

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-514449

(P2004-514449A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 31/12	4 C O 8 4
		4 C O 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 188 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-546732 (P2002-546732)	(71) 出願人	500579383
(86) (22) 出願日	平成13年11月30日 (2001.11.30)		メディジーン・アクチェンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		ドイツ連邦共和国デー-8 2 1 5 2 プラ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/014037		ネグ/マルティーンズリート, ロホハマー
(87) 国際公開番号	W02002/044384		・シュトラーセ 1 1
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002.6.6)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	100 59 631.2		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成12年12月1日 (2000.12.1)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 増井 忠式
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP, US	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パピローマウイルス L 1 タンパク質及び E 7 タンパク質の T 細胞エピトープと、診断及び治療へのそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、アミノ酸配列：

【化 1】

YLPPVPVSKVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL, VGHPYFPPIKKPNNKILVPK,
 GLQYRVFRIHLDPNKFQFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNKLDDETE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKGS, LELINTVIQDGMVDTGFGA, DMVDTGFGAMDFTTLQANKS,
 VTVDVTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIISM,
 PPPGGTLEDYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD,
 PLGRKFLLQAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDVTR, PPPPTTSLVDYRFVQSVAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN,
 PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL, YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEENDEID, SEENDEIDGVNHQHLRARR, SSADDLRAFQQLFLNLTLSFV
 NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL, FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV,
 GMHGPKATL, HGPATLQDI, MHGPKATL, 又は FQQLFLNTL

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列：

【化 1】

YLPPVFPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL,
 VGHPYFFPIKKPNNKILVPK, GLQYRVFRIHLDPNKFVGF,
 WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNLDDTE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKGS, LELINTVIQDGMVDTGFGA,
 DMVDTGFGAMDFTTLQANKS, VTVVDTTRSTNMSLCAAIST, 10
 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHS,
 PFPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE,
 LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLQAGMHGDTPTLH,
 YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGPNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDTTRS, PPPPTTSLVDTYRFVQSVAI,
 YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLKFWNVDLKEKFSLDL, 20
 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEEEDEID, SEEENDEIDGVNHQHLPAR,
 SSADDLRAFQQLFLNTLSFV, NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FVHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV, GMHGPKATL,
 HGPATLQDI, MHGPKATL, 又は FQQLFLNTL

を有する T 細胞エピトープ及び / 又はその機能的に活性な変異体。

【請求項 2】

前記変異体が、

【化 2】

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL,
 VGHPYFPIKKPNNKILVPK, GLQYRVFRIHLDPNKFQFP,
 WACVGVVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPILLNKLDDTE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA,
 DMVDTGFGAMDFTLQANKS, VTVVDTRSTNMSLCAAIST,
 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
 PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE,
 LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLQAGMHGDTPTLH,
 YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGPNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS, PPPPTTSLVDTYRFVQSVAI,
 YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLKFWNVDLKEKFSLDL,
 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEEENDEID, SEEENDEIDGVNHQHL PARR,
 SSADDLRAFQQLFLNLTLSFV, NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV, GMHGPKATL,
 HGPKATLQDI, MHGPKATL, 又は FQQLFLNTL

10

20

と、アミノ酸レベルにおいて少なくとも約 65%、好ましくは少なくとも約 75%、特に少なくとも約 85%の配列相同性を有することを特徴とする、請求項 1 記載の T 細胞エピートープ。

【請求項 3】

前記変異体が、

【化 3】

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL,
 VGHYPYFPIKKNPNNKILVVK, GLQYRVFRIHLDPDNKFGFP,
 WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNKLDDE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKGS, LELINTVIQDGMVDTGFGA,
 DMVDTGFGAMDFTTLQANKS, VTVVDTRSTNMSLCAAIST,
 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHS,
 PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE,
 LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLQAGMHGDTPTLH,
 YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGPNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS, PPPPTTSLVDTYRFVQSVAI,
 YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL,
 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEENDEID, SEENDEIDGVNHQHLPAR,
 SSADDLRAFQQLFLNLTLSFV, NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FVYHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV, GMHGPKATL,
 HGPATLQDI, MHGPKATL, 又は FQQLFLNLT

10

20

との構造相同性を有することを特徴とする、請求項 1 記載の T 細胞エピトープ。

【請求項 4】

T 細胞エピトープが細胞傷害性応答を誘発するか、T ヘルパー細胞機能を仲介することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の T 細胞エピトープ。

【請求項 5】

化合物がパピローマウイルス由来の天然生成 L 1 タンパク質ではなく、HPV-16 T 細胞エピトープの場合には、パピローマウイルス由来の天然生成 L 1 タンパク質の排他的に N 末端欠失又は排他的に C 末端欠失突然変異体ではない、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープを含有する化合物。

30

【請求項 6】

化合物がポリペプチド、特に融合タンパク質であることを特徴とする、請求項 5 記載の化合物。

【請求項 7】

化合物が、長さにおいて、少なくとも約 50 アミノ酸、好ましくは、少なくとも約 35 アミノ酸、特に、少なくとも約 20 アミノ酸、そして、特に好ましくは、少なくとも約 9 ~ 13 アミノ酸のポリペプチドであることを特徴とする、請求項 5 又は 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

化合物が T 細胞エピトープ及び / 若しくは前記融合タンパク質並びに / 又は該 T 細胞エピトープ及び / 若しくは融合タンパク質の化学的修飾の化学的標識、放射性標識、非放射性標識、同位体標識及び / 又は蛍光標識を含有することを特徴とする、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の化合物。

40

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープをコードする又は、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の T 細胞エピトープを含有する化合物をコードすることを特徴とする核酸。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸を含有することを特徴とするベクター、特に発現ベクター。

【請求項 11】

50

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを、又は請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の化合物を含有する、好ましくは提示することを特徴とする細胞。

【請求項 1 2】

請求項 9 記載の核酸及び / 又は請求項 1 0 記載のベクターによって、細胞がトランスフェクトされる、形質転換される及び / 又は感染されることを特徴とする、請求項 1 1 記載の細胞。

【請求項 1 3】

細胞が、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの化合物及び / 又は、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の T 細胞エピトープを含有する請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体と共に、インキュベートされたことを特徴とする、請求項 1 1 記載の細胞。

10

【請求項 1 4】

細胞が B 細胞、マクロファージ、樹枝状細胞又は線維芽細胞、特に J Y 細胞、T 2 細胞、C a S k i 細胞又は E B V 形質転換細胞であることを特徴とする、請求項 1 1 又は 1 2 記載の細胞。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープ又は請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の化合物及び少なくとも 1 つの更なる化合物を含む複合体。

【請求項 1 6】

複合体が少なくとも 1 つの M H C クラス I 分子を、好ましくは H L A A 2 . 0 1、A 1 又は A 2 4 テトラマーとして含有することを特徴とする、請求項 1 5 記載の複合体。

20

【請求項 1 7】

前記 M H C クラス I 分子がヒト M H C クラス I 分子、特に、H L A A 2 . 0 1、A 1 又は A 2 4 分子であることを特徴とする、請求項 1 6 記載の複合体。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープによる、又は請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープを含有する少なくとも 1 つの化合物による、T 細胞活性化の *i n - v i t r o* 検出方法であって、下記工程：

(a) 少なくとも 1 つの前記化合物によって細胞を刺激する工程；

(b) 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープ又は請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の複合体を提示する、少なくとも 1 つの標的細胞を加える工程；及び

30

(c) T 細胞の活性化を測定する工程

を含有する上記方法。

【請求項 1 9】

工程 (a) 後に、工程 (b) が次に続く前に、下記追加工程 (a ')：

(a ') 細胞を (i) 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の化合物、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体、少なくとも 1 つのキャプソメア、少なくとも 1 つの安定なキャプソメア、少なくとも 1 つの V L P、少なくとも 1 つの C V L P 及び / 又は少なくとも 1 つのウイルスを負荷されている、少なくとも 1 つの標的細胞、(i i) 請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体、並びに / あるいは (i i i) 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の T 細胞エピトープを提示する少なくとも 1 つの標的細胞と共に、少なくとも約 1 週間、特に少なくとも約 8 週間、同時培養する工程

40

を含有することを特徴とする、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

標的細胞を請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの化合物及び / 又は、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の T 細胞エピトープを含有する請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体と共に、インキュベートすることを特徴とする、請求項 1 1、1 3、1 4、1 8 又は 1 9 のいずれかに記載の標的細胞の調製方法。

50

【請求項 2 1】

標的細胞が請求項 9 記載の核酸及び / 又は請求項 10 記載のベクターによって、トランスフェクトされる、形質転換される及び / 又は感染されることを特徴とする、請求項 1 1、1 2、1 4、1 8 又は 1 9 のいずれかに記載の標的細胞の調製方法。

【請求項 2 2】

標的細胞が B 細胞、マクロファージ、樹枝状細胞又は線維芽細胞、特に J Y 細胞、T 2 細胞、C a S k i 細胞又は E B V 形質転換細胞であることを特徴とする、請求項 2 0 又は 2 1 に記載の標的細胞の調製方法。

【請求項 2 3】

工程 (a) の代わりに下記工程 (a ") :

(a ") T 細胞を含有するサンプルを単離及び調製して、次にそれらを培養する工程が行なわれることを特徴とする、請求項 1 8 又は 1 9 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

(a) 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの化合物、請求項 10 記載の少なくとも 1 つのベクター、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの細胞及び / 又は請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体、並びに (b) 免疫系エフェクター細胞、好ましくは T 細胞、特に細胞傷害性 T 細胞又は T ヘルパー細胞を含む、T 細胞活性化を *i n - v i t r o* 検出するための試験系。

【請求項 2 5】

免疫応答を誘発するため又は検出するための、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの化合物、請求項 10 記載の少なくとも 1 つのベクター、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの細胞及び / 又は請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体の使用。

20

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの化合物、請求項 10 記載の少なくとも 1 つのベクター、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの細胞及び / 又は請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体、及び適当な場合には、製薬的に受容されるキャリアーを含む薬剤又は診断剤。

30

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの T 細胞エピトープ、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの化合物、請求項 10 記載の少なくとも 1 つのベクター、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの細胞及び / 又は請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの複合体が溶解状態で存在する、固体マトリックスに結合している、及び / 又はアジュバントで処理されていることを特徴とする、請求項 2 6 記載の薬剤又は診断剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、アミノ酸配列 :

【0 0 0 2】

【化 4】

40

YLPPFVPSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL, VGHYPYFPIKPPNNNKILVPK,
 GLQYRVFRIHLDPNKFQFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLKLDDETE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA, DMVDTGFGAMDFTTLQANKS,
 VTVVDTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
 PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD,
 PLGRKFLLOAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVERV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS, PPPPTTSLVDTYRFVQSVAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN,
 PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL, YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEEENDEID, SEEENDEIDGVNHQHLPARR, SSADDLRAFQQLFLNNTLSFV,
 NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL, FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV,
 GMHGPKATL, HGPATLQDI, MHGPKATL 又は FQQLFLNNTL

10

【0003】

及び / 又はその機能的に活性な変異体を有するパピローマウイルス T 細胞エプトープ、並びに診断及び治療へのその使用に関する。

【0004】

いぼウイルスとも呼ばれる、パピローマウイルスは、約 8000 塩基対のゲノムサイズ及び約 55 nm の直径を有する正二十面体キャプシドを有する二本鎖 DNA ウイルスである。今までに、ヒトに対して病原性である 100 種類を超えるパピローマウイルス (HPV) が知られており、そのうちの幾つか、例えば、HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 及び HPV-58 は悪性腫瘍を誘発する可能性があり、他のもの、例えば、HPV-6, HPV-11 及び HPV-42, は良性腫瘍を誘発する可能性がある。

20

【0005】

パピローマウイルス・ゲノムは 3 領域に細分されることができる：第 1 領域は、ウイルスの転写及び複製を制御する要素を含有する非コーディング領域に関する。E (初期) 領域とも呼ばれる第 2 領域は異なるタンパク質コーディングセグメント E1 - E7 を含有し、これらのうちの例えば、E6 及び E7 タンパク質は上皮細胞の形質転換を担い、E1 タンパク質は DNA コピー数を制御する。E6 及び E7 領域は腫瘍遺伝子と呼ばれるものであり、悪性に変性した細胞においても発現される。L (後期) 領域とも呼ばれる第 3 領域は 2 つのタンパク質コーディングセグメント L1 及び L2 を含有し、これらはウイルスキャプシドの構成成分をコードする。ウイルスキャプシドの 90% より多くが L1 タンパク質から成り、L1 : L2 比率は一般に 30 : 1 である。本発明の意味において、L1 タンパク質なる用語は主要なパピローマウイルスキャプシドタンパク質を意味するとして理解される (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445)。

30

40

【0006】

症例の 50% より多くにおいて、HPV-16 が子宮頸部癌 (子宮頸癌) に関係する。HPV-16 は頸部新生物の形成の腫瘍危険因子である。この疾患の進行には免疫系が重要な役割を果たしている。したがって、防御機構には細胞免疫応答、特に抗原特異性 T リンパ球が恐らく重要であると思われる。それ故、極端に悪性な頸部上皮内新生物 (CIN II / III) 及び頸部腫瘍では、感染した上皮の全ての層において E7 遺伝子が構成的に発現されることが見出されている。E7 タンパク質が特に、可能な腫瘍抗原及び活性化 T 細胞の標的分子であると見なされるのはこの理由からである (例えば WO 93 / 20844 参照)。しかし、患者において E7 が誘発する細胞免疫応答は、疾患の経過に影響を及ぼすほど十分に強いとは思われない。この免疫応答は恐らく適当なワクチンによって

50

増強されると考えられる。

【0007】

L1遺伝子の発現又はL1遺伝子とL2遺伝子との同時発現がキャプソメア、安定なキャプソメア、キャプシド又はウイルス様粒子(VLPs)の形成をもたらしていることが見出されている(例えばWO 93/02184, WO 94/20137又はWO 94/05792参照)。キャプソメアは5つのL1タンパク質から成るオリゴマー立体配置を意味するとして理解される。キャプソメアは基本的ビルディング・ブロックであり、これからウイルスキャプシドが構築される。安定なキャプソメアは、キャプシドにアセンブルされることができないキャプソメアを意味するとして理解される。キャプシドは、例えば72キャプソメアから構成されるパピローマウイルス皮殻を意味するとして理解される(Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445)。VLPは、形態的に及びその抗原性において完全なウイルスに類似するキャプシドを意味するとして理解される。VLPsは、種々な動物系において中和抗体の形成を特徴とする体液性免疫応答を誘発させるために用いられている。しかし、L1タンパク質及び/又はL2タンパク質に対するウイルス-中和抗体の形成は、ウイルス感染が既に発生している場合には、臨床的に殆ど重要ではない、この理由は、ウイルス感染細胞を除去するために必要であると思われるのは抗体ではなくて、むしろウイルス特異的細胞傷害性T細胞(CTL)応答であるからである。その上、VLPsは細胞傷害性T細胞応答を誘発することができるとしても、排他的にキャプシドタンパク質L1及び/又はL2に対する免疫応答は、パピローマウイルス関連腫瘍を治療するために適するとは思われない。

10

20

【0008】

それゆえ、キメラパピローマウイルス様粒子(CVLPs)と呼ばれるものが開発されており、これらの粒子はキャプシドタンパク質L1と可能な腫瘍抗原E7との間に形成されるHPV-16融合タンパク質から成る(WO 96/11272及びMuller, M. et al. (1997) Virology, 234, 93)。CVLPsのみがE7タンパク質に対する弱い体液性免疫応答を誘発した(Muller, M. et al. (1997), 上記参照)。しかし、試験したCVLPsの幾つかは実際にはマウスにおいて所望のE7特異的細胞傷害性T細胞応答を誘発しなかった(Peng S. et al. (1998) Virology 240, 147-57も参照のこと)。それゆえ、CVLPsはワクチンの開発のためにも及び既存の感染とそれに由来する腫瘍の治療のためにも興味深い、この理由は、クラスI MHC分子を介して腫瘍細胞によって提示されるE7ペプチドが細胞傷害性T細胞の標的分子を構成すると考えられるからである。

30

【0009】

CVLPsから構成されるワクチンは、CVLPsによる細胞の偽感染(pseudo-infecting)の原理に基づく。これは、CVLPsがウイルスと同様に細胞にアクセスして、そこでペプチドに加工され、次に該ペプチドがMHCクラスI及びクラスII分子に負荷されて、最後に、それぞれCD8陽性細胞及びCD4陽性細胞に提示されることを意味する。この刺激の結果として、CD8細胞は分化して、細胞傷害性T細胞になって、次に細胞免疫応答を招来することができ；一方、CD4細胞はTヘルパー細胞に進化して、B細胞を刺激して、体液性免疫応答を生じさせる、又はCD8陽性T細胞に細胞傷害性免疫応答を生じさせ、それら自身で感染細胞の溶解を誘発することができる。

40

【0010】

小ペプチドは細胞表面上でMHCクラスI分子に既に結合して、次に、更なる加工なしに、CD8陽性又はCD4陽性細胞を刺激して、細胞免疫応答を生じさせることができる。しかし、特定のペプチドは特定のMHC分子によってのみ結合されることができ。したがって、天然集団におけるMHC分子の広範囲な多型現象(extensive polymorphism)の結果として、特定のペプチドは集団の小割合によってのみ結合され、提示されることができ。本発明の意味の範囲内で、提示は、ペプチド又はタンパク質フラグメントがMHC分子に結合し、この結合が例えば小胞体内、細胞外スペース内、エンドソーム、エンドソーム前駆体、リソソーム又はリソソーム前駆体において行なわれ

50

うる時、及びこのMHC分子/ペプチド複合体が次に、免疫細胞によって特異的に認識されうるように、細胞膜の細胞外側に結合する時を意味するとして理解される。

【0011】

C V L P s は細胞免疫応答及び体液性免疫応答の両方を誘発し、MHC制限されないので、これらの粒子は一般にワクチンの発生に適しており、L1部分は粒子を形成するための能力を与え、付加的な抗原部分がこのL1部分に融合する。

【0012】

このようなC V L P s を発生させようとするときには、C V L P 抗原性を直接研究するために用いることができる機能的試験系を用意することが絶対的に必要である。このような試験系は、異なる抗原部分を含有するC V L P s を同じ試験系を用いて研究することができるという性質を有するべきである。腫瘍又はウイルス性疾患を治療するための免疫学的方法にとって細胞免疫応答は極めて重要であるので、16型又は18型C V L P s によって誘発される細胞免疫応答を測定可能にするという目的が生じた。

10

【0013】

この目的は、MHC分子と一緒にあって、例えば*in vivo*及び*in vitro*で細胞傷害性T細胞応答を誘発するHPV-16又はHPV-18T細胞エピトープを同定することによって、達成された。それゆえ、本発明によるペプチドは配列：

【0014】

【化5】

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL, VGHPYFPIKKPNNKILVPK,
GLQYRVFRIHLDPDNKFGFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLKLDDE,
QLCLIGCKPPIGEHWGKGGSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA, DMVDTGFGAMDFTTLQANKS,
VTVVDTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIISM,
PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD,
PLGRKFLQAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS, PPPPTTSLVDTYRFVQSVAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN,
PYDKLKFWNVDLKEKFSLDL, YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
VDLLCHEQLSDSEENDEID, SEENDEIDGVNHQHLRARR, SSADDLRAFQQLFLNLSFV,
NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL, FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCCCKCEARIKLV,
GMHGPKATL, HGPATLQDI, MHGPKATL 又は FQQLFLNLT.

20

30

【0015】

を有する。

可能なエピトープはKast et al., (1994) Journal of Immunology 152, 3904-3912に既に発表されている。しかし、この刊行物は、これらのペプチドがHLA A1分子に結合することができることを示すに過ぎず、細胞傷害性T細胞応答が実際に誘発されることができると示していない。その上、この刊行物は、T細胞が該ペプチドをタンパク質成分として認識することができることを実証するデータを記載していない。HLA分子にそれ自体結合するペプチドがT細胞によって必ずしも認識されないことが、しばしば見出されている。その上、ペプチドがT細胞にT細胞応答を生じさせることができるという事実によって測定されることができ、ペプチドを認識するT細胞が、それにも拘わらず、対応ペプチドを含有する総タンパク質を負荷されている細胞を必ずしも認識しないことが知られている。このことは、ペプチドがしばしばプロテアーゼ切断部位を含有し、総タンパク質が細胞中でプロセスされている間に、該部位の範囲内で該ペプチドが切断され、そのため破壊されて；その結果として、該ペプチドがT細胞によってもはや認識されないという事実によって説明することができる。この問題は例えばFeltkamp et al. (1993), Eur. J. Im

40

50

munol. 23: 2242-2249において確認されている。

【0016】

それゆえ、本発明は、アミノ酸配列：

【0017】

【化6】

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL, VGHPYFPIKPNNNKILVPK,
 GLQYRVFRIHLDPDNKFGFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNLDDTE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA, DMVDTGFGAMDFTTLQANKS,
 VTVVDTTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
 PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAQCQKHTPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD,
 PLGRKFLQAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGPNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN, NNGVCWHNQLFVTVVDTTRS,
 PPPPTTSLVDTYRFVQSVAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLKFWNVDLKEKFSLDL,
 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE, VDLLCHEQLSDSEEENDEID,
 SEEENDEIDGVNHQHLPARR, SSADDLRAFQQLFLNLTLSFV, NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV, GMHGPKATL, HGPKATLQDI,
 MHGPKATL 又は FQQLFLNTL

10

20

【0018】

を有するT細胞エピトープ及び/又はその機能的に活性化変異体に関する。

本発明によるT細胞エピトープの機能的に活性化変異体は、T細胞の細胞傷害性試験系（例えば、本発明の実施例2～5を参照のこと）において、少なくとも、陰性対照の平均値と標準偏差の3倍との合計に相当する、本発明によるT細胞エピトープの細胞傷害性に比較して測定して、好ましくは少なくとも約30%、特に少なくとも約50%、そして特に好ましくは少なくとも約80%の細胞傷害性を有するT細胞エピトープであるとして理解される。

【0019】

好ましい変異体の例は、アミノ酸レベルで、本発明によるT細胞エピトープとの少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約75%、そして特に少なくとも約85%の配列相同性を有するT細胞エピトープである。他の好ましい変異体は、本発明によるT細胞エピトープとの構造相同性を有するT細胞エピトープでもある。このようなエピトープは、本発明によるT細胞エピトープに対する特異的T細胞を作製して（DeBruijn M. L. et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21, 2963-70; and DeBruijn M. L. (1992) Eur. J. Immunol. 22, 3013-20）、例えば、合成的に調製されたペプチドを、選択後に、ペプチド特異性T細胞（実施例参照）による認識に関して試験することによって見出すことができる。特に、T細胞エピトープは細胞傷害性T細胞エピトープ又はTヘルパー細胞エピトープ（ T_H , T_{H1} 又は T_{H2} ）を意味するとして理解される。しかし、同様にMHC I分子を認識することができる非細胞傷害性T細胞はまた、非細胞傷害性T細胞エピトープが本発明の変異体としても包含されるといったように知られる。

30

40

【0020】

本発明の他の実施態様は、化合物の一部であるT細胞エピトープであり、該化合物はパピロマウイルス由来の天然生成L1タンパク質ではなく、HPV-16 T細胞エピトープの場合には、パピロマウイルス由来の天然生成L1タンパク質の排他的N末端欠失及び排他的C末端欠失突然変異体ではない。例えば、該化合物は、本発明による同じ又は異なるT細胞エピトープの融合であることができる。

【0021】

50

特定の1実施態様では、本発明によるT細胞エピトープ及び/又は機能的に活性な変異体は、異なるパピロマウイルス由来のL1タンパク質中に又はキメラL1タンパク質、例えばHPV18 L1E7融合タンパク質又はHPV16 L1E7融合タンパク質中に存在しうる。本発明による、このような化合物は、CVLPsを形成する能力を有することができる。

【0022】

前記T細胞エピトープは好ましくは、化合物の一部として、好ましくは他のアミノ酸配列、特に融合タンパク質を含有するポリペプチドでありうる。特に、該化合物は長さにおいて少なくとも約50アミノ酸、好ましくは、少なくとも約35アミノ酸、特に少なくとも約20アミノ酸、そして特に好ましくは、少なくとも約9~12アミノ酸のポリペプチドであることができる。

10

【0023】

該化合物を検出する、又はT細胞への結合におけるその活性を修飾するために、該化合物はT細胞エピトープ及び/又は前記融合タンパク質の化学的、放射性同位体、非放射性同位体及び/又は蛍光標識を含有することができる。

【0024】

当業者(the skilled person)に知られた、そして本発明による化学的標識に適した化学物質の例は、ビオチン、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)及びストレプトアビジンである。

【0025】

可能な1実施態様は、ペプチドが少なくとも1つのリシンを含有するように修飾されることである。次に、ビオチン又はFITC(フルオレセインイソチオシアネート)がこのリシンに、当業者に知られた方法でカップリングする。この方法で修飾されたペプチドを適当なMHC分子に又は、適当なMHC分子を含有する細胞に結合させる。次に、該ペプチドを標識されたアビジン若しくはストレプトアビジンによって、又はFITCの蛍光を直接用いて検出することができる。

20

【0026】

当業者に知られた、そして本発明による放射性同位体標識に適した同位体の例は、³H、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³³P及び¹⁴Cである。

【0027】

当業者に知られた、そして本発明による非放射性同位体標識に適した同位体の例は、²H及び¹³Cである。

30

【0028】

当業者に知られた、そして本発明による蛍光標識に適した蛍光物質の例は、¹⁵²Eu、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド(o-phthaldehyde)及びフルオレスカミンである。

【0029】

本明細書に記載されないが、本発明の意味の範囲内での標識にやはり用いることができる他の標識を、当業者は熟知している。

40

【0030】

当業者に知られる、本発明による化学的修飾の例は、アセチル、ホスフェート及び/又は単糖基の転移(transfer)である。

【0031】

約50のアミノ酸長さを有する本発明によるポリペプチドは、例えば、化学的ペプチド合成を用いて調製することができる。長いポリペプチドは好ましくは組換えによって製造される。

【0032】

それゆえ、本発明は、例えば下記成分:(a)少なくとも1つの調節要素、及び(b)本発明による化合物のアミノ酸配列をコードする少なくとも1つの核酸を含有する、例えば

50

、前記T細胞エピトープ又は化合物を発現するための核酸にも関する。前記核酸構築体は好ましくはDNA又はRNAから構成される。適当な調節要素は、例えば、真核細胞における構成的、調節可能な、組織特異的、細胞サイクル特異的若しくは代謝特異的発現、又は原核細胞における構成的、代謝特異的若しくは調節可能な発現を可能にする。本発明によると、調節可能な要素はプロモーター、アクチベーター配列、エンハンサー、サイレンサー (silencers) 及び/又はリプレッサー配列である。

【0033】

真核細胞における構成的発現を可能にする、適当な調節可能な要素の例は、RNAポリメラーゼIIIによって認識されるプロモーター、又は例えばCMVエンハンサー、CMVプロモーター、SV40プロモーターとウイルスプロモーターのようなウイルスプロモーター及び、例えばHBV、HCV、HSV、HPV、EVB HTLV及びHIVに由来するアクチベーター配列である。

10

【0034】

真核細胞における調節可能な発現を可能にする調節可能な要素の例は、適当なリプレッサーと結合したテトラサイクリンオペレーターである (Gossen M. et al (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20)。

【0035】

真核細胞における組織特異的発現を可能にする調節可能な要素の例は、ある一定の細胞種類においてのみ発現されるタンパク質をコードするような遺伝子に由来する、プロモーター又はエンハンサーから構成されるアクチベーター配列のプロモーターである。

20

【0036】

真核細胞における細胞サイクル特異的発現を可能にする調節可能な要素の例は、下記遺伝子: cdc25C、cyclin A、cyclin E、cdc2、E2F、B-myb及びDHF1のプロモーターである (Zwicker J. and Muller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6)。

【0037】

真核細胞における代謝特異的発現を可能にする調節可能な要素の例は、酸素不足によって、グルコース欠乏によって、ホスフェート (phosphate) 濃度によって又は熱ショックによって制御されるプロモーターである。

【0038】

本発明による核酸は、例えば、DNAワクチンの製造に用いることもできる。このために、これらのエピトープと他の既知のパピローマウイルスエピトープとをコードする配列を任意の配列において直接一緒に、又はオープンリーディングフレームにおいて中間に幾つかのヌクレオチドを挟んで結合させることができる。さらに、例えば、得られたポリペプチド鎖を細胞内で特に小胞体中に、エンドソーム中に又はリソソーム中に向ける (targeting) ために用いられる非パピローマウイルスDNA配列を加えることができる。

30

【0039】

前記核酸を真核細胞又は原核細胞中にトランスフェクション、形質転換又は感染によって導入させることを可能にするために、該核酸はプラスミドとして、又はウイルスベクター若しくは非ウイルスベクターの一部として存在することができる。

40

【0040】

それゆえ、本発明は、本発明による核酸を含有するベクター、特に発現ベクターにも関する。これに関連して、特に適当なウイルスベクターは：バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス及びヘルペスウイルスである。これに関連して、特に適当な非ウイルスベクターは：ヴィロソーム、リポソーム、カチオン脂質及びポリリシン複合DNA (polylysine-conjugated DNA) である。

【0041】

その上、本発明はさらに、少なくとも1つのT細胞エピトープを含有する、好ましくは提

50

示する細胞にも関する。特定の1実施態様では、本発明によるペクターの1つで、細胞をトランスフェクト、形質転換又は感染させる。例えば、この細胞は、当業者に知られた、そしてその時点で用いられている調節可能な要素の活性化をもたらす条件下で、本発明によるポリペプチドを発現する。次に、例えば上記標識のいずれかを用いて、該ポリペプチドをこの細胞から単離して、精製することができる。原核細胞及び真核細胞、特に、例えば大腸菌のような細菌細胞、例えば*S. cerevisiae*のような酵母細胞、例えばスポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞 (Sf-9) 若しくはトリコプルシア・ナイ (*Trichoplusia ni*) 細胞のような昆虫細胞、又は例えばCOS細胞若しくはHEL細胞のような哺乳動物細胞が、組換え調製を行なうために適している。発現されている本発明による化合物を次に標準方法を用いて精製することができる。 10

【0042】

好ましい実施態様は、本発明によるポリペプチド自体を発現している細胞を用いることであり、特に好ましい実施態様では、細胞表面上に、MHC-1分子によって、本発明によるポリペプチドの一部を提示している細胞を用いることである。例えばB細胞、マクロファージ、樹枝状細胞、線維芽細胞又は他のHLA A2.01陽性細胞のような抗原提示細胞、好ましい実施態様では、JY、T2若しくはCaSki細胞又はEBV形質転換B細胞系 (BLCLs) が本発明による細胞の作製のために適している。T細胞エピトープを含有するポリペプチドを提示する、本発明による細胞を、免疫細胞、特にT細胞を再刺激するため及び/又はT細胞の活性化を測定するための標的細胞として用いることができる。本発明の意味の範囲内で、標的細胞とは、MHC分子によってT細胞エピトープを提示し、それによって、T細胞活性化、特に該細胞に対する細胞傷害性T細胞反応を特異的に誘出する細胞であると理解すべきである。 20

【0043】

その上、T細胞エピトープを含有する化合物は、この化合物が共有結合によって、又は疎水性相互作用、イオン結合若しくは水素結合によって、例えばペプチド、タンパク質、ペプトイド、直鎖若しくは分枝鎖オリゴ糖又は多糖類及び核酸のような、少なくとも1つの他の種に結合しているという事実を特徴とする複合体の一部であることができる。

【0044】

それゆえ、本発明は、T細胞エピトープ又は化合物及び少なくとも1つの他の化合物を含有する複合体に関する。好ましい実施態様は、ポリペプチドがMHCクラスI分子と結合して、例えばHLA A2.01 (又は他にHLA A1, HLA A24等) テトラマーとして存在することである。ヒトMHCクラスI分子が特に好ましい。例えば、Altman J. D. 等の手法 (1996, Science 274, 94-6) を、例えば、ペプチド特異的細胞傷害性T細胞のT細胞受容体に結合することができる、適当に結合したペプチドを含有するHLA A2.01テトラマーを調製するために用いることができる。 30

【0045】

他の実施態様は、本発明による化合物又は前記複合体を担体物質上に固定する実施態様である。適当な担体物質の例は、セラミック、金属、特に貴金属、ガラス、プラスチック、結晶質物質、又は担体、特に前記物質の薄層、又は例えばセルロース若しくは構造タンパク質のような(バイオ)分子フィラメントである。 40

【0046】

本発明による複合体を精製するために、複合体の1成分は付加的にタンパク質タグを含有することができる。本発明によるタンパク質タグは、例えば、マトリックスへの高アフィニティ吸収、該複合体を有意な程度に溶出させない、適当なバッファーによるストリンジエント (stringent) 洗浄、及び吸収された該複合体のその後の選択的溶出を可能にする。当業者に知られたタンパク質タグの例は、(HIS)。タグ、Mycタグ、FLAGタグ、ヘマグルテニン・タグ、グルタチオン・トランスフェラーゼ (GST) タグ、インテイン含有アフィニティキチン結合タグ又はマルトース結合タンパク質 (MBP) 50

タグである。本発明によるタンパク質タグはN末端に、C末端に及び/又は内部に配置されることができる。

【0047】

本発明は、T細胞エピトープを含有する少なくとも1つの化合物を用いて、T細胞の活性化を *in vitro* 検出するための方法に関する。このような方法は好ましくは3工程から成る：

(a) 第1工程では、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープで、好ましくは、本発明によるT細胞エピトープを含有する少なくとも1つの化合物で細胞を刺激する。この化合物は、T細胞エピトープを含有する、本発明による少なくとも1つの化合物、T細胞エピトープを含有する、少なくとも1つの複合体、少なくとも1つのキャプソメア、少なくとも1つの安定なキャプソメア、少なくとも1つのVLP、少なくとも1つのCVLP及び/又は少なくとも1つのウイルスを意味することができる。好ましい実施態様では、免疫細胞をCVLPsと共にインキュベートすることによって刺激する。この刺激は、例えば、ワクチン接種 (*vaccination*) として又は免疫細胞を *in vitro* でCVLPsと共にインキュベートすることによって行なうことができる。この方法で刺激された免疫細胞を例えばワクチン接種後に又は腫瘍患者の場合には、血液から、腫瘍から又はリンパ節から単離し、及び/又は培養する。

10

【0048】

(b) 第2工程では、細胞を、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープと共に、T細胞エピトープを含有する、本発明による少なくとも1つの化合物と共に、T細胞エピトープを提示する少なくとも1つの標的細胞と共に及び/又は本発明による少なくとも1つの複合体と共にインキュベートする。

20

【0049】

(c) 第3工程では、T細胞の活性化を検出する。このために適した方法は、例えば、T細胞によるサイトカインの産生若しくは分泌を検出する、T細胞の表面分子の発現を検出する、標的細胞の溶解 (*lysis*) を検出する又は細胞の増殖を検出する方法である。このために適当である手段の例は、サイトカイン・アッセイ (*chapter 6.2 to 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strobe* 30
r W., John Wiley & Sons)、ELISPOT (*chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, 上記参照*)、⁵¹Cr放出試験 (*chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, 上記参照*)、又は増殖の検出 (*chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, 上記参照*)。これに関連して、用いる手段に依存して、例えば細胞傷害性T細胞、Tヘルパー細胞、B細胞、NK細胞のような免疫細胞と他の細胞とを識別することも可能である。本発明による標識を含有する、本発明による化合物、複合体及び/又は細胞の使用は、標識された化合物、複合体及び/又は細胞の、T細胞への結合を検出することによって、T細胞エピトープを認識するT細胞を検出することを可能にする。好ましい実施態様では、本発明によるMHC/ポリペプチド複合体のT細胞表面への結合を検出する。これは、MHC複合体自体を標識する、例えば蛍光標識することによって、又は適切な (*in order*)、他の工程で、再度、MHC複合体を検出するためにMHC特異的標識された、例えば蛍光標識された抗体を用いることによって行なうことができる。次に、蛍光活性化セルソーター (*cell sorter*) (FACS) において、T細胞の蛍光標識を測定して、分析することができる。T細胞への該複合体の結合を検出するための他の可能性は、この場合も、T細胞活性化を測定する可能性である (サイトカイン・アッセイ、Elispot、⁵¹Cr放出試験又は増殖、上記参照)。しかし、これをするためには、例えば補受容体 (*coreceptor*) 特異的抗体 (*anti-CD28*) 及び/又は他の非特異的アクチベーター (*IL-2*) による補受容体 (例えば、*CD28*) の同時刺激が必 40 50

要である。

【0050】

本発明はまた、工程(a)の後に挿入される追加工程(a')を含有する方法に関する。

【0051】

(a')工程(a)に続く、この追加工程(a')では、単離された又は培養された細胞を、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの化合物、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体、少なくとも1つのキャプソミア、少なくとも1つの安定なキャプソミア、少なくとも1つのVLP、少なくとも1つのCVLP及び/若しくは少なくとも1つのウイルスを負荷された少なくとも1つの標的細胞と共に、並びに/又はT細胞エピトープを提示する少なくとも1つの標的細胞と共に、工程(b)が次に行なわれる前に、少なくとも約8週間、特に少なくとも約1週間共存培養する。

10

【0052】

共存培養は、同じ増殖培地中及び同じ組織培養容器における、

(i)本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する本発明による化合物、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体、少なくとも1つのキャプソミア、少なくとも1つの安定なキャプソミア、少なくとも1つのVLP、少なくとも1つのCVLP及び/又は少なくとも1つのウイルスを負荷された少なくとも1つの標的細胞の存在下で、

