

(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2014-530610

(P2014-530610A)

(43) 公表日 平成26年11月20日(2014.11.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/015 (2006.01)	C07K 14/015	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C084
A61K 39/12 (2006.01)	A61K 39/12	4C085
A61P 37/04 (2006.01)	A61P 37/04	4H045
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-535698 (P2014-535698)	(71) 出願人	500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー シティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191 04-6283, フィラデルフィア, チェスナット ストリート 3160, スイート 200
(86) (22) 出願日	平成23年10月12日 (2011.10.12)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成26年5月1日 (2014.5.1)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/055932	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02013/055326	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成25年4月18日 (2013.4.18)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルスのワクチンおよびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、改良型抗HPV免疫原および改良型抗HPV免疫原をコードする核酸分子を開示する。開示される免疫原は、コンセンサスHPV6、HPV11、HPV33およびHPV58のE6ならびにコンセンサスHPV6、HPV11、HPV33およびHPV58のE7を有する免疫原を含む。HPVに対する免疫反応を個体において誘導する医薬組成物、組み換えワクチン、および弱毒化生ワクチンを開示し、さらに、HPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法を開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 の配列と 90% の同一性を有する配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 の配列の断片、およびこれらの組合せからなる群から選択される HPV 抗原をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 の配列、またはこれらの組合せを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、または配列番号 7 の配列と少なくとも 95% の同一性を有する断片を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。 10

【請求項 4】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、または配列番号 7 の配列と少なくとも 98% の同一性を有する断片を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、及び配列番号 7 の配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 99% の同一性を有する断片を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列をコードするヌクレオチド配列；配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸断片をコードするヌクレオチド配列；配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列をコードするヌクレオチド配列の断片；および配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸断片をコードするヌクレオチド配列の断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。 20

【請求項 7】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記分子がプラスミドである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。 30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、医薬組成物。

【請求項 10】

HPV に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む組成物を、前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 11】

電気穿孔法により前記個体に前記核酸分子を導入することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、組み換えワクチン。 40

【請求項 13】

前記組み換えワクチンが組み換えワクシニアワクチンである、請求項 12 に記載の組み換えワクチン。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、弱毒化生ワクチン。

【請求項 15】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列；および配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列と少なくとも 90% の同一性を有する配列の断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、タンパク質。 50

【請求項 16】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列を含む、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 17】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列と少なくとも 95% の同一性を有する断片を含む、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 18】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列と少なくとも 98% の同一性を有する断片を含む、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 19】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 の配列と少なくとも 99% の同一性を有する断片を含む、請求項 15 に記載のタンパク質。

10

【請求項 20】

HPV に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、請求項 12 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組み換えワクチンを前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 21】

HPV に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、請求項 14 に記載の弱毒化生ワクチンを前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 22】

HPV 感染を有する前記個体を診断することをさらに含む、請求項 10 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 23】

配列番号 1 および配列番号 3 の HPV 抗原をコードするヌクレオチド配列、または 90% の同一性を有するそれらの断片を含む、医薬組成物。

【請求項 24】

HPV サブタイプ 6 または HPV サブタイプ 11 に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、請求項 23 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 25】

配列番号 5 および配列番号 7 の HPV 抗原をコードするヌクレオチド配列、または 90% の同一性を有するそれらの断片を含む、医薬組成物。

30

【請求項 26】

HPV サブタイプ 33 または HPV サブタイプ 58 に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、請求項 25 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトパピローマウイルス (HPV) の改良型ワクチン、HPV に対する免疫反応を誘導するための改良法、ならびに HPV に対して予防的および / または治療的に個体を免疫化するための改良法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

パピローマウイルスは、最高で 7 つの初期遺伝子および 2 つの後期遺伝子を含む小さい DNA ウイルスである。一般に、パピローマウイルスの初期遺伝子は E1 ~ E7 と命名され、パピローマウイルスの後期遺伝子は L1 および L2 と命名される。いくつかの動物の種類に、パピローマウイルスファミリーの一員は感染することができる。

【0003】

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は日常的であり、性的接触によって伝染され得る。HPV は、DNA 配列同一性に基づいて 56 種類以上に分類された。上皮異形成およ

50

び他の損傷を引き起こすHPVの16型および18型は、多くの場合、癌、特に、子宮頸部、膣、外陰部および肛門管の上皮内癌および湿潤性癌のリスクの増加と関連する。世界的に、子宮頸癌のほぼ88%が、HPVサブタイプ16、18、45、31、33、52および58によるものである。さらに、様々な研究により、再発性呼吸器乳頭腫症のほとんどの発生においてHPV6およびHPV11の存在が明らかになった。HPV6およびHPV11は、性器疣贅との関係が知られ、子宮頸癌の場合ではわずかな比率でのみ見られるが、軽度頸部病変の全ての場合の2.6~5.2%に見られる。さらに、HPV6およびHPV11は、今日、グレード2およびグレード3の子宮頸部上皮内腫瘍ならびに軽度の子宮頸部異形成を含む、現在では子宮頸癌の前兆と考えられている軽度扁平上皮内病変の約20%と関連している。研究が進むにつれ、これら2つの血清型が、性器疣贅、再発性呼吸器乳頭腫症、肺癌、扁桃癌、喉頭癌、および他の点では良性の腫瘍の他の悪性転換ならびに頭頸部の異形成を含む耳鼻科疾患の様々な形態と関連することが明らかになった。この研究の発見が、HPV6およびHPV11に対するコンセンサス配列DNAワクチンの使用を明らかにし、その将来の有望性を期待させる。

