV 18 である (それぞれ 55% および 12% の罹患率) (Clifford、2003)。より多くの人口を網羅するために、HPV 16 および HPV 18 の E7 を有する二価治療ワクチンを作成することが決定された。2つの可能性ある戦略が試験された：(i) 第一の戦略は、一方は HPV 16 の E7 を有する他方は HPV 18 の E7 を有する、等モル量の 2 個の組換え Cy a A を混合する；(ii) 第二の戦略は、HPV 16 および HPV 18 の両方の E7 タンパク質を有する組換え Cy a A を作成する。本リポートは、HPV 18 の E7 または両方のウイルスの E7 を有する組換え Cy a A の作成を記載した。構造物の免疫原性は、CTL アッセイにおいて試験した。

10

20

30

40

50

【0178】

エピトープ同定

HPV 18 E7 のアミノ酸配列を、H-2^b エピトープの探索中に、SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) にかけた。このソフトウェアは、アルゴリズムを使用して、画定された MHC 分子に結合する可能性があるエピトープを予測する。ソフトウェアは、25 のスコアで、H-2D^b 分子により拘束される推定エピトープを選出した。通常、本発明者らは、そのスコアが 22 を超えた場合にエピトープであると判断した。それ故、推定ペプチドの IDGVNHQHL が、Neosystem により合成された。

【0179】

組換え Cy a A の作成

Cy a A - HPV 18 E7、Cy a A - HPV 18 E7_{Δ32-42}、Cy a A - HPV 16 + 18 E7、Cy a A - HPV 16 + 18 ΔE7 を産生するためにプラスミドの作成に使用された戦略を示したスキームを、図 13 および 14 に示した。

【0180】

CTL アッセイ

この実験の目標は、インビボにおいて、完全な HPV 18 E7 タンパク質またはその断片並びに HPV 16 および HPV 18 E7 タンパク質の両方を有する、組換え Cy a A による CTL の誘導を実証することであった。標的化された H-2D^b エピトープは、コンピューター予測ソフトウェアから得られた HPV 18 E7₄₁₋₄₉ (IDGVNHQHL) および HPV 16 E7₄₉₋₅₇ であった。C57BL/6 マウスに、50 μg の Cy a A - Cy s OVA、Cy a A - HPV 18 E7、Cy a A - HPV 18 E7_{Δ32-42}、Cy a A - HPV 16 + 18 E7、または Cy a A - HPV 16 + 18 ΔE7 (各群において 2 匹) を静注によりワクチン接種した。7 日後、ブールした脾臓細胞を、インビトロで、ペプチド HPV 18 E7₄₁₋₄₉ (10 μg/ml)、OVA₂₅₇₋₂₆₄ (1 μg/ml) または HPV 16 E7₄₃₋₇₇ (1 μg/ml) で再刺激した。CTL 活性は、⁵¹Cr 放出を使用して 5 日後にアッセイした。標的細胞は、HPV 18 E7₄₁₋₄₉ ペプチド (8 nmol) をのせたまたはのせていない EL4 細胞、あるいは、TC-1 細胞であった。図中の説明文は：ワクチン接種/再刺激を示す。例：OVA/OVA は、Cy a A E5 - Cy s OVA でワクチン接種し、OVA ペプチドで再刺激したマウスを意味する。

【0181】

これらの結果 (図 16) により、Cy a A - HPV 18 E7_{Fu11} とは対照的に、Cy a A - HPV 18 E7_{Δ32-42} は、インビボにおいて、処理および MHC クラス I 経路に提示するために、コンピューターで予測した HPV 18 - E7 タンパク質の CD8⁺ H-2D^b 拘束性 T 細胞エピトープを、免疫担当細胞のサイトゾルへと送達でき、これ

により、強力なCTL応答を誘起できることが示された。Cy a A - HPV 18 E 7 $\Delta_{32 \sim 42}$ が、HPV 18 E 7 $_{41 \sim 49}$ に対するCTL応答を刺激できることは奇妙である。なぜなら、この組換えCy a Aは、ペプチドHPV 18 E 7 $_{41 \sim 49}$ の最初の2個のアミノ酸を欠失しているからである。しかし、HPV 18 E 7 断片 $_{43 \sim 105}$ の挿入部位においては、1個のアラニンおよび1個のセリンがあり、これにより、推定ペプチドは、ここで、IDGVNHQH Lではなく、ASGVNHQH Lであった。syfpeithiにかけると、このペプチドは、29のスコアで出て来た(天然のものは25)。それ故、本発明者らのクローニングにより、このペプチドの最初のアミノ酸を置換することにより、本発明者らは、潜在性から免疫原性へとすることができるようであった。これは、HPV 18 E 7 タンパク質のエピトープが、H - 2 D^b の関連で記載された初めてのケースであった。

10

【0182】

非特異的バックグラウンドレベルが高いにも関わらず、これらの結果によりまた、Cy a A - HPV 16 + 18 E 7_{F u l l} およびCy a A - HPV 16 + 18 E 7 Δ は、インビボにおいて、処理およびMHCクラスI経路に提示するために、HPV 16 - E 7 タンパク質のH - 2 D^b 拘束性T細胞エピトープを、免疫担当細胞のサイトゾルへと送達でき、これにより、強力なCTL応答を誘起できることが示された。Cy a A - HPV 16 + 18 E 7 Δ は、Cy a A - HPV 16 + 18 E 7_{F u l l} と比べて高いその能力を示した。これらのデータによりまた、初めて、大きなポリペプチド断片(203までのアミノ酸)を有するCy a Aは依然として免疫原性であることが示された。

20

【0183】

さらなる実験を実施し、図16に記載のことを確認した。各群の残りの2匹のマウスを、最初のものとは別々に処置した。実験設定は類似していた。結論は、CTLによるCy a A E 5 - HPV 18 E 7 $\Delta_{32 \sim 42}$ ワクチン接種マウスのEL4細胞の高い非特異的溶解レベルは、過剰のHPV 18 E 7 $_{41 \sim 49}$ ペプチドがフラスコに残っていることに起因することを除いて、図16のものと同じであった。