20

(ii)T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体の存在下で、

(iii)本発明によるT細胞エピトープを提示する少なくとも1つの標的細胞の存在下での細胞の増殖を意味すると理解すべきである。

【0053】

本発明はまた、T細胞エピトープを提示する標的細胞の調製方法にも関する。これに関連して、該標的細胞に異なるT細胞エピトープの組み合わせを負荷させることができる。好ましい実施態様では、標的細胞を、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する少なくとも1つの化合物及び/又はT細胞エピトープを含有する少なくとも1つの複合体と共にインキュベートする。特に好ましい実施態様では、標的細胞を、本発明によるポリペプチドを含有する増殖培地中で、又は本発明による結合ポリペプチドを含有するMHCクラスI複合体と共にインキュベートする。MHCクラスI複合体は例えばHLA A2.01テトラマーとして存在することができる。原則として、テトラマーはこれに関連して4ペプチドを結合する。これらのペプチドは同じであることも、ペプチドの異なる種を表すこともできる。他の好ましい実施態様では、標的細胞を本発明による核酸によって及び/又は本発明によるベクターによってトランスフェクトさせる、形質転換させる及び/又は感染させる。特に好ましい実施態様では、標的細胞をワクシニアウイルスベクターで感染させる。本発明による方法は、抗原を提示する細胞を用いて、例えば、B細胞、マクロファージ、樹枝状細胞、胚芽細胞又は線維芽細胞又は他のHLA陽性細胞を用いて、1実施態様では、JY、T2若しくはCaSki細胞又はEBV形質転換B細胞系を用いて、行なわれる。

30

【0054】

用いられるCVLPsは、パピローマウイルスL1タンパク質又はその変異体、特にHPV16L1タンパク質、及び必然的ではないとしても、L1に対して異種(heterologous)であるタンパク質又はその変異体を含有する。該2タンパク質は、それらが直接又は間接的に結合している形態で存在することができる。本発明の意味の範囲内で、直接結合したとは、2つのタンパク質の間に共有結合、例えばペプチド結合又はジスルフィド結合が存在することを意味する。間接的に結合したとは、これらのタンパク質が非共有結合によって、例えば疎水性相互作用、イオン結合又は水素結合によって結合することを意味する。他の実施態様では、CVLPsは、L1タンパク質又はその変異体の他に、パピローマウイルスL2タンパク質を含有する。

40

【0055】

50

本発明の L 1 タンパク質の好ましい実施態様の例は、1つ以上の欠失、特に C 末端欠失を含有する L 1 タンパク質によって代表される。C 末端欠失は、ウイルス様粒子の形成効率が、C 末端に位置付けられる核局在化シグナルが欠失するので、増加しうるという利点を有する。それゆえ、C 末端欠失は、好ましくは、総計で約 35 アミノ酸にまで、特に約 25 ~ 約 35 アミノ酸、とりわけ約 32 ~ 約 34 アミノ酸になる。例えば、32 アミノ酸長さの HPV 16 L 1 タンパク質の C 末端欠失は、ウイルス様粒子の形成を少なくとも約 10 倍増加させうるために充分である。その上、L 1 タンパク質は 1 つ以上の突然変異を有することができる、又は L 1 部分は、異なるパピローマウイルスからの L 1 タンパク質から構成することができる。本発明による L 1 タンパク質が共通に有する特徴は、それらが V L P s 又は C V L P s の形成を可能にすること、及びそれらが本発明による少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含有することである。

10

【0056】

好ましい実施態様では、L 1 タンパク質又はその変異体と、L 1 に対して異種であるタンパク質とは融合タンパク質を形成する。これはまた、幾つかの異なるタンパク質又はそれらの部分から構成される異種タンパク質を包含する。これらはまた、例えば、タンパク質のエピトープ、特に細胞傷害性 T 細胞エピトープでもありうる。これに関連して、本発明の意味の範囲内でのエピトープは、約 50 アミノ酸、好ましくは少なくとも約 35 アミノ酸、特に少なくとも約 20 アミノ酸、そして特に好ましくは、少なくとも約 9 アミノ酸の長さを有する合成ポリペプチドの一部でもあることができる。

【0057】

ウイルスタンパク質に由来する、例えば、HIV、HBV 又は HCV に由来する、好ましくはパピローマウイルス、特にヒトパピローマウイルスに由来する L 1 異種タンパク質が好ましい。

20

【0058】

好ましい実施態様では、この L 1 異種タンパク質はパピローマウイルス E タンパク質、好ましくは E 6 タンパク質及び / 又は E 7 タンパク質である。欠失 E タンパク質、好ましくは C 末端欠失 E タンパク質、特に C 末端欠失 E 7 タンパク質である E タンパク質が特に好ましい、この理由は、これらの構築体が欠失 L 1 タンパク質と結合して、ウイルス様粒子を優先的に形成することができるからである。55 アミノ酸まで、好ましくは約 5 ~ 約 55 アミノ酸、特に約 38 ~ 約 55 アミノ酸の欠失が特に好ましい。

30

【0059】

他の実施態様では、L 1 異種タンパク質は、非ウイルス病原体に由来する抗原から得ることができる。これらはまた、例えばチログロブリン、ミエリン塩基性タンパク質又は透明帯糖タンパク質 3 (Z P ₃) のような自己免疫抗原から得ることもでき、これらの自己免疫抗原は特定の自己免疫疾患、例えば、甲状腺炎、多発性硬化症、卵巣炎又はリウマチ性関節炎に随伴する。好ましい実施態様では、L 1 異種タンパク質を腫瘍抗原から、好ましくは黒色腫瘍抗原、例えば MART から、卵巣癌抗原、例えば Her 2 neu (c - e r b B 2)、BCRA - 1 若しくは CA 1 2 5、結腸癌抗原、例えば CA 1 2 5、又は乳癌抗原、例えば Her 2 neu (c - e r b B 2)、BCRA - 1 若しくは BCRA - 2 から得る。

40

【0060】

本発明はまた、サンプルから T 細胞を調製することによって得られる T 細胞の活性化の *in vitro* 検出方法にも関する。この方法は、サンプル中、例えば、患者からの血液サンプル中、又は腫瘍患者からの腫瘍若しくはリンパ節中にパピローマウイルス L 1 タンパク質特異的細胞傷害性 T 細胞が存在するか否かを判定することを可能にする。この検出方法は下記工程を含有する：

(a) 第 1 工程では、例えば、患者から血液を採取することによって、又は例えば腫瘍若しくはリンパ節を切開することによって細胞を得る。これらの細胞を次に増殖培地中に入れて、培養する。

【0061】

50

(b) 第2工程では、T細胞エピトープを提示する、少なくとも1つの標的細胞と共に、又は成分としてT細胞エピトープ含有化合物を包含する、少なくとも1つの複合体と共に細胞をインキュベートする。

【0062】

(c) 第3工程では、T細胞の活性化を測定する。このために適した方法は、例えば、T細胞によるサイトカインの産生若しくは分泌を検出し、T細胞上の表面分子の発現を検出する、標的細胞の溶解を検出する、又は細胞の増殖を検出する方法である。このために適した手段の例は、サイトカイン・アッセイ (chapter 6.2 to 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M. and Strober W., John Wiley & Sons)、ELISPOT (chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology、上記参照)、⁵¹Cr放出試験 (chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology、上記参照) 又は増殖の検出 (chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology、上記参照) である。これに関連して、用いる手段に依存して、例えば細胞傷害性T細胞、Tヘルパー細胞、B細胞、NK細胞のような免疫細胞と他の細胞とを識別することも可能である。標識を含有する、本発明による化合物、複合体及び/又は細胞の使用は、標識された化合物、複合体及び/又は細胞の、T細胞への結合を検出することによって、T細胞エピトープを認識するT細胞を検出することを可能にする。好ましい実施態様では、本発明によるMHC/ポリペプチド複合体のT細胞表面への結合を検出する。これは、MHC複合体自体を標識する、例えば蛍光標識することによって、又は適切な、他の工程で、再度、MHC複合体を検出するためにMHC特異的標識された、例えば蛍光標識された抗体を用いることによって行なうことができる。次に、蛍光活性化セルソーター (cell sorter) (FACS) において、T細胞の蛍光標識を測定して、分析することができる。T細胞への該複合体の結合を検出するための他の可能性は、この場合も、T細胞活性化を測定する可能性である (サイトカイン・アッセイ、Elispot、⁵¹Cr放出試験又は増殖、上記参照)。しかし、これをするためには、例えば補受容体特異的抗体 (anti-CD28) 及び/又は他の非特異的アクチベーター (IL-2) による補受容体 (例えば、CD28) の同時刺激が必要である。

【0063】

本発明はまた、工程 (a'') の後に挿入される追加工程 (a') を含有する方法に関する。

【0064】

(a') 工程 (a'') に続く、この追加工程 (a') では、単離された又は培養された細胞を、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する本発明による1つの化合物、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体、少なくとも1つのキャプソメア、少なくとも1つの安定なキャプソメア、少なくとも1つのVLP、少なくとも1つのCVLP及び/若しくは少なくとも1つのウイルスを負荷された少なくとも1つの標的細胞と共に、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体と共に、並びに/又はT細胞エピトープを提示する少なくとも1つの標的細胞と共に、工程 (b) が次に行なわれる前に、少なくとも約8週間、特に少なくとも約1週間共存培養する。

【0065】

共存培養は、同じ増殖培地中及び同じ組織培養容器における、

(i) 本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する本発明による化合物、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体、少なくとも1つのキャプソメア、少なくとも1つの安定なキャプソメア、少なくとも1つのVLP、少なくとも1つのCVLP及び/又は少なくとも1つのウイルスを負荷された

少なくとも1つの標的細胞の存在下で、

(i i) T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体の存在下で、
(i i i) T細胞エピトープを提示する少なくとも1つの標的細胞の存在下での細胞の増殖を意味すると理解すべきである。

【 0 0 6 6 】

本発明はまた、T細胞の活性化を *in vitro* 検出するための試験系(キット)であって、(a)本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、本発明による少なくとも1つの化合物、本発明による少なくとも1つのベクター、本発明による少なくとも1つの細胞、及び/又は本発明による少なくとも1つの複合体、及び(b)免疫系のエフェクター細胞、好ましくはT細胞、特に細胞傷害性T細胞又はTヘルパー細胞を含む前記試験系に関する。

10

【 0 0 6 7 】

特定の1実施態様では、該試験系は、例えば、患者からの血液サンプル中に又は腫瘍患者の腫瘍若しくはリンパ節中に存在するL1タンパク質特異的細胞傷害性T細胞を検出するために用いられる。この場合に、(b)に記載した細胞は、試験系中に存在する対照細胞であり、第1キット成分、即ち、(a)に記載した物質によるその活性化は標準として役立つ。この反応において観察される活性化を、患者から単離された細胞のキット成分(a)によるT細胞活性化と比較する。

【 0 0 6 8 】

他の好ましい実施態様では、この該試験系は、例えば、T細胞エピトープを含有する化合物、T細胞エピトープを含有する複合体、キャプソメア、安定なキャプソメア、VLP、CVLP及び/又はウイルスのL1タンパク質特異的抗原性を評価するために用いられる。この場合に、(a)に記載した物質は、第2キット成分、即ち、(b)に挙げた細胞に対するその活性化効果が基準として役立つような対照物質である。この反応において観察される活性化を、キット成分(b)に対する、T細胞エピトープを含有する化合物、T細胞エピトープを含有する複合体、キャプソメア、安定なキャプソメア、VLP、CVLP及び/又はウイルスの活性化効果と比較する。

20

【 0 0 6 9 】

その上、本発明は、免疫応答を誘発するため又は検出するための、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの化合物、T細胞エピトープを含有する化合物をコードする核酸を含有する、本発明による少なくとも1つのベクター、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの細胞及び/又はT細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの複合体の使用に関する。

30

【 0 0 7 0 】

それらのMHCクラス1分子によって本発明による少なくとも1つの分子を提示する細胞は、*in vitro*及び*in vivo*の両方において免疫細胞を刺激するために特に適する。抗原提示のために適した細胞の例は、免疫細胞と共に培養されることによって特異的T細胞の刺激を達成することができる、B細胞、樹枝状細胞、マクロファージ、線維芽細胞又は他のHLA陽性細胞である。

40

【 0 0 7 1 】

特定の1実施態様では、本発明による化合物、例えば、本発明によるT細胞エピトープを付加的に含有するHPV18 L1E7融合タンパク質を免疫応答の検出に用いることができる。本発明によるこのような化合物は、CVLPsを形成する能力を有することができる。

【 0 0 7 2 】

本発明はまた、本発明による少なくとも1つのT細胞エピトープ、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの化合物、T細胞エピトープを含有する化合物をコードする核酸を含有する少なくとも1つのベクター、T細胞エピトープを含有する本発明による少なくとも1つの細胞及び/又はT細胞エピトープを含有する本発明による少なくと

50

も1つの複合体と、必要な場合には、製薬的に受容されるキャリアーを含む薬剤又は診断剤に関する。

【0073】

当業者に知られたキャリアーの例は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然若しくは修飾セルロース(modified cellulose)、ポリアクリルアミド、アガロース、水酸化アルミニウム及びマグネシウム(magnitide)である。

【0074】

本発明による薬剤又は診断剤は溶解状態で、固体マトリックスに結合して、及び/又はアジュバントと混合して存在することができる。

10

【0075】

該薬剤又は診断剤は多様な方法で投与することができる。当業者に知られた投与形の例は、例えば、経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内及び/又は局所投与による、非経口、局部及び/又は全身投与である。好ましい投与形は、例えば、一定のパピローマウイルス感染の自然感染経路によって影響される。投与される量は患者の年齢、体重及び全身健康状態、並びにパピローマウイルス感染のタイプに依存する。該薬剤又は診断剤はカプセル、溶液、懸濁液、エリキシル剤(経口投与用)又は無菌溶液若しくは懸濁液(非経口若しくは鼻腔内投与用)の形態で投与することができる。リン酸塩緩衝化された塩溶液である塩溶液を例えば不活性な、免疫学的に受容されるキャリアーとして用いることができる。該薬剤は治療的に有効な量で投与される。これは、保護的免疫応答を導出するために充分である量を意味する。

20

【0076】

特定の1実施態様では、本発明による化合物、例えば、付加的に本発明によるT細胞エピトープを含有するHPV18 L1 E7融合タンパク質を薬剤又は診断剤として用いることができる。本発明によるこのような化合物は、CVLPsを形成する能力を有することができる。

【0077】

図面及び下記実施例は、本発明を限定することなく、本発明を明確にするように意図される。

【0078】

実施例

30

1. 出発物質の説明

HPV16 L1_C*E7₁₋₅₅ CVLPsはドイツ特許出願DE 19812941に記載されているように調製した。Muller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111も参照のこと。

【0079】

PBMCは末梢血単核細胞を意味し、これの単離は例えばRudolf M. P. et al. (1999), Biol. Chem. 380, 335-40に記載されている。

【0080】

BLCCLは、各場合にEpstein-Barrウイルスで形質転換され、各血液ドナーの場合に個別に調製されたB細胞系を意味する(Dr Andreas Kaufmann, Jena, Germanyから入手)。

40

【0081】

CVLP刺激されたネズミT細胞は、次のようにして得た：

354数の(354 several)C57BL/6マウス又はC₃Hマウスを各場合にHPV16 L1_C*E7₁₋₅₅ CVLPs又はHPV18 L1_CDIE7_{1-53DI} CVLPsとHPV18 L1_CDIE7_{1-60DI} CVLPsとから成る1:1混合物によって、又は対照の場合にはバッファーによって2回免疫化した(immunized)。2週間後に、脾臓細胞を標準方法を用いて単離した。

50

【0082】

脾臓細胞は次のようにして得た：

非接種マウスから脾臓を摘出して、脾臓細胞を標準方法を用いて再懸濁させた。

【0083】

細胞に関連して、APCは抗原提示細胞を意味する。

JAWS細胞はATCC(CRL-11904)から入手した。

【0084】

LKKはATCC(CCL-1)から入手した。

RMA細胞はC57BL/6マウスの胸腺腫から得た(Ljunggren H. G. and Karre K. (1985) J. Exp. Med. 162, 1745-59)。

【0085】

- マウスCD8/PEは、ネズミCD8の細胞外部分に対して向けられ、蛍光標識フィコエリトリンを含有するラットモノクローナル抗体を意味する(Pharmingen, Heidelberg, Germany)。

【0086】

- マウスCD4/シクロム(cychrome)は、ネズミCD4の細胞外部分に対して向けられ、蛍光標識シクロムを含有するラットモノクローナル抗体を意味する(Pharmingen, Heidelberg, Germany)。

【0087】

- マウスIFN / FITCは、ネズミインターフェロン に対して向けられ、蛍光標識FITCを含有するラットモノクローナル抗体を意味する(Caltag, Hamburg, Germany)。

【0088】

- ヒトCD8/APCは、ヒトCD8の細胞外部分に対して向けられ、蛍光標識APCを含有するマウスモノクローナル抗体を意味する(Caltag, Hamburg, Germany)。

【0089】

- ヒトCD4/PerCPは、ヒトCD4の細胞外部分に対して向けられ、蛍光標識PerCPを含有するマウスモノクローナル抗体を意味する(Becton Dickinson, Hamburg, Germany)。

【0090】

- ヒトIFN / FITCは、ヒトインターフェロン に対して向けられ、蛍光標識FITCを含有するマウスモノクローナル抗体を意味する(Caltag, Hamburg, Germany)。

【0091】

- ヒトIL4/PEは、ヒトインターロイキン4に対して向けられ、蛍光標識フィコエリトリンを含有するマウスモノクローナル抗体を意味する(Caltag, Hamburg, Germany)。

【0092】

ヒトGM-CSF (Leukomax)は、Novartis Pharma GmbH (Nurnberg, Germany)から入手した。

【0093】

ヒトIL4は、Becton Dickinson (Hamburg, Germany)から入手した。

ヒトIL2は、Becton Dickinson (Hamburg, Germany)から入手した。

【0094】

Monensinは、Sigma (Deisenhofen, Germany)から入手した。

Triton X100は、Sigma (Deisenhofen, Germany) から入手した。

【0095】

細胞は、各場合に、10%ウシ胎仔血清、カナマイシン及びアンピシリンを含有するRPMI培地 (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) 中、37及び5%CO₂において培養した。

【0096】

Lumaプレート及びCanberra-Packerd B-Plate CounterはCanberra-Packerd, Dreieich, Germanyから入手した。

10

【0097】

FACScan Caliburは、“蛍光活性化セルソーター”を意味する；この装置は、Becton Dickinson (Hamburg, Germany) から入手した。

【0098】

Cellquestソフトウェアは、Becton Dickinson (Hamburg, Germany) から入手した。

【0099】

各場合に9アミノ酸だけオーバーラップし、HPV16 L1及びE7タンパク質の配列をカバーする20マー・ペプチドを合成した。これらのペプチドに1から52まで連続的に番号を付けた。これらの名称及びこれらの配列を下記表にまとめる。

20

【0100】

表1：HPV16 L1及びE7の合成オーバーラップ20マーペプチド

【0101】

【化7】

ペプチド 番号	配列	相対的位置	
HPV16 L1 ペプチド			
P1	MSLWLPSEATVYLPPVPVSK	1 -20	
P2	YLPPVPVSKVVSTDEYVART	12 -31	
P3	STDEYVARTNIYYHAGTSRL	23 -42	
P4	YYHAGTSRLLAVGHPYFPIK	34 -53	
P5	VGHPYFPIKKPNNNKILVPK	45 -64	
P6	NNNKILVPKVSGLQYRVFRI	56 -75	10
P7	GLQYRVFRIHLDPNKFQFP	67 -86	
P8	PDPNKFQFPDTSFYNPDTQR	78 -97	
P9	SFYNPDTQRLVWACVGEVVG	89 -108	
P10	WACVGEVVGRRGQPLGVGISG	100 -119	
P11	QPLGVGISGHPLLNKLDDE	111 -130	
P12	LLNKLDDETNASAYAANAGV	122 -141	
P13	SAYAANAGVDNRECISMDYK	133 -152	
P14	RECISMDYKQTQLCLIGCKP	144 -163	
P15	QLCLIGCKPPIGEHWGKGSF	155 -174	
P16	GEHWGKGSFCTNVAVNPDC	166 -185	20
P17	NVAVNPDCPPLELINTVIQ	177 -196	
P18	LELINTVIQDGMVDTGFGA	188 -207	
P19	DMVDTGFGAMDFTTLQANKS	199 -218	
P20	FTTLQANKSEVPLDICTSIC	210 -229	
P21	PLDICTSICKYPDYIKMVSE	221 -240	
P22	PDYIKMVSEPYGDSLFFYL	232 -251	
P23	GDSLFFYLRRREQMFRHLFN	243 -262	
P24	QMFVRHLENRAGAVGENVPD	254 -273	
P25	GAVGENVPDDLYIKGSGSTA	265 -284	
P26	YIKGSGSTANLASSNYFPTP	276 -295	30
P27	ASSNYFPTPSGSMVTSDAQI	287 -306	
P28	SMVTSDAQIFNKPYWLQRAQ	298 -317	
P29	KPYWLQRAQGHNNGICWGNQ	309 -328	
P30	NNGICWGNQLFVTVDTRRS	320 -339	
P31	VTVDTRRSTNMSLCAAIST	331 -350	
P32	MSLCAAISTSETTYKNTNFK	342 -361	
P33	TTYKNTNEKEYLRHGEEYDL	353 -372	
P34	LRHGEEYDLQFIFQLCKITL	364 -383	
P35	IFQLCKITLTADVMTYIHSM	375 -394	40

【 0 1 0 2 】

【 化 8 】

P36	DVMTYIHSMNSTILEDWNFG	386 -405
P37	TILEDWNFGLQPPPGGTLED	397 -416
P38	PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA	408 -427
P39	RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE	419 -438
P40	KHTPPAPKEDPLKKYTFWEV	430 -449
P41	LKKYTFWEVNLKEKFSADLD	441 -460
P42	KEKFSADLDQFPLGRKFLQ	452 -471
P43	PLGRKFLQAGMHGDTPTLH	463 -473 及び E7 1-9

HPV16 E7 ペプチド

10

P44	MHGDTPTLHEYMLDLQPETT	1 -20
P45	MLDLQPETTDLYCYEQLNDS	12 -31
P46	YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA	23 -42
P47	EEDEIDGPAGQAE PDRAHYN	34 -53
P48	AEPDRAHYNIVTFCKCDST	45 -64
P49	TFCKCDSTLRRLCVQSTHVD	56 -75
P50	LCVQSTHVDIRTLEDLLMGT	67 -86
P51	TLEDLLMGT LGIVCPICSQKP	78 -97

【 0 1 0 3 】

20

” HPV 1 6 L 1 ペプチドプール ” は、ペプチド P 1 ~ P 4 3 の混合物を意味するとして理解され、” HPV 1 6 E 7 ペプチドプール ” は、ペプチド P 4 4 ~ P 5 1 の混合物を意味するとして理解される。

【 0 1 0 4 】

HPV 1 8 L 1 及び E 7 タンパク質の配列をカバーし、各場合に 9 アミノ酸だけオーバーラップする 2 0 マーペプチドも合成した。これらのペプチドに 1 から 5 2 まで連続的に番号を付けた。これらの名称及び配列を下記表にまとめる。

【 0 1 0 5 】

表 2 : HPV 1 8 L 1 及び E 7 の合成オーバーラップ 2 0 マーペプチド

【 0 1 0 6 】

30

【 化 9 】

ペプチド 番号	配列	相対的位置	
HPV18 L1 ペプチド			
Q1	MALWRPSDNTVYLPSPVAR	1 -20	
Q2	YLPSPVARVVNTDDYVTRT	12 -31	
Q3	NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL	23 -42	
Q4	FYHAGSSRLLTVGPNYFRVP	34 -53	
Q5	VGNPNYFRVPAGGGNKQDIPK	45 -64	
Q6	GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV	56 -75	10
Q7	AYQYRVFRVQLPDPNKFGLP	67 -86	
Q8	PDPNKFGLPDTSIYNPETQR	78 -97	
Q9	SIYNPETQRLVWACAGVEIG	89 -108	
Q10	WACAGVEIGRGQPLGVGLSG	100 -119	
Q11	QPLGVGLSGHPFYNKLDDTE	111 -130	
Q12	FYNKLDDESSHAATSNVSE	122 -141	
Q13	HAATSNVSEDRVNDVSDYK	133 -152	
Q14	RDNVSDYKQTQLCILGCAP	144 -163	
Q15	QLCILGCAPAIGEHWAKGTA	155 -174	20
Q16	GEHWAKGTACKSRPLSQGDC	166 -185	
Q17	SRPLSQGDCPPLELKNVLE	177 -196	
Q18	LELKNVLEEDGDMVDTGYGA	188 -207	
Q19	DMVDTGYGAMDFSTLQDTKC	199 -218	
Q20	FSTLQDTKCEVPLDICQSIC	210 -229	
Q21	PLDICQSICKYPDYLQMSAD	221 -240	
Q22	PDYLQMSADPYGDSMFFCLR	232 -251	
Q23	GDSMFFCLRREQLFARHFWN	243 -262	
Q24	QLFARHFWNRAGTMGDTVPO	254 -273	
Q25	GTMGDTVPOSLYIKGTGMRA	265 -284	30
Q26	YIKGTGMRASPGSCVYSPSP	276 -295	
Q27	GSCVYSPSPSGSIVTSDSQL	287 -306	
Q28	SIVTSDSQLFNKPYWLHKAQ	298 -317	
Q29	KPYWLHKAQGHNNVCWHNQ	309 -328	
Q30	NNVCWHNQLFVTVVDTTRS	320 -339	
Q31	VTVVDTTRSTNLTIQASTQS	331 -350	
Q32	LTIQASTQSPVPGQYDATKF	342 -361	
Q33	PGQYDATKFKQYSRHVEEYD	353 -372	
Q34	YSRHVEEYDLQFIFQLCTIT	364 -383	
Q35	FIFQLCTITLTADVMSYIHS	375 -394	40

【 0 1 0 7 】

【 化 1 0 】

Q36	ADVMSYIHSMNSSILEDWNF	386-405
Q37	SSILEDWNFGVPPPTTSLV	397-416
Q38	PPPTTSLVDTYRFVQSVAI	408-427
Q39	YRFVQSVAITCQKDAAPAEN	419-438
Q40	QKDAAPAENKDPYDKLKFWN	430-449
Q41	PYDKLKFWNVDLKEKFSLDL	441-460
Q42	LKEKFSLDLDQYPLGRKFLV	452-471
Q43	YPLGRKFLVQAGMHGPKATL	463-474 及び E7 1-8

10

HPV18 E7 ペプチド

Q44	MHGPKATLQDIVLHLEPQNE	1 - 20
Q45	VLHLEPQNEIPVDLLCHEQL	12 - 31
Q46	VDLLCHEQLSDSEEENDEID	23 - 42
Q47	SEEENDEIDGVNHQHLPARR	34 - 53
Q48	NHQHLPARRAEPQRHTMLCM	45 - 64
Q49	QRHTMLCMCKCEARIKLV	56 - 75
Q50	KCEARIKLVVSSADDLRAF	67 - 86
Q51	SSADDLRAFQQLFLNTLSFV	78 - 97
Q52	LFLNTLSFVCPWCASQQ	89-104

20

【0108】

”HPV18 L1 ペプチドプール”は、ペプチドQ1～Q43の混合物を意味するとして理解され、”HPV18 E7 ペプチドプール”は、ペプチドQ44～Q52の混合物を意味するとして理解される。

【0109】

2. HPV18 L1 C D I E 7₁₋₅₃ D I C V L P s 及び HPV18 L1 C D I E 7₁₋₆₀ D I C V L P s の調製

(a) 構築体の調製

個々のパピロームウイルス特異的タンパク質をコードする核酸を、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）増幅によって、遺伝子ライブラリーから単離して、クローン化した。HPV18ゲノムは、GenBank Accession No. X05015で広く入手することができ、Cole及びDanos（J. Mol. Biol. 1987, 193（4）, 599-608）によって発表されている。

30

【0110】

この他に、本発明による融合タンパク質を構築するための基礎として用いた配列は、L1遺伝子における下記変化を示した：DNAレベルで、L1遺伝子中の位置89、848、1013及び1230においてCがGと交換された。タンパク質レベルでは、最初の3変化はArgによるProの交換を生じるが、最後の突然変異はタンパク質レベルでの如何なる変化も生じない。E7遺伝子は発表された配列に対応する。

40

【0111】

所望の核酸を得る他の方法は、いぼ又は腫瘍から直接パピロームウイルス特異的遺伝子を単離するためにPCRを用いることである。HPV16及びHPV18 E6とE7遺伝子のための適当なプライマーは、例えばWO93/21958に開示されている。所望の核酸を扱った他の参考文献（literature references）の例は、Kirnbaum, R.等（1994）のJ. Virol., 67, 6929-6936又は既に上述した、EMBLデータベースに寄託されたクローンである。

【0112】

HPV18 L1 C D I を調製するために、HPV18 L1 オープンリーディングフレーム（ORF）に相補的である2つのプライマーを構築した。第1プライマーは配列：

50

【 0 1 1 3 】

【 化 1 1 】

5'-ACC AGA CTC GAG ATG GCT TTG TGG CGG CCT AGT GAC-3'

【 0 1 1 4 】

を有し、第 2 プライマーは配列：

【 0 1 1 5 】

【 化 1 2 】

5'-ATA GCC AAG CTT AAT GAT ATC CTG AAC CAA AAA TTT ACG TCC-3'

【 0 1 1 6 】

を有する。

第 1 プライマーは、X h o I 制限酵素切断部位 5' をコードする。第 2 プライマーは E c o R V 制限酵素切断部位 5' をコードする。HPV 18 L1 ORF の最後の 35 アミノ酸を欠失させるために、E c o R V 部位の後に T A A 翻訳終止コドンをつける。PCR 生成物を X h o I / E c o R V によって切断して、やはり X h o I / E c o R V によって既に切断されている p B l u e s c r i p t (登録商標) ベクターにライゲートする。得られた構築体、即ち、HPV 18 L1_{C D I} p K S を、HPV 18 E 7_{1-53 D I} 及び HPV 18 E 7_{1-60 D I} ORF ' s を E c o R V 部位にクローン化するために用いた。

10

【 0 1 1 7 】

5' E c o R V 制限酵素切断部位を有するプライマーを、HPV 18 E 7 フラグメント

20

をクローン化するために用いた。下記プライマー対を用いた：

【 0 1 1 8 】

【 化 1 3 】

5'-GGC CAT GAT ATC ATG CAT GGA CCT AAG GCA ACA TTG-3'

(E7 遺伝子の 5' 末端)

及び

30

5'-GGC CAT GAT ATC TCG TCG GGC TGG TAA ATG TTG ATG-3'

(E7_{1-53DI} フラグメントの 3' 末端)

又は

5'-GGC CAT GAT ATC TGT GTG ACG TTG TGG TTC GGC TC-3'

40

(E7_{1-60DI} フラグメントの 3' 末端)

【 0 1 1 9 】

PCR 生成物を E c o R V によって切断して、修飾された L1 遺伝子の E c o R V 部位に挿入した。

【 0 1 2 0 】

該クローンを DNA 配列決定によって分析した。それぞれ、HPV 18 L1_{C D I} E 7_{1-53 D I} 及び HPV 18 L1_{C D I} E 7_{1-60 D I} 融合遺伝子を次に、p B l u e s c r i p t (登録商標) ベクターから B g l I I / E c o R I 制限消化 (r e s t r

50

iction digestion) を用いて切り取って、組換えバキュロウイルスを調製するために、BglII/EcoRI 切断バキュロウイルス転移ベクター pVL1392 にライゲートした。

【0121】

(b) 組換えバキュロウイルスの調製

Spodoptera frugiperda (Sf9) 細胞を、10%ウシ胎仔血清を含有するTNM-FH 昆虫培地 (insect medium) (Life Technologies, Karlsruhe) 中の単層として又は懸濁培養で増殖させた。組換えプラスミド5 μ gと線状化Baculo-Gold (登録商標) DNA (PharMingen, San Diego, CA) 1 μ gとをSf9細胞中に同時トランスフェクトする (cotransfecting) ことによって、組換えバキュロウイルスを調製した。組換えウイルスを、終点希釈 (end point dilution) 及び/又はブランク単離によって精製した。発現を試験するために、10⁶ Sf9細胞を組換えバキュロウイルスによって0.5及び1のm.o.i.'s (感染多重度) で48時間感染させた。インキュベーション後に、培地を除去して、細胞をPBS (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂PO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.2) で洗浄した。次に、細胞をFACS測定によって分析したか、又はSDSサンプルバッファー中で溶菌させて、SDSゲルクロマトグラフィー及びイムノブロット・アッセイ (immunoblot assay) によって試験した。

10

【0122】

(c) キメラウイルス様粒子の精製

CVLPsを調製するために、Sf9又はSF+細胞を無血清培地 Insect X Press (Biowhitaker, Verviers, Belgium) 又はSf900II (Life Technologies, Karlsruhe) 中、27において、1.5~2x10⁶細胞/mlの密度になるまで培養した。培養物200mlを組換えバキュロウイルスによって1~2のm.o.i.で48時間感染させた。次に、細胞をペレット化して、-80において凍結した。次に、4倍量の抽出バッファー (200mM NaCl, 50mM Tris, pH 8.5) を加えて、凍結融解溶菌 (freeze-thaw lysis) を行なった。該ホモジネートを、Sorvall SS34ローターにおいて10,000rpmで遠心分離することによって、清澄化した。免疫学的アッセイのために、L1E7タンパク質を、清澄化粗抽出物から35~40%飽和の硫酸アンモニウムによって沈降させ、次にFractogel (登録商標) TMAE (Merck, Darmstadt) 上でのアニオン交換クロマトグラフィーを行なって、精製した。CVLPsは線状塩勾配で300~400mM NaClにおいて溶出した。精製した画分の該タンパク質含量を、基準としてウシ血清アルブミンを用いるBradford法によって測定した。

20

30

【0123】

3. HPV16 L1ペプチド刺激ネズミT細胞の、異なる抗原提示細胞による再刺激 HPV16L1_C*E7₁₋₅₅ CVLP接種C57BL/6マウスから得たネズミT細胞 (4x10⁵) を、HPV16 L1ペプチドプールによって37において5週間、各個々のペプチド1 μ g/ml及び10⁵抗原提示細胞 (照射済み脾臓細胞) を毎週添加しながら刺激して、回収した。該細胞を次に、培地100 μ l中で、37において、図1のX軸に示したペプチド1 μ g/ml及び10⁵抗原提示細胞 (JAWS) によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。バッファーのみと共にインキュベートした細胞を陰性対照として用いる。

40

【0124】

1時間後に、モネンシン (300 μ M) 1 μ lを加えた。該細胞を37においてさらに5時間インキュベートした。次に、細胞を固定し、-マウスCD8/PE、-マウスCD4/シクロム及び-マウスインターフェロン / FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバー (caliber) によって分析して、測

50

定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0125】

結果：図1の上部に示すようなペプチドP18, P19若しくはP43と共に、又は図1の下部に示すようなペプチドP35若しくはP3と共にインキュベートした場合に、JAWS細胞は、ペプチド刺激されたCD8陽性ネズミT細胞の再刺激をもたらした。その結果、ペプチドP3, P18, P19, P35及びP43は、H2b制限された細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

【0126】

4. P33負荷RMA細胞の溶菌

RMA細胞を⁵¹Crと共に37°Cにおいて1時間インキュベートし、培地によって3回洗淨し、2つのアリコートに分割した。該細胞の一方のアリコートにP33ペプチド10µg/mlを加え、他方のアリコートはペプチドの不存在下の陰性対照として用いた。各場合に、次に2000細胞(=標的細胞)を40,000T細胞(=エフェクター細胞)に150µlの総量で加えた。該T細胞は既に、43ペプチド(ペプチド1~43、各場合に1µg/ml)から成る混合物によって5週間刺激されたものである。

【0127】

該細胞の自然溶菌及び最大溶菌のためのアッセイ混合物を並行して設定した。培養培地と共にインキュベートした標的細胞を自然溶菌のために用いた。最大溶菌のためには、0.5% Triton X100を加えて、標的細胞を溶菌した。

【0128】

該アッセイ混合物を37°Cにおいて5時間インキュベートした。該アッセイ混合物からの50µl量の上清をLumaプレートに加えて、室温において一晚乾燥させた。翌朝に、放射性⁵¹Crの量(カウント)をCanberra-Packard Bプレート・カウンターを用いて測定し、Tritonアッセイ混合物中の最大溶菌細胞に関連づけた。

次に、式：

$X = 100 \cdot (\text{カウント} - \text{自然カウント}) / (\text{最大カウント} - \text{自然カウント})$ を用いて、比溶菌%を算出した。

【0129】

図2は、T細胞がP33ペプチドを負荷されたRMA細胞を効果的に溶菌することができるのに対して、これらのT細胞が非負荷RMA細胞を溶菌することができなかったことを示す。したがって、P33ペプチドはH2b制限された細胞傷害性T細胞エピトープである。

【0130】

5. 異なる抗原提示細胞による、HPV18ペプチド刺激されたネズミT細胞の再刺激
HPV18 L1_{CDIE71-53DI} CVLPs及びHPV18 L1_{CDIE71-60DI} CVLPsを接種されたC₃Hマウスから得たネズミT細胞(4×10^5)を、HPV18 L1又はE7ペプチドプールによって37°Cで5週間、各個々のペプチド1µg/ml及び 10^5 抗原提示細胞(照射済み脾臓細胞)を毎週添加しながら、刺激して、回収した。次に、該細胞を37°Cにおいて及び培地100µl中で、図3のX軸に示したペプチド1µg/ml及び 10^5 抗原提示細胞(LKK)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。バッファーのみと共にインキュベートした細胞を陰性対照として用いた。

【0131】

1時間後に、モネンシン(300µM)1µlを加えた。該細胞を37°Cにおいてさらに5時間インキュベートした。次に、細胞を固定し、 α -マウスCD8/PE、 α -マウスCD4/シクロム及び α -マウスインターフェロン γ /FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーによって分析して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0132】

結果：図3に示すようなペプチドQ22, Q23, Q51, Q43及びQ44と共に

、又は図4に示すようなペプチドQ41及びQ5と共にインキュベートした場合に、LKK細胞は、ペプチド刺激されたネズミCD8陽性T細胞の再刺激をもたらした。その結果、ペプチドQ5、Q22、Q23、Q41、Q43、Q44及びQ51は、H2k制限された細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

【0133】

6.異なる抗原提示細胞による、HPV18 CVLP刺激されたT細胞の再刺激
非HLA型血液ドナーからのヒトT細胞(4x10⁵)をHPV18L1_{CDIE71-53DI}CVLPs及びHPV18L1_{CDIE71-60DI}CVLPs、ヒトGM-CSF 800U/ml並びにヒトIL4 500U/mlによって1週間刺激し、さらに、HPV18L1_{CDIE71-53DI}CVLPs及びHPV18L1_{CDIE71-60DI}CVLPsによって37においてさらに5週間、CVLPs混合物(該2構築体の比率1:1)1µg/ml及び10⁵抗原提示細胞(照射済みPMB C)を毎週添加しながら、刺激して、回収した。

【0134】

20マーペプチドQ1~52を、それぞれ、マトリックスに従って、ペプチドプールA~H及び1~7にアセンブルした。

【0135】

【化14】

HPV18 プール	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
2	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16
3	Q17	Q18	Q19	Q20	Q21	Q22	Q23	Q24
4	Q25	Q26	Q27	Q28	Q29	Q30	Q31	Q32
5	Q33	Q34	Q35	Q36	Q37	Q38	Q39	Q40
6	Q41	Q42	Q43	Q44	Q45	Q46	Q47	Q48
7	Q49	Q50	Q51	Q52				

【0136】

次に、該T細胞を37において及び培地100µl中で該ペプチドプール及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一のBLCL)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。これに関連して用いたペプチドプール量は、各個々のペプチドの場合に1µg/mlが加えられるような量であった。

【0137】

バッファーのみと共にインキュベートした細胞を陰性対照として用い、それぞれ、HPV18L1ペプチドプール及びHPV18E7ペプチドプールと共にインキュベートした細胞は陽性対照として用いた。

【0138】

1時間後に、モネンシン1µlを加えた。次に、該細胞を37においてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN/FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーによって分析して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0139】

結果：図5は、ペプチドプールF及び1と共にインキュベートされたBLCLが特に、C

V L P 刺激されたヒト C D 4 陽性 T 細胞の再刺激をもたらしたことを示す。その上、ペプチドプール A 及び 6 は、陰性対照の再刺激よりも明らかに高度である再刺激を示した。対照的に、他のペプチドプールと共にインキュベートされた B L C L、及び陰性対照又は E 7 ペプチドプールと共にインキュベートされた B L C L は、反応性 C D 4 陽性 T 細胞の小さい割合を示したに過ぎなかった。ペプチドプール F 及び 1 は共通にペプチド Q 6 を含有し、その結果として、C V L P 刺激された T 細胞の再刺激を惹起する。したがって、ペプチド Q 6 は T ヘルパーエピトープを含有する。ペプチドプール A 及び 1 は、共通に有されるペプチドとしてペプチド Q 1 を含有し、これに対して、A 及び 6 の場合には、このペプチドは Q 4 1 であり、F 及び 6 の場合には、Q 4 6 である。その結果、ペプチド Q 1、Q 4 1 及び Q 4 6 も T ヘルパーエピトープを含有する。

10

【0140】

7. 異なる抗原提示細胞による、HPV 16 C V L P 刺激された T 細胞の再刺激
実施例 6 と同様に、非 H L A 型血液ドナーから得たヒト T 細胞を HPV 16 L 1 C * E 7₁₋₅₅ C V L P s によって刺激して、回収した。

【0141】

20 マーペプチド P 1 ~ 5 1 を、それぞれ、次のマトリックスに従って、ペプチドプール A ~ H 及び 1 ~ 7 にアセンブルした。

【0142】

【化15】

HPV16 プール	A	B	C	D	E	F	G	H
1	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8
2	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15	P 16
3	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24
4	P 25	P 26	P 27	P 28	P 29	P 30	P 31	P 32
5	P 33	P 34	P 35	P 36	P 37	P 38	P 39	P 40
6	P 41	P 42	P 43	P 44	P 45	P 46	P 47	P 48
7	P 49	P 50	P 51					

20

30

【0143】

次に、該 T 細胞を実施例 6 に記載したように再刺激し、固定し、透過させ、染色した。分析も実施例 6 に記載したように行なった。

【0144】

結果：図 6 は、ペプチドプール G 及び 3 と共にインキュベートされた B L C L が、C V L P 刺激された T 細胞の再刺激をもたらしたことを示す。さらに、ペプチドプール B 及び C、並びに 2 及び 4 も、陰性対照の再刺激よりも明らかに高度である再刺激を示した。対照的に、他のペプチドプールと共にインキュベートされた P B M C、及び陰性対照としてインキュベートされた P B M C は、反応性 C D 4 陽性 T 細胞の小さい割合を示したに過ぎなかった；しかし、他のペプチドプールと共にインキュベートされた B L C L、並びに陰性対照及び、E 7 ペプチドプールと共にインキュベートされた P B M C はこのようにしなかった。ペプチドプール G 及び 3 は共通に P 2 3 を含有し；これに対して、B 及び 2 は共通に P 1 0 を含有し、B 及び 3 は共通に P 1 8 を含有し、B 及び 4 は共通に P 2 6 を含有し、C 及び 2 は共通に P 1 1 を含有し、C 及び 3 は共通に P 1 9 を含有し、C 及び 4 は共通に P 2 7 を含有し、G 及び 2 は共通に P 1 5 を含有し、G 及び 4 は共通に P 3 1 を含有す

40

50

る。したがって、これらのペプチドは各場合にC V L P刺激されたT細胞の再刺激を惹起する。この結果、ペプチドP 1 0、P 1 1、P 1 5、P 1 8、P 1 9、P 2 3、P 2 6、P 2 7及びP 3 1は、各場合に、Tヘルパーエピトープを含有する。

【0145】

8.異なる抗原提示細胞による、HPV18 L1ペプチド刺激されたT細胞の再刺激
実施例3と同様に、HLA A24陽性ドナーから得たヒトT細胞(4 × 10⁵)をHPV18 L1ペプチドプールによって37 °Cにおいて3週間、各個々のペプチド1 μg/ml及び10⁵抗原提示細胞(照射済みPMBC)を毎週添加しながら、刺激して、回収した。

【0146】

次に、該細胞を培地100 μl中、37 °CにおいてHPV18 L1ペプチドQ9 10 μg/ml及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BLCL)によって、IL2 10 IU/mlの存在下で再刺激した。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用いた。

【0147】

1時間後に、モネンシン(300 μM)1 μlを加えた。該細胞を37 °Cにおいてさらに5時間インキュベートした。この後に、次に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN γ/FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーによって検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0148】

結果：図7は、ペプチドQ9と共にインキュベートされたBLCL細胞が、HPV18 L1ペプチドプールで刺激されたCD8陽性T細胞の再刺激をもたらしたことを示す。したがって、ペプチドQ9は、HLA A24制限細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

【0149】

http://www-bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/でParker'sペプチド予測プログラムと呼ばれるもので実施された、可能なHLA A24結合ペプチドに関するアルゴリズム(Parker, K et al. (1994) J. Immunol. 152:163)を用いて、該ペプチドIYNPETQRLがHLA A24ハプロタイプ(haplotype)のMHCクラスI分子に結合することを確認した。したがって、ペプチドIYNPETQRLは、Q9ペプチドと共にインキュベートされたBLCL細胞によるT細胞の再刺激を惹起する。

【0150】

したがって、オーバーラップ20マーのペプチドQ9中に含有されるペプチドIYNPETQRLは、HLA A24制限細胞傷害性T細胞エピトープである。

【0151】

9.異なる抗原提示細胞による、HPV16 C V L P刺激されたT細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞をHPV16 L1 C * E7₁₋₅₅ C V L P sによって刺激して、回収した。

【0152】

次に、該T細胞を37 °Cにおいて及び培地100 μl中で、実施例7からのペプチドプール及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BLCL)によってIL2 10 IU/mlの存在下で再刺激した。これに関連して、各個々のペプチドの場合に1 μg/mlが加えられるような量であるペプチドプール量を用いた。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV16 L1ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた。

【0153】

1時間後に、モネンシン1 μlを加えた。次に、該細胞を37 °Cにおいてさらに5時間インキュベートした。この後に、次に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒト

10

20

30

40

50

CD4 / PerCP及び - ヒトIFN / FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーによって検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0154】

結果：図8（上部）は、ペプチドプールG及び5と共にインキュベートされたBLC Lの場合に並びにP39と共にインキュベートされたBLC Lの場合にはCD4陽性及びIFN陽性細胞の割合が非常に高いことを示す。ペプチドP39は、ペプチドプールG及び5に共通に含有され、そのまま同様にCVLP刺激されたT細胞の再刺激をもたらしたペプチドであるので、ペプチドP39はTヘルパーエピトープを含有する。CD4陽性及びIFN陽性細胞は一般に T_{H1} であるので、その結果、該エピトープは T_{H1} エピトープである。

10

【0155】

さらに、CD4陽性及びIL4陽性細胞の割合（図8の下部）は、ペプチドプールF、G及び5と共にインキュベートされたBLC Lの場合には、他のペプチドプールと共にインキュベートされたBLC Lの場合又は陰性対照の場合の反応性細胞の割合よりも顕著に高い。一般に、CD4陽性及びIL4陽性細胞は T_{H2} 細胞である。このことは次には、G及び5中に含有されるペプチドP39もさらに T_{H2} エピトープを含有するか、又は T_{H1} エピトープに同じであること、並びにF及び5中に含有されるペプチド38もまた T_{H2} エピトープを含有することを意味する。

【0156】

10.異なる抗原提示細胞による、HPV16 CVLP刺激されたT細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞をHPV16 L1_C*E7₁₋₅₅ CVLPsによって刺激して、回収した。

20

【0157】

次に、該T細胞を37において及び培地100 μ l中で、実施例7からのペプチドプール及び10⁵抗原提示細胞（ドナー同一BLC L）によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。これに関連して、各個々のペプチドの場合に1 μ g/mlが加えられるような量であるペプチドプール量を用いた。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV16 L1ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた。

30

【0158】

1時間後に、モネンシン1 μ lを加えた。次に、該細胞を37においてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、- ヒトCD8/APC、- ヒトCD4/PerCP及び - ヒトIFN / FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーにおいて検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0159】

結果：図9は、ペプチドプールB、E、G及び1と共にインキュベートされたBLC Lの場合にCD8陽性T細胞の割合が高いことを示す。ペプチドプールB及び1はペプチドP2を共通に含有し、これに対してペプチドプールE及び1はP5を共通に含有し、ペプチドプールG及び1はP7を共通に含有するので、ペプチドP2、P5及びP7はそれぞれ細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

40

【0160】

11. P33刺激された抗原提示細胞による、HPV16 CVLP刺激されたT細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞をHPV16 L1_C*E7₁₋₅₅ CVLPsによって刺激して、回収した。

【0161】

次に、該T細胞を37において及び培地100 μ l中で、ペプチドP33 1 μ g/ml及び10⁵抗原提示細胞（ドナー同一BLC L）によってIL2 10IU/mlの存

50

在下で再刺激した。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV 16 L1ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた。

【0162】

1時間後に、モネンシン1 μ lを加えた。次に、該細胞を37 $^{\circ}$ Cにおいてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN γ /FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーにおいて検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0163】

結果：図10は、ペプチドP33と共にインキュベートされたBCLCの場合にはCD8陽性T細胞の割合が、陰性対照の場合よりも顕著に高いことを示す。したがって、ペプチドP33は細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

【0164】

12.異なる抗原提示細胞による、HPV18 CVLP刺激されたT細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞を37 $^{\circ}$ CにおいてHPV18 L1_{CDI E71-53DI} CVLPs及びHPV18 L1_{CDI E71-60DI} CVLPsによって刺激して、回収した。

【0165】

次に、該T細胞を37 $^{\circ}$ Cにおいて及び培地100 μ l中で、実施例6からのHPV18ペプチドプール及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BCLC)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。これに関連して、各個々のペプチドの場合に1 μ g/mlが加えられるような量であるペプチドプール量を用いた。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV18 L1ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた。

【0166】

1時間後に、モネンシン1 μ lを加えた。次に、該細胞を37 $^{\circ}$ Cにおいてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN γ /FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーにおいて検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0167】

結果：図11(上部)は、ペプチドプールF、G、5及び6と共にインキュベートされたBCLCの場合にはCD4陽性及びIFN γ 陽性細胞の割合が高いことを示す。したがって、ペプチドプールF及び5は共通にペプチドQ38を有し、ペプチドプールF及び6は共通にペプチドQ46を有し、ペプチドプールG及び5は共通にペプチドQ39を有し、ペプチドプールG及び6は共通にペプチドQ47を有する。したがって、ペプチドQ38、Q39、Q46及びQ47はそれぞれT_{H1}エピトープを含有する。

【0168】

図11(下部)は、CD4陽性及びIL4陽性細胞の割合がペプチドプールGの場合に特に高い；しかし、反応性細胞の割合はプール3、4、5及び6の場合にほぼ等しい高さであることを示し、このことは、この実験からT_{H2}エピトープに関する明白な結論を引き出すことが不可能であったことを意味する。しかし、ペプチドQ38、Q39、Q46及びQ47を下記実験では個別に試験した。

【0169】

13. Q38ペプチド、Q39ペプチド、Q46ペプチド又はQ47ペプチドによって刺激された抗原提示細胞による、HPV18 CVLP刺激T細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞(4 \times 10⁵)をHPV18 L1_{CDI E71-53DI} CVLPs及びHPV18 L1_{CDI E71-60DI} CVLPsによって刺激して、回収した。

10

20

30

40

50

【0170】

次に、該T細胞を37において及び培地100 μ l中で、各場合に、ペプチドQ38、Q39、Q46又はQ47 1 μ g/ml及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BLLC)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV18 L1ペプチドプール又はE7ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた。

【0171】

1時間後に、モネンシン1 μ lを加えた。次に、該細胞を37においてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN γ /FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーにおいて検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

10

【0172】

結果：図12(上部左)は、ペプチドQ38及びQ39と共にインキュベートされたBLLCの場合には反応性CD4陽性及びIFN γ 陽性T細胞の割合が特に高く、この割合がペプチドQ46及びQ47の場合にも陰性対照の場合よりもまだ顕著に高いことを示す。したがって、Q38、Q39、Q46及びQ47はそれぞれT_{H1}エピトープを含有する。

【0173】

図12(下部左)は、ペプチドQ38及びQ39の場合には反応性CD4陽性及びIL4陽性T細胞の割合が特に高いことを示し、このことは、Q38及びQ39が、T_{H1}エピトープの他に、さらにT_{H2}エピトープをも含有するか、又はT_{H1}エピトープが同時にT_{H2}エピトープでもあることを意味する。

20

【0174】

図12(上部右)は、ペプチドQ38、Q39及びQ47の場合には反応性CD8陽性及びINF γ 陽性T細胞の割合が特に高いことを示し、このことは、ペプチドQ38、Q39及びQ47が付加的に細胞傷害性T細胞エピトープを含有することを意味する。CD8陽性及びIL4陽性細胞の割合は低く、ペプチドQ38、Q39、Q46及びQ47の場合には陰性対照に匹敵する、これは、CD8陽性細胞が一般にIL4を全く発現しないという事実によって説明することができる発見である。

30

【0175】

14.異なる抗原提示細胞による、HPV16 CVLP刺激されたT細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞をHPV16 L1_C*E7₁₋₅₅ CVLPsによって刺激して、回収した。

【0176】

次に、該T細胞を37において及び培地100 μ l中で、実施例7からのペプチドプール及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BLLC)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。これに関連して、各個々のペプチドの場合に1 μ g/mlが加えられるような量であるペプチドプール量を用いた。バッファーのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV16 L1又はE7ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた。

40

【0177】

1時間後に、モネンシン1 μ lを加えた。次に、該細胞を37においてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN γ /FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーにおいて検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0178】

結果：図13は、CD8陽性及びINF γ 陽性T細胞の割合が、ペプチドプールA、C、E、F、1及び6と共にインキュベートされたBLLCの場合に高いことを示す。ペプチ

50

ドプールA及び1はペプチドP1を共通に含有し、これに対して、ペプチドプールC及び1はペプチドP3を共通に含有し、ペプチドプールE及び1はペプチドP5を共通に含有し、ペプチドプールF及び1はペプチドP6を共通に含有し、ペプチドプールA及び6はペプチドP41を共通に含有し、ペプチドプールC及び6はペプチドP43を共通に含有し、ペプチドプールE及び6はペプチドP45を共通に含有し、そしてペプチドプールF及び6はペプチドP46を共通に含有する。したがって、ペプチドP1、P3、P5、P6、P41、P43、P45及びP46は、それぞれ、細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

【0179】

15.異なる抗原提示細胞による、HPV18 CVLP刺激されたT細胞の再刺激
実施例6と同様に、非HLA型血液ドナーから得たヒトT細胞を37°CにおいてHPV18 L1_{CDI E71-53DI} CVLPs及びHPV18 L1_{CDI E71-60DI} CVLPsによって刺激して、回収した。

10

【0180】

次に、該T細胞を37°Cにおいて及び培地100µl中で、実施例6からのペプチドプール及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BLC L)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。これに関連して、各個々のペプチドの場合に1µg/mlが加えられるような量であるペプチドプール量を用いた。バッファのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用い、これに対して、HPV18 L1又はE7ペプチドプールと共にインキュベートされた細胞を陽性対照として用いた(図14の上部)。図14の下部の場合には、T細胞を37°Cにおいて及び培地100µl中で、ペプチドプールF及び4によって並びにペプチドQ30 1µg/ml及び10⁵抗原提示細胞(ドナー同一BLC L)によってIL2 10IU/mlの存在下で再刺激した。

20

【0181】

1時間後に、モネンシン1µlを加えた。次に、該細胞を37°Cにおいてさらに5時間インキュベートした。この後に、細胞を固定し、-ヒトCD8/APC、-ヒトCD4/PerCP及び-ヒトIFN-γ/FITCによって透過させ、染色した。細胞の標識をFACSscanキャリバーにおいて検査して、測定結果をCellquestソフトウェアを用いて分析した。

【0182】

結果：図14(上部)は、CD4陽性及びIFN-γ陽性T細胞の割合が、ペプチドプールF及び4と共にインキュベートされたBLC Lの場合には高いことを示す。ペプチドプールF及び4はペプチドQ30を共通に含有する。したがって、ペプチドQ30はT_H1エピトープを含有する。

30

【0183】

この結果は、図14に示す実験によって実証された。T細胞がペプチドプールF若しくは4と共にインキュベートされたBLC L、又はペプチドQ30と共にインキュベートされたBLC Lのいずれによって再刺激されたかに拘わらず、反応性CD4陽性及びIFN-γ陽性T細胞の割合は、各場合に、類似する。

【0184】

16. HPV18ペプチド刺激されたネズミT細胞の再刺激
実施例5と同様に、CVLP接種されたマウスから得たネズミT細胞をL1又はE7ペプチドプールによって、添加した抗原提示細胞の存在下で刺激した。次に、該細胞を図15におけるX軸上に示したペプチド(図15の上部ではQ3及びQ4、図15の下部ではL1₄₇₄E7₁₋₈、E7₂₋₁₁及びE7₁₋₈)及びさらに抗原提示細胞(RMA)によって再刺激した。バッファのみと共にインキュベートされた細胞を陰性対照として用いた。

40

【0185】

実験をさらに実施例5と同様に分析し、反応性CD8陽性細胞を抗体染色及びFACSscanによって測定した。

50

【0186】

結果：図15は、ペプチドQ3及びQ4（図の上部）並びにペプチドL1₄₇₄E7₁₋₈、E7₂₋₁₁及びE7₁₋₈（図の下部）と共にインキュベートされたときに、RMA細胞がペプチド刺激されたネズミCD8T細胞の再刺激をもたらしたことを示す。したがって、ペプチドQ3、Q4、L1₄₇₄E7₁₋₈、E7₂₋₁₁及びE7₁₋₈はそれぞれH2b制限細胞傷害性T細胞エピトープを含有する。

【0187】

17. HPV18ペプチド負荷RMA細胞/LKK細胞の溶菌

実施例4と同様に、RMA細胞又はLKK細胞を⁵¹Crによって放射能標識して、X軸上にプロットしたペプチド（図16の上部ではQ43及びQ44、図16の下部ではQ49）と共にインキュベートした。ペプチドなしの細胞は陰性対照として用いた。次に、予めペプチドプールで刺激されているT細胞を加えた。

【0188】

T細胞によるRMA細胞又はLKK細胞の溶菌を⁵¹Crの放出によって測定し、実施例4に記載したように算出する。

【0189】

結果：図16は、T細胞が、Q43又はQ44を負荷されたRMA細胞（図16の上部）又はQ49を負荷されたLKK細胞（図16の下部）を効果的に溶菌することができたが、負荷されないRMA細胞又はLKK細胞を溶菌することはできなかったことを示す。したがって、Q43ペプチド及びQ44ペプチドはH2b制限された細胞傷害性T細胞エピトープであるが、この結果、Q49はH2k制限された細胞傷害性T細胞エピトープである。

【0190】

18. 細胞傷害性T細胞エピトープHPV18 E7₈₆₋₉₄の同定

A. HLA結合予測

HLA A*0201に高い強度で結合すると考えられるHPV型18 E7タンパク質中の9マー配列を予測するために、NIH HLA結合予測プログラム（アドレス：http://www-bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla/_bind/）を用いた。該9マーはHLAクラスI分子のための最適リガンドであるので、これらを試験した。この予測のために、HPV18 E7タンパク質の完全なアミノ酸配列を該プログラムに供給して、HLA A*0201対立遺伝子に対する9マーが予測されることを決定した。該プログラムは、見出された9マーが結合強度に従って配列されるリストを提供する。結合強度の値は、対応アミノ酸配列を有するペプチドの解離の半変化値（half-change value）（ $T_{1/2}$ ）（分）として記載する。

【0191】

B. PBMCのin vitroワクチン接種

予測ペプチドを、標準方法（Fmoc方法）を用いて合成した。HLA-A2に対して高い予測結合強度を有するペプチドに対して、ペプチド特異的T細胞系を確立した。このために、健康なHLA-A2陽性ドナーから得た 1×10^5 PBMCを96穴プレートの各穴中の培地（RPMI 1640、10%熱不活化ABプラズマ）100 μ l中に撒き散らした。ペプチド20 μ g/mlを該培養培地に加えた。細胞を37 $^{\circ}$ Cにおいてインキュベートして、照射済みペプチド負荷された自己PBMC（autologous PBMC）で1回/週再刺激した。刺激剤PBMCを、ペプチド20 μ g/mlを含有する培地中で4時間インキュベートした。照射後に、これらを培地で 1×10^4 / 100 μ lまでに希釈して、ペプチド刺激されたPBMCに加えた。このために、該培地の半分を各穴から吸引して、刺激剤PBMC懸濁液100 μ lを加えた。IL-2 10U/ml及びIL-7 10U/mlを第3刺激以降加えた。第5刺激以降、再刺激をペプチド負荷自己Bリンパ芽球細胞系（BCLL）を用いて同じ方法で行なった。

【0192】

同種腫瘍細胞を用いたin vitroワクチン接種のために、HeLa細胞をCD80

及びHLA-A2によってトランスフェクトした(H7.1-A2)。これらの細胞を照射して、 1×10^4 / 穴の濃度でPBMCを刺激するために用いた。再刺激はペプチド刺激と同様な方法で3回行なった。

【0193】

C. ELISpotアッセイ

1×10^4 刺激剤細胞(K-562細胞(ATCC CCL-243))であるK-A2細胞をHLA A2 発現ベクター、PBMC又は樹枝状細胞によってトランスフェクトした)を、96穴丸底細胞培養プレートの1つの穴中の培地(RPMI 1640、0.4%ヒトアルブミン)60 μ l中に撒き散らし、ペプチド50 μ g/mlを一晩負荷させた。次の日、培地(IL-2及びIL-7各10U/ml含有)60 μ l中の 5×10^4 T細胞を各穴に加えて、プレートを4時間インキュベートした。MilliporeニトロセルロースHAプレートを4 において抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体1-D1k(10 μ g/ml PBS中、60 μ l/穴、Holzel Diagnostika, Cologne)で一晩被覆した。次の日、該プレートを滅菌PBS150 μ l/穴で3回各場合に5分間洗浄し、次に、37 において培地で1時間ブロッキングした。このブロッキング培地を除去して、細胞を該丸底細胞培養プレートからフィルター・プレートに移して、次にさらに20~22時間インキュベートした。この後に、細胞及び培地を取り出し、フィルター・プレートをPBS/Tween20(0.05%)で2分間6回洗浄した。次に、抗体Ab-7-B6-1-ビオチン(2 μ g/ml PBS/BSA中、60 μ l/穴、Holzel Diagnostika)を加えて、このプレートを4 において一晩インキュベートした。次の日、該フィルター・プレートを再度PBS/Tween20(0.05%)で2分間6回洗浄して、ストレプトアビジン-AP(50ng/ml PBS中、Sigma(Deisenhofen)、100 μ l/穴)を加えた。室温において2時間インキュベートした後に、該フィルター・プレートをPBS/Tween20(0.05%)で2分間3回及びPBSで2分間3回洗浄した。次に、BCIP/NBT基質(Sigma, Deisenhofen)60 μ lを加えて、該プレートを、青みを帯びた黒色スポットが出現するまで、さらに1~2時間、室温においてインキュベートした。該反応を水で停止させ、該プレートを乾燥させた。スポットを、ZEISS-VISION(Halbergmoos)ELISpot読み出し系を用いて、計数した。

【0194】

D. 細胞傷害性試験

HPV18 E7₈₆₋₉₄ 特異的T細胞の細胞傷害性をクロム放出アッセイにおいて評価した。標的細胞として、自己BLCLを用いた。各場合に、 5×10^5 細胞を培地(RPMI 1640、10% FCS)100 μ l中に入れ、⁵¹Cr(NEEN)20 μ lで処理した。BLCLにペプチドを負荷させるために、対応ペプチド50 μ g/mlを加えた。この後に、20~30分間毎に細心に再懸濁させながら、細胞を室温において2時間インキュベートした。次に、細胞を培地5mlで3回洗浄した。沈降させるために、細胞を各場合に1500rpmで5分間遠心分離し、次に細心に再懸濁させた。標的(target)を培地中に入れ、 1×10^5 細胞/mlの密度に調節した。各場合に、この細胞懸濁液40 μ lを、96穴先端の尖った底(pointed-bottom)細胞培養プレートの穴中に既に撒き散らされた、エフェクター及びCCL-243 K-562細胞に加えた。

【0195】

エフェクター(エピトープ特異的T細胞)を回収して、培地(RPMI 1640、10% FCS、IL-2及びIL-7 10U/ml)中に入れた。各場合に、この細胞懸濁液80 μ lを96穴先端の尖った底細胞培養プレートの穴中にピペットで入れた(2とおり)。同時に、細胞数/mlを、所望のエフェクター/標的比率が得られることを保証するように調節した。該細胞系中に存在する可能性があるNK細胞活性を完全に阻止するために、非標識K-562細胞(40 μ l、標的細胞を基準にして20倍過剰)をエフェ

クターに加えた。該エフェクターをK - 562細胞と共に少なくとも30分間インキュベートしてから、標識した標的細胞を加えた。

【0196】

対照(6倍のアッセイサンプル)として、標的細胞を、一方では、K - 562及び培地と共にインキュベートし(低放出対照)、他方では、K562、培地及びTween20と共にインキュベートした(高放出対照)。NK活性が完全に阻止されたかどうかチェックするために、エフェクターをさらに非標識K - 562及び標識K - 562と共にインキュベートした。

【0197】

アッセイサンプルを37、98%大気湿度及び5%CO₂において、4時間インキュベートした。この後に、細胞を沈降させるために、培養プレートを700rpmにおいて5分間遠心分離した。次に、細胞ペレットを旋回させることなく、各穴からの上清100μlをピペットでOpti-Plateシンチレーション製錠プレート(scintillation tableting plate)上に載せ、室温において一晩放置した。次の日に、Microscint 40シンチレーション液(Canberra-Packard, Dreieich)150μlを加えて、個々のアッセイサンプル中の崩壊数/分をシンチレーション計数器(Topcount, Canberra-Packard, Dreieich)において測定した。結論として、多重アッセイサンプルの平均値及び標準偏差を算定した。

【0198】

下記式を用いて、比溶菌を算出した：

$$\text{比溶菌}(\%) = 100 \times (\text{結果} - \text{低放出}) \times (\text{高放出} - \text{低放出})^{-1}$$

E. 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の培養

HPV18及びHLA-A2陽性を示す女性患者に存在する腫瘍のバイオプシーからのTILを、IL-2及びIL-7各場合に100U/ml並びにDyna1ビーズT細胞エキスパンダー(expander)(Dyna1, Hamburg)0.125μl/穴を含有するAIM-V培地(Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)中でTILを培養することによって、増殖させた。これらのTILのHPV18 E7₈₆₋₉₄ペプチドエピトープの特異性をELISpotアッセイにおいて直接試験した。

【0199】

F. 結果

HPV18 E7タンパク質のいずれのHLA-A2制限ペプチドが腫瘍細胞によってプロセスされ、提示されるかを判定するために、HeLa CD80/HLA-A2トランスフェクタント(transfectants)(H7.1-A2)を用いるinvitroワクチン接種によってT細胞系を作製した。IFN-ELISpot分析(図17の上部参照)において予測合成ペプチドFQQFLNTLに対する特異的反応が見られた。他の予測ペプチドと比較して、このペプチドはHLA-A2に対する相対的に低い結合アフィニティを有する。これにも拘わらず、特異的T細胞が検出された。IFN-分泌を誘発しなかったHPV16 E7₂₈₋₃₆を対照ペプチドとして用いた。このことは、このペプチドがH7.1-A2細胞によって提示されることを示唆する。

【0200】

HPV18 E7₈₆₋₉₄特異的T細胞が溶菌活性(cytolytic activity)を有するかどうかを試験するために、合成ペプチドに対してT細胞系を調製した。このT細胞をクロム放出アッセイにおいて試験した。標的細胞として、自己ペプチド負荷BLC1を用いた。エフェクター対標的比率30:1において約20%の比溶菌が観察された(図17の下部参照)。対照ペプチドHPV18 E7₇₋₁₅及びHPV16 E6₂₈₋₃₆に対しては、比溶菌が測定されなかった。

【0201】

HPV18 E7₈₆₋₉₄ペプチドもイムノプロテアソーム(immunoprote 50

asome)によって自然にプロセスされるかどうかをチェックするために、抗原負荷自己樹枝状細胞(DC)で刺激することによって、T細胞系を調製した。このDCに組換えHPV18 E7タンパク質又は、総HPV18 E7を表すオーバーラップ20マーペプチドから成るプール(図18の上部:それぞれ、"E7タンパク質誘導"及び"E7ペプチドプール誘導"参照)を負荷させた。HPV18 E7₈₆₋₉₄ エピトープに対する誘導T細胞の特異性をELISpotアッセイにおいて試験した。HPV18 E7₈₆₋₉₄ 特異的T細胞が両T細胞系で検出された(図18の上部参照)。このことは、該イムノプロテアソームが該エピトープをプロセスすることを意味する。

【0202】

HPV18 E7₈₆₋₉₄ エピトープの生物学的関連をTIL集団を用いて研究した。HPV18-及びHLA-A2-陽性女性患者から得た腫瘍バイオプシーからTILを単離して、如何なる抗原特異的再刺激もなしに、*in vitro*で直線的に増殖させた。ELISpotアッセイで、これらをHPV18 E7₈₆₋₉₄ 負荷K-A2(刺激剤としての、HLA-A2でトランスフェクトされたK-562細胞)と対決させた。

10

【0203】

TIL集団にはHPV18 E7₈₆₋₉₄ に対する顕著な反応が存在するが、Rudolf MP等(2001, *Clinical Cancer Research* 7(3 Suppl): pp788-795)が記載するHPV18 E7₇₋₁₅ エピトープに対するこのような反応は存在しない(図18の下部参照)。該ペプチドHPV18 E7₇₋₁₅ はHLA-A2に対して、2.5倍大きい結合アフィニティを有する。これらの結果は、HPV18 E7₈₆₋₉₄ 特異的T細胞が腫瘍中に自然に存在することを暗示し、今までに見出されているペプチドプールの関連を強調する重要なことである。

20

【0204】

19. 実施例3~18の概要

実施例3~18で得られたデータを表3及び4に要約する。

【0205】

【化16】

表3 : HPV16 ペプチド/エピトープ

名称	配列	相対的位置	種	ハプロ タイプ	エピトープ タイプ	データ
P2	YLPPVFSKVVSTDEYVART	L1 12-31	ヒト		T _C	実施例 9
P3	STDEYVARTNIYYHAGTSRL	L1 23-42	ネズミ	H2b		実施例 2
P3	STDEYVARTNIYYHAGTSRL	L1 23-42	ヒト		T _C	実施例 9, 13
P5	VGHPYFPIKPPNNKILVPK	L1 45-64	ヒト		T _C	実施例 13
P7	GLQYRVFRIHLPDPNKFQFP	L1 67-86	ヒト		T _C	実施例 9
P10	WACVGVVEVGRGQPLGVGISG	L1 100-119	ヒト		T _H	実施例 6
P11	QPLGVGISGHPLLNKLDDETE	L1 111-130	ヒト		T _H	実施例 6
P15	QLCLIGCKPPIGEHWGKGSF	L1 155-174	ヒト		T _H	実施例 6
P18	LELINTVIQDGMVDTGFGA	L1 188-207	ネズミ	H2b		実施例 2
P18	LELINTVIQDGMVDTGFGA	L1 188-207	ヒト		T _H	実施例 6
P19	DMVDTGFGAMDFTTLQANKS	L1 199-218	ネズミ	H2b		実施例 2
P31	VTVVDTRSTNMSLCAAIST	L1 331-350	ヒト		T _H	実施例 6
P33	TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL	L1 353-372	ネズミ	H2b		実施例 3
P33	TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL	L1 353-372	ヒト		T _C	実施例 10
P35	IFQLCKITLTADVMTYIHSM	L1 375-394	ネズミ	H2b		実施例 2
P38	PPPGGTLEDYRFVTSQAIA	L1 408-427	ヒト		T _{H2}	実施例 8
P39	RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE	L1 419-438	ヒト		T _{H1} , T _{H2}	実施例 8
P41	LKKYTFWEVNLKEKFSADLD	L1 441-460	ヒト		T _C	実施例 13
P43	PLGRKFLQAGMHGDTPTLH	L1 463-482	ネズミ	H2b		実施例 2
P46	YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA	E7 23-42	ヒト		T _C	実施例 13

10

20

30

【 0 2 0 6 】

【 化 1 7 】

表4：HPV18 ペプチド/エピトープ

名称	配列	相対的位置	種	ハプロタイプ	エピトープタイプ	データ
Q3	NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL	L1 23-42	ネズミ	H2b	T _C	実施例 16
Q4	FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP	L1 34-53	ネズミ	H2b	T _C	実施例 16
Q5	VGNPYFRVPAGGGNKQDIPK	L1 45-64	ネズミ	H2k		実施例 4
Q6	GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV	L1 56-75	ヒト		T _H	実施例 5
Q9	SIYNPETQRLVWACAGVEIG IYNPETQRL	L1 89-108 90-98	ヒト	A24	T _C	実施例 7
Q22	PDYLQMSADPYGDSMFCLR	L1 232-251	ネズミ	H2k		実施例 4
Q23	GDSMFCLRRREQLFARHFVN	L1 243-262	ネズミ	H2k		実施例 4
Q30	NNGVCWHNQLFVTVVDTRTS	L1 320-339	ヒト		T _{H1}	実施例 14
Q38	PPPTTSLVDTYRFVQSVAI	L1 408-427	ヒト		T _{H1} , T _{H2} , T _C	実施例 11, 12
Q39	YRFVQSVAITCQKDAAPAEN	L1 419-438	ヒト		T _{H1} , T _{H2} , T _C	実施例 11, 12
Q41	PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL	L1 441-460	ネズミ	H2k		実施例 4
Q43	YPLGRKFLVQAGMHGPKATL	L1 463-482	ネズミ	H2k		実施例 4
Q43	YPLGRKFLVQAGMHGPKATL	L1 463-474 E7 1-8	ネズミ	H2b	T _C	実施例 17
Q44	MHGPKATLQDIVLHLEPQNE	E7 1-20	ネズミ	H2b	T _C	実施例 17
Q44	MHGPKATLQDIVLHLEPQNE	E7 1-20	ネズミ	H2k		実施例 4
Q46	VDLLCHEQLSDSEEENDEID	E7 23-42	ヒト		T _{H1}	実施例 11, 12
Q47	SEEENDEIDGVNHQHLPARR	E7 34-53	ヒト		T _{H1} , T _C	実施例 11, 12
Q49	PQRHTMLCMCKCEARIKLV	E7 56-75	ネズミ	H2k	T _C	実施例 17
Q51	SSADDLRAFQQLFLNLSFV	E7 78-97	ネズミ	H2k		実施例 4
L1 ₄₇₄ E7 ₁₋₈	GMHGPKATL	L1 474 E7 1-8	ネズミ	H2b	T _C	実施例 16
E7 ₂₋₁₁	HGPKATLQDI	E7 2-11	ネズミ	H2b	T _C	実施例 16
E7 ₁₋₈	MHGPKATL	E7 1-8	ネズミ	H2b	T _C	実施例 16
E7 ₈₆₋₉₄	FQQLFLNLT	E7 86-94	ヒト	HLA-A2	T _C	実施例 18

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、異なるペプチドを提示するJAWS細胞による、特異的ネズミT細胞の再刺激後の2つのFACSscan実験の分析図を示す。それぞれのペプチドの名称はX軸に示す；ペプチドなしのJAWS細胞はバッファのみとインキュベートして、陰性対照として用いた。FACSscan実験におけるIFN発現に基づいて反応性であると分類されたCD8陽性T細胞の割合をY軸にプロットする。

【図2】

図2は、ペプチドP33をRMA細胞(標的細胞)に負荷した後の⁵¹Cr放出実験の分

10

20

30

40

50

析図を示す。該標的細胞を、ペプチド P 1 ~ P 4 3 によって刺激された T 細胞 (エフェクター細胞) によって溶菌させた、用いた標的細胞に対して用いたエフェクター細胞の比率は 20 である。バッファーのみとインキュベートされた R M A 細胞 (陰性対照) と、P 3 3 ペプチドと共にインキュベートされた R M A 細胞とをそれぞれ X 軸上に示す。標的細胞からの ^{51}Cr の放出によって判定して、特異的に溶菌された標的細胞の % を Y 軸にプロットする。これらの % 値は、実施例 4 に記載した式を用いて算出した。