【0184】

またCy a A - HPV 16 + 18 Δ E 7 でワクチン接種したマウスの脾臓細胞ではTC - 1細胞の溶解は認められたが、今回Cy a A - HPV 16 + 18 E 7 でワクチン接種したマウスには認められなかった。この実験において、非特異的バックグラウンドは40%でピークに達した。それにも関わらず、図17から導き出せる結論は、図16から導いた結論を確認した、すなわち：

30

- Cy a A - HPV 18 E 7 $\Delta_{32 \sim 42}$ は、インビボにおいて、処理およびMHCクラスI経路への提示のために、コンピューターで予測したHPV 18 - E 7 タンパク質のCD8⁺ H - 2 D^b 拘束性T細胞エピトープを、免疫担当細胞のサイトゾルへと送達でき、これにより強力なCTL応答を誘起できる。これは、HPV 18 E 7 タンパク質のエピトープが、H - 2 D^b の関連で記載された最初のケースであった。

- 大きなポリペプチド断片(203までのアミノ酸)を有する組換えCy a Aは、依然として免疫原性であった。

【0185】

40

結論

HPV 16 および HPV 18 の E 7 を有する二価治療ワクチンを作成することが決定された。2つの可能性ある戦略が考えられた：(i) 第一の戦略は、一方はHPV 16 の E 7 を有する他方はHPV 18 の E 7 を有する、等モル量の2個の組換えCy a Aを混合する；(ii) 第二の戦略は、HPV 16 および HPV 18 の両方の E 7 タンパク質を有する組換えCy a Aを作成する。本結果は、HPV 18 の E 7 または両方のウイルスの E 7 を有する組換えCy a Aの作成を記載した。構造物の免疫原性は、CTLアッセイにおいて試験した。

【0186】

本研究の主な結論は、考えられている両方の戦略が、実現可能であることである。なぜ

50

なら、HPV 18 E7 の配列内に潜在性 H - 2 D^b 拘束性エピトープが初めて判明したため、HPV 18 E7 亜断片を有する組換え Cy a A が機能的であるからである。さらに、HPV 16 および 18 ウイルスの両方の E7 タンパク質（または亜断片）を有する組換え Cy a A は、TC - 1 細胞により天然に提示される H - 2 D^b 拘束性 HPV 16 E7 エピトープに対する CTL 応答を刺激できるので、依然として最も興味深いことに免疫原性であった。

【 0 1 8 7 】

【表 9】

参考文献

1. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2: 342-350, 2002.
2. Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N., and Franceschi, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 88: 63-73, 2003.
3. Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*, 4: 46-55, 2004.
4. de Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Walboomers, J. M., Stukart, M. J., Doekhie, F. S., Remmink, A. J., Helmerhorst, T. J., Verheijen, R. H., Duggan-Keen, M. F., Stern, P. L., Meijer, C. J., and Scheper, R. J. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res*, 58: 1700-1706, 1998.
5. Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S., and Borysiewicz, L. K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*, 57: 2943-2950, 1997.
6. Nimako, M., Fiander, A. N., Wilkinson, G. W., Borysiewicz, L. K., and Man, S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res*, 57: 4855-4861, 1997.
7. Rensing, M. E., van Driel, W. J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M. P., Hartman, M., Anholts, J. D., Schreuder, G. M., ter Harnsel, W. B., Fleuren, G. J., Trimbo, B. J., Kast, W. M., and Melief, C. J. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res*, 56: 582-588, 1996.

10

20

30

40

50

8. van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., and Offringa, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer*, 91: 612-618, 2001. 10
9. Schreurs, M. W., Scholten, K. B., Kueter, E. W., Ruizendaal, J. J., Meijer, C. J., and Hooijberg, E. In vitro generation and life span extension of human papillomavirus type 16-specific, healthy donor-derived CTL clones. *J Immunol*, 171: 2912-2921, 2003.
10. Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res*, 63: 636-641, 2003. 20
11. Roden, R. and Wu, T. C. Preventative and therapeutic vaccines for cervical cancer. *Expert Rev Vaccines*, 2: 495-516, 2003.
12. Ladant, D. and Ullmann, A. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol*, 7: 172-176, 1999. 30
13. Morón, G., Dadaglio, G., and Leclerc, C. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends in Immunology*, 25: 92-97, 2004.
14. Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., and Leclerc, C. The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 193: 1035-1044, 2001.
15. Guermonprez, P., Fayolle, C., Rojas, M. J., Rescigno, M., Ladant, D., and Leclerc, C. In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant 40

- invasive bacterial toxoid to CD11c + CD8 alpha -CD11bhigh dendritic cells. *Eur J Immunol*, 32: 3071-3081, 2002.
16. Fayolle, C., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A., and Leclerc, C. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol*, 162: 4157-4162, 1999.
 17. Fayolle, C., Osickova, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M. J., Saron, M. F., Sebo, P., and Leclerc, C. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J Virol*, 75: 7330-7338, 2001. 10
 18. Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., and Tonegawa, S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell*, 71: 1205-1214, 1992.
 19. Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 10338-10343, 1999. 20
 20. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 1: 167-178, 1994.
 21. Lin, K. Y., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Levitsky, H. I., August, J. T., Pardoll, D. M., and Wu, T. C. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*, 56: 21-26, 1996. 30
 22. Feltkamp, M. C., Smits, H. L., Vierboom, M. P., Minnaar, R. P., de Jongh, B. M., Drijfhout, J. W., ter Schegget, J., Melief, C. J., and Kast, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*, 23: 2242-2249, 1993. 40