【図 3】

図 3 は、異なるペプチドを提示する L K K 細胞による、特異的ネズミ T 細胞の再刺激後の 2 つの F A C S c a n 実験の分析図を示す。それぞれのペプチドの名称は X 軸に示す；ペプチドなしの L K K 細胞はバッファーのみとインキュベートして、陰性対照として用いた。F A C S c a n 実験において I F N 発現に基づいて反応性であると分類された C D 8 陽性 T 細胞の割合を Y 軸にプロットする。

10

【図 4】

図 4 は、異なるペプチドを提示する L K K 細胞による、特異的ネズミ T 細胞の再刺激後の 2 つの F A C S c a n 実験の分析図を示す。それぞれのペプチドの名称は X 軸に示す；ペプチドなしの L K K 細胞はバッファーのみとインキュベートして、陰性対照として用いた。F A C S c a n 実験において I F N 発現に基づいて反応性であると分類された C D 8 陽性 T 細胞の割合を Y 軸にプロットする。

【図 5】

図 5 は、異なる H P V 1 8 ペプチドプールを提示するドナー同一 B L C L による、特異的ヒト T 細胞の再刺激後の F A C S c a n 実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプールの名称は X 軸に示す；“なし (without)” は、バッファーのみとインキュベートされる B L C L (陰性対照) を意味し、これに対して、L 1 及び E 7 は、それぞれ、H P V 1 8 L 1 ペプチドプール及び H P V 1 8 E 7 ペプチドプールと共にインキュベートされる B L C L (陽性対照) をそれぞれ意味する。F A C S c a n 実験において I F N 発現に基づいて反応性であると分類された C D 4 陽性 T 細胞の割合を Y 軸にプロットする。

20

【図 6】

図 6 は、異なる H P V 1 8 ペプチドプールを提示するドナー同一 B L C L による、特異的ヒト T 細胞の再刺激後の F A C S c a n 実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプールの名称は X 軸に示す；“なし” は、バッファーのみとインキュベートされる B L C L (陰性対照) を意味し、これに対して、L 1 及び E 7 は、それぞれ H P V 1 8 L 1 ペプチドプール及び H P V 1 8 E 7 ペプチドプールと共にインキュベートされる B L C L (陽性対照) をそれぞれ意味する。F A C S c a n 実験において I F N 発現に基づいて反応性であると分類された C D 4 陽性 T 細胞の割合を Y 軸にプロットする。

30

【図 7】

図 7 は、Q 9 ペプチドを提示するドナー同一 B L C L による、特異的ヒト T 細胞の再刺激後の F A C S c a n 実験の分析図を示す。それぞれのペプチドの名称は X 軸に示す；B L C L は、バッファーのみとインキュベートされる B L C L (陰性対照) を意味する。F A C S c a n 実験において I F N 発現に基づいて反応性であると分類された C D 8 陽性 T 細胞の割合を Y 軸にプロットする。

40

【図 8】

図 8 は、異なる H P V 1 6 ペプチドプール又は P 3 9 ペプチドを提示するドナー同一 B L C L による、特異的ヒト T 細胞の再刺激後の 2 つの F A C S c a n 実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプール (A ~ H、1 ~ 7) 又はそれぞれのペプチド (P 3 9) の名称は X 軸に示す；“なし” は、バッファーのみとインキュベートされる B L C L (陰性対照) を意味し、これに対して、L 1 は、H P V 1 6 L 1 ペプチドプールと共にインキュベートされる B L C L (陽性対照) を意味する。F A C S c a n 実験において I F N 発現に基づいて反応性であるとして、したがって T ヘルパー 1 細胞 ($T_H 1$) であるとして分類された C D 4 陽性 T 細胞の割合を、図 8 の上部において、Y 軸にプロットする。F A C S c a n 実験において I L - 4 発現に基づいて T ヘルパー 2 細胞 ($T_H 2$) であるとして

50

分類されたCD4陽性T細胞の割合を、図8の下部において、Y軸にプロットする。

【図9】

図9は、異なるHPV16ペプチドプールを提示するドナー同一BLCCLによる、特異的ヒトT細胞の再刺激後のFACSscan実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプールの名称はX軸に示す；“なし”は、バッファーのみとインキュベートされるBLCCL（陰性対照）を意味し、これに対して、L1は、HPV16 L1ペプチドプールと共にインキュベートされるBLCCL（陽性対照）を意味する。FACSscan実験においてIFN発現に基づいて反応性であると分類されたCD8陽性T細胞の割合をY軸にプロットする。

【図10】

図10は、P33ペプチドを提示するドナー同一BLCCLによる、特異的ヒトT細胞の再刺激後のFACSscan実験の分析図を示す。ペプチドの名称はX軸に示す；“なし”は、バッファーのみとインキュベートされたBLCCL（陰性対照）を意味し、これに対して、L1は、HPV16 L1ペプチドプールと共にインキュベートされたBLCCL（陽性対照）を意味する。FACSscan実験においてIFN発現に基づいて反応性であると分類されたCD8陽性T細胞の割合をY軸にプロットする。

【図11】

図11は、異なるHPV18ペプチドプールを提示するドナー同一BLCCLによる、特異的ヒトT細胞の再刺激後の2つのFACSscan実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプール（A～H、1～7）の名称はX軸に示す；“なし”は、バッファーのみとインキュベートされたBLCCL（陰性対照）を意味し、これに対して、L1及びE7は、それぞれHPV18 L1ペプチドプール及びHPV18 E7ペプチドプールと共にインキュベートされたBLCCL（陽性対照）をそれぞれ意味する。FACSscan実験においてIFN発現に基づいて反応性であるとして、したがってTヘルパー1細胞（ T_{H1} ）であるとして分類されたCD4陽性T細胞の割合を、図11の上部において、Y軸にプロットする。L1及びE7の値を、異なるY軸目盛りを用いた別のグラフ（上部右）に、陰性対照と共に示す。FACSscan実験においてIL-4発現に基づいてTヘルパー2細胞（ T_{H2} ）であるとして分類されたCD4陽性T細胞の割合を、図11の下部において、Y軸にプロットする。

【図12】

図12は、異なるHPV18ペプチド又はペプチドプールを提示するドナー同一BLCCLによる、特異的ヒトT細胞の再刺激後の4つのFACSscan実験の分析図を示す。それぞれのペプチド（Q38、Q39、Q46及びQ47）の名称はX軸に示す；“なし”は、バッファーのみとインキュベートされたBLCCL（陰性対照）を意味し、これに対して、L1及びE7は、それぞれHPV18 L1ペプチドプール及びHPV18 E7ペプチドプールと共にインキュベートされたBLCCL（陽性対照）をそれぞれ意味する。各場合に、反応性T細胞の割合をY軸にプロットする。

図12（上部左）は、FACSscan実験においてIFN発現に基づいて反応性であるとして、したがってTヘルパー1細胞（ T_{H1} ）であるとして分類されたCD4陽性T細胞の割合をプロットする。

図12（上部右）は、FACSscan実験においてIFN発現に基づいて反応性細胞傷害性T細胞であるとして分類されたCD8陽性T細胞の割合をプロットする。

図12（下部左）は、FACSscan実験においてIL-4発現に基づいてTヘルパー2細胞（ T_{H2} ）であるとして分類されたCD4陽性T細胞の割合をプロットする。

図12（下部右）は、IL-4を発現するCD8陽性T細胞の割合をプロットする。

【図13】

図13は、異なるHPV16ペプチドプールを提示するドナー同一BLCCLによる、特異的ヒトT細胞の再刺激後のFACSscan実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプール（A～H、1～7）の名称はX軸に示す；“なし”は、バッファーのみとインキュベートされたBLCCL（陰性対照）を意味し、これに対して、L1及びE7は、それぞれHP

10

20

30

40

50

V16 L1ペプチドプール及びHPV18 E7ペプチドプールと共にインキュベートされたB L C L (陽性対照)をそれぞれ意味する。F A C S c a n実験においてI F N 発現に基づいて反応性であるとして、したがって細胞傷害性T細胞であるとして分類されたC D 8陽性T細胞の割合をY軸にプロットする。

【図14】

図14は、異なるHPV18ペプチドプール又はペプチドを提示するドナー同一B L C Lによる、特異的ヒトT細胞の再刺激後の2つのF A C S c a n実験の分析図を示す。それぞれのペプチドプール(A~H、1~7)又はペプチドQ30の名称はX軸に示す；“なし”は、バッファーのみとインキュベートされたB L C L (陰性対照)を意味し、これに対して、L1及びE7は、それぞれHPV18 L1ペプチドプール及びHPV18 E7ペプチドプールと共にインキュベートされたB L C L (陽性対照)をそれぞれ意味する。F A C S c a n実験においてI F N 発現に基づいて反応性であるとして、したがってTヘルパー1細胞(T_H1)であるとして分類されたC D 4陽性T細胞の割合を、図14の上部において、Y軸にプロットする。F A C S c a n実験においてI L - 4発現に基づいてTヘルパー2細胞(T_H2)であるとして分類されたC D 4陽性T細胞の割合を、図14の下部において、Y軸にプロットする。

10

【図15】

図15は、異なるペプチドを提示するR M A細胞による、特異的ネズミT細胞の再刺激後の2つのF A C S c a n実験の分析図を示す。それぞれのペプチドの名称はX軸に示す；ペプチドなしのR M A細胞はバッファーのみとインキュベートして、陰性対照として用いた。F A C S c a n実験においてI F N 発現に基づいて反応性であると分類されたC D 8陽性T細胞の割合をY軸にプロットする。

20

【図16】

図16は、それぞれペプチドQ43及びQ44を並びにそれぞれQ49をR M A細胞(上部)及びL K K細胞(下部)(標的細胞)に負荷した後の ^{51}Cr 放出実験の分析図を示す。該標的細胞を、HPV18 L1及びHPV18 E7ペプチドプールによって刺激されたT細胞(エフェクター細胞)によって溶菌させた、用いた標的細胞に対して用いたエフェクター細胞の比率は20である。細胞種類及びペプチドをX軸に示し、ペプチドなしの細胞は陰性対照として機能した。標的細胞からの ^{51}Cr の放出によって判定して、特異的に溶菌された標的細胞の%をY軸にプロットする。これらの%値は、実施例4に記載した式を用いて算出した。

30

【図17】

図17上部は、H7.1-A2特異的T細胞系におけるHPV18 E7₈₆₋₉₄エピトープ反応性T細胞を示す。H7.1-A2細胞による*in vitro*ワクチン接種によって、T細胞系を作製した。このT細胞系をE L I S p o tアッセイにおいて、ペプチドHPV18 E7₈₆₋₉₄を負荷された自己P B M Cに対して試験した。T c oは、非特異的T細胞を用いる陰性対照を意味し、これに対して、P B M C c oは、ペプチドを負荷されなかったP B M Cを用いる陰性対照を意味する。

図17下部は、HPV18 E7₈₆₋₉₄特異的T細胞の溶菌活性を示す。エピトープHPV18 E7₈₆₋₉₄に対するT細胞系を2人の健康な血液ドナーから調製して、細胞傷害性試験(^{51}Cr 放出アッセイ)(エフェクター：標的細胞比率30：1)においてペプチド-パルス処理(*peptide-pulsed*)自己B L C Lの溶菌に関して試験した。B L C L c oは、ペプチドでパルス処理されなかったB L C Lの陰性対照を意味する。

40

【図18】

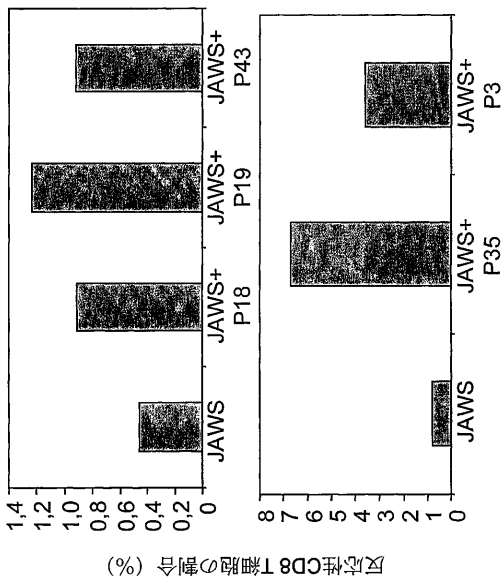
図18上部は、樹枝状細胞によるエピトープHPV18 E7₈₆₋₉₄の自然プロセッシングを示す。HPV18 E7に対するT細胞系を、タンパク質負荷又はペプチドプール負荷自己樹枝状細胞による*in vitro*ワクチン接種によって作製した。エピトープ負荷樹枝状細胞(D C)によるHPV18 E7₈₆₋₉₄特異的T細胞の刺激をE L I S p o tアッセイにおいて測定した。T c oは、非特異的T細胞を用いる陰性対照を意

50

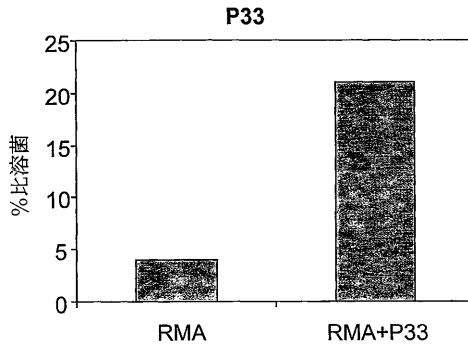
味し、これに対して、D C c o は、ペプチドを負荷されなかった D C s の陰性対照を意味する。

図 1 8 下部は、腫瘍浸潤リンパ球の集団における H P V 1 8 E 7 8 6 - 9 4 特異的 T 細胞の存在を示す。H P V 1 8 陽性及び H L A - A 2 陽性の女性患者から得た T I L を i n v i t r o で増殖させて、E L I S p o t アッセイにおいて、H P V 1 8 E 7 8 6 - 9 4 エピトープとの反応性に関して試験した。T c o は、非特異的 T 細胞を用いる陰性対照を意味し、これに対して、K - A 2 は、ペプチドを負荷されなかった K - A 2 細胞の陰性対照を意味する。

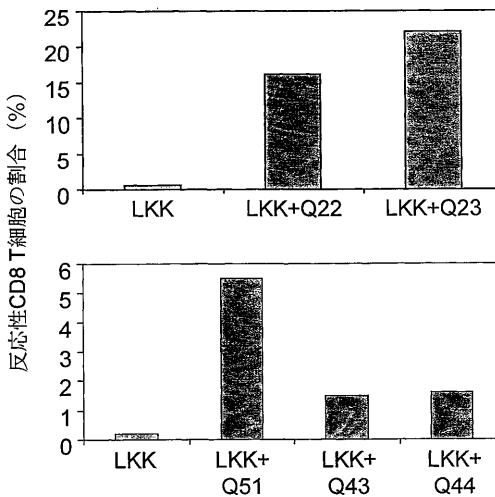
【 図 1 】



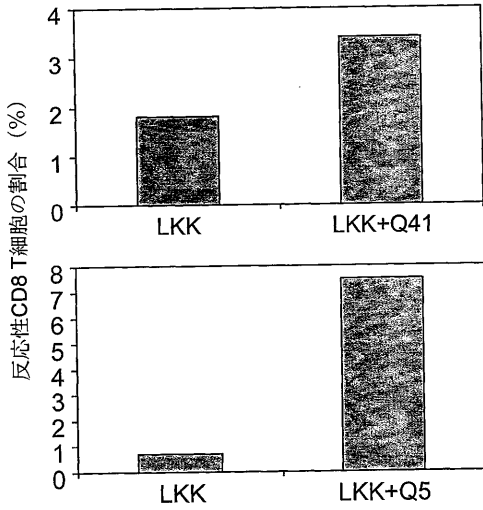
【 図 2 】



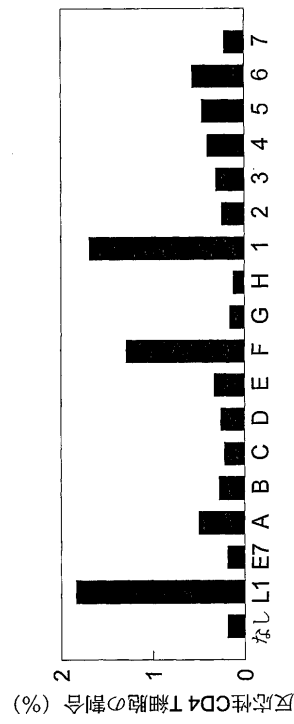
【 図 3 】



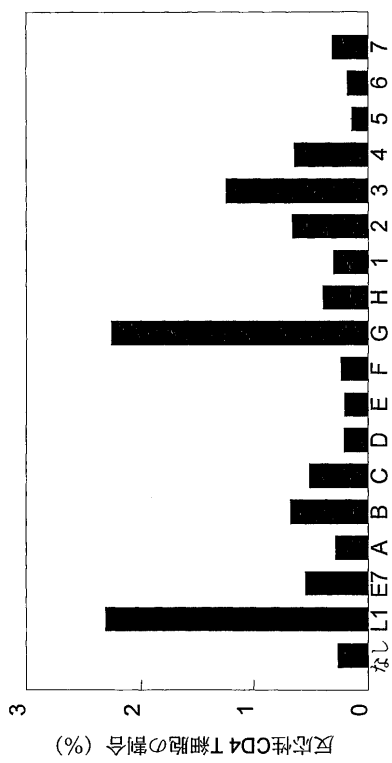
【 図 4 】



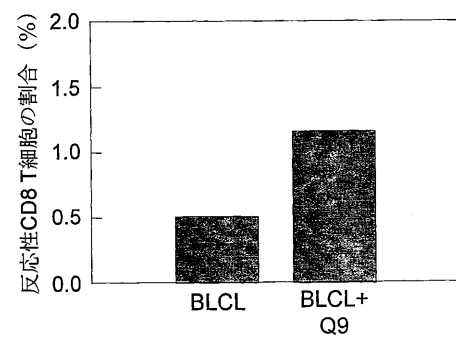
【 図 5 】



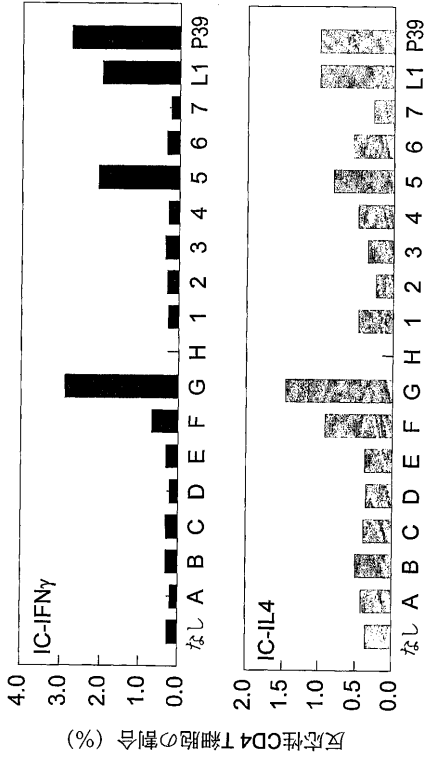
【 図 6 】



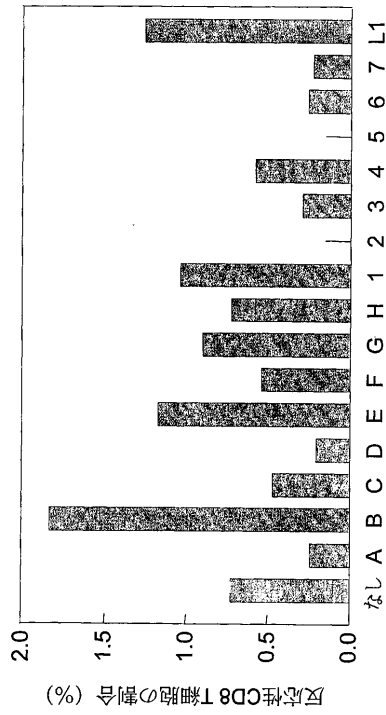
【 図 7 】



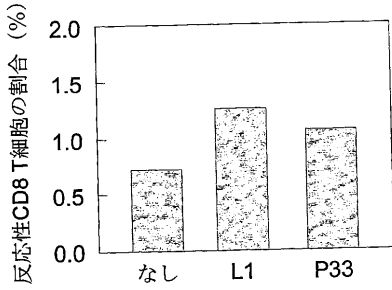
【 図 8 】



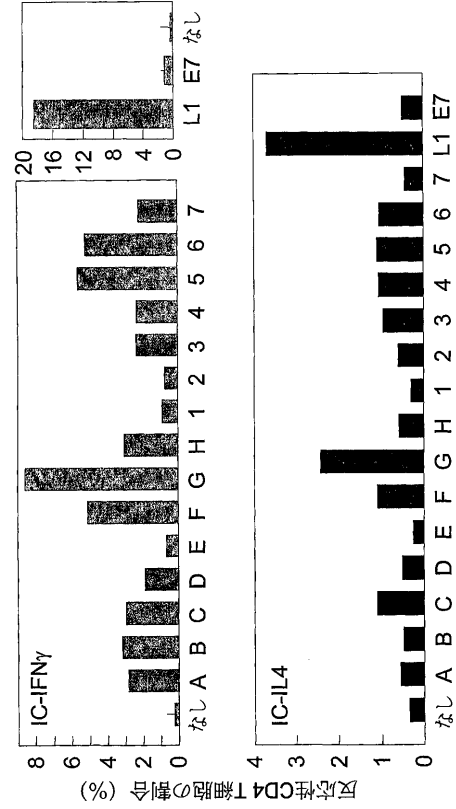
【 図 9 】



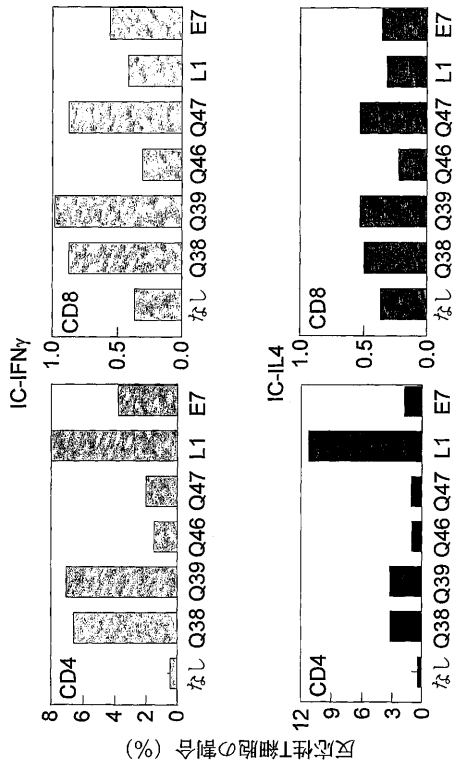
【 図 10 】



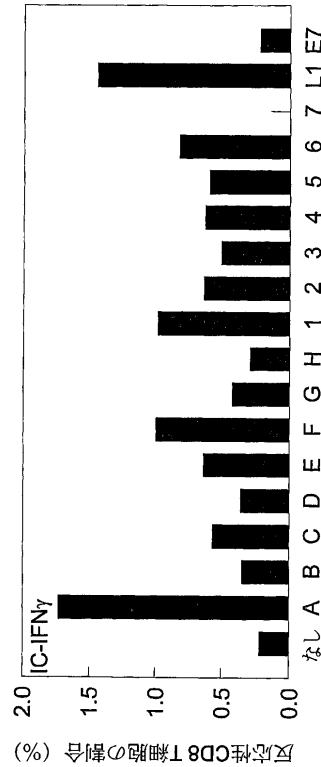
【 図 11 】



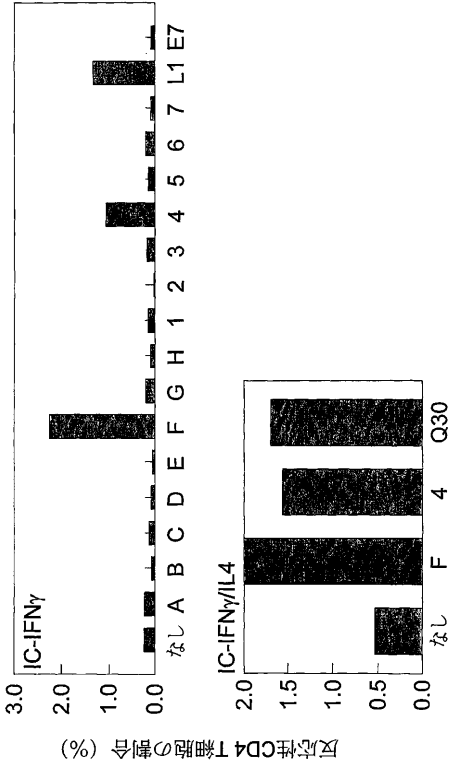
【 図 1 2 】



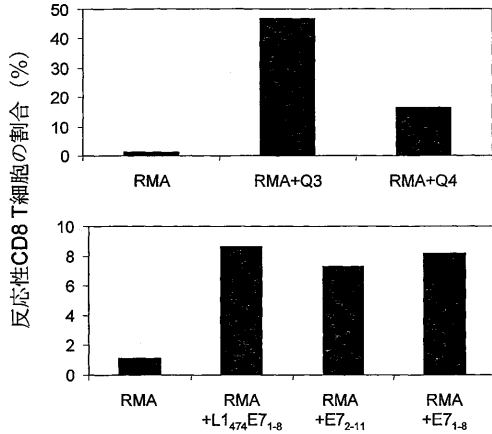
【 図 1 3 】



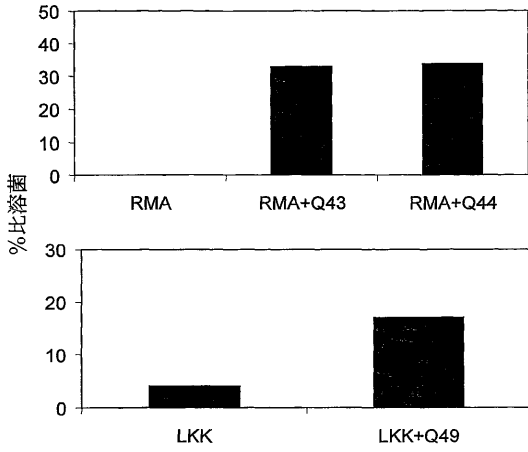
【 図 1 4 】



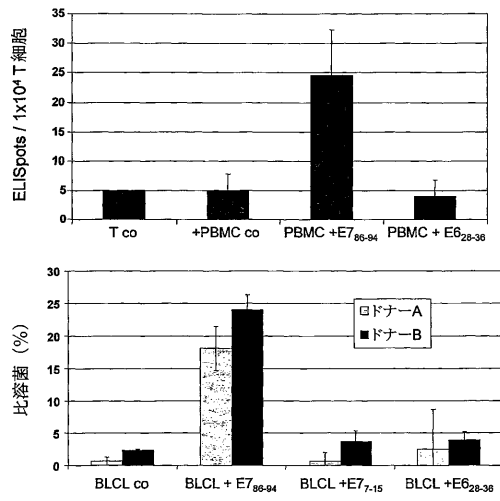
【 図 1 5 】



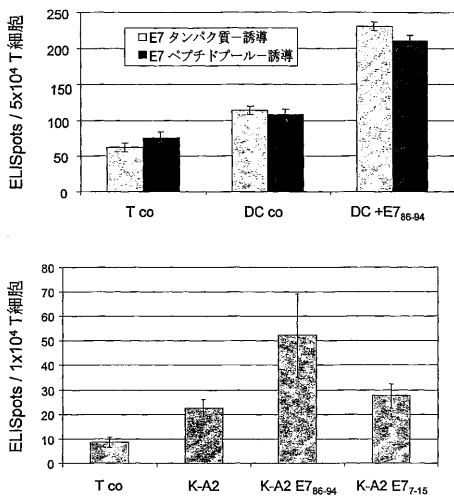
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Juni 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/44384 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/37,
15/62, 5/10, 5/06, C07K 14/025, 16/08, G01N 33/566,
33/53, 33/50, A61K 39/12

[NL/DE]; Tellhöhe 18, 82131 Stockdorf (DE). KAUF-
MANN, Andreas [DE/DE]; Sophienstr. 46, 07743 Jena
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14037

(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost,
Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, 81679
München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. November 2001 (30.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 59 631.2 1. Dezember 2000 (01.12.2000) DE

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Lochhamer Str. 11, 82152 Planegg/Martinsried
(DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIELAND, John



WO 02/44384 A2

(54) Title: T-CELL EPITOPE OF THE PAPILLOMAVIRUS L1 AND E7 PROTEIN AND USE THEREOF IN DIAGNOSTICS
AND THERAPY

(54) Bezeichnung: T-ZELLEPTOPE DES PAPILLOMAVIRUS L1- UND E7-PROTEINS UND IHRE VERWENDUNG IN DI-
AGNOSTIK UND THERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to a papillomavirus T-cell epitope with an amino acid sequence (I) and/or a functionally active
derivative thereof, and the use of the above in diagnostics and therapy.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz
und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

WO 02/44384

1

PCT/EP01/14037

5 **T-Zellepitope des Papillomavirus L1- und E7-Proteins und ihre Verwendung
in Diagnostik und Therapie**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz

10 YLPPVPVSKVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL, VGHYPYFPIKPPNNKILVPK,
GLQYRVFRIHLDPDNKFGFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNKLDDE,
QLCLIGCKPPIGEHWGKGGSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA, DMVDTGFGAMDFTTLQANKS,
VTVVDTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
PPPGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD,
15 PLGRKFLQAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGKQDIPK,
GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFVN,
NNGVCWHNQLFVTIVVDITRS, PPPPTSLVDTYRFVQSAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN,
PYDKLFWNVDLKEKFSLDL, YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
20 VDLCHEQLSDSEENDEID, SEENDEIDGVNHQHLPAR, SSADDLRAFQQLPLNLSFV,
NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL, FYHAGSSRLTVGNPYFRVP, PORHTMLCMCKCEARIKLV,
GMHGPKATL, HGPKATLQDI, MHGPKATL oder FQQLFLNLT

und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Dia-
25 gnostik und Therapie.

Die Papillomviren, auch Warzenviren genannt, sind doppelsträngige DNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 8000 Basenpaaren und einem Icosaederförmigen Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 55 nm. Bis heute sind mehr als
30 100 verschiedene humanpathogene Papillomavirustypen (HPV) bekannt, von denen einige, z.B. HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 oder HPV-58, bösartige Tumore und andere, z.B. HPV-6, HPV-11 oder HPV-42 gutartige Tumore verursachen können.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 2 -

Das Genom der Papillomaviren läßt sich in drei Bereiche unterteilen: Der erste Bereich betrifft eine nicht-kodierende Region, die Regulationselemente für die Transkription und Replikation des Virus enthält. Die zweite Region, sogenannte E-(Early)Region enthält verschiedene Protein-kodierende Abschnitte E1-E7, von denen z.B. das E6- und das E7-Protein für die Transformation von Epithelzellen verantwortlich sind und das E1-Protein die DNA-Kopienzahl kontrolliert. Bei der E6- und E7-Region handelt es sich um sogenannte Onkogene, die auch in bösartig entarteten Zellen exprimiert werden. Die dritte Region, auch L-(Late)Region genannt, enthält zwei Protein-kodierende Abschnitte L1 und L2, die für Strukturkomponenten des Viruskapsids kodieren. Das L1-Protein ist zu über 90% im viralen Kapsid vorhanden, wobei das Verhältnis von L1:L2 im allgemeinen 30:1 ist. Unter dem Begriff L1-Protein versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung das Hauptkapsid Protein der Papillomaviren (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445).

In über 50% der Fälle wird HPV-16 mit Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom) in Verbindung gebracht. HPV-16 ist der Hauptrisikofaktor für die Ausbildung von cervicalen Neoplasien. Das Immunsystem spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der Krankheit. So sind vermutlich zelluläre Immunantworten und insbesondere Antigen-spezifische T-Lymphozyten wichtig für den Abwehrmechanismus. Es wurde weiterhin gefunden, daß in hochgradig malignen cervicalen intraepithelialen Neoplasien (CIN II/III) und cervicalen Tumoren das E7-Gen konstitutiv in allen Schichten des infizierten Epithels exprimiert wird. Daher wird vor allem das E7-Protein als potentielles Tumorantigen und als Zielmolekül für aktivierte T-Zellen betrachtet (siehe z.B. WO 93/20844). Die E7-induzierte zelluläre Immunantwort im Patienten ist aber anscheinend nicht stark genug, um den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Die Immunantwort kann eventuell durch geeignete Impfstoffe verstärkt werden.

30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 3 -

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des L1-Gens bzw. die Coexpression des L1- und L2-Gens zur Bildung von Capsomeren, stabilen Capsomeren, Capsiden oder Virus-ähnliche Partikel (VLPs für virus-like particle) führen kann (siehe z.B. WO 93/02184, WO 94/20137 oder WO 94/05792). Unter Capsomeren versteht man eine oligomere Konfiguration, die aus fünf L1-Proteinen aufgebaut ist. Das Capsomer ist der Grundbaustein, aus denen virale Capside aufgebaut sind. Unter stabilen Capsomeren versteht man Capsomere, die nicht dazu in der Lage sind sich zu Capsiden zusammensetzen. Unter Capsiden versteht man die Hülle des Papillomavirus, die beispielsweise aus 72 Capsomeren zusammengesetzt ist (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445). Unter VLP versteht man ein Capsid, das morphologisch und in seiner Antigenität einem intakten Virus gleicht. Die VLPs konnten zur Auslösung einer humoralen Immunantwort, die durch Bildung von neutralisierenden Antikörpern charakterisiert ist, in verschiedenen tierischen Systemen verwendet werden. Die Bildung von virus-neutralisierenden Antikörpern gegen L1- und/oder L2-Protein ist jedoch von geringerer klinischer Bedeutung, wenn die Virusinfektion bereits stattgefunden hat, da für die Eliminierung virus-infizierter Zellen keine Antikörper, sondern eine virus-spezifische zytotoxische T-Zell-(CTL)-Antwort notwendig zu sein scheint. Und obwohl VLPs in der Lage sind eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen, scheint eine ausschließlich gegen die Kapsidproteine L1 und/oder L2 gerichtete Immunantwort nicht zur Bekämpfung eines durch Papillomaviren bedingten Tumors geeignet.

Es wurden daher sogenannte chimäre Papillomavirus-ähnliche Partikel (CVLPs für chimeric virus-like particle) entwickelt, die aus einem HPV-16 Fusionsprotein des Kapsidproteins L1 und des potentiellen Tumorantigen E7 bestehen (WO 96/11272 und Müller, M. et al. (1997) Virology, 234, 93). Die CVLPs lösten nur im geringen Maße eine gegen das E7-Protein gerichtete humorale Immunantwort aus (Müller, M. et al. (1997), supra). Einige der getesteten CVLPs induzieren jedoch tatsächlich die erwünschte E7-spezifische zytotoxische T-Zellantwort in Mäusen (siehe auch Peng S. et al. (1998) Virology 240,147-57). CVLPs sind des-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 4 -

halb sowohl für die Entwicklung eines Impfstoffes als auch für die Behandlung
bereits bestehender Infektionen und daraus resultierender Tumore interessant, da
die über MHC-Moleküle der Klasse I-präsentierten E7-Peptide von Tumorzellen
5 Zielmoleküle von zytotoxischen T-Zellen darstellen würden.

Einem Impfstoff bestehend aus CVLPs liegt das Prinzip der Pseudoinfektion der
Zellen durch die CVLPs zugrunde. Dies bedeutet, daß die CVLPs wie Viren in die
Zelle gelangen, dort zu Peptiden prozessiert werden, die Peptide dann auf MHC-
10 Klasse I und II-Moleküle geladen werden und letztendlich CD8- bzw. CD4-
positiven T-Zellen präsentiert werden. CD8-Zellen können als Folge dieser Stim-
ulation zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und dann eine zelluläre Im-
munantwort bewirken, CD4-Zellen hingegen entwickeln sich zu T-Helferzellen
und stimulieren B-Zellen zu einer humoralen oder CD8-positive T-Zellen zu einer
15 zytotoxischen Immunantwort und können selbst die Lyse von infizierten Zellen
induzieren.

Kleine Peptide können bereits auf der Zelloberfläche an MHC-Klasse I-Moleküle
binden und dann ohne weitere Prozessierung CD8- oder CD4-positive Zellen zu
20 einer zellulären Immunantwort stimulieren. Ein bestimmtes Peptid kann jedoch
nur durch bestimmte MHC-Moleküle gebunden werden. Durch den großen Poly-
morphismus der MHC-Moleküle in natürlichen Populationen kann deshalb ein
bestimmtes Peptid lediglich durch einen kleinen Teil einer Population gebunden
und präsentiert werden. Unter Präsentation im Sinne der vorliegenden Erfindung
25 wird verstanden, wenn ein Peptid oder Proteinfragment an ein MHC-Molekül
bindet, wobei diese Bindung beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum, im
extrazellulären Raum, den Endosomen, Proendosomen, Lysosomen oder Protoso-
somen, stattfinden kann, und wenn dann dieser MHC-Molekül-Peptid-Komplex
auf der extrazellulären Seite der Zellmembran gebunden ist, so daß er durch Im-
30 munitäten spezifisch erkannt werden kann.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 5 -

Da CVLPs sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort auslösen und nicht MHC-restringiert sind, eignen sich diese Partikel generell zur Entwicklung von Impfstoffen, indem die Fähigkeit zur Partikelbildung durch einen L1-Anteil zur Verfügung gestellt wird und ein zusätzlicher Antigenanteil an diesen L1-Anteil fusioniert wird.

Bei der Entwicklung derartiger CVLPs ist es unbedingt notwendig, ein funktionelles Testsystem zur Verfügung zu haben, mit dem man direkt die Immunogenität von CVLPs untersuchen kann. Ein derartiges Testsystem sollte die Eigenschaft besitzen, daß CVLPs mit unterschiedlichen Antigenanteilen mit demselben Testsystem untersucht werden können. Da für immunologische Therapieverfahren von Tumoren oder Viruserkrankungen die zelluläre Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, stellte sich die Aufgabe, die durch CVLPs vom Typ 16 bzw. 18 hervorgerufene zelluläre Immunantwort meßbar zu machen.