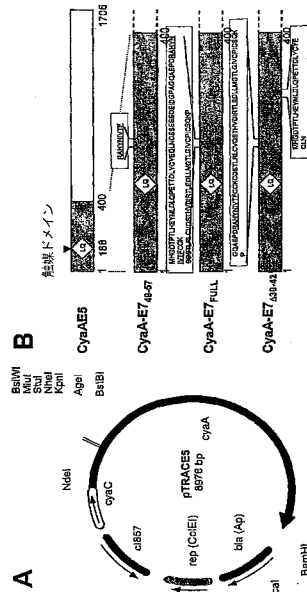
23. Tindle, R. W., Fernando, G. J., Sterling, J. C., and Frazer, I. H. A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 5887-5891, 1991.
24. Dadaglio, G., Morel, S., Bauche, C., Moukrim, Z., Lemonnier, F. A., Van Den Eynde, B. J., Ladant, D., and Leclerc, C. Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA*0201-restricted melanoma epitopes. *Int Immunol*, 15: 1423-1430, 2003. 10
25. Gmira, S., Karimova, G., and Ladant, D. Characterization of recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. *Res Microbiol*, 152: 889-900, 2001.
26. Guernonprez, P., Fayolle, C., Karimova, G., Ullmann, A., Leclerc, C., and Ladant, D. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8-positive T-cell epitopes into antigen-presenting cells. *Methods Enzymol*, 326: 527-542, 2000. 20
27. Franken, K. L., Hiemstra, H. S., van Meijgaarden, K. E., Subronto, Y., den Hartigh, J., Ottenhoff, T. H., and Drijfhout, J. W. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif*, 18: 95-99, 2000. 30
28. Dadaglio, G., Moukrim, Z., Lo-Man, R., Sheshko, V., Sebo, P., and Leclerc, C. Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, 68: 3867-3872, 2000.
29. Michallet, M. C., Preville, X., Flacher, M., Fournel, S., Genestier, L., and Revillard, J. P. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation*, 75: 657-662, 2003. 40

30. Siegel, S. and Castellan, N. J. Non parametric statistics for the behavioral sciences. New York: McGraw-Hill, 1988.
31. Sebo, P., Moukrim, Z., Kalhous, M., Schaft, N., Dadaglio, G., Sheshko, V., Fayolle, C., and Leclerc, C. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying multiple copies of a viral CD8(+) T-cell epitope. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 26: 167-173, 1999. 10
32. Matsui, S., Ahlers, J. D., Vortmeyer, A. O., Terabe, M., Tsukui, T., Carbone, D. P., Liotta, L. A., and Berzofsky, J. A. A model for CD8+ CTL tumor immunosurveillance and regulation of tumor escape by CD4 T cells through an effect on quality of CTL. *J Immunol*, 163: 184-193, 1999.
33. Romagnani, S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol*, 80: 225-235, 1996.
34. Greenstone, H. L., Nieland, J. D., de Visser, K. E., De Bruijn, M. L., Kirnbauer, R., Roden, R. B., Lowy, D. R., Kast, W. M., and Schiller, J. T. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1800-1805, 1998. 20
35. De Bruijn, M. L., Schuurhuis, D. H., Vierboom, M. P., Vermeulen, H., de Cock, K. A., Ooms, M. E., Rensing, M. E., Toebes, M., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Ottenhoff, T. H., Offringa, R., and Melief, C. J. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res*, 58: 724-731, 1998. 30
36. El Azami El Idrissi, M., Ladant, D., and Leclerc, C. The adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: a vector to target antigen presenting cells. *Toxicon*, 40: 1661-1665, 2002. 40

37. Zwaveling, S., Ferreira Mota, S. C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G. B., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol*, 169: 350-358, 2002.
38. Knutson, K. L., Schiffman, K., and Disis, M. L. Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest*, 107: 477-484, 2001. 10
39. Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C., and Ladant, D. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 12532-12537, 1998.
40. van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., O'Neill, T., Brandt, R. M., Melief, C. J., Hickling, J. K., and Offringa, R. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vaccine*, 19: 3652-3660, 2001. 20
41. Chu, N. R., Wu, H. B., Wu, T., Boux, L. J., Siegel, M. I., and Mizzen, L. A. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol*, 121: 216-225, 2000. 30
42. Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science*, 297: 2060-2063, 2002.
43. Glaser, P. et al, 1988, The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *E. coli* *Molecular Microbiology* 2(1), 19-30. 40

44. Sebo P. et al, 1995, Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8⁺ cytotoxic T cells. *Infection and Immunity*, p. 3851-3857.
45. El-Azami-El-Idrissi M. et al, 2003 October 3, Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18 : Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* 278 (40): 38514-21. 10
46. Kast, W.M. et al, 1994, Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins, *J. Immunol*, 152: 3904-3912.
47. Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 2003;33:1373-83. 20
48. Chu NR, Wu HB, Wu T, Boux LJ, Siegel MI, Mizzen LA. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 2000;121:216-25. 30