Die Lösung dieser Aufgabe gelang durch die Identifikation von HPV-16 bzw. HPV-18 T-Zell-Epitopen, die in Verbindung mit MHC-Molekülen in vivo und in vitro beispielsweise eine zytotoxische T-Zellantwort auslösen. Die erfindungsge-
mäßigen Peptide haben daher die Sequenz

YLPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIIYHAGTSRL, VGHYPFPIKKPNNKILVPK,
GLQYRVFRIHLPDPNKFQFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGSG, QPLGVGISGHFLLNKLDDE,
QLCLIGCKPPIGEHWKQSP, LELINTVIQDGDMDVTGPGA, DMVDTGFGAMDFTTLQANKS,
VTVDVTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
PPGGTLEDYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAQCQKHTPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD,
PLGRKFLQAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAAGGNKQDIPK,
GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFVN,
NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS, PPPPTSLVDYRFVQSVAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN,
PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL, YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
VDLLCHEQLSDSEENDEID, SEENDEIDGVNHQHLPAR, SSADDLRAFQQLFLNLSFV,
NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL, FVHAGSSRLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCCCKCEARIKLV,
GMHGPKATL, HGPATLQDI, MHGPKATL oder FQQLFLNNTL.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 6 -

Potentielle Epitope sind bereits in Kast et al., (1994) Journal of Immunology 152, 3904-3912 publiziert. Allerdings wird in dieser Publikation lediglich gezeigt, daß diese Peptide an HLA A1 Moleküle binden können, jedoch nicht, daß tatsächlich ein zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst werden kann. Des weiteren sind keine Daten aufgeführt, die dokumentieren, daß die Peptide als Bestandteil eines Proteins durch T-Zellen erkannt werden. Es wurde vielfach gezeigt, daß Peptide, die per se an HLA-Moleküle binden, nicht notwendigerweise auch durch T-Zellen erkannt werden. Des weiteren ist bekannt, daß T-Zellen, die zwar ein Peptid erkennen, meßbar dadurch daß sie sich durch das Peptid zu einer T-Zellantwort induzieren lassen, nicht notwendigerweise auch Zellen erkennen, die mit ganzen Proteinen – enthaltend das entsprechende Peptid – beladen wurden. Dies ist dadurch zu erklären, daß oft Peptide Proteaseschnittstellen enthalten, innerhalb derer die Peptide während der Prozessierung der ganzen Proteine in der Zelle geschnitten und somit zerstört werden und somit nicht mehr durch T-Zellen erkannt werden können. Diese Problematik wird beispielsweise in Feltkamp et al. (1993), Eur. J. Immunol. 23: 2242-2249 bestätigt.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz

YLPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL, VGHFYFPIKKPNNKILVPK, GLQYRVFRIHLDPDNKPGFP, WACVGVVEVGRGQPLGVGIG, QPLGVGISGHPLLNKLDDE, QLCIGCKPPIGEHWGKGSF, LELINTVIQDGMVDTGFGA, DMVDTGFGAMDFTLQANKS, VTVDTRSTNMSLCAAIST, TTYKNTNFKEYLRHGOEYDL, IFQLCKITLADVMTYIHSM, PPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAACQKHTPPAPKE, LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLVQAGMHGDTPTLH, YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGKQDIPK, GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL, PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN, NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS, PPPPTSLVDTYRFVQSVAI, YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLRFWNVDLKEKFSLDL, YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE, VDLLCHEQLSDSEENDEID, SEENDEIDGVNHQHLPARR, SSADDLRAFQQLFLNLSFV, NTDDYVTRTSIPYHAGSSRL, FYHAGSSRLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV, GMHGPATL, HGPATLQDI, MHGPKATL oder FQQLFLNLT

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 7 -

und/oder eine funktionell aktive Variante davon.

5 Unter einer funktionell aktiven Variante der erfindungsgemäßen T-Zell-Epitope versteht man ein T-Zell-Epitop, das in einem T-Zell-Zytotoxizitäts-Testsystem (siehe beispielsweise Beispiele 2-5 der vorliegenden Erfindung) eine, an der Zytotoxizität des erfindungsgemäßen T-Zell-Epitops gemessene Zytotoxizität besitzt, die mindestens der Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrollen und der dreifachen Standardabweichung entspricht, vorzugsweise von mindestens ca. 10 30%, insbesondere mindestens ca. 50% und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 80%.

Eine bevorzugte Variante ist beispielsweise ein T-Zell-Epitop mit einer Sequenzhomologie zu den erfindungsgemäßen T-Zell-Epitopen von mindestens ca. 65%, 15 vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene. Andere bevorzugte Varianten sind auch T-Zell-Epitope, die eine strukturelle Homologie zu den erfindungsgemäßen T-Zell-Epitopen besitzen. Solche Epitope können aufgefunden werden, indem man gegen die erfindungsgemäßen T-Zell-Epitope spezifische T-Zellen generiert (DeBruijn M.L. et al. (1991) 20 *Eur. J. Immunol.* 21, 2963-70; und DeBruijn M.L. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 3013-20) und beispielsweise synthetisch hergestellte Peptide nach Wahl auf Erkennung durch die peptidspezifischen T-Zellen getestet werden (siehe Beispiele). Insbesondere werden unter T-Zellepitopen zytotoxische T-Zellepitope oder T-Helferzellepitope (T_H , T_{H1} oder T_{H2}) verstanden. Es sind jedoch auch nicht zyto- 25 toxische T-Zellen bekannt, die ebenfalls MHC I-Moleküle erkennen können, so daß auch nicht-zytotoxische T-Zellepitope als Variante von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein T-Zell-Epitop, 30 das Teil einer Verbindung ist, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und im Falle eines HPV-16 T-Zell-Epitops

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 8 -

keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist. Bei-

spielsweise kann die Verbindung eine Fusion von gleichen oder verschiedenen
5 erfindungsgemäßen T-Zell-Epitopen darstellen.

In einer besonderen Ausführungsform kann ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop
und/oder eine funktionell aktive Variante in einem L1-Protein eines anderen Pa-
pillomavirus oder in einem chimären L1-Protein, beispielsweise einem
10 HPV18L1E7- oder HPV16L1E7-Fusionsprotein, enthalten sein. Eine solche er-
findungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

Vorzugsweise kann das genannte T-Zell-Epitop als Teil einer Verbindung ein
Polypeptid, das in bevorzugter Weise weitere Aminosäuresequenzen enthält, ins-
15 besondere ein Fusionsprotein sein. Insbesondere kann die Verbindung ein Poly-
peptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35
Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders
bevorzugter Weise von mindestens ca. 9-12 Aminosäuren Länge sein.

20 Um die Verbindung zu detektieren oder in ihrer Aktivität der Bindung an T-Zellen
zu modifizieren, kann sie eine chemische, radioaktive Isotopen-, nicht radioaktive
Isotopen-, und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des ge-
nannten Fusionsproteins enthalten.

25 Beispiele von dem Fachmann bekannten chemischen Substanzen, die sich für eine
erfindungsgemäße chemische Markierung eignen, sind: Biotin, FITC (Fluorescei-
nisothiocyanat) oder Streptavidin.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 9 -

Eine mögliche Ausführungsform ist, daß ein Peptid derart modifiziert wird, daß es mindestens ein Lysin enthält. An dieses Lysin wird in der dem Fachmann bekannter Weise Biotin oder FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt. Ein derar-

5 tig modifiziertes Peptid wird an ein entsprechendes MHC-Molekül oder an eine Zelle mit entsprechenden MHC-Molekülen gebunden. Daraufhin kann das Peptid über markiertes Avidin oder Streptavidin bzw. direkt über die Fluoreszenz des FITC nachgewiesen werden.

10 Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P oder ^{14}C .

Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße nicht radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^2H oder ^{13}C .

Beispiele von dem Fachmann bekannten fluoreszierenden Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße Fluoreszenzmarkierung eignen, sind: ^{152}Eu , Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-
20 Phtaldehyd oder Fluorescamin.

Dem Fachmann sind weitere hier nicht aufgeführte Markierung bekannt, die auch im Sinne dieser Erfindung zur Markierung eingesetzt werden können.

25 Beispiele von dem Fachmann bekannten erfindungsgemäßen chemischen Modifikationen sind die Übertragung von Acetyl-, Phosphat-, und/oder Monosaccharidgruppen

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 10 -

Erfindungsgemäße Polypeptide mit einer Aminosäurelänge von ca. 50 können beispielsweise durch eine chemische Peptidsynthese hergestellt werden. Längere Polypeptide werden vorzugsweise gentechnisch erzeugt.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Nukleinsäure, beispielsweise zur Expression des genannten T-Zell-Epitops oder der Verbindungen, die beispielsweise folgende Komponenten enthält: (a) mindestens ein regulatorisches Element und (b) mindestens eine Nukleinsäure, die für eine Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindung kodiert. Das genannte Nukleinsäurekonstrukt ist vorzugsweise aus DNA oder RNA. Geeignete regulatorische Elemente erlauben beispielsweise die konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzykluspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen oder die konstitutive, metabolischspezifische oder regulierbare Expression in prokaryotischen Zellen. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer, und/oder Repressorsequenzen.

Beispiele für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen sind Promotoren die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, wie CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor und virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV HTLV oder HIV.

Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen sind der Tetrazyklinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die gewebsspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 11 -

oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden.

- 5 Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen sind die Promotoren der folgenden Gene: cdc25C, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker J. und Müller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6).
- 10 Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolisch spezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glucosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann beispielsweise auch für die Herstellung einer DNA-Vakzine verwendet werden. Dazu können die kodierenden Sequenzen für diese Epitope sowie für andere bereits bekannte Epitope von Papillomaviren in beliebiger Reihenfolge direkt oder mit mehreren Nukleotiden dazwischen in einem offenen Leserahmen aneinandergelagert werden. Ferner können Papillomavirus-fremde DNA-Sequenzen angefügt werden, die zum Beispiel für ein intrazelluläres Targeting der entstehenden Polypeptidkette eingesetzt werden, insbesondere in das endoplasmatische Retikulum, in die Endosomen oder die Lysomen.

Um die Einführung der genannten Nukleinsäure in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen, oder nicht viralen Vektors vorliegen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure ent-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 12 -

hält. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht virale Vektoren

5 eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder Poly-Lysin konjugierte DNA.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Zelle, die mindestens ein T-Zell-Epitop enthält, vorzugsweise präsentiert. In einer besonderen Ausführungsform wird die Zelle durch einen der erfindungsgemäßen Vektoren transfiguriert, transformiert oder infiziert. Beispielsweise exprimiert diese Zelle unter dem Fachmann bekannten Bedingungen, die zur Aktivierung der jeweils verwendeten regulierbaren Elemente führen, das erfindungsgemäße Polypeptid. Das Polypeptid kann dann aus dieser Zelle isoliert und z.B. unter Verwendung einer der oben genannten Markierungen aufgereinigt werden. Zur gentechnischen Herstellung eignen sich prokaryotische und eukaryotische Zellen, insbesondere Bakterienzellen wie beispielsweise E. coli, Hefezellen wie beispielsweise S. cerevisiae, Insekten Zellen wie beispielsweise Spodoptera frugiperda Zellen (Sf-9) oder Trichoplusia ni Zellen oder Säugerzellen wie beispielsweise COS-Zellen oder HeLa-Zellen. Anschließend können die exprimierten, erfindungsgemäßen Verbindungen nach Standardverfahren aufgereinigt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist es, die Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptide exprimiert, selbst zu verwenden, wobei in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die Zelle Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids über MHC-1 Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Für die Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle sind Antigen-präsentierende Zellen wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Fibroblasten oder anderen HLA A2.01 positive Zellen, in einer bevorzugten Ausführungsform JY-, T2, CaSki-Zellen oder EBV-transformierte B-Zelllinien (BLCL), geeignet. Die erfindungs-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 13 -

gemäßigen Zellen, die ein Polypeptid enthaltend ein T-Zell-Epitop, präsentieren, können als Zielzellen zur Restimulation von Immunzellen, insbesondere T-Zellen und/oder zur Messung der Aktivierung von T-Zellen eingesetzt werden. Unter Zielzelle im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle zu verstehen, die ü-

5

ber MHC-Moleküle ein T-Zell-Epitope präsentiert und damit spezifisch eine T-Zell-Aktivierung hervorruft, insbesondere eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen die Zelle.

10 Ferner kann die ein T-Zell-Epitop enthaltene Verbindung, Teil eines Komplexes sein, der dadurch charakterisiert ist, daß die Verbindung kovalent oder über hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindung oder Wasserstoffbrückenbindungen mit mindestens einer weiteren Spezies wie Peptide, Proteine, Peptoide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysaccharide und Nukleinsäuren verbunden ist.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung und mindestens eine weitere Verbindung. Eine bevorzugte Ausführungsform ist, daß das Polypeptid in Verbindung mit MHC Klasse I-Molekülen, zum Beispiel als HLA A2.01 (oder auch HLA A1, HLA A24 etc.) Tetramer vorliegt. Besonders bevorzugt sind humane MHC-Klasse I Moleküle. Durch die Technik von Altman J.D. et al. (1996, Science 274, 94-6) lassen sich beispielsweise HLA A2.01-Tetramere mit den entsprechenden gebundenen Peptiden herstellen, die in der Lage sind, an die T-Zellrezeptoren von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen zu binden.

20

25 Eine weitere Ausführungsform ist die Immobilisierung der erfindungsgemäßen Verbindung oder des genannten Komplexes an Trägermaterialien. Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers,

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 14 -

insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose oder Gerüstproteine.

Zur Aufreinigung des erfindungsgemäßen Komplexes kann eine Komponente des Komplexes zusätzlich noch ein Protein-Tag enthalten. Erfindungsgemäße Protein-Tags erlauben beispielsweise die hochaffine Adsorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern ohne den Komplex im nennenswerten Maße zu eluieren und anschließende gezielte Elution des adsorbierten Komplexes. Beispiele von dem Fachmann bekannten Protein-Tags, sind ein (HIS)₆-Tag, ein Myc-Tag, ein FLAG-Tag, ein Hämagglutinin-Tag, Glutathion-Transferase (GST)-Tag, Intein mit einem Affinitäts- Chitin-binding Tag oder Maltose binding protein (MBP)-Tag. Die erfindungsgemäßen Protein-Tags können sich N-, C-terminal, und/oder intern befinden.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop. Ein derartiges Verfahren besteht vorzugsweise aus drei Schritten:

- a) In einem ersten Schritt werden Zellen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, vorzugsweise mit mindestens einer Verbindungen enthaltend ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop stimuliert. Diese Verbindung kann mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens ein Capsomer, mindestens ein stabiles Capsomer, mindestens ein VLP, mindestens ein CVLP, und/oder mindestens ein Virus bedeuten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Immunzellen durch die Inkubation mit CVLPs stimuliert. Diese Stimulation kann beispielsweise in Form einer Impfung erfolgen, oder durch Inkubation von Immunzellen mit CVLPs in vitro. Derartig stimulierte Immunzellen werden beispielsweise nach einer Impfung oder bei einem Tumorpatienten

aus dem Blut, aus Tumoren oder aus Lymphknoten gewonnen, und/oder werden kultiviert.

- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung 5 enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert und/oder mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex inkubiert.
- c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T- 10 Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies 15 D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B- 20 Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen, die erfindungsgemäße Markierungen enthalten, erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T- 25 Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, 30 oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, mar-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 16 -

kierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated

5 Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ⁵¹Cr-Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), be-
10 spielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a) eingeführt wird.

15 a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a) nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mit mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop,
20 mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 8 Wochen, insbesondere für mindestens ca.
25 1 Woche kokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Kokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

(i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-
30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 17 -

Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,

- 5 (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop präsentiert,
- im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbehälter zu verstehen.
- 10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer T-Zell-Epitop präsentierenden Zielzelle. Hierbei ist es möglich, die Zielzelle mit Kombinationen von unterschiedlichen T-Zell-Epitopen zu beladen.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mit mindestens einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop und/oder mindestens einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop inkubiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle in Wachstumsmedium, das erfindungsgemäße Polypeptide enthält, oder mit

20 MHC Klasse I-Komplexen mit gebundenen erfindungsgemäßen Polypeptiden inkubiert. Die MHC Klasse I-Komplexe können beispielsweise als HLA A2.01-Tetramere vorliegen. Ein Tetramer bindet dabei in der Regel vier Peptide. Diese können sowohl identisch sein oder aber unterschiedliche Spezies von Peptiden repräsentieren. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle

25 mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert, transformiert und/oder infiziert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit einem Vakziniavirusvektor infiziert. Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit Antigen-präsentierenden Zellen beispielsweise mit B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, embryonalen Zellen oder Fibroblasten oder anderen HLA-positiven Zellen, in einer Ausführungs-

30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 18 -

form mit JY-, T2-, CaSki- Zellen oder EBV-transformierten B-Zelllinien durchgeführt.

Die verwendeten CVLPs enthalten ein Papillomavirus L1-Protein oder Varianten davon, insbesondere HPV16 L1-Protein und, jedoch nicht notwendigerweise, ein zu L1 heterologes Protein oder Varianten davon. Die zwei Proteine können direkt oder indirekt gebunden vorliegen. Direkt gebunden meint im Sinne der Erfindung, daß eine kovalente Bindung zwischen den beiden Proteinen vorliegt, beispielsweise eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung. Indirekt gebunden bedeutet, daß die Proteine über nicht-kovalente Bindungen gebunden sind, beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindungen oder Wasserstoffbrücken. In einer weiteren Ausführungsform enthalten die CVLPs zusätzlich zu L1-Protein oder Varianten davon ein Papillomavirus L2-Protein.

15 Eine bevorzugte Ausführung des L1-Proteins der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise L1-Proteine mit einer oder mehreren Deletionen, insbesondere einer C-terminalen Deletion. Eine C-terminale Deletion hat den Vorteil, daß die Effizienz der Bildung virus-ähnlicher Partikel gesteigert werden kann, da das am C-Terminus lokalisierte nukleäre Lokalisationssignal deletiert wird. Die C-terminale Deletion beträgt daher vorzugsweise bis zu ca. 35 Aminosäuren, insbesondere ca. 25 bis ca. 35 Aminosäuren, vor allem ca. 32 bis ca. 34 Aminosäuren. Beispielsweise ist eine 32 Aminosäuren lange C-terminale Deletion des HPV16 L1-Proteins ausreichend, um die Bildung von virus-ähnlichen Partikeln um das mindestens ca. zehnfache steigern zu können. Des Weiteren kann das L1-Protein 20 eine oder mehrere Mutationen tragen oder der L1-Anteil aus L1-Proteinen verschiedener Papillomaviren zusammengesetzt sein. Gemeinsames Kennzeichen der erfindungsgemäßen L1-Proteine ist, daß sie die Bildung von VLPs bzw. CVLPs zulassen und daß sie mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthalten.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 19 -

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das L1-Protein oder Varianten davon und das zu L1 heterologe Protein ein Fusionsprotein. Beinhaltet sind auch heterologe Proteine, die aus mehreren verschiedenen Proteinen oder Teilen davon zusammengesetzt sind. Dies können beispielsweise auch Epitope, insbesondere

5

zytotoxische T-Zellepitope von Proteinen sein. Epitope im Sinne der Erfindung können dabei auch Teil eines synthetischen Polypeptids mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von

10

mindestens ca. 9 Aminosäuren sein.

Bevorzugt sind zu L1 heterologe Proteine, die von einem viralen Protein abgeleitet sind, beispielsweise abgeleitet von HIV, HBV oder HCV, vorzugsweise von Papillomaviren, insbesondere von humanen Papillomaviren.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein E-Protein eines Papillomavirus, vorzugsweise ein E6- und/oder E7-Protein. Insbesondere ist bevorzugt, wenn das E-Protein ein deletiertes E-Protein ist, vorzugsweise ein C-terminal deletiertes, insbesondere ein C-terminal deletiertes E7-Protein, da diese Konstrukte in

20

Verbindung mit deletiertem L1-Protein bevorzugt virus-ähnliche Partikel ausbilden können. Insbesondere bevorzugt sind Deletionen bis zu 55 Aminosäuren, vorzugsweise ca. 5 bis ca. 55 Aminosäuren, insbesondere ca. 38 bis ca. 55 Aminosäuren.

25

In einer weiteren Ausführungsform kann das zu L1 heterologe Protein von Antigenen nicht viraler Erreger abstammen. Ebenso können sie von Autoimmunantigenen wie z.B. Thyroglobulin, Myelin basic protein oder Zona Pellucida Glycoprotein 3 (ZP₃), die mit bestimmten Autoimmunkrankheiten wie z.B. Thyroiditis, Multiple Sklerose, Oophoritis oder rheumatoider Arthritis assoziiert sind, abgeleitet sein. In einer bevorzugten Ausführung stammt das zu L1 heterologe Protein

30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 20 -

von Tumorantigenen ab, vorzugsweise Melanomaantigenen wie MART, Ovarialcarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1 oder CA125, Colocarzinomantigenen wie CA125 oder Mammacarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1, BCRA-2.

5

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen, die durch Präparation aus Proben gewonnen werden. Dieses Verfahren erlaubt es zu bestimmen, ob in einer Probe, beispielsweise einer Blutprobe eines Patienten oder in Tumoren oder Lymphknoten eines Tumorpatienten, Papillomavirus L1-Protein-spezifische zytotoxische T-Zellen vorhanden sind. Ein derartiges Nachweisverfahren enthält die folgenden Schritte:

- 10 a'') In einem ersten Schritt werden Zellen gewonnen, beispielsweise durch Blutabnahme von einem Patienten oder durch die Präparation zum Beispiel von Tumoren oder Lymphknoten. Anschließend werden die Zellen in
15 Wachstumsmedium aufgenommen und kultiviert.
- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert oder mit mindestens einem Komplex, der als eine Komponente eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitope umfaßt, inkubiert.
- 20 c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Im-
- 25
30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 21 -

munzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen, die Markierungen enthalten, erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop er-

5

kennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ⁵¹Cr-Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

10

15

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a'') eingeführt wird.

25 a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a'') nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens
30 einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus,

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 22 -

mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 8 Wochen, insbesondere für mindestens ca. 1 Woche kokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

5

Unter Kokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

- 10
- (i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- 15
- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert,

im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbehälter zu verstehen.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testsystem (Kit) zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:

- 25
- a) mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop, mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex, und
- b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 23 -

Das Testsystem wird in einer besonderen Ausführungsform zur Bestimmung der, beispielsweise in einer Blutprobe eines Patienten oder in Tumoren oder Lymphknoten eines Tumorpatienten vorhandenen L1-Protein-spezifischen zytotoxischen T-Zellen verwendet. In diesem Fall sind die in b) beschriebenen Zellen im Test-

5

system enthaltene Kontrollzellen, deren Aktivierung durch die erste Kitkomponente, die unter a) genannten Substanzen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit die T-Zell-Aktivierung von aus Patienten isolierten Zellen durch die Kitkomponente a) verglichen.

10

In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird das Testsystem beispielsweise zur Bestimmung der L1-Protein-spezifischen Antigenität einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Capsomers, eines stabilen Capsomers, eines VLPs, eines CVLPs, und/oder eines Virus verwendet. In diesem Fall sind die in a) beschriebenen Substanzen Kontrollsubstanzen deren aktivierende Wirkung auf die zweite Kitkomponente, die unter b) genannten Zellen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit der aktivierenden Wirkung einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Capsomer, einem stabilen Capsomer, einem VLP, ein CVLP, und/oder einem Virus auf die Kitkomponente b) verglichen.

15

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens einer erfindungsgemäßen Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop zur, und/oder mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.

25

30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 24 -

Zur Stimulation von Immunzellen *in vitro* wie *in vivo* eignen sich insbesondere Zellen, die mindestens eines der erfindungsgemäßen Moleküle über ihre MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren. Zur Antigen-Präsentation geeignete Zellen sind z.

5 B. B-Zellen, dendritische Zellen, Macrophagen, Fibroblasten oder andere HLA-

positive Zellen, die durch eine gemeinsame Kultivierung mit Immunzellen eine Stimulation von spezifischen T-Zellen erreichen können.

10 In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, zur Detektion einer Immunantwort eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop, mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine ein T-Zell-Epitop enthal-

20 tende Verbindung, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Beispiele von dem Fachmann bekannten Trägern sind Glas, Polystyren, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon, Amylase, natürliche oder modifizierte Zellulose, Polyacrylamide, Agarose, Aluminiumhydroxid oder Magnitid.

25

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 25 -

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Lösung vorliegen, an eine feste Matrix gebunden sein, und/oder mit einem Adjuvans versetzt sein.

5 Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann auf verschiedene Weisen verabreicht werden. Beispiele von dem Fachmann bekannten Verabreichungsformen sind parenterale, lokale und/oder systemische Applikation durch z. B. orale, intranasale,

intravenöse, intramuskuläre, und/oder topische Applikation. Die bevorzugte Applikationsform wird beispielsweise durch den natürlichen Infektionsweg der jeweiligen Papillomavirusinfektion beeinflusst. Die verabreichte Menge richtet sich nach Alter, Gewicht, allgemeinem Gesundheitszustand des Patienten und dem Typ der Papillomavirusinfektion. Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Form von Kapseln, Lösung, Suspension, Elixier (für orale Applikation) oder sterile Lösungen bzw. Suspensionen (für parenterale oder intranasale Applikation) verabreicht werden. Als inerte und immunologisch akzeptable Träger kann beispielsweise Salzlösung oder phosphatgepufferte Salzlösung verwendet werden. Das Arzneimittel wird in therapeutisch effektiven Mengen verabreicht. Das bedeutet Mengen, die ausreichend sind, um eine schützende immunologische Antwort hervorzurufen.

In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, als Arzneimittel oder Diagnostikum eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

Die Figuren und die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

Fig. 1 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer muriner T-Zellen mit JAWS-Zellen, die unterschiedliche Peptide präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptids angegeben, JAWS-Zellen ohne Peptid wurden lediglich mit Puffer inkubiert und dienten als Negativ-Kontrolle. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

10 Fig. 2 zeigt die graphische Auswertung eines ^{51}Cr -Freisetzungsexperiments nach Beladung von RMA-Zellen mit dem Peptid P33 (Zielzellen). Die Zielzellen wurden durch mit den Peptiden P1 bis P43 stimulierte T-Zellen (Effektorzellen) lysiert, wobei das Verhältnis der eingesetzten Effektorzellen zu den eingesetzten Zielzellen 20 betrug. Auf der X-Achse sind RMA-Zellen mit Puffer inkubiert (Negativkontrolle) bzw. RMA-Zellen mit dem P33-Peptid inkubiert, aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die % der spezifisch lysierten Zielzellen, bestimmt durch die Freisetzung von ^{51}Cr aus den Zielzellen, aufgetragen. Die %-Werte wurden nach der in Beispiel 4 angegebenen Formel berechnet.

20 Fig. 3 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer muriner T-Zellen mit LKK-Zellen, die unterschiedliche Peptide präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptids angegeben, LKK-Zellen ohne Peptid wurden lediglich mit Puffer inkubiert und dienten als Negativ-Kontrolle. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

30 Fig. 4 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer muriner T-Zellen mit LKK-Zellen, die unterschiedliche Peptide präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptids

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 27 -

angegeben, LKK-Zellen ohne Peptid wurden lediglich mit Puffer inkubiert und dienten als Negativ-Kontrolle. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

5

Fig. 5 zeigt die graphische Auswertung eines FACScan-Experiments nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV18 Peptidpools präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 bzw. E7 steht für mit HPV18 L1- bzw. HPV18 E7-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrollen). Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

15 Fig. 6 zeigt die graphische Auswertung eines FACScan-Experiments nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV18 Peptidpools präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 bzw. E7 steht für mit HPV18 L1- bzw. HPV18
20 E7-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrollen). Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 7 zeigt die graphische Auswertung eines FACScan-Experiments nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die das Q9 Peptid präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptids angegeben, BLCL steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle). Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.
30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 28 -

Fig. 8 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV16 Peptidpools bzw. das P39-Peptid präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools (A bis H, I bis 7) bzw. für das jeweilige Peptid (P39) angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 steht für mit HPV16 L1-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrolle). Auf der Y-Achse der Fig. 8 oben ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv und somit als T-Helfer-1-Zellen (T_{H1}) klassifiziert wurden. Auf der Y-Achse der Fig. 8 unten ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IL-4-Expression im FACScan-Experiment als T-Helfer-2-Zellen (T_{H2}) klassifiziert wurden.

Fig. 9 zeigt die graphische Auswertung eines FACScan-Experiments nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV16 Peptidpools präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 steht für mit HPV16 L1-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrollen). Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 10 zeigt die graphische Auswertung eines FACScan-Experiments nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die das P33 Peptid präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des Peptids angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 steht für mit HPV16 L1-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrollen). Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 11 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV18 Peptidpools präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools (A bis H, 1 bis 7) angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 bzw. E7 steht für mit HPV18 L1- bzw. HPV18 E7-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrolle). Auf der Y-Achse der Fig. 11 oben ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv und somit als T-Helfer-1-Zellen (T_{H1}) klassifiziert wurden. Die Werte für L1 und E7 wurden gemeinsam mit der Negativ-Kontrolle mit einer unterschiedlichen Y-Achsen-Skalierung in einer separaten Graphik dargestellt (oben rechts). Auf der Y-Achse der Fig. 11 unten ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IL-4-Expression im FACScan-Experiment als T-Helfer-2-Zellen (T_{H2}) klassifiziert wurden.

Fig. 12 zeigt die graphische Auswertung von vier FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV18 Peptide bzw. Peptidpools präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptids (Q38, Q39, Q46 oder Q47) angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 bzw. E7 steht für mit HPV18 L1- bzw. HPV18 E7-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrolle). Auf der Y-Achse ist jeweils der Anteil reaktiver T-Zellen angegeben.

In Fig. 12 (oben links) ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv und somit als T-Helfer-1-Zellen (T_{H1}) klassifiziert wurden.

In Fig. 12 (oben rechts) ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktive zytotoxische T-Zellen klassifiziert wurden.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 30 -

In Fig. 12 (unten links) ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IL-4-Expression im FACScan-Experiment als T-Helfer-2-Zellen (T_{H2}) klassifiziert wurden.

In Fig. 12 (unten rechts) ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die IL-4 exprimieren.

Fig. 13 zeigt die graphische Auswertung eines FACScan-Experiments nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV16 Peptidpools präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools (A bis H, 1 bis 7) angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 bzw. E7 steht für mit HPV16 L1- bzw. HPV16 E7-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrolle). Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv und somit als zytotoxische T-Zellen klassifiziert wurden.

Fig. 14 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer humaner T-Zellen mit donor-identischen BLCL, die unterschiedliche HPV18 Peptidpools bzw. ein Peptid präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptidpools (A bis H, 1 bis 7) bzw. des Peptids Q30 angegeben, „ohne“ steht für lediglich mit Puffer inkubierte BLCL (Negativ-Kontrolle), L1 bzw. E7 steht für mit HPV18 L1- bzw. HPV18 E7-Peptidpool inkubierte BLCL (Positiv-Kontrolle). Auf der Y-Achse der Fig. 14 oben ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv und somit als T-Helfer-1-Zellen (T_{H1}) klassifiziert wurden. Auf der Y-Achse der Fig. 14 unten ist der Anteil der CD4-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IL-4-Expression im FACScan-Experiment als T-Helfer-2-Zellen (T_{H2}) klassifiziert wurden.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 31 -

Fig. 15 zeigt die graphische Auswertung von zwei FACScan-Experimenten nach Restimulation spezifischer muriner T-Zellen mit RMA-Zellen, die unterschiedliche Peptide präsentieren. Auf der X-Achse ist der Name des jeweiligen Peptids angegeben, RMA-Zellen ohne Peptid wurden lediglich mit Puffer inkubiert und dienten als Negativ-Kontrolle. Auf der Y-Achse ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen aufgetragen, die anhand von IFN γ -Expression im FACScan-Experiment als reaktiv klassifiziert wurden.

Fig. 16 zeigt die graphische Auswertung eines ^{51}Cr -Freisetzungsexperiments nach Beladung von RMA- (oben) bzw. LKK-Zellen (unten) mit den Peptiden Q43, Q44 bzw. Q49 (Zielzellen). Die Zielzellen wurden durch mit den HPV18 L1 und E7-Peptidpools stimulierte T-Zellen (Effektorzellen) lysiert, wobei das Verhältnis der eingesetzten Effektorzellen zu den eingesetzten Zielzellen 20 betrug. Auf der X-Achse ist der Zelltyp sowie das Peptid angegeben, wobei die Zelle ohne Peptid als Negativ-Kontrolle fungiert. Auf der Y-Achse sind die % der spezifisch lysierten Zielzellen, bestimmt durch die Freisetzung von ^{51}Cr aus den Zielzellen, aufgetragen. Die %-Werte wurden nach der Beispiel 4 angegebenen Formel berechnet.

Fig. 17 oben: HPV18E7₈₆₋₉₄ epitopreaktive T Zellen in H7.1-A2 spezifischen T-Zelllinien. Durch *in vitro* Vakzinierung mit H7.1-A2 Zellen wurde eine T-Zelllinie generiert. Im ELISpot assay wurde sie gegen autologe PBMC, die mit dem Peptid HPV18 E7₈₆₋₉₄ beladen waren, getestet. T co steht für eine Negativ-Kontrolle mit unspezifischen T-Zellen, PBMC co steht für eine Negativ-Kontrolle mit PBMC, die nicht mit Peptid beladen wurden.

Fig. 17 unten: Zytolytische Aktivität von HPV18E7₈₆₋₉₄-spezifischen T-Zellen. T Zelllinien zweier gesunder Blutdonoren wurden gegen das Epitop HPV18 E7₈₆₋₉₄ hergestellt und im Zytotoxizitätstest (^{51}Cr -Chrom-release assay) auf Lyse peptidgepulster autologer BLCL (Effektor: Targetzellverhältnis von 30:1) getestet. BLCL co steht für eine Negativ-Kontrolle von BLCL, die nicht mit Peptid gepulst waren.

30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 32 -

Fig. 18 oben: Natürliche Prozessierung des Epitops HPV18 E7₈₆₋₉₄ durch dendritische Zellen. T-Zelllinien gegen HPV18 E7 wurden durch *in vitro* Vakzinierung mit Protein- bzw. Peptidpool-beladenen autologen dendritischen Zellen generiert. Im ELISpot assay wurde die Stimulation von HPV18E7₈₆₋₉₄ spezifischen T-Zellen durch epitopbeladene dendritische Zellen (DC) gemessen. T co steht für eine Negativ-Kontrolle mit unspezifischen T-Zellen, DC co steht für eine Negativ-Kontrolle von DCs, die nicht mit Peptid beladen wurden.

Fig 18 unten: Präsenz von HPV18 E7₈₆₋₉₄ spezifischen T-Zellen in Populationen tumorinfiltrierender Lymphozyten. TIL einer HPV18 positiven und HLA-A2 positiven Patientin wurden *in vitro* expandiert und im ELISpot assay auf Reaktivität mit dem HPV18 E7₈₆₋₉₄ Epitop getestet. T co steht für eine Negativ-Kontrolle mit unspezifischen T-Zellen, K-A2 für eine Negativ-Kontrolle von K-A2-Zellen, die nicht mit Peptid beladen waren.

15

Beispiele

1. Beschreibung der Ausgangsmaterialien

- 20 • Die Herstellung der HPV16L1_{ΔC}E7₁₋₅₅ CVLPs erfolgte gemäß der deutschen Patentanmeldung DE 19812941, siehe auch Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111.
- PBMC bedeutet periphere Blutmononukleäre Zellen, deren Isolierung wird beispielsweise in Rudolf M. P. et al. (1999), Biol. Chem. 380, 335-40 beschrieben.
- 25 • BLCL bedeutet jeweils mit Hilfe des Epstein-Barr-Virus transformierte B-Zelllinien, die für jeden Blutspender individuell hergestellt wurden (erhalten von Dr. Andreas Kaufmann, Jena, Deutschland).
- CVLP-stimulierter muriner T-Zellen wurden wie folgt gewonnen:

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 33 -

354 Mehrere C57BL/6- oder C₃H-Mäuse wurden 2 mal mit je 20 µg HPV16L1_{ΔC}•E7₁₋₅₅ CVLPs oder mit einem 1:1 Gemisch aus HPV18 L1_{ΔC}•E7₁₋₅₃ΔI CVLPs und HPV18 L1_{ΔC}•E7₁₋₆₀ΔI CVLPs bzw. zur Kontrolle mit Puffer immunisiert. Nach 2 Wochen wurden die Milzzellen nach Standardmethoden gewonnen.

- 5
- Splenozyten wurden wie folgt gewonnen:
Die Milz von nicht geimpften Mäusen wurde entnommen und die Milzzellen nach Standardmethoden resuspendiert.
 - APC steht im Zusammenhang mit Zellen für Antigen-präsentierende Zellen.

10

 - JAWS-Zellen wurden von ATCC bezogen (CRL-11904).
 - LKK wurden von ATCC bezogen (CCL-1).
 - RMA-Zellen stammen aus einem Thymom einer C57BL/6-Maus (siehe Ljunggren H.G. and Kärre K. (1985) J. Exp. Med. 162, 1745-59).

15

 - α-mouse CD8/PE bedeutet ein monoklonaler Ratten-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil des murinen CD8 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Phycoerithrin enthält (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).
 - α-mouse CD4/Cychrome bedeutet ein monoklonaler Ratten-Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil des murinen CD4 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Cychrome enthält (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).

20

 - α-mouse IFN γ /FITC bedeutet ein monoklonaler Ratten-Antikörper, der gegen das murine Interferon γ gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker FITC enthält (Caltag, Hamburg, Deutschland).
 - α-human CD8/APC bedeutet ein monoklonaler Maus Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil des humanen CD8 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker APC enthält (Caltag, Hamburg, Deutschland).

25

 - α-human CD4/PerCP bedeutet ein monoklonaler Maus Antikörper, der gegen den extrazellulären Teil des humanen CD4 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker PerCP enthält (Becton Dickinson, Hamburg, Deutschland).

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 34 -

- α -human IFN γ /FITC bedeutet ein monoklonaler Maus Antikörper, der gegen das humane Interferon γ gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker FITC enthält (Caltag, Hamburg, Deutschland).
- 5 • α -human IL4/PE bedeutet ein monoklonaler Maus Antikörper, der gegen das humane Interleukin 4 gerichtet ist und den Fluoreszenzmarker Phycoerythrin enthält (Caltag, Hamburg, Deutschland).
- Humanes GM-CSF (Leukomax) wurde von Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, Deutschland) bezogen.
- 10 • Humanes IL4 wurde von Becton Dickinson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- Humanes IL2 wurde von Becton Dickinson (Hamburg, Deutschland) bezogen.