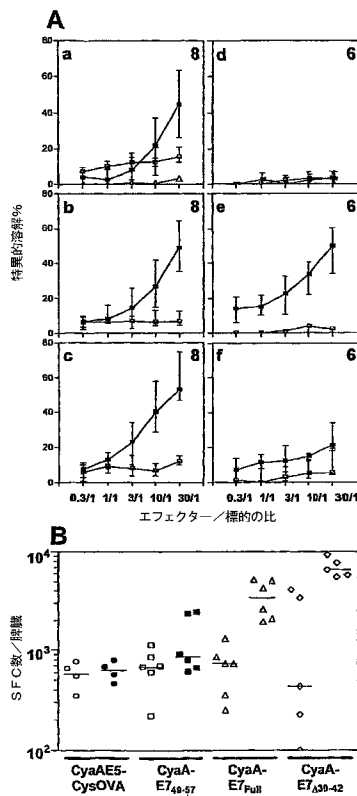
【図 1 A】



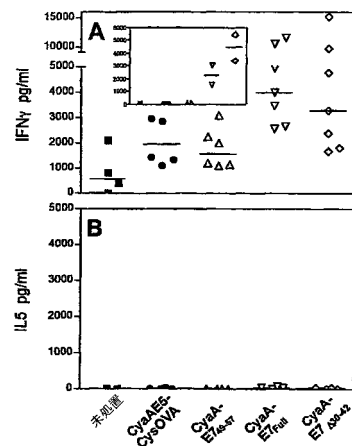
【図 1 B】



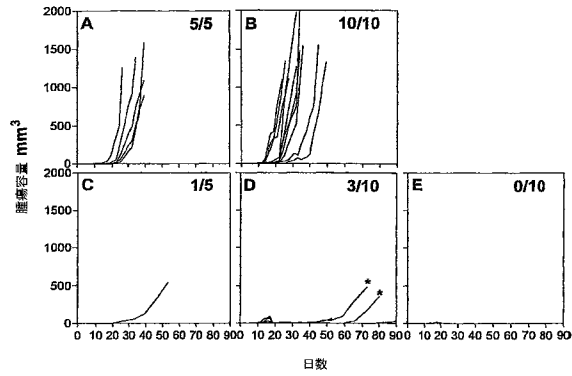
【図 2】



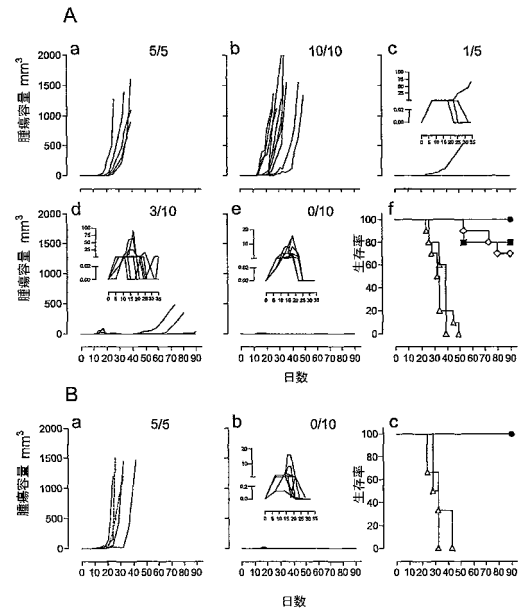
【図 3】



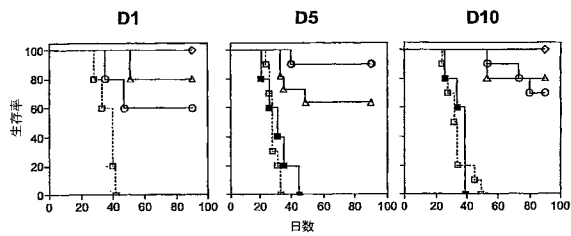
【図 4 A】



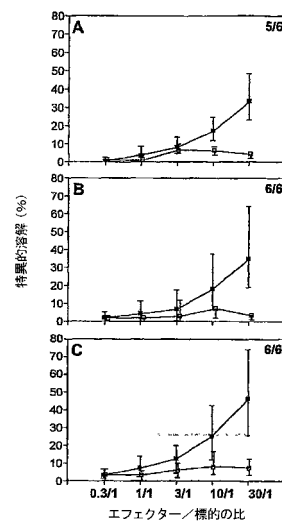
【図 4 B】



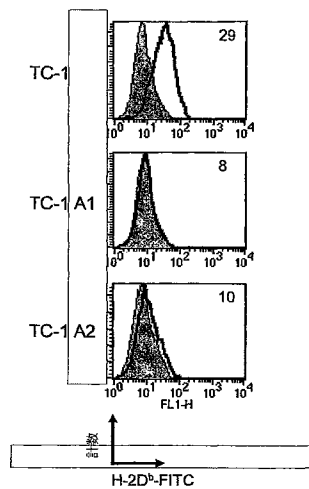
【図 5】



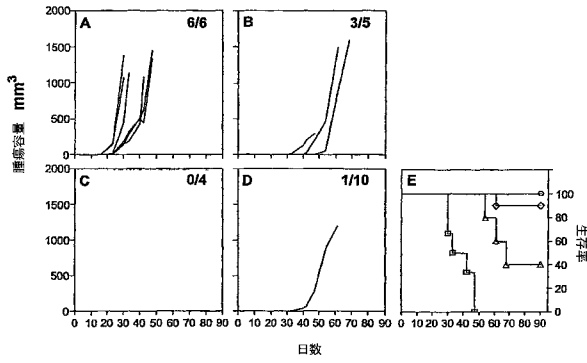
【図 7】



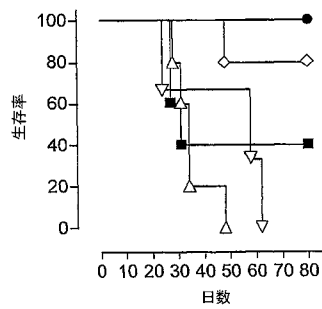
【図 6】



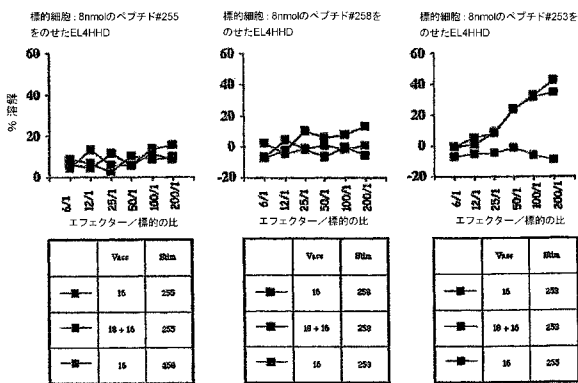
【図 8】



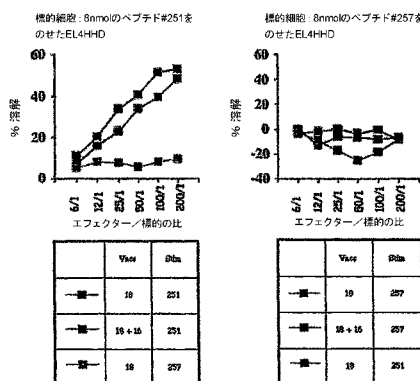
【図 9】



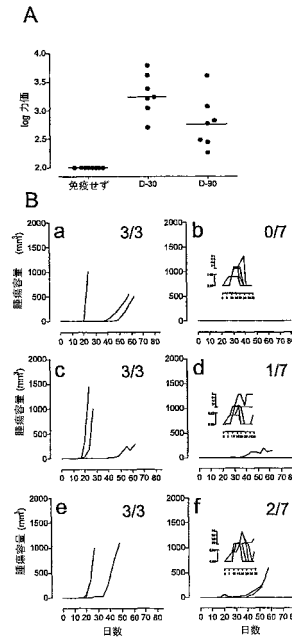
【図 1 1】



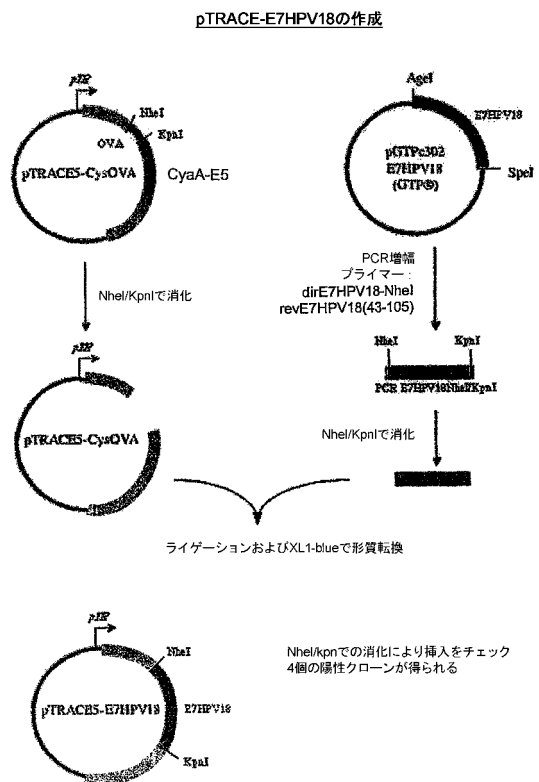
【図 1 2】



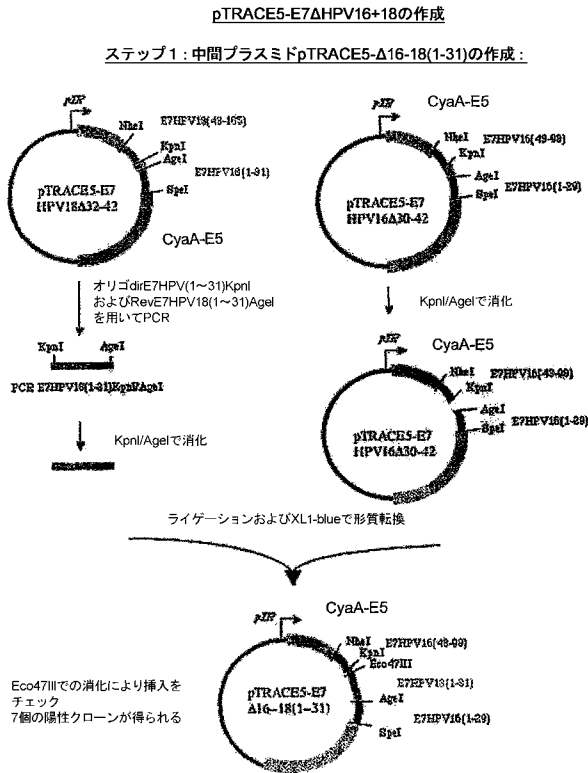
【図 1 0】



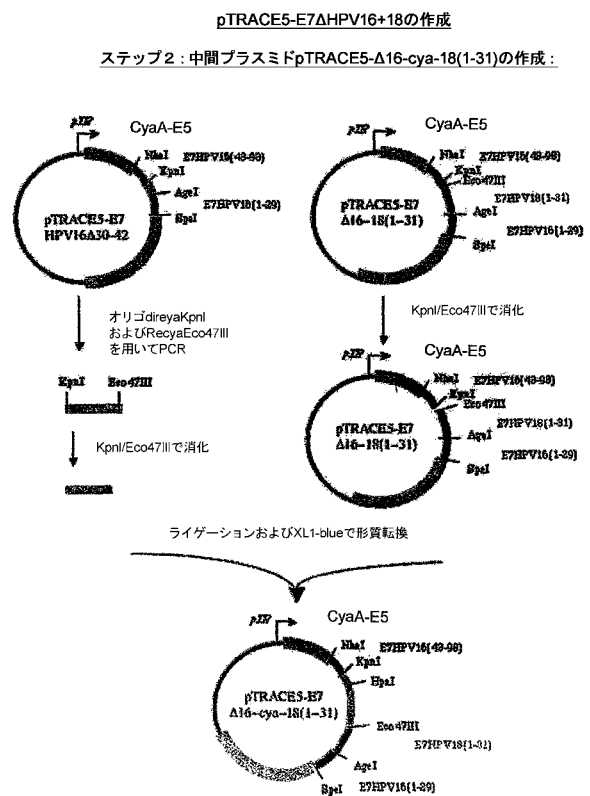
【図 1 3】



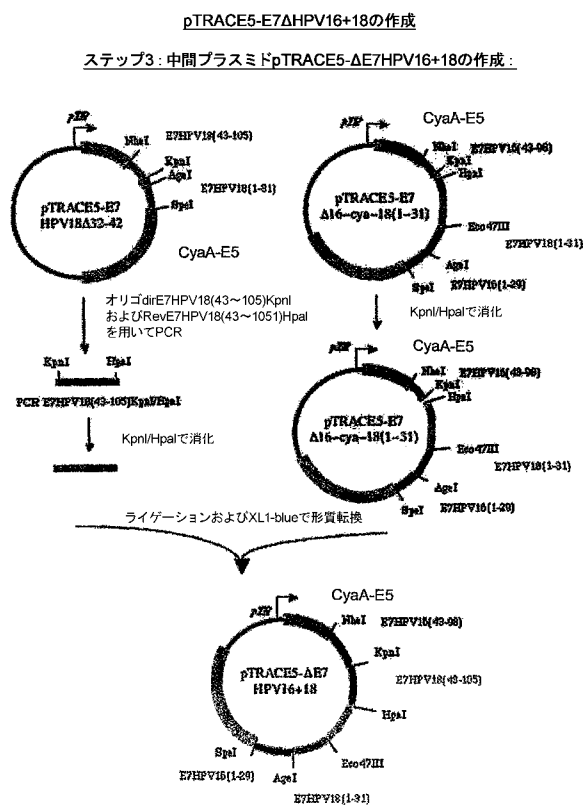
【図 14 A】



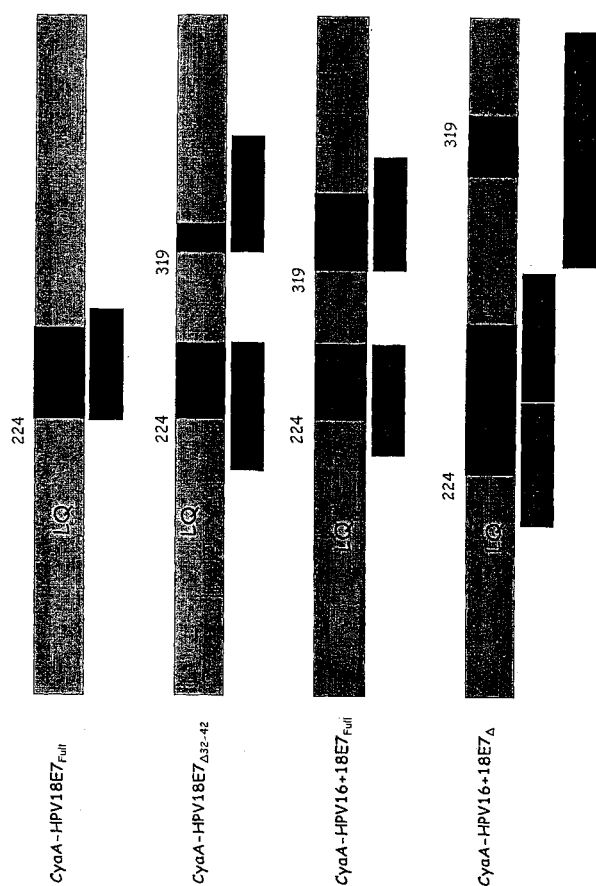
【図 14 B】



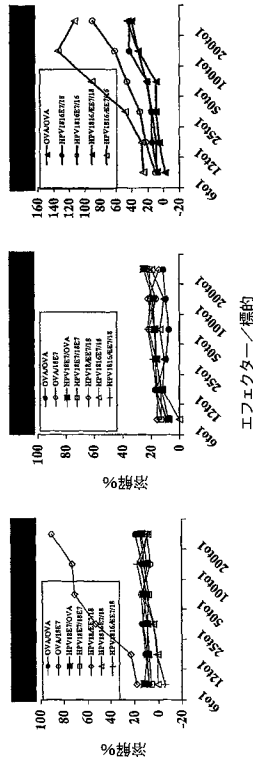
【図 14 C】



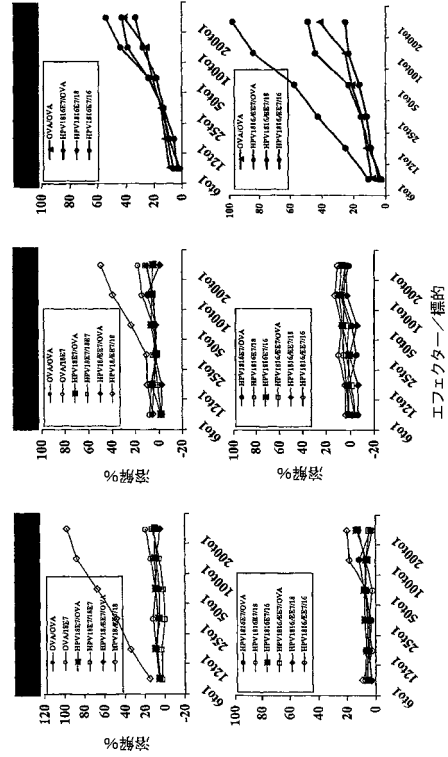
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【手続補正書】