- Monensin wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.
- 15 • Triton X100 wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.
- Zellen wurden jeweils bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum, Kanamycin und Ampillin kultiviert.
- 20 • Luma-Platten und er Canberra-Packerd B-Plate Counter wurden von Canberra-Packerd, Dreieich, Deutschland bezogen.
- FACScan calibur bedeutet 'fluorescens activated cell sorter'; die Apparatur wurde von Becton Dickenson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- Cellquest Software wurde von Becton Dickenson (Hamburg, Deutschland) bezogen.
- 25 • Es wurden um jeweils 9 Aminosäuren überlappende 20mer-Peptide synthetisiert, welche die Sequenz des L1 und des E7 Proteins von HPV16 umfassen. Die Peptide wurden von 1 bis 52 durchnummeriert. Ihr Name und ihre Sequenz sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 1: Synthetische überlappende 20mer Peptide von HPV16 L1 und E7

Peptid Nr.	Sequenz	relative Position
HPV16 L1-Peptide		
P1	MSLWLPSEATVYLPVPVSK	1 -20
P2	YLPVPVSKVVSTDEYVART	12 -31
P3	STDEYVARTNIYYHAGTSRL	23 -42
P4	YYHAGTSRLLAVGHPYFPIK	34 -53
P5	VGHPYFPIKPNNNKILVPK	45 -64
P6	NNNKILVPKVSGLQYRVFRI	56 -75
P7	GLQYRVFRIHLPDPNKGFP	67 -86
P8	PDPNKGFPDTSFYNPDTQR	78 -97
P9	SFYNPDTQRLVWACVGEVG	89 -108
P10	WACVGEVGRGQPLGVGISG	100 -119
P11	QPLGVGISGHPLLNKLDDE	111 -130
P12	LLNKLDDEENASAYAANAGV	122 -141
P13	SAYAANAGVDNRECI SMDYK	133 -152
P14	RECI SMDYKQTQLCLIGCKP	144 -163
P15	QLCLIGCKPPIGEHWKGS P	155 -174
P16	GEHWKGS PCTNVAVNP GDC	166 -185
P17	NVAVNP GDCPPLELINTV IQ	177 -196
P18	LELINTV IQDGMVDTGF GA	188 -207
P19	DMVDTGF GAMDFTTLQANKS	199 -218
P20	FTTLQANKSEVPLDICTS IC	210 -229
P21	FLDICTS ICKYPDYIKMVSE	221 -240
P22	PDYIKMVSEFYGDSLFFYL R	232 -251
P23	GDSLFFYLRRQMFVRHLFN	243 -262
P24	QMFVRHLFNRAGAVGENV PD	254 -273
P25	GAVGENV PDDLYIKGSGSTA	265 -284
P26	YIKGSGSTANLASSNYFPT P	276 -295
P27	ASSNYFPTPSGSMVTSDAQ I	287 -306
P28	SMVTSDAQIFNKPYWLQRAQ	298 -317

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 36 -

P29	KPYWLQRAQGHNNIGICWGNQ	309-328
P30	NNGICWGNQLFVTVVDTTRS	320-339
P31	VTVVDTTRSTNMSLCAAIST	331-350
P32	MSLCAAISTSETTYKNTNFK	342-361
P33	TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL	353-372
P34	LRHGEEYDLQFIFQLCKITL	364-383
P35	IFQLCKITLTADVMTYIHSM	375-394
P36	DVMTYIHSMNSTILEDWNFG	386-405
P37	TILEDWNFGLQPPPGGTLED	397-416
P38	PPPGGTLEDYRFVTSQAIA	408-427
P39	RFVTSQAIAQKHTPPAPKE	419-438
P40	KHTPPAPKEDFLKKYTFWEV	430-449
P41	LKKYTFWEVNLKEKFSADLD	441-460
P42	KEKFSADLDQFPLGRKFLQ	452-471
P43	PLGRKFLQAGMHGDTPTLH	463-473 und E7 1-9

HPV16 E7 Peptide

P44	MHGDTPTLHEYMLDLQPETT	1-20
P45	MLDLQPETTDLYCYEQLNDS	12-31
P46	YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA	23-42
P47	EEDEIDGPAGQAEFDRAHYN	34-53
P48	AEPDRAHYNIVTFCKCDST	45-64
P49	TFCKCDSTLRLCVQSTHVD	56-75
P50	LCVQSTHVDIRTLLEDLLMGT	67-86
P51	TLEDLLMGTGIVCPICSQKP	78-97

Unter HPV16 L1-Peptidpools wird das Gemisch der Peptide P1 bis P43, unter HPV16 E7-Peptidpools das Gemisch der Peptide P44 bis P51 verstanden.

- 5 • Des weiteren wurden um jeweils 9 Aminosäuren überlappende 20mer-Peptide synthetisiert, welche die Sequenz des L1 und des E7 Proteins von HPV18 umfassen. Die Peptide wurden von 1 bis 52 durchnummeriert. Ihr Name und ihre Sequenz sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 2: Synthetische überlappende 20mer Peptide von HPV18 L1 und E7

Peptid Nr.	Sequenz	relative Position
HPV18 L1 Peptide		
Q1	MALWRPSDNTVYLPPPSVAR	1 -20
Q2	YLPPPSVARVVNTDDYVTRT	12 -31
Q3	NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL	23 -42
Q4	FYHAGSSRLTVGNPYFRVP	34 -53
Q5	VGNPYFRVPAGGGNKQDIPK	45 -64
Q6	GGNKQDIPKVSAYQYRVERV	56 -75
Q7	AYQYRVERVQLPDPNKFGLP	67 -86
Q8	PDPNKFGLPDTSIYNPETQR	78 -97
Q9	SIYNPETQRLLWACAGVEIG	89 -108
Q10	WACAGVEIGRGQPLGVLSG	100 -119
Q11	QPLGVLSGHPFYNKLDDE	111 -130
Q12	FYNKLDDESSHAATSNVSE	122 -141
Q13	HAATSNVSEDRDNVSVDYK	133 -152
Q14	RDNVSVDYKQQLCILGCAP	144 -163
Q15	QLCILGCAPAI GEHWAKGTA	155 -174
Q16	GEHWAKGTACKSRPLSQGDC	166 -185
Q17	SRPLSQGDCPPELEKNTVLE	177 -196
Q18	LELKNTVLEDDGMVDTGYGA	188 -207
Q19	DMVDTGYGAMDFSTLQDTKC	199 -218
Q20	FSTLQDTKCEVPLDICSIC	210 -229
Q21	PLDICSICKYPDYLQMSAD	221 -240
Q22	PDYLQMSADPYGDSMFCLR	232 -251
Q23	GDSMFCLRREQLFARHFWN	243 -262
Q24	QLFARHFWNRAGTMGDTVPO	254 -273
Q25	GTMGDTVPOQSLYIKGTGMRA	265 -284
Q26	YIKGTGMRASPGSCVYSPSP	276 -295
Q27	GSCVYSPSPSGSIVTSDSQL	287 -306

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 38 -

Q28	SIVTSDSQLFNKPYWLHKAQ	298 -317
Q29	KFYWLHKAQGHNNQVCWHNQ	309 -328
Q30	NNGVCWHNQLFVTVVDTRRS	320 -339
Q31	VTVVDTRRSTNLTIKASTQS	331 -350
Q32	LTICASTQSPVPGQYDATKF	342 -361
Q33	PGQYDATKFKQYSRHVVEEYD	353 -372
Q34	YSRHVEEYDLQFIFQLCTIT	364 -383
Q35	FIFQLCTITLTADVMSYIHS	375 -394
Q36	ADVMSYIHSMNSSILEDWNF	386 -405
Q37	SSILEDWNFVPPPTTSLV	397 -416
Q38	PPPTTSLVDTYRFVQSVAI	408 -427
Q39	YRFVQSVAITCQKDAAPAEN	419 -438
Q40	QKDAAPAENKDPYDKLKFVN	430 -449
Q41	PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL	441 -460
Q42	LKEKFSLDLDQYPLGRKFLV	452 -471
Q43	YELGRKFLVQAGMHGPKATL	463 -474 und E7 1-8

HPV18 E7 Peptide

Q44	MHGPKATLQDIVLHLEPQNE	1 - 20
Q45	VLHLEPQNEIPVDLLCHEQL	12 - 31
Q46	VDLLCHEQLSDSEEBENDEID	23 - 42
Q47	SEEBENDEIDGVNHQHLPARR	34 - 53
Q48	NHQHLPARRAEPQRHTMLCM	45 - 64
Q49	PQRHTMLCMCKCEARIKLV	56 - 75
Q50	KCEARIKLVVSSADDLRAF	67 - 86
Q51	SSADDLRAFQQLFLNLSFV	78 - 97
Q52	LFLNLSFVCPWCASQQ	89 -104

Unter HPV18 L1-Peptidpools wird das Gemisch der Peptide Q1 bis Q43, unter HPV18 E7-Peptidpools das Gemisch der Peptide Q44 bis Q52 verstanden.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 39 -

2. Herstellung von HPV18 L1_{ΔCD1}E7_{1-53DI} CVLPs und HPV18 L1_{ΔCD1}E7_{1-60DI} CVLPs

a) Herstellung der Konstrukte

- 5 Die kodierenden Nucleinsäuren für die einzelnen Papillomavirus-spezifischen Proteine wurden beispielsweise über eine PCR („polymerase chain reaction“)-

Amplifizierung aus einer Genbank isoliert und kloniert. Das Genom von HPV18 ist unter der GenBank Accession No. X05015 allgemein erhältlich und wurde von
10 Cole und Danos publiziert (*J. Mol. Biol.* 1987, 193 (4), 599-608).

Die für die Konstruktion der erfindungsgemäßen Fusionsproteine zugrunde gelegte Sequenz besaß dazu folgende Änderungen im L1 Gen: An den Positionen 89, 848, 1013 und 1230 des L1-Gens wurde auf DNA-Ebene ein C gegen ein G
15 ausgetauscht. Auf Protein-Ebene führen die ersten drei Änderungen zu einem Austausch von Pro nach Arg, während die letzte Mutation keine Änderung auf Protein-Ebene zur Folge hat. Das E7 Gen entspricht der publizierten Sequenz.

Eine andere Methode, die gewünschten Nucleinsäuren zu erhalten, ist, die Papillomavirus-spezifischen Gene direkt aus Warzen oder Tumore mittels PCR zu isolieren. Geeignete Primer für die E6- und E7-Gene aus HPV16 und HPV18 sind
20 z.B. in WO93/21958 offenbart. Weitere Literaturstellen für die gewünschten Nucleinsäuren sind beispielsweise Kirnbaum, R. et al. (1994), *J. Virol.*, 67, 6929-6936 bzw. die oben bereits erwähnten in der EMBL-Datenbank hinterlegten Klone.
25 ne.

Zur Herstellung von HPV18L1_{ΔCD1} wurden zwei Primer konstruiert, die zum offenen Leserahmen (ORF) von HPV18L1 komplementär sind. Der erste Primer hat die Sequenz

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 40 -

5'-ACC AGA CTC GAG ATG GCT TTG TGG CGG CCT AGT GAC-3'

und der zweite Primer

5

5'-ATA GCC AAG CTT AAT GAT ATC CTG AAC CAA AAA TTT ACG
TCC-3'

- 10 Der erste Primer kodiert 5' eine XhoI Restriktionsenzymstichstelle. Der zweite Primer kodiert 5' eine EcoRV Restriktionsenzymstichstelle. Auf die EcoRV Stelle folgt ein TAA Translationsstopkodon, um die letzten 35 Aminosäuren des HPV18L1 ORF zu deletieren. Das PCR-Produkt wurde mit XhoI/EcoRV gespalten und in den ebenfalls XhoI/EcoRV gespaltenen Vektor pBluescript® ligiert.
- 15 Das erhaltene Konstrukt HPV18L1_{ΔCD1} pKS wurde benutzt, um den ORF von HPV18E7_{1-53D1} und HPV18E7_{1-60D1} in die EcoRV Stelle zu klonieren.

Zur Klonierung der HPV18 E7 Fragmente wurden Primer mit einer 5'-EcoRV Restriktionsenzymstichstelle verwendet. Es wurde folgende Primerpaare eingesetzt:

20

5'-GGC CAT GAT ATC ATG CAT GGA CCT AAG GCA ACA TTG-3'
(5'-Ende des E7 Gens)

25 und

5'-GGC CAT GAT ATC TCG TCG GGC TGG TAA ATG TTG ATG-3'
(3'-Ende des E7_{1-53D1} Fragments)

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 41 -

bzw.

5'-GGC CAT GAT ATC TGT GTG ACG TTG TGG TTC GGC TC-3'

5

(3'-Ende des E7_{1-60D1} Fragments).

Die PCR Produkte wurden mit EcoRV gespalten und in die EcoRV Stelle des modifizierten L1-Gens inseriert.

10

Die Klone wurden durch DNA-Sequenzierung analysiert. Anschließend wurden die HPV18L1_{ΔCD1E7_{1-53D1}} bzw. HPV18L1_{ΔCD1E7_{1-60D1}} Fusionsgene durch BglII/EcoRI Restriktionsverdau aus dem Vektor pBluescript[®] herausgeschnitten und in den BglII/EcoRI gespaltenen Baculovirus Transfervektor pVL1392 ligiert, um rekombinante Baculoviren herzustellen.

15

b) Herstellung rekombinanter Baculoviren

Spodoptera frugiperda (Sf9) Zellen wurden als Monolayer oder in Suspensionskultur in TNM-FH Insektenmedium (Life Technologies, Karlsruhe) mit 10% fötalem Kälberserum und herangezogen. Rekombinante Baculoviren wurden durch Cotransfektion von 5 µg der rekombinanten Plasmide und 1 µg von linearisiertem Baculo-Gold[®] DNA (Pharmingen, San Diego, CA) in Sf9 Zellen hergestellt. Rekombinante Viren wurden durch Endpunktverdünnung und/oder Plaque-Vereinzelung gereinigt. Um die Expression zu testen, wurden 10⁶ Sf9 Zellen mit rekombinantem Baculovirus und einer m.o.i. („multiplicity of infection“) von 0,5 und 1 für 48h und infiziert. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) gewaschen. Die Zellen wurden dann durch FACS-Messung un-

25

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 42 -

tersucht oder in SDS-Probenpuffer lysiert und durch SDS-Gelchromatographie und Immunoblotassay getestet.

c) Reinigung von chimären virus-ähnlichen Partikeln

5

Für die Herstellung von CVLPs wurden Sf9 oder Sf+-Zellen bei 27°C bis zu einer Dichte von $1,5-2 \times 10^6$ Zellen pro ml in den serumfreien Medien InsectXPress (Biowhittaker, Verviers, Belgien) oder Sf 900II (Life Technologies, Karlsruhe) gezüchtet. Eine 200 ml Kultur wurde mit einer m.o.i. von 1 bis 2 mit rekombinanten Baculoviren für 48h infiziert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und bei -80°C eingefroren. Frier-Tau Lyse erfolgte durch Zugabe von 4 Vol. Extraktionspuffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,5). Die Klärung des Homogenats erfolgte durch Zentrifugation bei 10.000 rpm im Sorvall SS34 Rotor. Die Aufreinigung des L1E7 Proteins aus dem geklärten Rohextrakt für die immunologischen Assays erfolgte durch Ammoniumsulfat-Fällung bei 35-40% Sättigung und anschließende Anionenaustausch-Chromatographie an Fractogel® TMAE (Merck, Darmstadt), wobei die CVLPs im linearen Salzgradienten bei 300-400mM NaCl eluiert werden. Die Bestimmung des Proteingehalts der gereinigten Fraktionen erfolgte nach der Bradford-Methode unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard.

20

3. Restimulation von HPV16 L1 Peptid-stimulierten murinen T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

25 Murine T-Zellen (4×10^5) von HPV16L1_{9C}•E7₁₋₅₅ CVLP-geimpften C57BL/6-Mäusen wurden für 5 Wochen mit HPV16 L1 Peptidpools bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml je einzelnes Peptid sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte Splenozyten) stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit 1 µg/ml der auf der X-
30 Achse der Fig. 1 angegebenen Peptide sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 43 -

(JAWS) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.

5 Nach einer Stunde wurden 1 µl Monensin (300 µM) zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-mouse CD8/PE, mit α-mouse CD4/Cyochrome und mit α-mouse Interferon γ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

10

Ergebnis: Fig. 1 oben zeigt für die Peptide P18, P19, P43 bzw. Fig. 1 unten für die Peptide P35 und P3, daß die mit diesen Peptiden inkubierten JAWS-Zellen eine Restimulation von Peptid-stimulierten CD8-positiven murinen T-Zellen bewirkten. Die Peptide P3, P18, P19, P35 und P43 enthalten somit H2b-restringierte zytotoxische T-Zellepitope.

15

4. Lyse von mit P33 beladenen RMA-Zellen

RMA-Zellen wurden mit ⁵¹Cr für eine Stunde bei 37°C inkubiert, dreimal mit Medium gewaschen und in 2 Aliquots aufgeteilt. Zum einen Aliquot der Zellen wurden 10 µg/ml de P33-Peptids gegeben, das andere Aliquot diente als Negativkontrolle in Abwesenheit des Peptids. Anschließend wurden jeweils 2000 der Zellen (=Zielzellen) zu 40.000 T-Zellen (=Effektorzellen) in einem Gesamtvolumen von 150 µl gegeben. Die T-Zellen waren zuvor über 5 Wochen mit einem Gemisch aus 43 Peptiden (Peptide 1-43, je 1 µg/ml) stimuliert worden.

20

Parallel wurden Ansätze für spontane und maximale Lyse der Zellen angesetzt. Für die spontane Lyse dienten Zielzellen, die mit Kulturmedium inkubiert wur-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 44 -

den. Für die maximale Lyse wurden Zielzellen durch Zugabe von 0,5% Triton X100 lysiert.

Die Ansätze wurden für 5h bei 37°C inkubiert. 50 µl Überstand der Ansätze wurden auf Luma-Platten gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten morgen wurde die Menge an radioaktivem ⁵¹Cr mit Hilfe eines Canberra-Packard B-Plate Counter bestimmt (counts) und in Relation zu den maximal lysierten Zellen des Triton-Ansatzes gesetzt. Dabei wurden die % spezifische Lyse nach der Formel:

10 $x = 100 \cdot (\text{counts} - \text{spontan counts}) / (\text{maximal counts} - \text{spontan counts})$
bestimmt.

Fig. 2 zeigt, daß die mit dem P33-Peptid beladenen RMA-Zellen effektiv durch die T-Zellen lysiert werden konnten, die nicht beladenen RMA-Zellen hingegen
15 nicht. Das P33-Peptid ist somit ein H2b restringiertes zytotoxisches T-Zellepitop.

5. Restimulation von HPV18 Peptid-stimulierten murinen T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Murine T-Zellen (4×10^5) von HPV18 L1_{ΔCD1E71-53D1} CVLP- und HPV18 L1_{ΔCD1E71-60D1} CVLP-geimpften C₃H-Mäusen wurden für 5 Wochen mit HPV18 L1 oder E7 Peptidpools bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 µg/ml je einzelnes Peptid sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte Splenozyten) stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit 1 µg/ml der auf der X-Achse der Fig. 3 angegebenen Peptide sowie 10^5
25 Antigen-präsentierende Zellen (LKK) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 45 -

Nach einer Stunde wurden 1 μ l Monensin (300 μ M) zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α -mouse CD8/PE, mit α -mouse CD4/Cychrome und mit α -mouse Interferon γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer

5 Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

Ergebnis: Fig. 3 zeigt für die Peptide Q22, Q23, Q51, Q43 und Q44 bzw. Fig. 4 für die Peptide Q41 und Q5, daß die mit diesen Peptiden inkubierten LKK-Zellen

10 eine Restimulation von Peptid-stimulierten murinen CD8-positiven T-Zellen bewirkten. Die Peptide Q5, Q22, Q23, Q41, Q43, Q44 und Q51 enthalten somit H2k-restringierte zytotoxische T-Zellepitope.

6. Restimulation von HPV18 CVLP-stimulierten T-Zellen mit

15 unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Humane T-Zellen (4×10^5) eines nicht-HLA-typisierten Blutspenders wurden für 1 Woche mit HPV18 L1_{ΔCD1E71-53D1} CVLPs und HPV18 L1_{ΔCD1E71-60D1} CVLPs, 800 U/ml humanem GM-CSF und 500 U/ml humanem IL4 sowie für weitere 5 Wo-

20 chen mit HPV18 L1_{ΔCD1E71-53D1} CVLPs und HPV18 L1_{ΔCD1E71-60D1} CVLPs bei 37°C unter wöchentlicher Zugabe von 1 μ g/ml des CVLPs-Gemisches (Verhältnis 1:1 der beiden Konstrukte) sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet.

Die 20mer-Peptide Q1 bis 52 wurden gemäß der Matrix

HPV18 Pools	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Q1	Q 2	Q 3	Q 4	Q 5	Q 6	Q 7	Q 8
2	Q 9	Q 10	Q 11	Q 12	Q 13	Q 14	Q 15	Q 16
3	Q 17	Q 18	Q 19	Q 20	Q 21	Q 22	Q 23	Q 24
4	Q 25	Q 26	Q 27	Q 28	Q 29	Q 30	Q 31	Q 32
5	Q 33	Q 34	Q 35	Q 36	Q 37	Q 38	Q 39	Q 40
6	Q 41	Q 42	Q 43	Q 44	Q 45	Q 46	Q 47	Q 48
7	Q 49	Q 50	Q 51	Q 52				

in Peptidpools A bis H bzw. 1 bis 7 zusammengefaßt.

- 5 Anschließend wurden die T-Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit den Peptidpools sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 µg/ml zugegeben wurde.
- 10 Als Negativ-Kontrolle dient lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrollen mit HPV18 L1- bzw. HPV18 E7-Peptidpool inkubierte Zellen.

- Nach einer Stunde wurde 1 µl Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-human CD8/APC, mit α-human CD4/PerCP und mit α-human IFNγ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.
- 15

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 47 -

Ergebnis: Fig. 5 zeigt, daß insbesondere die mit den Peptidpools F und I inkubierten BLCL eine Restimulation von CVLP-stimulierten humanen CD4-positiven T-Zellen bewirkten. Des weiteren zeigten die Peptidpools A und 6 eine deutlich über der Negativkontrolle liegende Restimulation. Die mit den übrigen Peptidpools inkubierten BLCL bzw. die Negativkontrolle oder die mit dem E7-Peptidpool inkubierten BLCL wiesen hingegen einen geringen Anteil an reaktiven CD4-positiven T-Zellen auf. Die Peptidpools F und I enthalten gemeinsam das Peptid Q6, das somit für die Restimulation der CVLP-stimulierten T-Zellen verantwortlich ist. Das Peptid Q6 enthält somit ein T-Helferepitop. Die Peptidpools A und I enthalten als gemeinsames Peptid Q1, A und 6 Q41 sowie F und 6 Q46. Somit enthalten auch die Peptide Q1, Q41 und Q46 T-Helferepitope.

7. Restimulation von HPV16 CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

15

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blut-spenders mit HPV16L1_{ΔC}•E7₁₋₅₅ CVLPs stimuliert und geerntet.

Die 20mer-Peptide P1 bis 51 wurden gemäß der Matrix

HPV16 Pools	A	B	C	D	E	F	G	H
1	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8
2	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15	P 16
3	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24
4	P 25	P 26	P 27	P 28	P 29	P 30	P 31	P 32
5	P 33	P 34	P 35	P 36	P 37	P 38	P 39	P 40
6	P 41	P 42	P 43	P 44	P 45	P 46	P 47	P 48
7	P 49	P 50	P 51					

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 48 -

in Peptidpools A bis H bzw. 1 bis 7 zusammengefaßt.

5 Anschließend wurden die T-Zellen wie in Beispiel 6 beschrieben restimuliert, fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte ebenso wie in Beispiel 6 beschrieben.

Ergebnis: Fig. 6 zeigt für die Peptidpools G und 3, daß die mit diesen Peptidpools inkubierten BLCL eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkten. 10 Des weiteren zeigten die Peptidpools B und C sowie 2 und 4 eine deutlich über der Negativkontrolle liegende Restimulation. Die mit den übrigen Peptidpools inkubierten PBMC bzw. die Negativkontrolle inkubierten PBMC wiesen hingegen einen geringen Anteil an reaktiven CD4-positiven T-Zellen auf, nicht aber die mit den übrigen Peptidpools inkubierten BLCL bzw. die Negativkontrolle oder die 15 mit dem E7-Peptidpool inkubierten PBMC. Die Peptidpools G und 3 enthalten gemeinsam das Peptid P23, B und 2 enthalten P10, B und 3 P18, B und 4 P26, C und 2 P11, C und 3 P19, C und 4 P27, G und 2 P15 sowie G und 4 P31. Diese Peptide sind somit jeweils für die Restimulation der CVLP-stimulierten T-Zellen 20 verantwortlich. Die Peptide P10, P11, P15, P18, P19, P23, P26, P27 und P31 enthalten somit jeweils ein T-Helferepitop.

8. Restimulation von HPV18 L1-Peptid stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

25

Analog zu Beispiel 3 wurden humane T-Zellen (4×10^5) eines HLA A24-positiven Spenders für 3 Wochen mit dem HPV18 L1-Peptidpool bei 37°C unter wöchentli-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 49 -

cher Zugabe 1 µg/ml je einzelnes Peptid sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (bestrahlte PMBC) stimuliert und geerntet.

5 Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit 10 µg/ml des HPV18 L1-Peptids Q9 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.

10 Nach einer Stunde wurden 1 µl Monensin (300 µM) zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-human CD8/APC, mit α-human CD4/PerCP und mit α-human IFNγ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

15

Ergebnis: Fig. 7 zeigt, daß die mit dem Peptid Q9 inkubierten BLCL-Zellen eine Restimulation von HPV18 L1-Peptidpool-stimulierten CD8-positiven T-Zellen bewirkten. Somit enthält das Peptid Q9 ein HLA A24-restringiertes zytotoxisches T-Zellepitop.

20

Anhand des Algorithmus für potentielle HLA A24-bindende Peptide (Paker, KC et al. (1994) J. Immunol. 152:163), durchgeführt in dem sogenannten Peptid-Prediction Program von Parker unter http://www-bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/, wurde festgestellt, daß das Peptid IYNPETQRL an MHC-Klasse I Moleküle des Haplotyps HLA A24 bindet. Das Peptid IYNPETQRL ist somit für die Restimulation der T-Zellen durch die mit dem Q9-Peptid inkubierten BLCL-Zellen verantwortlich ist.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 50 -

Somit ist das Peptide IYNPETQRL, das in dem Peptid Q9 der überlappenden 20mere enthalten ist, ein HLA A24-restringiertes zytotoxisches T-Zellepitop.

9. Restimulation von HPV16 CVLP-stimulierten T-Zellen mit
5 unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blut-spenders mit HPV16L1_{ΔC}-E7₁₋₅₅ CVLPs stimuliert und geerntet.

- 10 Anschließend wurden die T-Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit den Peptidpools aus Beispiel 7 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identischen BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 µg/ml zugegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrollen mit HPV16 L1-Peptidpool inkubierte Zellen.
15

Nach einer Stunde wurde 1 µl Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und per-

- 20 meabilisiert, mit α-human CD8/APC, mit α-human CD4/PerCP und mit α-human IFNγ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

- 25 Ergebnis: Fig. 8 (oben) zeigt, daß der Anteil der CD4- und IFNγ-positiven Zellen für die mit den Peptidpools G und 5 inkubierten BLCL ebenso wie für die mit P39 inkubierten BLCL sehr hoch ist. Da die Peptidpools G und 5 als gemeinsames

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 51 -

Peptid P39 enthalten, das für sich alleine ebenfalls eine Restimulation von CVLP-stimulierten T-Zellen bewirkte, enthält das Peptid P39 ein T-Helferepitop. Da CD4- und IFN γ -positive Zellen in der Regel T_{H1}-Zellen sind, handelt es sich somit um ein T_{H1}-Epitop.

5

Des weiteren war der Anteil der CD4- und IL4-positiven Zellen (Fig. 8 unten) für die mit den Peptidpools F, G und 5 inkubierten BLCL deutlich erhöht gegenüber dem Anteil reaktiven Zellen, die mit den übrigen Peptidpools inkubierten BLCL bzw. der Negativkontrolle. CD4- und IL4- positive Zellen sind in der Regel T_{H2}-Zellen. Dies wiederum besagt, daß das in G und 5 enthaltene Peptid P39 zusätzlich auch ein T_{H2}-Epitop enthält oder mit dem T_{H1}-Epitop identisch ist und daß zusätzlich das in F und 5 enthaltene Peptid 38 ein T_{H2}-Epitop enthält.

10. Restimulation von HPV16 CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

15

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blut-spenders mit HPV16L1_{ΔC}·E7₁₋₅₅ CVLPs stimuliert und geerntet.

20 Anschließend wurden die T-Zellen in 100 μ l Medium bei 37°C mit den Peptidpools aus Beispiel 7 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 μ g/ml zugegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrollen mit HPV16 L1-Pool inkubierte Zellen.

25

Nach einer Stunde wurde 1 μ l Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und per-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 52 -

meabilisiert, mit α -human CD8/APC, mit α -human CD4/PerCP und mit α -human IFN γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

5

Ergebnis: Fig. 9 zeigt, daß der Anteil der CD8-positiven T-Zellen für die mit den Peptidpools B, E, G und I inkubierten BLCL hoch ist. Da die Peptidpools B und I als gemeinsames Peptid P2, die Peptidpools E und I P5 sowie G und I P7 enthalten, enthalten die Peptide P2, P5 und P7 je ein zytotoxisches T-Zellepitop.

10

11. Restimulation von HPV16 CVLP-stimulierten T-Zellen mit P33-stimulierten Antigen-präsentierenden Zellen

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blut-spenders mit HPV16L1 Δ C \cdot E71-55 CVLPs stimuliert und geerntet.

15

Anschließend wurden die T-Zellen in 100 μ l Medium bei 37°C mit 1 μ g/ml Peptid P33 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in

20 Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrolle mit HPV16 L1-Peptidpool inkubierte Zellen.

Nach einer Stunde wurde 1 μ l Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α -human CD8/APC, mit α -human CD4/PerCP und mit α -human IFN γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in

25

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 53 -

einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

- Ergebnis: Fig. 10 zeigt, daß der Anteil der CD8-positiven Zellen für die mit dem P33 Peptid inkubierten BLCL deutlich höher ist als in der Negativkontrolle. P33 enthält somit ein zytotoxisches T-Zellepitop.

12. Restimulation von HPV18 CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

10

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blutspenders mit HPV18L1 Δ CD/E7_{1-33Dt} CVLPs und HPV18L1 Δ CD/E7_{1-60Dt} CVLPs bei 37°C stimuliert und geerntet.

- 15 Anschließend wurden die T-Zellen in 100 μ l Medium bei 37°C mit den HPV18-Peptidpools aus Beispiel 6 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 μ g/ml zugegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrolle mit HPV18 L1-Peptidpool inkubierte Zellen.

- Nach einer Stunde wurde 1 μ l Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α -human CD8/APC, mit α -human CD4/PerCP und mit α -human IFN γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 54 -

Ergebnis: Fig. 11 (oben) zeigt, daß der Anteil der CD4- und IFN γ -positiven Zellen für die mit den Peptidpools F, G, 5 und 6 inkubierten BLCL hoch ist. Den Peptidpools F und 5 ist das Peptid Q38, F und 6 das Peptid Q46, G und 5 das Peptid Q39 sowie G und 6 das Peptid Q47 gemeinsam. Somit enthalten die Peptide Q38, Q39, Q46 und Q47 je ein T_{H1}-Epitop.

Fig. 11 (unten) zeigt, daß der Anteil der CD4- und IL4-positiven Zellen für den Peptidpool G besonders hoch ist, allerdings sind der Anteil der reaktiven Zellen für die Pools 3, 4, 5 und 6 etwa gleich hoch, so daß aus diesem Versuch kein eindeutiger Rückschluß auf die T_{H2}-Epitope gezogen werden konnte. Die Peptide Q38, Q39, Q46 und Q47 wurden jedoch im nachfolgenden Beispiel individuell getestet.

13. Restimulation von HPV18 CVLP-stimulierten T-Zellen mit Q38-, Q39-, Q46- bzw. Q47-Peptid-stimulierten Antigen-präsentierenden Zellen

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen (4×10^5) eines nicht-HLA-typisierten Blutspenders mit HPV18L1_{ACD}E7_{1-53D} CVLPs und HPV18L1_{ACD}E7_{1-60D} CVLPs stimuliert und geerntet.

20

Anschließend wurden die T-Zellen in 100 μ l Medium bei 37°C mit je 1 μ g/ml Peptid Q38, Q39, Q46 oder Q47 sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrollen mit HPV18 L1- oder E7-Peptidpool inkubierte Zellen.

Nach einer Stunde wurde 1 μ l Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α -human CD8/APC, mit α -human CD4/PerCP und mit α -

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 55 -

human IFN γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

5 Ergebnis: Fig. 12 (oben links) zeigt, daß der Anteil der reaktiven CD4- und IFN γ -positiven T-Zellen für die mit den Peptiden Q38 und Q39 inkubierten BLCL besonders hoch ist, aber auch für die Peptide Q46 und Q47 noch deutlich höher ist als in der Negativkontrolle. Somit enthalten Q38, Q39, Q46 und Q47 je ein T_{H1}-Epitop.

10

Fig. 12 (unten links) zeigt, daß der Anteil der reaktiven CD4- und IL4-positiven T-Zellen für die Peptide Q38 und Q39 besonders hoch ist, so daß Q38 und Q39 neben den T_{H1}-Epitopen zusätzlich auch T_{H2}-Epitope enthalten bzw. daß die T_{H1}-Epitope gleichzeitig auch T_{H2}-Epitope sind.

15

Fig. 12 (Oben rechts) zeigt, daß der Anteil der reaktiven CD8- und IFN γ -positiven T-Zellen für die Peptide Q38, Q39 und Q47 besonders hoch ist, so daß die Peptide Q38, Q39 und Q47 des weiteren zytotoxische T-Zellepitope enthalten. Der Anteil an CD8- und IL4-positiven Zellen ist für die Peptide Q38, Q39, Q46 und Q47

20 gering und vergleichbar zur Negativkontrolle, was dadurch zu erklären ist, daß CD8-positive Zellen in der Regel kein IL4 exprimieren.

14. Restimulation von HPV16 CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

25

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blutspenders mit HPV16L1 Δ C \rightarrow E7₁₋₅₅ CVLPs stimuliert und geerntet.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 56 -

Anschließend wurden die T-Zellen in 100 μ l Medium bei 37°C mit den Peptidpools aus Beispiel 7 sowie 10^5 Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 μ g/ml zugegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrollen mit HPV16 L1 bzw. E7-Peptidpool inkubierte Zellen.

Nach einer Stunde wurde 1 μ l Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und per-

meabilisiert, mit α -human CD8/APC, mit α -human CD4/PerCP und mit α -human IFN γ /FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

Ergebnis: Fig. 13 zeigt, daß der Anteil der CD8- und IFN γ -positiven T-Zellen für die mit den Peptidpools A, C, E, F, 1 und 6 inkubierten BLCL hoch ist. Den Peptidpools

- 20 A und 1 ist das Peptid P1,
C und 1 das Peptid P3,
E und 1 das Peptid P5,
F und 1 das Peptid P6,
A und 6 das Peptid P41,
25 C und 6 das Peptid P43,
E und 6 das Peptid P45 und
F und 6 das Peptid P46

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 57 -

gemeinsam. Somit enthalten die Peptide P1, P3, P5, P6, P41, P43, P45 und P46 je ein zytotoxisches T-Zellepitop.

15. Restimulation von HPV18 CVLP-stimulierten T-Zellen mit unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen

Analog zu Beispiel 6 wurden humane T-Zellen eines nicht-HLA-typisierten Blutspenders mit HPV18L1_{ΔCD1E71-53D1} CVLPs und HPV18L1_{ΔCD1E71-60D1} CVLPs bei 37°C stimuliert und geerntet.

10

Anschließend wurden die T-Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit den Peptidpools aus Beispiel 6 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert. Dabei wurden derartige Mengen der Peptidpools eingesetzt, daß für jedes einzelne Peptid 1 µg/ml zugegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle dient lediglich mit Puffer inkubierte Zellen, als Positiv-Kontrollen mit HPV18 L1 bzw. E7-Peptidpool inkubierte Zellen (Fig. 14 oben). Für Fig. 14 unten wurden die T-Zellen in 100 µl Medium bei 37°C mit den Peptidpools F und 4 sowie mit 1 µg/ml Peptid Q30 sowie 10⁵ Antigen-präsentierenden Zellen (donor-identische BLCL) in Anwesenheit von 10 IU/ml IL2 restimuliert.

20

Nach einer Stunde wurde 1 µl Monensin zugegeben. Die Zellen wurden für weitere 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit α-human CD8/APC mit α-human CD4/PerCP und mit α-human IFNγ/FITC gefärbt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Markierung in einem FACScan calibur untersucht und die Meßergebnisse mit Hilfe von Cellquest Software analysiert.

25

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 58 -

Ergebnis: Fig. 14 (oben) zeigt, daß der Anteil der CD4- und IFN γ -positiven T-Zellen für die mit den Peptidpools F und 4 inkubierten BLCL hoch ist. Den Peptidpools F und 4 ist das Peptid Q30 gemeinsam. Somit enthält das Peptid Q30 ein T_{H1}-Epitop.

5

Dieses Ergebnis konnte durch den Versuch dargestellt in Fig. 14 unten bestätigt werden. Der Anteil der reaktiven CD4- und IFN γ -positiven T-Zellen ist jeweils vergleichbar, egal ob die T-Zellen mit den Peptidpools F-, 4- oder mit dem Peptid Q30-inkubierten BLCL restimuliert wurden.

10

16. Restimulation von HPV18 Peptid-stimulierten murinen T-Zellen

Analog zu Beispiel 5 wurden murine T-Zellen von CVLP-geimpften Mäusen mit L1 oder E7 Peptidpools unter Zugabe von Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit den auf der X-Achse der Fig. 15 angegebenen Peptide (Q3 und Q4 in Fig. 15 oben, L1₄₇₄E7₁₋₈, E7₂₋₁₁, E7₁₋₈ in Fig. 15 unten) sowie Antigen-präsentierenden Zellen (RMA) restimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienten lediglich mit Puffer inkubierte Zellen.

20 Die Auswertung des Experiments erfolgte ebenfalls analog zu Beispiel 5, indem die reaktiven CD8-positiven Zellen durch Antikörperfärbung und FACScan bestimmt wurden.

Ergebnis: Fig. 15 oben zeigt für die Peptide Q3 und Q4 bzw. Fig. 15 unten für die Peptide L1₄₇₄E7₁₋₈, E7₂₋₁₁ und E7₁₋₈, dass die mit diesen Peptiden inkubierten RMA-Zellen eine Restimulation von Peptid-stimulierten murinen CD8-T-Zellen bewirkten. Die Peptide Q3, Q4, L1₄₇₄E7₁₋₈, E7₂₋₁₁ und E7₁₋₈ enthalten somit jeweils ein H2b restringiertes zytotoxisches T-Zellepitop.

25

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 59 -

17. Lyse von HPV18 Peptid-beladenen RMA-/LKK-Zellen

Analog zu Beispiel 4 wurden RMA- bzw. LKK-Zellen mit ^{51}Cr radioaktiv markiert und mit den auf der X-Achse aufgetragenen Peptiden (Q43 und Q44 in Fig. 16 oben, Q49 in Fig. 16 unten) inkubiert. Zellen ohne Peptid dienten als Negativkontrollen. Anschließend wurden T-Zellen hinzugegeben, die zuvor mit dem Peptidpool stimuliert worden waren.

Die Lyse der RMA- bzw. LKK-Zellen durch die T-Zellen wurde anhand der Freisetzung des ^{51}Cr gemessen und wie in Beispiel 4 berechnet.

Ergebnis: Fig. 16 zeigt, dass die mit dem Q43 oder Q44 beladenen RMA-Zellen (Fig. 16 oben) bzw. die mit dem Q49 beladenen LKK-Zellen (Fig. 16 unten) effektiv durch die T-Zellen lysiert werden konnten, die nicht beladenen RMA- bzw. LKK-Zellen hingegen nicht. Das Q43- und das Q44-Peptid sind somit H2b-restringierte zytotoxische T-Zellepitope, das Q49 ist somit ein H2k-restringiertes zytotoxisches T-Zellepitop.

18. Identifizierung des zytolytischen T-Zell-Epitops HPV18 E7₈₆₋₉₄

20

A. HLA-Bindungs-Vorhersage

Für die Vorhersage von 9-mer-Sequenzen mit hoher Bindungsstärke an HLA-A*0201 im E7-Protein des HPV-Typs 18 wurde das HLA-Bindungsvorhersageprogramm des NIH genutzt (Adresse: http://www.bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/). Es wurden 9-merer untersucht, da sie die optimalen Liganden für HLA-Klasse I Moleküle darstellen. Zur Vorhersage wur-

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 60 -

de die vollständige Aminosäuresequenz des HPV18 E7-Proteins in das Programm eingespeist und festgelegt, daß 9-mere für das HLA-Allel A*0201 vorhergesagt werden sollen. Das Programm liefert eine Liste, in der die gefundenen 9-mere nach Bindungsstärke angeordnet sind. Der Wert für die Bindungsstärke ist als
5 Halbwertszeit in Minuten der Dissoziation eines Peptides der entsprechenden Aminosäuresequenz ($T_{1/2}$) angegeben.

B. *In vitro* Vakzinierung von PBMC

10 Die vorhergesagten Peptide wurden nach Standardmethoden synthetisiert (F moc Methode). Gegen Peptide mit hoher vorhergesagter HLA-A2-Bindungsstärke wurden peptidspezifische T-Zelllinien etabliert. Dazu wurden je Loch einer 96-Lochplatte 1×10^5 PBMC von gesunden, HLA-A2 positiven Donoren in 100 μ l
15 Medium (RPMI 1640, 10% hitzeinaktiviertes AB-Plasma) ausgesät. Dem Kulturmedium wurden 20 μ g/ml Peptid zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und 1 mal wöchentlich mit bestrahlten peptidbeladenen autologen PBMC restimuliert. Die Stimulator-PBMC wurden für 4 Stunden in Medium mit 20
20 μ g/ml Peptid inkubiert. Nach der Bestrahlung wurden sie auf $1 \times 10^4/100$ μ l mit Medium verdünnt und zu den peptidstimulierten PBMC gegeben. Dazu wurde die Hälfte des Mediums aus jeder Vertiefung abgesaugt und 100 μ l der Stimulator-PBMC Suspension zugegeben. Ab der 3. Stimulation wurden 10 U/ml IL-2 und 10 U/ml IL-7 zugesetzt. Ab der 5. Stimulation wurde auf die gleiche Art und Weise mit peptidbeladenen autologen B-lymphoblastischen Zelllinien (BLCL) restimuliert.

25

Zur *in vitro* Vakzinierung mit allogenen Tumorzellen wurden HeLa Zellen mit CD80 und HLA-A2 transfiziert (H7.1-A2). Diese Zellen wurden bestrahlt und zur Stimulation von PBMC bei 1×10^4 /Loch eingesetzt. Es wurde 3 mal analog zu Peptidstimulation restimuliert.

30

C ELISpot-Assay

1x10⁴ Stimulatorzellen (K-A2 - dies sind K-562-Zellen (ATCC CCL-243) wurden mit einem HLA A2-Expressionsvektor transfiziert, PBMC oder dendritische Zellen) wurden in 60 µl Medium (RPMI 1640, 0,4% Humanalbumin) in eine Vertiefung einer 96-Loch-Rundboden-Zellkulturplatte ausgesät und mit 50 µg/ml Peptid über Nacht beladen. Am nächsten Tag wurden 5x10⁴ T-Zellen/Loch in 60µl Medium (mit je 10 U/ml IL-2 und IL-7) zugegeben und 4 Stunden inkubiert. Eine Millipore Nitrocellulose HA-Platte wurde über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper 1-D1k anti-human IFN-γ (10 µg/ml in PBS, 60 µl/Loch, Hölzel Diagnostika, Köln) beschichtet. Am nächsten Tag wurde 3 mal mit 150 µl sterilem PBS pro Vertiefung jeweils 5 min gewaschen und 1 Stunde bei 37°C mit Medium geblockt. Das Blocking-Medium wurde entfernt, die Zellen von der Rundboden-Zellkulturplatte auf die Filterplatte übertragen und weitere 20 bis 22 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen und das Medium entfernt und die Filterplatte 6 mal 2 min mit PBS/Tween 20 (0.05%) gewaschen. Dann wurde der Antikörper Ab-7-B6-1-biotin zugegeben (2 µg/ml in PBS/BSA, 60µl/Vertiefung, Hölzel Diagnostika) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Filterplatte wieder 6 mal 2 Minuten mit PBS/Tween 20 (0.05%) gewaschen und Streptavidin-AP (50 ng/ml in PBS, Sigma (Deisenhofen), 100 µl/Vertiefung) zugegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Filterplatte 3 mal 2 Minuten mit PBS/Tween 20 (0.05%) und 3 mal 2 Minuten mit PBS gewaschen. Es wurden dann 60 µl BCIP/NBT-Substrat (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt und weiter 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bis blauschwarze Flecken erschienen. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Platte getrocknet. Die Auszählung der Flecken (spots) erfolgte am ELISpot-Auslese-System der Firma ZEISS-VISION (Halbergmoos).

D Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität von HPV18 E7₈₆₋₉₄ spezifischen T-Zellen wurde im Chrom-
5 release Assay bestimmt. Als Targetzellen wurden autologe BLCL eingesetzt. Je-
weils 5×10^5 Zellen wurden in 100 μ l Medium (RPMI 1640, 10% FCS) aufge-
nommen und mit 20 μ l 51 Chrom (NEN) versetzt. Zur Peptidbeladung der BLCL
wurde 50 μ g/ml des entsprechenden Peptids zugefügt. Anschließend erfolgte eine
10 Inkubation bei Raumtemperatur über 2 Stunden, wobei die Zellen alle 20-30 min
vorsichtig resuspendiert wurden. Es folgte eine 3 malige Waschung der Zellen mit
5 ml Medium. Zum Sedimentieren der Zellen wurden sie dabei jeweils 5 min bei
1500 U/min zentrifugiert und vorsichtig resuspendiert. Die Targets wurden in
Medium aufgenommen und auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. 40 μ l dieser Zellsus-
15 pension wurden jeweils zu den bereits in die Vertiefungen einer 96-Loch Spitzbo-
den-Zellkulturplatte ausgesäten Effektoren und K-562-Zellen CCL-243 gegeben.

Die Effektoren (epitopspezifische T-Zellen) wurden geerntet und in Medium
(RPMI 1640, 10% FCS, 10 U/ml IL-2 und IL-7) aufgenommen. Je 80 μ l dieser
Zellsuspension wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Spitzboden-
Zellkulturplatte pipettiert (Duplikate). Dabei wurde die Zellzahl/ml so eingestellt,
20 daß das gewünschte Effektor-Target-Verhältnis erreicht wurde. Den Effektoren
wurden unmarkierte K-562-Zellen (40 μ l, 20 facher Überschuß zu Targetzellen)
zugefügt, um die in den Zelllinien eventuell vorhandene Aktivität von NK-Zellen
vollständig zu blockieren. Die Effektoren wurden mit den K-562-Zellen minde-
stens 30 Minuten inkubiert, bevor die markierten Targetzellen zugesetzt wurden.

25

Als Kontrollen (6-fach-Ansätze) wurden zum einen Targetzellen mit K-562 und
Medium inkubiert (Low-Release-Kontrolle) und zum anderen Targetzellen mit K-
562, Medium und Tween 20 (High-Release-Kontrolle). Um zu kontrollieren, ob
die NK-Aktivität vollständig geblockt wurde, wurden außerdem Effektoren mit
30 unmarkierten und markierten K-562 inkubiert.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 63 -

Die Ansätze wurden 4 Stunden bei 37°C, 98% Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Kulturplatten 5 min bei 700 U/min zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Aus jeder Vertiefung wurden, ohne das Zellpellet aufzuwirbeln, 100 µl des Überstandes auf eine Opti-Plate-Scintillationszählplatte
5 pipettiert, und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden 150 µl Scintillationsflüssigkeit Microscint 40, Canberra-Packard, Deieich) zugegeben und die Anzahl der Zerfälle pro Minute in den einzelnen Ansätzen im Scintillationszählgerät (Topcount, Canberra-Packard, Dreieich) gemessen. Abschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mehrfachansätze gebildet.
10

Die Berechnung der spezifischen Lyse wurde nach der folgenden Formel vorgenommen:

spezifische Lyse (%) = 100 x (Ergebnis - Low Release) x (High Release - Low Release)⁻¹
15

E Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

Aus den Biopsien von Tumoren von Patientinnen mit HPV18 und HLA-A2 Positivität wurden TIL durch Kultur in AIM V Medium (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)
20 mit jeweils 100 U/ml IL-2 und IL-7 und 0.125 µl/well Dynal beads T cell expander (Dynal, Hamburg) zum auswachsen gebracht. Diese TIL wurden direkt im ELISpot assay auf ihre Spezifität für das HPV18 E7₈₆₋₉₄ Peptidpitop untersucht.

F Ergebnisse

25

Um zu bestimmen, welche HLA-A2 restringierten Peptide des HPV18 E7 Proteins von Tumorzellen prozessiert und präsentiert werden, wurde durch *in vitro*

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 64 -

Vakzinierung mit HeLa CD80/HLA-A2 Transfektanten (H7.1-A2) eine T-Zelllinie generiert. In der IFN- γ ELISpot Analyse zeigte sich eine spezifische Reaktion gegen das vorhergesagte synthetische Peptid FQQLFLNLT (siehe Fig. 17 oben). Dieses Peptid hat im Vergleich zu anderen vorhergesagte Peptiden eine relativ geringe Bindungsaffinität an HLA-A2. Trotzdem wurden spezifische T-Zellen detektiert. Als Kontrollpeptid wurde HPV16 E7₂₈₋₃₆ verwendet, das keine IFN- γ Sekretion induzierte. Dies lässt den Schluß zu, dass dieses Peptid von H7.1-A2 Zellen präsentiert wird.

10 Um zu testen, ob HPV18 E7₈₆₋₉₄ spezifische T-Zellen zytolytische Aktivität besitzen wurden T-Zelllinien gegen das synthetische Peptid hergestellt. Die T-Zellen wurden im Chrom release assay getestet. Als Targetzellen wurden autologe peptidbeladene BLCL eingesetzt. Bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 30:1 wurde eine spezifische Lyse von ca. 20% beobachtet (siehe Fig. 17 unten). Gegen die Kontrollpeptide HPV18 E7₇₋₁₅ und HPV16 E6₂₈₋₃₆ wurde keine spezifische Lyse gemessen.

Um zu überprüfen, ob das HPV18 E7₈₆₋₉₄ Peptid auch vom Immunoproteasom natürlich prozessiert wird, wurden T-Zelllinien durch Stimulation mit antigenbeladenen autologen dendritischen Zellen (DC) hergestellt. Die DC wurden mit rekombinantem HPV18 E7 Protein bzw. einem Pool aus überlappenden 20-mer Peptiden, die das gesamte HPV18 E7 repräsentieren, beladen (siehe Fig. 18 oben: „E7 Protein induziert“ bzw. „E7 Peptidpool induziert“). Die induzierten T-Zellen wurden im ELISpot assay auf Spezifität für das HPV18 E7₈₆₋₉₄ Epitop getestet. In 25 beiden T-Zelllinien wurden HPV18 E7₈₆₋₉₄ spezifische T-Zellen detektiert (siehe Fig. 18 oben). Das bedeutet, dass das Immunoproteasom das Epitop prozessiert.

Die biologische Relevanz des HPV18 E7₈₆₋₉₄ Epitops wurde an TIL Populationen untersucht. TIL wurden aus einer Tumorbiopsie einer HPV18 und HLA-A2 positiven Patientin isoliert und *in vitro* linear expandiert ohne antigenspezifische Re- 30

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 65 -

stimulation. Sie wurden im ELISpot assay mit HPV18 E7₈₅₋₉₄ beladenen K-A2 (HLA-A2 transfizierten K-562 Zellen als Stimulatoren) konfrontiert.

- In den TIL Populationen findet sich eine deutliche Reaktion gegen HPV18 E7₈₆₋₉₄ jedoch nicht gegen das von Rudolf MP et al. (2001, Clinical Cancer Research 7 (3 Suppl):788s-795s) beschriebene Epitop HPV18 E7₇₋₁₅ (siehe Fig. 18 unten). Das Peptid HPV18 E7₇₋₁₅ hat eine 2,5-fach höhere Bindungsaffinität an HLA-A2. Diese Ergebnisse deuten auf die natürliche Präsenz von HPV18 E7₈₆₋₉₄ spezifischen T-Zellen in Tumoren hin, was die Relevanz des gefundenen Peptidepitops unterstreicht.

10

19. Zusammenfassung der Beispiele 3 bis 18

Die gewonnenen Daten der Beispiele 3 bis 18 sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt:

15 Tabelle 3: HPV16-Peptide /-Epitope

Name	Sequenz	rel. Position	Species	Haplo- typ	Art des Epitops	Daten in
P2	YLPPVPVSKVVSTDEYVART	L1 12-31	human		T _C	Beispiel 9
P3	STDEYVARTNIYYHAGTSRL	L1 23-42	murin	H2b		Beispiel 2
P3	STDEYVARTNIYYHAGTSRL	L1 23-42	human		T _C	Beispiel 9, 13
P5	VGHPYFFIKKFNKKILVPEK	L1 45-64	human		T _C	Beispiel 13
P7	GLQYRVFRIHLDPNKGFGFP	L1 67-86	human		T _C	Beispiel 9
P10	WACVGVVEVGRGQPLGVGISG	L1 100-119	human		T _H	Beispiel 6
P11	QPLGVGISGHPLLNKLDDE	L1 111-130	human		T _H	Beispiel 6
P15	QLCLIGCKPPIGEHWGKGSF	L1 155-174	human		T _H	Beispiel 6
P18	LELINTVIQDGDMDVTGFGA	L1 188-207	murin	H2b		Beispiel 2
P18	LELINTVIQDGDMDVTGFGA	L1 188-207	human		T _H	Beispiel 6
P19	DMVDTGFGAMDFTTLQANKS	L1 199-218	murin	H2b		Beispiel 2

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 66 -

P31	VTVVDTRSTNMSLCAAI	L1 331-350	human		T _H	Beispiel 6
P33	TTYKNTNFKEYLRHGGEYDL	L1 353-372	murin	H2b		Beispiel 3
P33	TTYKNTNFKEYLRHGGEYDL	L1 353-372	human		T _C	Beispiel 10
P35	IFQLCKITLTADVMTYIHS	L1 375-394	murin	H2b		Beispiel 2
P38	PPGGTLEDTYRFVTSQAIA	L1 408-427	human		T _{H2}	Beispiel 8
P39	RFVTSQAIACQKHTPPAPRE	L1 419-438	human		T _{H1} , T _{H2}	Beispiel 8
P41	LKKYTFWEVNLKEKFSADLD	L1 441-460	human		T _C	Beispiel 13
P43	ELGRKFLVQAGMHGDTPTLH	L1 463-482	murin	H2b		Beispiel 2
P46	YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA	E7 23-42	human		T _C	Beispiel 13

Tabelle 4: HPV18-Peptide /-Epitope

Name	Sequenz	rel. Position	Species	Haplo- typ	Art des Epitops	Daten in
Q3	NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL	L1 23-42	murin	H2b	T _C	Beispiel 16
Q4	FYHAGSSRLLTVGNPYFRVP	L1 34-53	murin	H2b	T _C	Beispiel 16
Q5	VGNFYFRVFPAGGGNKQDLK	L1 45-64	murin	H2k		Beispiel 4
Q6	GGNKQDIPKVSAYQYRFRV	L1 56-75	human		T _H	Beispiel 5
Q9	SIYNPETQRLVWACAGVEIG bzw. IYNFETQRL	L1 89-108 90-98	human	A24	T _C	Beispiel 7
Q22	PDYLQMSADPYGDSMFCLR	L1 232- 251	murin	H2k		Beispiel 4
Q23	GDSMFCLRRQLFARHFWN	L1 243- 262	murin	H2k		Beispiel 4
Q30	NNGVCWHNQLFVTVDTRRS	L1 320- 339	human		T _{H1}	Beispiel 14
Q38	PPPTTSLVDTYRFVQSVAI	L1 408- 427	human		T _{H1} , T _{H2} , T _C	Beispiel 11, 12
Q39	YRFVQSVAITCQKDAAPAEN	L1 419- 438	human		T _{H1} , T _{H2} , T _C	Beispiel 11, 12
Q41	FYDKLKFVNVDLKEKFSLDL	L1 441- 460	murin	H2k		Beispiel 4
Q43	YPLGRKFLVQAGMHGPKATL	L1 463- 482	murin	H2k		Beispiel 4

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 67 -

Q43	YPLGRKFLVQAGMHGPKATL	L1 463-474 E7 1-8	murin	H2b	T _C	Beispiel 17
Q44	MHGPKATLQDIVLHLEPQNE	E7 1-20	murin	H2b	T _C	Beispiel 17
Q44	MHGPKATLQDIVLHLEPQNE	E7 1-20	murin	H2k		Beispiel 4
Q46	VDLLCHEQLSDSEENDEID	E7 23-42	human		T _{H1}	Beispiel 11, 12
Q47	SEENDEIDGVNHQHLPARR	E7 34-53	human		T _{H1} , T _C	Beispiel 11, 12
Q49	PQRHTMLCMCKCEARIKLV	E7 56-75	murin	H2k	T _C	Beispiel 17
Q51	SSADDLRAFQQLFLNTLSFV	E7 78-97	murin	H2k		Beispiel 4
L1 ₄₇₄ E7 ₁₋₈	GMHGPKATL	L1 474 E7 1-8	murin	H2b	T _C	Beispiel 16
E7 ₂₋₁₁	HGPKATLQDI	E7 2-11	murin	H2b	T _C	Beispiel 16
E7 ₁₋₈	MHGPKATL	E7 1-8	murin	H2b	T _C	Beispiel 16
E7 ₈₆₋₉₄	FQQLFLNTL	E7 86-94	human	HLA-A2	T _C	Beispiel 18

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 68 -

Patentansprüche

5

1. T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL,
 VGHYPYPIKPPNNKILVVK, GLQYRVFRIHLPDPNKFQFP,
 WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNKLDDETE,
 10 QLCLIGCKPPIGEHWKGGSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA,
 DMVDTGFGAMDFTTLQANKS, VTVVDITRSTNMSLCAAIST,
 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
 PPPGGTLEDYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAQCQKHTPPAPKE,
 LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLQAGMHGDTPTLH,
 15 YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGGNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQRLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDITRS, PPPPTSLVDYRFVQSVAI,
 YRFVQSVAITCQKDAAPAE, PYDKLKFVWVDLKEKFSLDL,
 20 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEEEDEID, SEEEDEIDGVNHQHLPAR,
 SSADDLRAFQQLFLNLSFV, NTDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FYHAGSSRLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCKCEARIKLV, GMHGPKATL,
 HGPKATLQDI, MHGPKATL, oder FQQLFLNLT

25

und/oder eine funktionell aktive Variante davon.

2. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine Sequenzhomologie zu

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL,
 VGHYPYPIKPPNNKILVVK, GLQYRVFRIHLPDPNKFQFP,
 WACVGVVEVGRGQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNKLDDETE,
 30 QLCLIGCKPPIGEHWKGGSP, LELINTVIQDGMVDTGFGA,
 DMVDTGFGAMDFTTLQANKS, VTVVDITRSTNMSLCAAIST,
 35 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLTADVMTYIHSM,
 PPPGGTLEDYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAQCQKHTPPAPKE,
 LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLQAGMHGDTPTLH,

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 69 -

YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGQNKQDIPK,
 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDTTRS, PPPPTSLVDTYRFVQSVAI,
 5 YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL,
 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 VDLLCHEQLSDSEEEDEID, SEEEDEIDGVNHQHLPAR,
 SSADDLRAFQQLFLNLSFV, NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FYHAGSSRLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCCCKCEARIKLV, GMHGPKATL,
 10 HGPKATLQDI, MHGPKATL, oder FQQLFLNLT
 von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere
 mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene besitzt.

3. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte
 15 Variante eine strukturelle Homologie zu

YLPPVPVSKVVSTDEYVART, STDEYVARTNIYYHAGTSRL,
 VGHPYFPIKPNNNKILVPK, GLQYRVFRIHLPDPNKFQFP,
 WACVGEVVEGRQPLGVGISG, QPLGVGISGHPLLNKLDDTE,
 QLCLIGCKPPIGEHWGKGSF, LELINTVIQDGMVDTGFGA,
 20 DMVDTGFAMDFTLQANKS, VTVDTRSTNMSLCAAIST,
 TTYKNTNFKEYLRHGEEYDL, IFQLCKITLADVMYIHSM,
 PPPGGTLEDTYRFVTSQAIA, RFVTSQAIAQCQKHTPPAPKE,
 LKKYTFWEVNLKEKFSADLD, PLGRKFLVQAGMHGDTPTLH,
 YCYEQLNDSSEEEDEIDGPA, VGNPYFRVPAGGQNKQDIPK,
 25 GGNKQDIPKVSAYQYRVFRV, SIYNPETQLVWACAGVEIG, IYNPETQRL,
 PDYLQMSADPYGDSMFFCLR, GDSMFFCLRREQLFARHFWN,
 NNGVCWHNQLFVTVVDTTRS, PPPPTSLVDTYRFVQSVAI,
 YRFVQSVAITCQKDAAPAEN, PYDKLKFVNVDLKEKFSLDL,
 YPLGRKFLVQAGMHGPKATL, MHGPKATLQDIVLHLEPQNE,
 30 VDLLCHEQLSDSEEEDEID, SEEEDEIDGVNHQHLPAR,
 SSADDLRAFQQLFLNLSFV, NTDDYVTRTSIFYHAGSSRL,
 FYHAGSSRLTVGNPYFRVP, PQRHTMLCMCCCKCEARIKLV, GMHGPKATL,
 HGPKATLQDI, MHGPKATL, oder FQQLFLNLT
 hat.

35

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 70 -

4. T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das T-Zell-Epitop eine zytotoxische Antwort auslöst oder eine T-Helferzellfunktion vermittelt.
- 5 5. Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und im Falle eines HPV-16 T-Zell-Epitops keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist.
- 10 6. Verbindung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid, insbesondere ein Fusionsprotein ist.
- 15 7. Verbindung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9-13 Aminosäuren Länge ist.
- 20 8. Verbindung nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung eine chemische, radioaktive, nicht radioaktive Isotopen und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins, und/oder eine chemische Modifikation des T-Zell-Epitops und/oder Fusionsproteins enthält.
- 25 9. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 kodiert.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 71 -

10. Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 enthält.
11. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 enthält, vorzugsweise präsentiert.
12. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert, und/oder infiziert ist.
13. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit mindestens einem T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wurde.
14. Zelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine dendritische Zelle, ein Fibroblast, insbesondere eine JY-, T2-, CaSki-Zelle oder EBV-transformierte Zelle ist.
15. Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und mindestens eine weitere Verbindung.
16. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex mindestens ein MHC-Klasse I-Molekül, vorzugsweise als HLA A2.01, A1 oder A24 Tetramer enthält.

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 72 -

17. Komplex nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte MHC-Klasse I Molekül ein humanes MHC-Klasse I Molekül, insbesondere ein HLA A2.01, A1 oder A24 Molekül ist.
- 5
18. Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens einem T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, das folgende Schritte enthält:
- 10
- a) Stimulation von Zellen mit mindestens einer genannten Verbindung;
 - b) Zugabe von mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert oder eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
 - c) Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen.
- 15
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es nach Schritt a) folgenden zusätzlichen Schritt a') enthält:
- a') Cokultivierung der Zellen für mindestens ca. 1 Woche, insbesondere mindestens ca. 8 Wochen mit:
- 20
- (i) mindestens einer Zielzelle beladen mit einem T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- 25
- (ii) mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17,
 - (iii) und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert,

bevor sich Schritt b) anschließt.

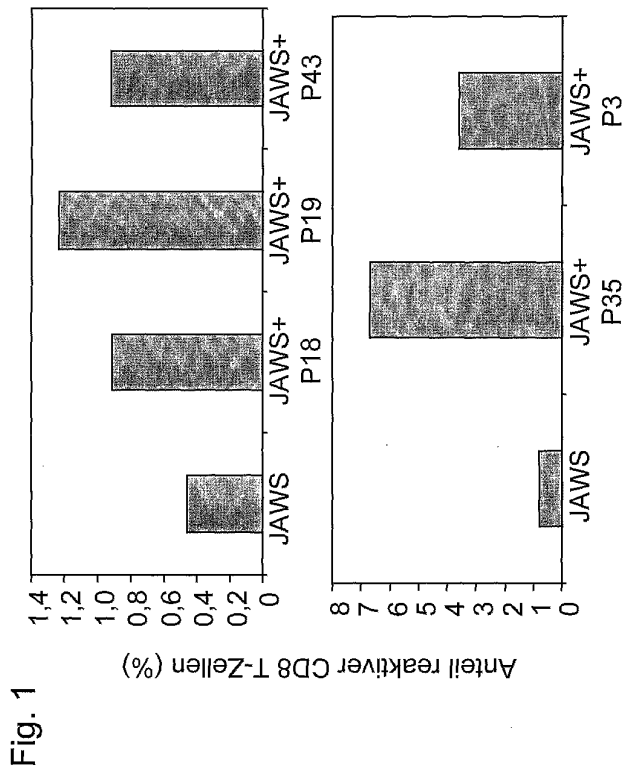
20. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11,
5 13, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle mit mindestens einem T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wird.
- 10
21. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 12, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzellen mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert und/oder infiziert wird.
- 15
22. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine dendritische Zelle, ein Fibroblast, insbesondere eine JY-, T2-, CaSki-Zelle oder EBV-transformierte Zelle ist.
- 20
23. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle von Schritt a) folgender Schritt a'') durchgeführt wird:
a'') Gewinnung und Präparation von Proben enthaltend T-Zellen und anschließende Kultivierung.
- 25
24. Testsystem zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

- 74 -

- 5 a) mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
- 10 b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.
- 15 25. Verwendung mindestens eines T-Zell-Epitops gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens eines Vektors gemäß Anspruch 10, mindestens einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17 zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.
- 20 26. Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
- 25 27. Arzneimittel oder Diagnostikum nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens ein Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens ein Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 in Lösung vorliegt, an eine feste Matrix gebunden ist, und/oder mit einem Adjuvans versetzt ist.
- 30



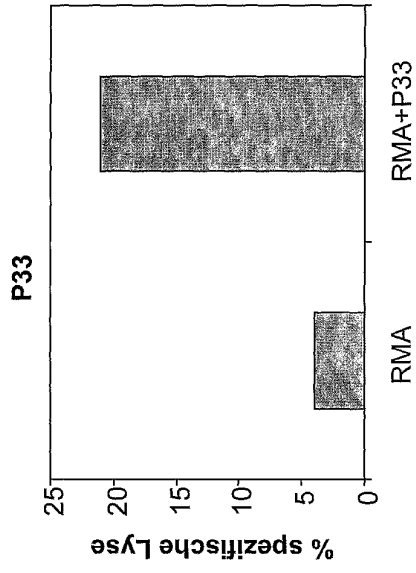


Fig. 2

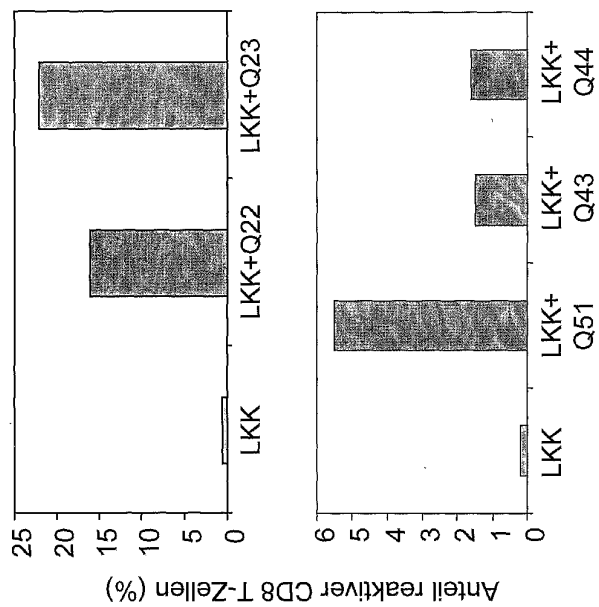


Fig. 3

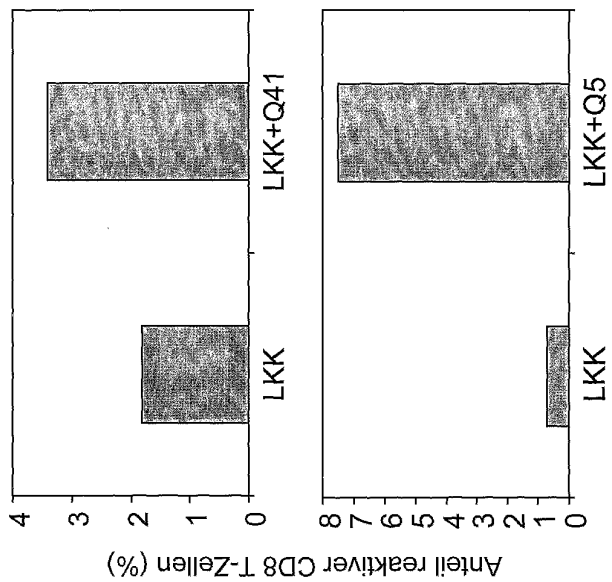


Fig. 4

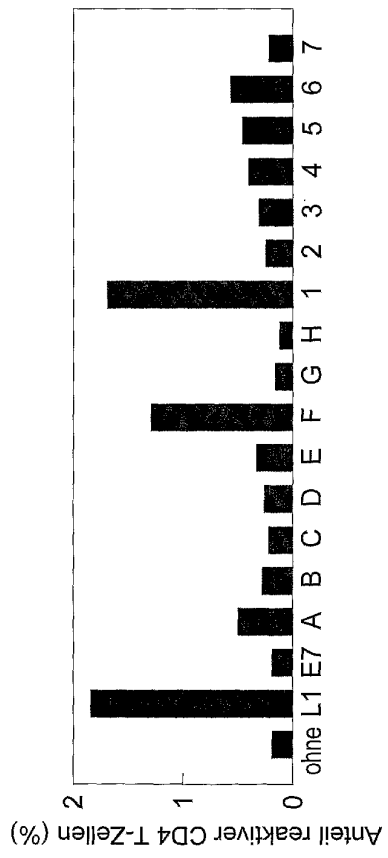


Fig. 5

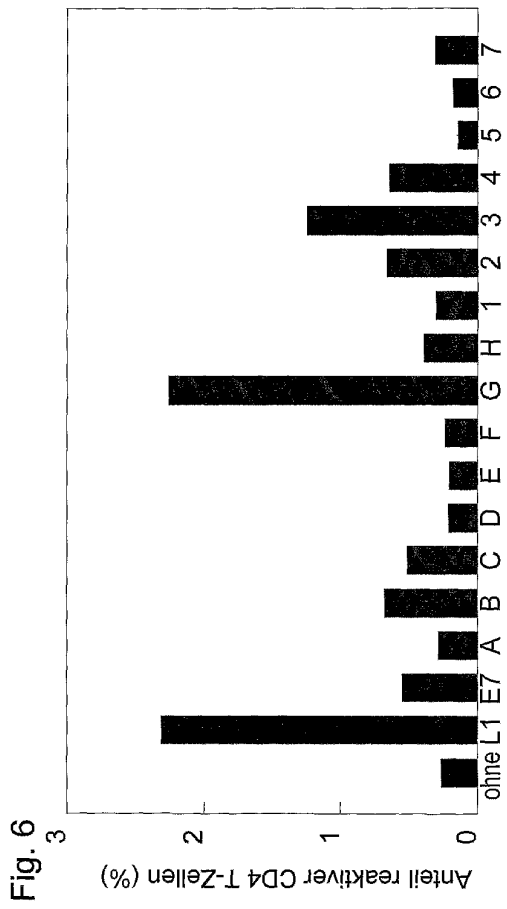


Fig. 6

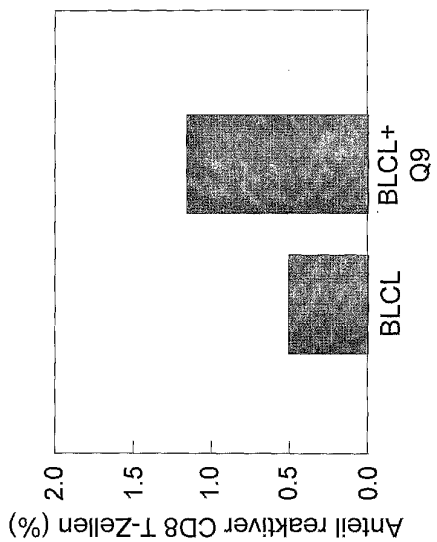
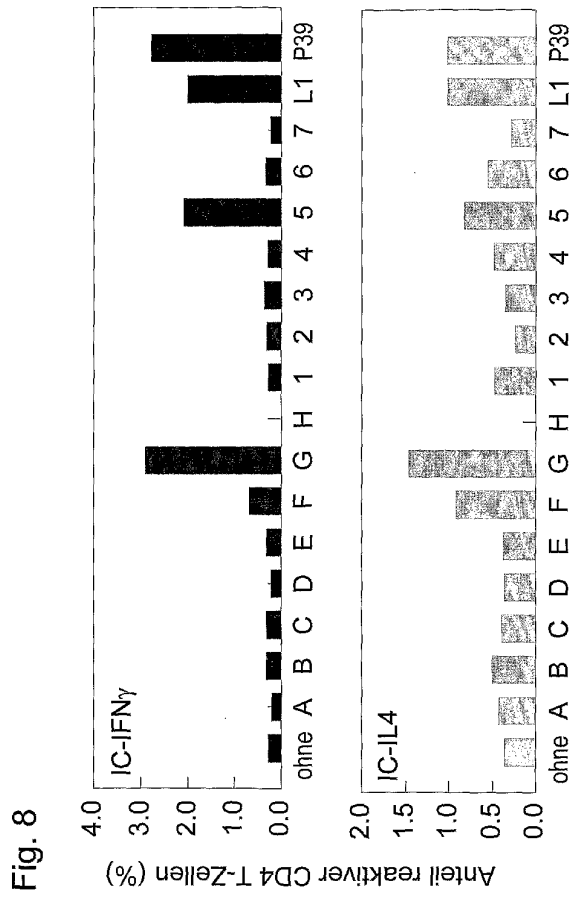
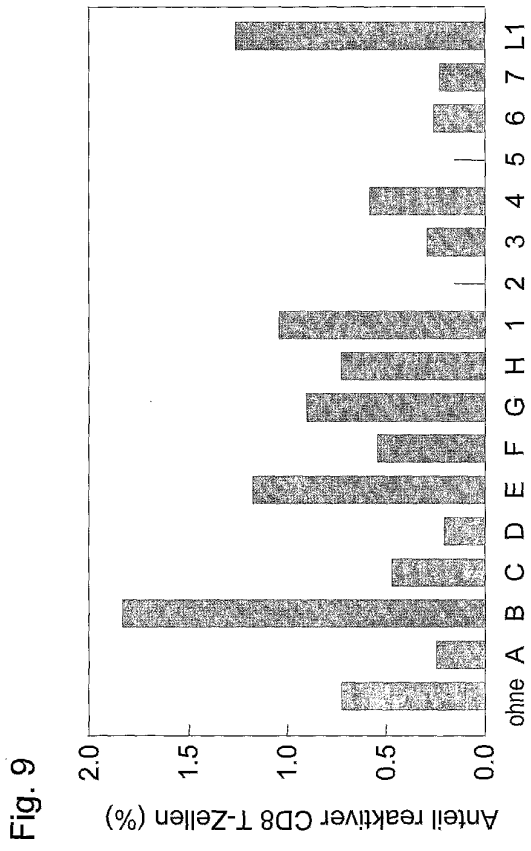