【提出日】平成25年5月21日(2013.5.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

発癌性HPV株に由来するE6タンパク質からの1個または数個のエピトープを有する1個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質であって、前記ポリペプチドは、ボルデテラ(Bordetella)種アデニル酸シクラーゼ(CyaA)タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、前記CyaA断片は、抗原提示細胞を標的化するという前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持している、前記組換えタンパク質。

【請求項2】

CyaAタンパク質断片は、CD11b/CD18抗原提示細胞を標的化するという前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持している、請求項1に記載の組換えタンパク質。

【請求項3】

CyaAタンパク質断片は、標的化細胞のサイトゾルへの前記ポリペプチドのエピトープの転位または前記ポリペプチドの転位を可能とするというCyaAの特性を保持している、請求項1または2に記載の組換えタンパク質。

【請求項4】

標的抗原提示細胞への前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持している前記

C y a A タンパク質断片が、アミノ酸残基 2 2 5 ~ 2 3 4 が欠失しているボルデテラ ペルツシス (*Bordetella pertussis*) の C y a A タンパク質に相当する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 5】

C y a A タンパク質断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されている 1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する 1 又は数個のポリペプチドを含む請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組換えタンパク質であって、前記断片は、3 0 ~ 1 3 0 0 アミノ酸残基を含み、前記断片は、ボルデテラ ペルツシス (*Bordetella pertussis*) の C y a A タンパク質のアミノ酸残基 1 2 0 8 ~ 1 2 4 3 またはボルデテラ ペルツシス (*Bordetella pertussis*) の C y a A タンパク質のアミノ酸残基 1 1 6 6 ~ 1 2 8 1 を包含する、前記組換えタンパク質。

【請求項 6】

前記ポリペプチドおよび / または数個のポリペプチドが一緒になって、1 0 ~ 5 0 アミノ酸残基、または 3 0 もしくは 5 0 ~ 2 0 0 アミノ酸残基、又は 1 0 0 ~ 2 0 0 又は 1 0 0 ~ 2 1 0 アミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 7】

前記ポリペプチドに対する抗原特異的応答を誘起することのできる、請求項 6 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 8】

1 個または数個のエピトープを有する少なくとも 1 個のポリペプチドが、高発癌性 H P V に由来している、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 9】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 6、H P V 1 8、H P V 3 1、H P V 3 3、H P V 3 5、H P V 4 5、H P V 5 2、または H P V 5 8 に由来している、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 0】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 6 および / または H P V 1 8 の E 6 タンパク質から選択される H P V 抗原に由来している、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 1】

1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する複数のポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 2】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 6 の E 6 タンパク質に由来している、請求項 1 0 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 3】

1 個または数個のエピトープを有するポリペプチドが、H P V 1 8 の E 6 タンパク質に由来している、請求項 1 0 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 4】

前記ポリペプチドが、全長 E 6 タンパク質である、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 5】

C y a A 配列またはその断片の異なる許容部位に挿入されている複数のポリペプチドを含む、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 6】

前記ポリペプチドまたはポリペプチド群が、分断された天然 H P V 抗原に存在し、前記分断は、前記 H P V 抗原の酸性領域における 1 個または数個のアミノ酸残基の欠失、および / または、アデニル酸シクラーゼの少なくとも 2 箇所の許容部位への前記 H P V 抗原の少なくとも 2 個のポリペプチド断片の挿入からなる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記

載の組換えタンパク質。

【請求項 17】

前記分断された天然 H P V 抗原が、アデニル酸シクラーゼの少なくとも 2 箇所の許容部位への、天然 H P V 抗原の少なくとも 2 個の断片の挿入によって得られ、これらの少なくとも 2 個の断片は、天然抗原におけるその天然の位置と比べて逆であり、すなわち、天然抗原においてより N 末端側である断片は、C y a A タンパク質またはその断片に挿入されると、より C 末端側となり、その逆も同様である、請求項 16 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 18】

1 個または数個の H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する少なくとも 1 個のポリペプチドが、得られる組換えタンパク質の免疫原性を高めるために抗原の天然又は非天然のランキング配列の付加によってそのネイティブなアミノ酸配列に対して改変されている、請求項 1 ~ 13 または 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 19】

C y a A タンパク質が、*Bordetella pertussis* に由来する、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 20】

C y a A タンパク質の酵素活性が不活性化されている、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 21】

C y a A タンパク質の酵素活性が遺伝子的に不活性化されている、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 22】

C y a A タンパク質の酵素活性が、シクラーゼ活性に関与する C y a A のアミノ酸配列部位にジペプチドが挿入されている結果、不活性化されている、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 23】

C y a A タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されている、様々な H P V 抗原の 1 個または数個のエピトープを有する数個のポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 24】

前記ポリペプチドが、それぞれ H P V 16 および H P V 18 に由来する全長 E6 ポリペプチドであり、前記ポリペプチドは、C y a A タンパク質の異なる許容部位に挿入されている、請求項 23 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 25】

1 個または数個の抗原の 1 個または数個のエピトープを有する 1 個または数個のポリペプチドを含む組換えタンパク質であって、前記ポリペプチドは、アデニル酸シクラーゼ (C y a A) タンパク質またはその断片の同じまたは異なる許容部位に挿入されており、前記 C y a A 断片は、抗原提示細胞を標的化するという前記アデニル酸シクラーゼタンパク質の特性を保持しており、前記エピトープの少なくとも 1 個は、サブドミナント潜在性 T 細胞エピトープであり、前記組換えタンパク質は、前記ポリペプチドに対する抗原特異的応答を誘起できる、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 26】

組成物が、哺乳動物宿主に投与されることを特徴とする、哺乳動物宿主において細胞性免疫応答を誘起するための、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 27】

組成物が、哺乳動物宿主に投与されることを特徴とする、哺乳動物宿主において体液性免疫応答を誘起するための、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチ

ド。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え発現ベクター。

【請求項 3 0】

細菌で発現させるのに適した、請求項 2 9 に記載の組換えベクター。

【請求項 3 1】

真核細胞での発現に適した、請求項 3 0 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 3 2】

哺乳動物細胞での発現に適した、請求項 3 1 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 3 3】

請求項 2 8 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 2 9 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の組換え発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項 3 4】

生理的に許容されるビヒクル、賦形剤、担体、および / または希釈剤と共に、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質を含む、免疫原性組成物。

【請求項 3 5】

アジュバントおよび / または界面活性剤および / または免疫調節物質をさらに含む、請求項 3 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 6】

組成物が、哺乳動物宿主に投与されることを特徴とする、哺乳動物宿主において細胞性免疫応答を誘導するための、請求項 3 4 又は 3 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 7】

細胞媒介免疫応答が、細胞媒介細胞溶解免疫応答を誘導する、請求項 3 6 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 8】

さらに体液性免疫応答を誘導する、請求項 3 6 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 9】

組成物が、哺乳動物宿主に投与されることを特徴とする、H P V 感染を予防または処置するための、請求項 3 4 又は 3 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 0】

組成物が、哺乳動物宿主に投与されることを特徴とする、癌免疫療法のための請求項 3 4 又は 3 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 1】

組成物が、哺乳動物宿主に投与されることを特徴とする、宿主における H P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続の予防または処置のための、請求項 3 4 又は 3 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 2】

組換えタンパク質を患者に投与することを特徴とする、患者における H P V 感染の処置または予防のための、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 4 3】

組換えタンパク質を患者に投与することを特徴とする、患者における H P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続に対する免疫療法のための請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 4 4】

ワクチン組成物を宿主に投与することを特徴とする、宿主において細胞性および / または体液性免疫応答を誘起するのに適した、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質を含む、ワクチン組成物。

【請求項 4 5】

薬物組成物を宿主に投与することを特徴とする、宿主における H P V 感染を予防または処置するための、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質を含む、薬物

組成物。

【請求項 4 6】

薬物組成物を宿主に投与することを特徴とする、宿主における H P V 感染に起因する悪性形質転換の発症または存続の予防または処置のための、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質を含む、薬物組成物。

【請求項 4 7】

薬物組成物を宿主に投与することを特徴とする、癌免疫療法のための、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質を含む、薬物組成物。

【請求項 4 8】

請求項 1 ～ 2 5 のいずれかに記載の組換えタンパク質または請求項 2 8 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 2 9 ～ 3 0 のいずれかに記載のベクターを含む、H P V 感染の診断キット、または H P V 感染を免疫モニタリングするためのキット。

【請求項 4 9】

哺乳動物から得られた T 細胞を前記組換えタンパク質に暴露させ、T 細胞の活性化における改変を検出することを特徴とする、インビトロで H P V 感染を診断するためのか又は H P V 感染を免疫モニタリングするための、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質。