Fig. 7





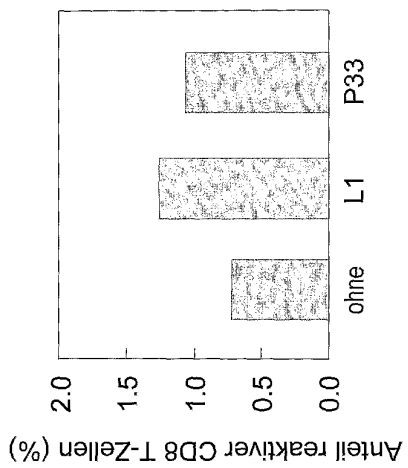


Fig. 10

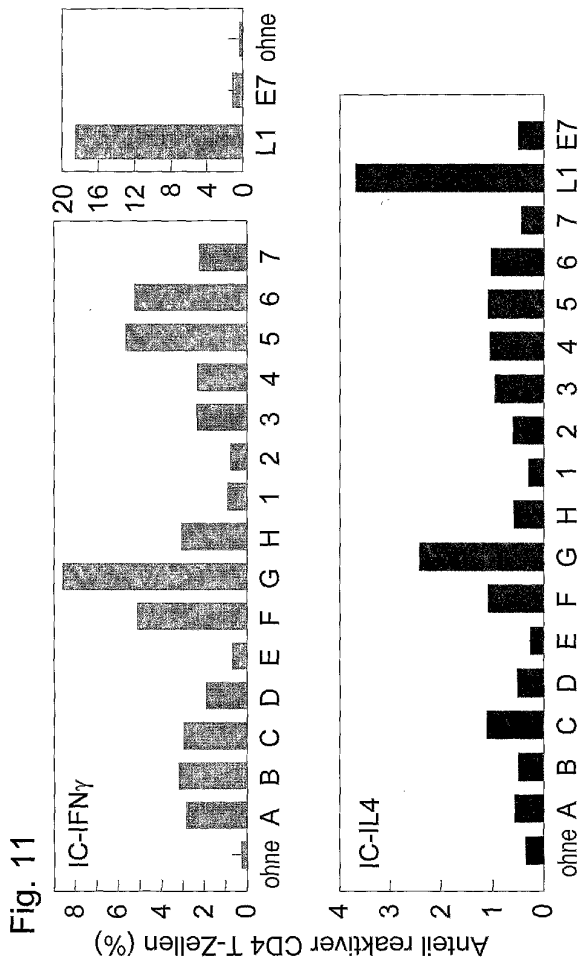
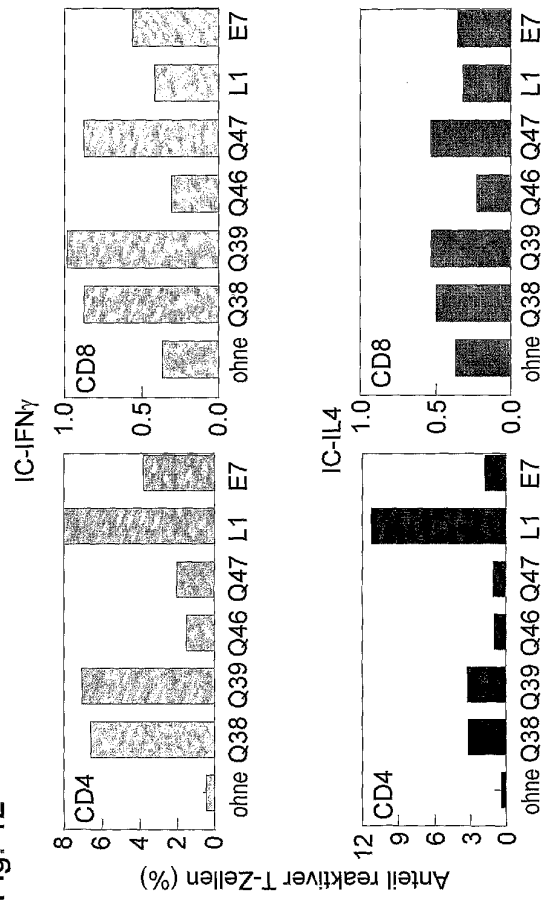
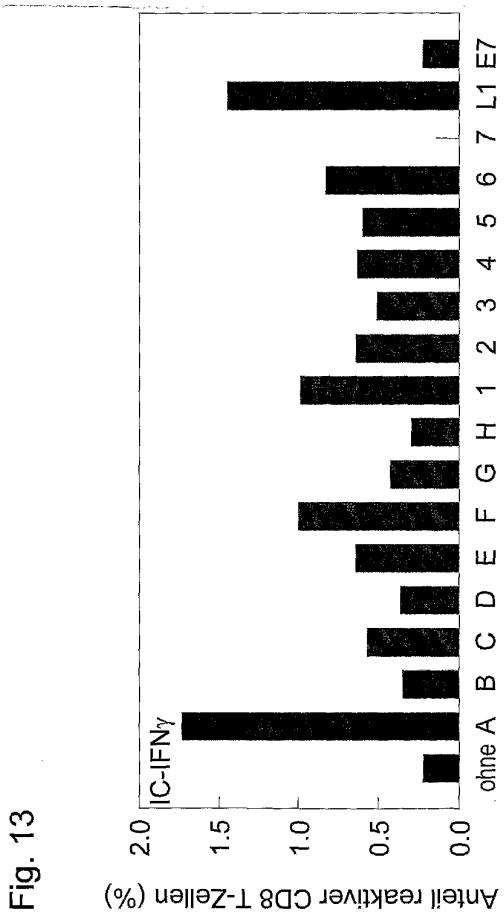
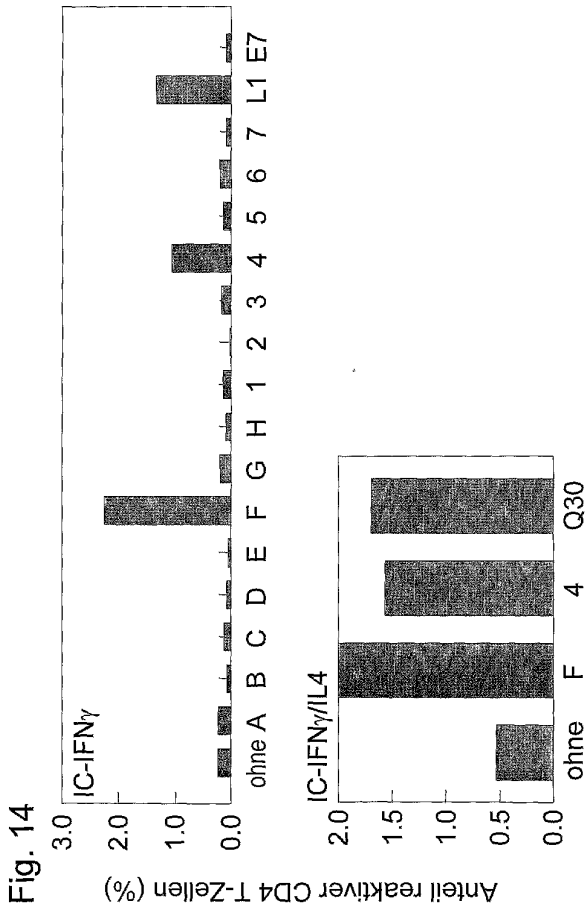
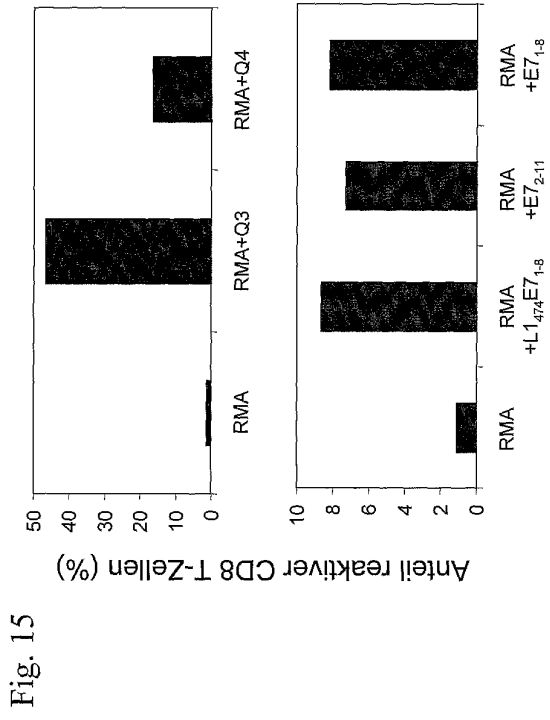


Fig. 12









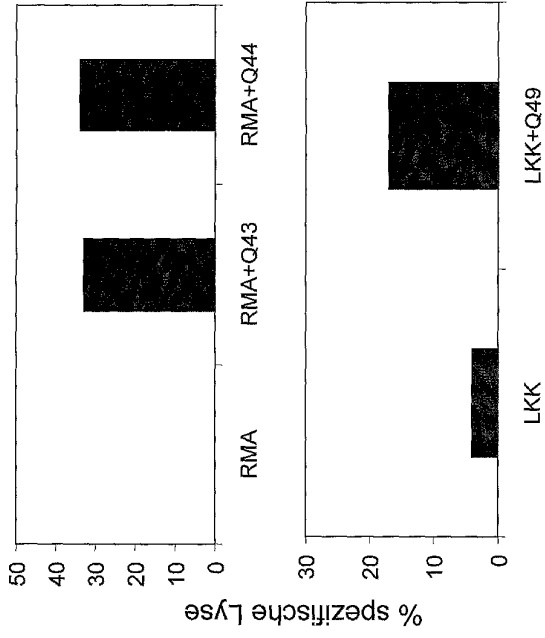


Fig. 16

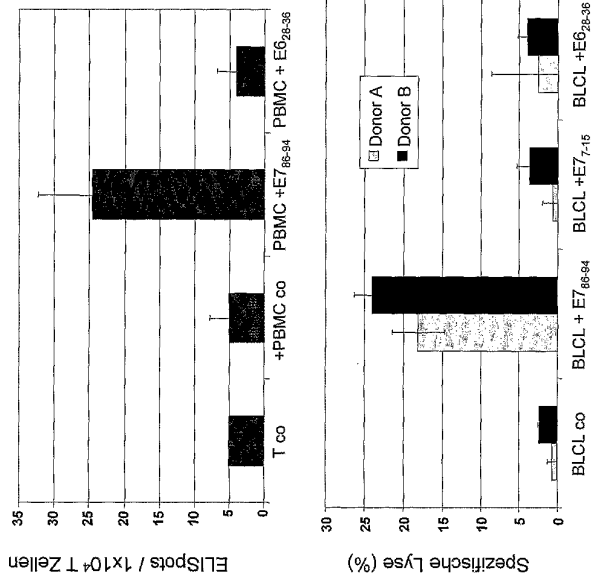


Fig. 17

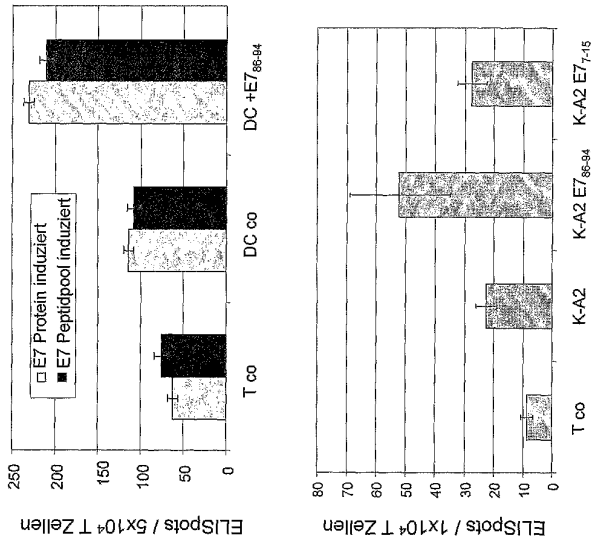


Fig. 18

WO 02/44384

1

PCT/EP01/14037

SEQUENCE LISTING

<110> MediGene Aktiengesellschaft
 <120> T-Zellepitope des Papillomavirus L1- und E7-Proteins und
 ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie
 <130> M35079PC
 <150> 100 59 631.2
 <151> 2000-12-01
 <160> 115
 <170> Word 6.0, PC-DOS/MS-DOS

 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> HPV16

 <400> 1
 Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Pro Val Ser Lys
 20

 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> HPV16

 <400> 2
 Tyr Leu Pro Pro Val Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr
 1 5 10 15
 Val Ala Arg Thr
 20

 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> HPV16

WO 02/44384

2

PCT/EP01/14037

<400> 3

Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Arg Leu
 20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 4

Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
 1 5 10 15
 Phe Pro Ile Lys
 20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 5

Val Gly His Pro Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile
 1 5 10 15
 Leu Val Pro Lys
 20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 6

Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg
 1 5 10 15
 Val Phe Arg Ile
 20

WO 02/44384

3

PCT/EP01/14037

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 7

Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro Asn Lys
1 5 10 15

Phe Gly Phe Pro
20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 8

Pro Asp Pro Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro
1 5 10 15

Asp Thr Gln Arg
20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 9

Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly
1 5 10 15

Val Glu Val Gly
20

<210> 10

<211> 20

WO 02/44384

4

PCT/EP01/14037

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 10

Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 1 5 10 15

Gly Ile Ser Gly
 20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 11

Gln Pro Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Asp Thr Glu
 20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 12

Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala
 1 5 10 15

Asn Ala Gly Val
 20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 13

Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile Ser
 1 5 10 15

WO 02/44384

5

PCT/EP01/14037

Met Asp Tyr Lys
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 14

Arg Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile
1 5 10 15

Gly Cys Lys Pro
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 15

Gln Leu Cys Leu Ile Gly Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly
1 5 10 15

Lys Gly Ser Pro
20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 16

Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr Asn Val Ala Val Asn
1 5 10 15

Pro Gly Asp Cys
20

<210> 17

<211> 20

WO 02/44384

6

PCT/EP01/14037

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 17

Asn	Val	Ala	Val	Asn	Pro	Gly	Asp	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn
1				5					10						15

Thr	Val	Ile	Gln
			20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 18

Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Val	Ile	Gln	Asp	Gly	Asp	Met	Val	Asp	Thr
1				5					10						15

Gly	Phe	Gly	Ala
			20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 19

Asp	Met	Val	Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Asp	Phe	Thr	Thr	Leu	Gln
1				5					10						15

Ala	Asn	Lys	Ser
			20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 20

Phe	Thr	Thr	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ser	Glu	Val	Pro	Leu	Asp	Ile	Cys
1				5					10						15

WO 02/44384

7

PCT/EP01/14037

Thr Ser Ile Cys
20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 21

Pro Leu Asp Ile Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys
1 5 10 15

Met Val Ser Glu
20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 22

Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe
1 5 10 15

Phe Tyr Leu Arg
20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 23

Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe Val Arg
1 5 10 15

His Leu Phe Asn
20

<210> 24

<211> 20

WO 02/44384

8

PCT/EP01/14037

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 24

Gln Met Phe Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu
 1 5 10 15

Asn Val Pro Asp
 20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 25

Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala
 20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 26

Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser Ser Asn Tyr
 1 5 10 15

Phe Pro Thr Pro
 20

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 27

WO 02/44384

PCT/EP01/14037

9

Ala Ser Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Gln Ile
 20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 28

Ser Met Val Thr Ser Asp Ala Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Gln
 20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 29

Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
 1 5 10 15

Trp Gly Asn Gln
 20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 30

Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp
 1 5 10 15

Thr Thr Arg Ser
 20

WO 02/44384

10

PCT/EP01/14037

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 31

Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Met	Ser	Leu	Cys	Ala
1				5					10						15

Ala	Ile	Ser	Thr
			20

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 32

Met	Ser	Leu	Cys	Ala	Ala	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Lys	Asn
1				5					10						15

Thr	Asn	Phe	Lys
			20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 33

Thr	Thr	Tyr	Lys	Asn	Thr	Asn	Phe	Lys	Glu	Tyr	Leu	Arg	His	Gly	Glu
1				5					10						15

Glu	Tyr	Asp	Leu
			20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

WO 02/44384

11

PCT/EP01/14037

<400> 34

Leu Arg His Gly Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys
1 5 10 15

Lys Ile Thr Leu
20

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 35

Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr Ala Asp Val Met Thr Tyr
1 5 10 15

Ile His Ser Met
20

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 36

Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu Asp
1 5 10 15

Trp Asn Phe Gly
20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 37

Thr Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Leu Glu Asp
20

WO 02/44384

12

PCT/EP01/14037

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 38

Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser
1 5 10 15

Gln Ala Ile Ala
20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 39

Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr Pro Pro
1 5 10 15

Ala Pro Lys Glu
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 40

Lys His Thr Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr
1 5 10 15

Phe Trp Glu Val
20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

WO 02/44384

13

PCT/EP01/14037

<400> 41

Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser
 1 5 10 15

Ala Asp Leu Asp
 20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 42

Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu Gly Arg Lys
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Gln
 20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 43

Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Met His Gly Asp Thr
 1 5 10 15

Pro Thr Leu His
 20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 44

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr
 20

WO 02/44384

14

PCT/EP01/14037

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 45

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Asn Asp Ser
 20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 46

Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile
 1 5 10 15
 Asp Gly Pro Ala
 20

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 47

Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg
 1 5 10 15
 Ala His Tyr Asn
 20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

WO 02/44384

15

PCT/EP01/14037

<400> 48

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys
1 5 10 15

Cys Asp Ser Thr
20

<210> 49

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 49

Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser
1 5 10 15

Thr His Val Asp
20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 50

Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu
1 5 10 15

Leu Met Gly Thr
20

<210> 51

<211> 21

<212> PRT

<213> HPV16

<400> 51

Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
1 5 10 15

Cys Ser Gln Lys Pro
20

WO 02/44384

16

PCT/EP01/14037

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 52

Met Ala Leu Trp Arg Pro Ser Asp Asn Thr Val Tyr Leu Pro Pro Pro
1 5 10 15

Ser Val Ala Arg
20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 53

Tyr Leu Pro Pro Pro Ser Val Ala Arg Val Val Asn Thr Asp Asp Tyr
1 5 10 15

Val Thr Arg Thr
20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 54

Asn Thr Asp Asp Tyr Val Thr Arg Thr Ser Ile Phe Tyr His Ala Gly
1 5 10 15

Ser Ser Arg Leu
20

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

17

PCT/EP01/14037

<400> 55

Phe Tyr His Ala Gly Ser Ser Arg Leu Leu Thr Val Gly Asn Pro Tyr
 1 5 10 15

Phe Arg Val Pro
 20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 56

Val Gly Asn Pro Tyr Phe Arg Val Pro Ala Gly Gly Gly Asn Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ile Pro Lys
 20

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 57

Gly Gly Asn Lys Gln Asp Ile Pro Lys Val Ser Ala Tyr Gln Tyr Arg
 1 5 10 15

Val Phe Arg Val
 20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 58

Ala Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Arg Val Gln Leu Pro Asp Pro Asn Lys
 1 5 10 15

Phe Gly Leu Pro
 20

WO 02/44384

18

PCT/EP01/14037

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 59

Pro Asp Pro Asn Lys Phe Gly Leu Pro Asp Thr Ser Ile Tyr Asn Pro
1 5 10 15

Glu Thr Gln Arg
20

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 60

Ser Ile Tyr Asn Pro Glu Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Val Glu Ile Gly
20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 61

Trp Ala Cys Ala Gly Val Glu Ile Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Gly
20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

19

PCT/EP01/14037

<400> 62

Gln Pro Leu Gly Val Gly Leu Ser Gly His Pro Phe Tyr Asn Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Asp Thr Glu
 20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 63

Phe Tyr Asn Lys Leu Asp Asp Thr Glu Ser Ser His Ala Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Asn Val Ser Glu
 20

<210> 64

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 64

His Ala Ala Thr Ser Asn Val Ser Glu Asp Val Arg Asp Asn Val Ser
 1 5 10 15

Val Asp Tyr Lys
 20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 65

Arg Asp Asn Val Ser Val Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Cys Ala Pro
 20

WO 02/44384

20

PCT/EP01/14037

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 66

Gln Leu Cys Ile Leu Gly Cys Ala Pro Ala Ile Gly Glu His Trp Ala
 1 5 10 15
 Lys Gly Thr Ala
 20

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 67

Gly Glu His Trp Ala Lys Gly Thr Ala Cys Lys Ser Arg Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 Gln Gly Asp Cys
 20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 68

Ser Arg Pro Leu Ser Gln Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 Thr Val Leu Glu
 20

<210> 69

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

21

PCT/EP01/14037

<400> 69

Leu Glu Leu Lys Asn Thr Val Leu Glu Asp Gly Asp Met Val Asp Thr
 1 5 10 15

Gly Tyr Gly Ala
 20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 70

Asp Met Val Asp Thr Gly Tyr Gly Ala Met Asp Phe Ser Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Asp Thr Lys Cys
 20

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 71

Phe Ser Thr Leu Gln Asp Thr Lys Cys Glu Val Pro Leu Asp Ile Cys
 1 5 10 15

Gln Ser Ile Cys
 20

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 72

Pro Leu Asp Ile Cys Gln Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Ser Ala Asp
 20

WO 02/44384

22

PCT/EP01/14037

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 73

Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ser Ala Asp Pro Tyr Gly Asp Ser Met Phe
1 5 10 15Phe Cys Leu Arg
20

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 74

Gly Asp Ser Met Phe Phe Cys Leu Arg Arg Glu Gln Leu Phe Ala Arg
1 5 10 15His Phe Trp Asn
20

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 75

Gln Leu Phe Ala Arg His Phe Trp Asn Arg Ala Gly Thr Met Gly Asp
1 5 10 15Thr Val Pro Gln
20

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

23

PCT/EP01/14037

<400> 76

Gly Thr Met Gly Asp Thr Val Pro Gln Ser Leu Tyr Ile Lys Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Met Arg Ala
 20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 77

Tyr Ile Lys Gly Thr Gly Met Arg Ala Ser Pro Gly Ser Cys Val Tyr
 1 5 10 15

Ser Pro Ser Pro
 20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 78

Gly Ser Cys Val Tyr Ser Pro Ser Pro Ser Gly Ser Ile Val Thr Ser
 1 5 10 15

Asp Ser Gln Leu
 20

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 79

Ser Ile Val Thr Ser Asp Ser Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu
 1 5 10 15

His Lys Ala Gln
 20

WO 02/44384

24

PCT/EP01/14037

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 80

Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu	His	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Val	Cys
1				5					10					15	

Trp	His	Asn	Gln
			20

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 81

Asn	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	His	Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp
1				5					10					15	

Thr	Thr	Arg	Ser
			20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 82

Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Leu	Thr	Ile	Cys	Ala
1				5					10					15	

Ser	Thr	Gln	Ser
			20

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

25

PCT/EP01/14037

<400> 83

Leu Thr Ile Cys Ala Ser Thr Gln Ser Pro Val Pro Gly Gln Tyr Asp
1 5 10 15Ala Thr Lys Phe
20

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 84

Pro Gly Gln Tyr Asp Ala Thr Lys Phe Lys Gln Tyr Ser Arg His Val
1 5 10 15Glu Glu Tyr Asp
20

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 85

Tyr Ser Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu
1 5 10 15Cys Thr Ile Thr
20

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 86

Phe Ile Phe Gln Leu Cys Thr Ile Thr Leu Thr Ala Asp Val Met Ser
1 5 10 15Tyr Ile His Ser
20

WO 02/44384

26

PCT/EP01/14037

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 87

Ala Asp Val Met Ser Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Ser Ile Leu Glu
1 5 10 15
Asp Trp Asn Phe
20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 88

Ser Ser Ile Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Val Pro Pro Pro Pro Thr
1 5 10 15
Thr Ser Leu Val
20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 89

Pro Pro Pro Pro Thr Thr Ser Leu Val Asp Thr Tyr Arg Phe Val Gln
1 5 10 15
Ser Val Ala Ile
20

<210> 90

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

27

PCT/EP01/14037

<400> 90

Tyr Arg Phe Val Gln Ser Val Ala Ile Thr Cys Gln Lys Asp Ala Ala
1 5 10 15
Pro Ala Glu Asn
20

<210> 91

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 91

Gln Lys Asp Ala Ala Pro Ala Glu Asn Lys Asp Pro Tyr Asp Lys Leu
1 5 10 15
Lys Phe Trp Asn
20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 92

Pro Tyr Asp Lys Leu Lys Phe Trp Asn Val Asp Leu Lys Glu Lys Phe
1 5 10 15
Ser Leu Asp Leu
20

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 93

Leu Lys Glu Lys Phe Ser Leu Asp Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg
1 5 10 15
Lys Phe Leu Val
20

WO 02/44384

28

PCT/EP01/14037

<210> 94

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 94

Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Val Gln Ala Gly Met His Gly Pro
1 5 10 15

Lys Ala Thr Leu
20

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 95

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu
20

<210> 96

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 96

Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys
1 5 10 15

His Glu Gln Leu
20

<210> 97

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 97

WO 02/44384

29

PCT/EP01/14037

Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Asp
 20

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 98

Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu
 1 5 10 15

Pro Ala Arg Arg
 20

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 99

Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr
 1 5 10 15

Met Leu Cys Met
 20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 100

Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg
 1 5 10 15

Ile Lys Leu Val
 20

WO 02/44384

30

PCT/EP01/14037

<210> 101

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 101

Lys Cys Glu Ala Arg Ile Lys Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp
1 5 10 15Leu Arg Ala Phe
20

<210> 102

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 102

Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr
1 5 10 15Leu Ser Phe Val
20

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 103

Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln
1 5 10 15

Gln

<210> 104

<211> 36

<212> DNA

<213> HPV18

WO 02/44384

31

PCT/EP01/14037

<400> 104
accgactcg agatggcttt gtggcggcct agtgac
36

<210> 105

<211> 42

<212> DNA

<213> HPV18

<400> 105
atagocaaagc ttaatgatat cotgaaccaa aaatttaogt cc
42

<210> 106

<211> 36

<212> DNA

<213> HPV18

<400> 106
ggccatgata tcatgcatgg acctaaaggca acattg
36

<210> 107

<211> 35

<212> DNA

<213> HPV18

<400> 107
ggccatgata tctcgtcggg ctggtaaagtg tcatg
35

<210> 108

<211> 35

<212> DNA

<213> HPV18

<400> 108
ggccatgata tctgtgtgac gttgtggttc ggctc
35

WO 02/44384

32

PCT/EP01/14037

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 109

Asn Thr Asp Asp Tyr Val Thr Arg Thr Ser Ile Phe Tyr His Ala Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Arg Leu
 20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 110

Phe Tyr His Ala Gly Ser Ser Arg Leu Leu Thr Val Gly Asn Pro Tyr
 1 5 10 15

Phe Arg Val Pro
 20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 111

Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg
 1 5 10 15

Ile Lys Leu Val
 20

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> HPV18

WO 02/44384

33

PCT/EP01/14037

<400> 112

Gly Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu
1 5

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 113

His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile
1 5 10

<210> 114

<211> 8

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 114

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu
1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> HPV18

<400> 115

Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu
1 5

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Juni 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/044384 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/37, 15/62, 5/10, 5/06, C07K 14/025, 16/08, G01N 33/566, 33/53, 33/50, A61K 39/12 (DE); KATHER, Angela [DE/DE]; Schleidenstrasse 6, 07745 Jena (DE). SCHINZ, Manuela [DE/DE]; Magdelsstieg 47, 07745 Jena (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14037 (74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Isenbruck BösJ Hirschler Wichmann Huhn, Postfach 86 08 80, 81635 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 30. November 2001 (30.11.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Angaben zur Priorität: 100 59 631.2 1. Dezember 2000 (01.12.2000) DE Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Lochthamer Str. 11, 82152 Planegg/Martinsried (DE). (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 16. Oktober 2003
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIELAND, John [NL/DE]; Tellhöhe 18, 82131 Stockdorf (DE). KAUFMANN, Andreas [DE/DE]; Sophienstr. 46, 07743 Jena
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/044384 A3

(54) Title: T-CELL EPITOPE OF THE PAPILLOMAVIRUS L1 AND E7 PROTEIN AND USE THEREOF IN DIAGNOSTICS AND THERAPY

(54) Bezeichnung: T-ZELLEPTOPE DES PAPILLOMAVIRUS L1- UND E7-PROTEINS UND IHRE VERWENDUNG IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to a papillomavirus T-cell epitope with an amino acid sequence (I) and/or a functionally active derivative thereof, and the use of the above in diagnostics and therapy.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/14037
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/37 C07K15/08	C12N15/62 G01N33/566
	C12N5/10 G01N33/53	C12N5/06 G01N33/50
		C07K14/025 A61K39/12
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
WPI Data, EPO-Internal, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS, SCISEARCH, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 989 548 A (DILLNER JOAKIM) 23 November 1999 (1999-11-23) column 65, paragraph 102 claim 1	1-19, 25-27
A	GB 2 279 651 A (BRITISH TECH GROUP) 11 January 1995 (1995-01-11) the whole document	
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		** late document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 March 2003		03 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentstr. 2 NL- 2280 HS Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8018		Authorized officer NIEMANN, F

Form PCT/ISA/10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/14037
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOCHMUS I ET AL: "CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 (HPV 16) AS A PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINE" ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, MEXICO, MX, vol. 30, no. 4, July 1999 (1999-07), pages 269-274, XP000057577 ISSN: 0188-4409 the whole document	
P,X	WO 00 73335 A (MEDIGENE AG ;JOCHMUS INGRID (DE); NIELAND JOHN (DE)) 7 December 2000 (2000-12-07) page 31, line 10; table 2 -----	1-27

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. EP01/14037
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p style="text-align: center;">see supplementary sheet (FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210)</p>
2.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p>
3.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see supplementary sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p style="text-align: center;">1-27 PARTIALLY</p>
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. EP01/14037

Continuation of I.1

Although Claim 25 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Although Claim 25 relates to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged properties of the compound or composition.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

Invention 1: Claims 1-27 (partially)

T-cell epitope YLPPVPVSKVVSTDEYVART, variants, homologues, fusion proteins, corresponding DNA and vectors, cells that present the epitope, complex, method of in vitro detection of the activation of T cells with the aid of the epitope, medicament containing the epitope.

Inventions 2-29

each peptide claimed represents a separate invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/EP 01/14037	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5989548	A	23-11-1999	AU 5520796	A	18-11-1996
			EP 0824359	A1	25-02-1998
			WO 9633737	A1	31-10-1996
GB 2279651	A	11-01-1995	AU 7040594	A	24-01-1995
			CA 2166333	A1	12-01-1995
			EP 0706533	A1	17-04-1996
			WO 9501374	A1	12-01-1995
			JP 8512045	T	17-12-1996
			NZ 257682	A	28-10-1996
WO 0073335	A	07-12-2000	DE 19925199	A1	07-12-2000
			AU 5527500	A	18-12-2000
			CA 2375802	A1	07-12-2000
			WO 0073335	A1	07-12-2000
			EP 1181312	A1	27-02-2002
			JP 2003502027	T	21-01-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Int PCT/EP 01/14037
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/37 C12N15/62 C12N5/10 C12N5/06 C07K14/025 C07K16/08 G01N33/566 G01N33/53 G01N33/50 A61K39/12		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Forschelarter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K G01N		
Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, EPO-Internal, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS, SCISEARCH, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 989 548 A (DILLNER JOAKIM) 23. November 1999 (1999-11-23) Spalte 65, Absatz 102 Anspruch 1	1-10, 25-27
A	GB 2 279 651 A (BRITISH TECH GROUP) 11. Januar 1995 (1995-01-11) das ganze Dokument -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch neu am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geklärt ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angezogen ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem besprochenen Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipis oder ihrer zugrundeliegenden Theorie angegebener ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
20. März 2003	03 JUL 2003	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. Box 5519, Patentstr. 2 NL-2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2049, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Rechtsinhaber/Bediensteter NIEMANN, F	

Formblatt PCT/ISA/210 (Rev. 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internales Aktenzeichen PCT/EP 01/14037
C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beif. Anspruch Nr.
A	<p>JOCHMUS I ET AL: "CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 (HPV 16) AS A PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINE" ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, MEXICO, MX, Bd. 30, Nr. 4, Juli 1999 (1999-07), Seiten 269-274, XP000957577 ISSN: 0188-4409 das ganze Dokument</p>	
P,X	<p>WO 00 73335 A (MEDIGENE AG ; JOCHMUS INGRID (DE); NIELAND JOHN (DE)) 7. Dezember 2000 (2000-12-07) Seite 31, Zeile 10; Tabelle 2</p>	1-27

Formblatt PCT/EA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/14037
Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)		
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210	
2.	<input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich	
3.	<input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.	
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)		
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:		
siehe Zusatzblatt		
1.	<input type="checkbox"/> Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.	
2.	<input type="checkbox"/> Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.	
3.	<input type="checkbox"/> Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____	
4.	<input checked="" type="checkbox"/> Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten: 1-27 PARTIALLY	
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs <input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.		
<input type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.		

Internationales Abzeichen PCT/EP 01/14037

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA 210
<p data-bbox="276 342 470 365">Fortsetzung von Feld I.1</p> <p data-bbox="276 376 866 448">Obwohl Anspruch 25 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p> <p data-bbox="276 448 842 510">Obwohl Anspruch 25 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>	

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/14037

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

Invention 1 : claims 1-27 (partially)

T-Zell-Epitop YLPPVPVSKVSTDEYVART, Varianten, Homologe, Fusionsproteine, entsprechende DNA und Vektoren, Zellen welche das Epitop präsentieren, Komplex, Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen mithilfe des Epitops, Arzneimittel enthaltend das Epitop.

Inventions 2-39 : claims 1-27 (partially)

Jedes beanspruchte Peptid stellt eine separate Erfindung dar.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				PCT/EP 01/14037	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	Patent-Aktionszeichen	
US 5989548 A	23-11-1999	AU 5520796 A	18-11-1996		
		EP 0824359 A1	25-02-1998		
		WO 9633737 A1	31-10-1996		
GB 2279651 A	11-01-1995	AU 7040594 A	24-01-1995		
		CA 2166333 A1	12-01-1995		
		EP 0706533 A1	17-04-1996		
		WO 9501374 A1	12-01-1995		
		JP 8512045 T	17-12-1996		
		NZ 267682 A	28-10-1996		
WO 0073335 A	07-12-2000	DE 19925199 A1	07-12-2000		
		AU 5527500 A	18-12-2000		
		CA 2375802 A1	07-12-2000		
		WO 0073335 A1	07-12-2000		
		EP 1181312 A1	27-02-2002		
		JP 2003502027 T	21-01-2003		

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/04	C 0 7 K 14/01	
C 0 7 K 14/01	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 ニーラント, ヨン

ドイツ連邦共和国 8 2 1 3 1 シュトックドルフ, テルヘーエ 1 8

(72)発明者 カウフマン, アンドレアス

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イェーナ, ゾフィエンシュトラッセ 4 6

(72)発明者 カーター, アンゲラ

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 5 イェーナ, シュライデンシュトラッセ 6

(72)発明者 シンツ, マヌエラ

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 5 イェーナ, マグデルシュティーク 4 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 CA07 DA02 EA04 GA11 HA01 HA17

4B063 QA18 QQ08 QR48 QS31 QX02

4B065 AA92X AA99Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA17 BA18 BA19 BA35 BA41 BA42

CA53 CA59 MA01 MA17 MA22 MA23 MA37 MA52 MA59 MA66

NA14 ZB092 ZB262 ZB332

4C087 AA01 AA02 BB63 BB64 BC83 CA05 CA12 DA32 MA01 MA17

MA22 MA23 MA37 MA52 MA59 MA66 NA14 ZB09 ZB26 ZB33

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 DA86 EA28 EA31 FA74

【要約の続き】

を有するパピローマウイルスT細胞エピトープ及び/又はその機能的に活性化変異体、並びに診断及び療法へのその使用に関する。

专利名称(译)	乳头状瘤病毒L1蛋白和E7蛋白的T细胞表位及其用于诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2004514449A	公开(公告)日	2004-05-20
申请号	JP2002546732	申请日	2001-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	麦迪金股份公司		
申请(专利权)人(译)	MEDI基因股份公司		
[标]发明人	ニーラントヨン カウフマンアンドレアス カーターアンゲラ シンツマヌエラ		
发明人	ニーラント, ヨン カウフマン, アンドレアス カーター, アンゲラ シンツ, マヌエラ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/01 C07K14/025 C07K19/00 C12N5/08 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/37 C12Q1/02 G01N33/50		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/005 C07K2319/00 C12N2710/20022 G01N33/505 G01N2333/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/12 A61K35/76 A61K48/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/01 C07K19/00 C12Q1/02 G01N33/53.Y C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS31 4B063/QX02 4B065/AA92X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/MA01 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/BC83 4C087/CA05 4C087/CA12 4C087/DA32 4C087/MA01 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA37 4C087/MA52 4C087/MA59 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 山口明子		
优先权	10059631 2000-12-01 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及具有氨基酸序列和/或其功能活性变体的乳头瘤病毒T细胞表位，及其在诊断和治疗中的用途。

(51) Int. Cl. ⁷		F I			テマコード
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K	35/12	A 6 1 K	35/12		4 B O 6 3
A 6 1 K	35/76	A 6 1 K	35/76		4 B O 6 5
A 6 1 K	38/00	A 6 1 K	48/00		4 C O 8 4
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P	31/12		4 C O 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 188 頁) ;

(21) 出願番号	特願2002-546732 (P2002-546732)	(71) 出願人	500579383
(86) (2) 出願日	平成13年11月30日 (2001. 11. 30)		メディジーン・アクチュングゼ
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月30日 (2003. 5. 30)		ドイツ連邦共和国ゲーラー821
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/014037		ネグ/マルティーンズリート、
(87) 国際公開番号	W02002/044384		・シュトラーク 1 1
(87) 国際公開日	平成14年6月6日 (2002. 6. 6)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	100 59 631. 2		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成12年12月1日 (2000. 12. 1)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 増井 忠武
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, CA, JP, US	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行

最終

(54) 「説明の名称」は「**...**」である。