【請求項 5 0】

前記 T 細胞が、ヒト患者から得られた、請求項 4 9 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 5 1】

キメラ C y a A - ポリペプチドタンパク質に含まれるポリペプチド中の未知または亜優性潜在性 T 細胞エピトープのスクリーニング方法であって、ここで、C y a A は、請求項 1 ～ 5 及び 1 9 ～ 2 2 のいずれかに開示されているアデニル酸シクラーゼまたはその断片であり、この方法は、

- 前記キメラタンパク質を動物宿主に投与すること、
 - 前記宿主の T 細胞応答を決定すること
- を含む、前記スクリーニング方法。

【請求項 5 2】

前記ポリペプチドが、H P V 抗原に由来する、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記ポリペプチドが、H P V 1 6 および / または H P V 1 8 E 6 タンパク質に由来する、請求項 5 2 に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	1 0 1	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/01 (2006.01)		C 0 7 K 14/01		4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)		A 6 1 K 39/12		
A 6 1 K 39/39 (2006.01)		A 6 1 K 39/39		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 31/20 (2006.01)		A 6 1 P 31/20		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	H	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02		

- (71)出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メディカル
 フランス国 7 5 6 5 4 パリ セデックス 1 3 リュ ドゥ トルビアック 1 0 1
- (71)出願人 595040744
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・シャンティフィク
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 フランス国、7 5 7 9 4 パリ・セデックス 1 6、リュ・ミシェル・アンジュ 3
- (74)代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
- (74)代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄
- (74)代理人 100119079
 弁理士 伊藤 佐保子
- (74)代理人 100135873
 弁理士 小澤 圭子
- (74)代理人 100122736
 弁理士 小國 泰弘
- (74)代理人 100122747
 弁理士 田中 洋子
- (74)代理人 100132540
 弁理士 生川 芳徳
- (74)代理人 100146031
 弁理士 柴田 明夫
- (74)代理人 100141357
 弁理士 鈴木 音哉
- (72)発明者 ブレヴィル、グザヴィエ - エドモン - エドワール
 フランス国、エフ - 9 5 4 6 0 エザンヴィル、アレ・エドワール・マネ 1 2
- (72)発明者 ルクレール、クロード
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ラミラル・ルーサン 1 3
- (72)発明者 ラダン、ダニエル
 フランス国、エフ - 9 4 2 3 0 カシャン、リュ・ラスパイユ 1 1
- (72)発明者 ティーママン、ベネディクト
 フランス国、エフ - 3 1 0 0 0 トゥールーズ、アレ・ジャン・ジョレス 3 2

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA29 AA40 CA18 DA36 FA37 FB01 FB03 FB12 FB15
GC10 GC15 JA01
4B024 AA01 BA07 BA32 CA07 DA06 EA04
4B050 CC05 DD02 LL01
4B063 QA18 QQ20 QQ96 QR48 QR72 QR77 QX07
4B065 AA01Y AA26X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA27 CA45
4C085 AA03 BA76 BB11 CC08 DD86 EE06 FF24
4H045 AA11 BA10 BA41 CA01 CA11 DA86 EA31 FA74

【外国語明細書】

2013176390000001.pdf

专利名称(译)	具有插入腺苷酸环化酶蛋白质或其片段的人乳头瘤病毒表位的重组蛋白质及其治疗用途		
公开(公告)号	JP2013176390A	公开(公告)日	2013-09-09
申请号	JP2013107236	申请日	2013-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 Jentiseru GENTICEL 法国国家健康医学研究院 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 Jentiseru Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 中心法国国家，香提网络点击		
[标]发明人	プレヴィルグザヴィエエドモンエドワール ルクレールクロード ラダンダニエル ティーママンベネディクト		
发明人	プレヴィル,グザヴィエ-エドモン-エドワール ルクレール,クロード ラダン,ダニエル ティーママン,ベネディクト		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/88 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/01 C07K19/00 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/39 A61P35/00 A61P31/20 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1 /02 C07K14/025 C07K14/235		
CPC分类号	A61K2039/525 A61P31/12 A61P31/20 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/005 C07K2319/00 C12N7/00 C12N9/88 C12N2710/20022 A61K39/385 A61K45/06 A61K2039/6037 C07K14/235		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N9/88 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K14/01 C07K19/00 A61K39/00.H A61K39/12 A61K39/39 A61P35/00 A61P31/20 G01N33/53.D G01N33/569.H G01N33/15. Z G01N33/50.Z C12Q1/02 A61P37/02 C07K14/025 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/37 C12N15/60 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N15/85.Z C12N5/10 G01N33/569.L		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045 /FB03 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC10 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/BA07 4B024/BA32 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B050/CC05 4B050/DD02 4B050/LL01 4B063 /QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QX07 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA27 4B065 /CA45 4C085/AA03 4C085/BA76 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/DD86 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045 /FA74		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 田中洋子 阿基奥·希巴达		
优先权	2004290741 2004-03-18 EP		
其他公开文献	JP5824474B2 JP2013176390A5		

摘要(译)

要解决的问题：提供可用于设计抗人乳头瘤病毒（HPV）感染或其恶性作用的治疗方法的重组蛋白或多核苷酸。一种重组蛋白，其包含一种或多种具有一种或几种HPV抗原表位的多肽，其中所述重组蛋白包含腺苷酸环化酶（CyaA）蛋白或其片段。其中所述CyaA片段保留所述腺苷酸环化酶靶向抗原呈递细胞的性质，所述CyaA片段插入相同或不同的许可位点。【选择图】无

CTL誘導 (CTLアッセイ)		
マウスの数	CyaAE5	免疫化用量/容量/尿素濃度
3	CyaA-HPV16E7 _{Δ30-42}	50 µg / 200 µl / 1.6 M
3	CyaA-HPV18E7 _{Δ32-42}	50 µg / 200 µl / 1.5 M
5	CyaA-HPV16E7 _{Δ30-42} および CyaA-HPV18E7 _{Δ32-42}	200 µl / 3.1 M 各々 50 µg