10

【0004】

DNAワクチンは、弱毒化生ウイルスワクチンおよび組み換えタンパク質に基づくワクチンなどの、より伝統的なワクチン接種法を上回る多くの概念的な利点を有する。DNAワクチンは、安全であり、安定であり、容易に産生され、かつヒトにおいて十分に耐容性を示し、前臨床試験はプラスミド組み込みの証拠を示さない(Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. Hum Gene Ther, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Ann N Y Acad Sci, 1995. 772: p. 30-9)。さらに、DNAワクチンの有効性が、ベクターに対する、以前から存在する抗体力価によって影響されないという事実により、DNAワクチンは反復投与に十分に適する(Chattergoon, M., J. Boyer, and D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. FASEB J, 1997. 11(10): p. 753-63)。しかし、大型動物に移行した時、DNAワクチンの臨床導入に対する1つの重大な障害は、プラットフォームとなる免疫原性の減少であった(Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. Adv Genet, 2005. 55: p. 25-40)。コドン最適化、RNA最適化および免疫グロブリンリーダー配列の付加などの、DNAワクチン免疫原の遺伝子工学処理における最近の技術的進歩により、DNAワクチンの発現および免疫原性が改良され(Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. J Virol, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. J Virol, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. Vaccine, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization

20

30

40

50

and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33)、かつ、近年、電気穿孔法などのプラスミド送達システムの技術が開発された(Hirao, L. A., et al., *Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., *Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., *In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53)。さらに、コンセンサス免疫原を使用することで、天然の抗原のみと比較して、細胞性免疫反応の幅を拡大させることができる可能性があることを複数の研究が示唆した(Yan, J., et al., *Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., *Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14)。

【0005】

HPV感染、特に、子宮頸癌ならびにノまたは肺癌、扁桃癌、および咽頭癌を引き起こす感染を予防および治療するための改良型ワクチンならびに方法に対するニーズが依然としてある。

【発明の概要】

【0006】

本発明の態様には、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7；90%の相同性を有するそれらの断片；およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるHPV抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が含まれる。一部の態様において、これらの核酸分子は、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8をコードするヌクレオチド配列；配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸断片をコードするヌクレオチド配列；配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8をコードするヌクレオチド配列の断片；および配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸断片をコードするヌクレオチド配列の断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。

【0007】

一部の態様において、本明細書に記載の核酸分子を含む医薬組成物を提供する。

【0008】

他の態様において、HPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、本

明細書に記載の核酸分子を含む組成物を当該個体に投与することを含む方法を提供する。

【0009】

本発明には、本明細書に記載の核酸分子を含む組換えワクチンも含まれる。これらの組換えワクチンには、組換えワクシニアワクチン、弱毒化生ワクチン、およびDNAプラスミドが含まれる。

【0010】

本発明の一部の態様には、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8；および配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8と少なくとも90%の相同性を有する配列の断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質が含まれる。

10

【0011】

HPVに対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、本明細書に提供する組換えワクチンを当該個体に投与することを含む方法も提供する。

【0012】

一部の態様において、配列番号1および配列番号3のHPV抗原をコードするヌクレオチド配列；もしくはそれらの断片；またはそれらと90%の相同性を有する断片を含む医薬組成物を提供する。HPVサブタイプ6または11に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、前述の医薬組成物を当該個体に投与することを含む方法も提供する。

【0013】

一部の態様において、配列番号5および配列番号7のHPV抗原をコードするヌクレオチド配列；もしくはそれらの断片；またはそれらと90%の相同性を有する断片を含む医薬組成物を提供する。HPVサブタイプ33または58に対する免疫反応を個体において誘導する方法であって、前述の医薬組成物を当該個体に投与することを含む方法も提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、E6およびE7のアライメント（それぞれ、AおよびB）の近隣結合評価に基づく系統樹である。アスタリスクは、各樹におけるコンセンサス配列の位置を示す。

30

【図2】図2は、p6E6E7およびp11E6E7のインビボ発現を示すデータである。溶解したトランスフェクト293-T細胞から遺伝子産物を単離し、SDS-PAGEゲルに通過させ、オートラジオグラフィを用いて検出した。HPV6およびHPV11のE6/E7タンパク質の両方は、それぞれ約32kDaである（A）。ヒト横紋筋肉腫（RD）細胞も、p6E6E7およびp11E6E7でトランスフェクトし、その後免疫蛍光染色を行った後に固定した。FITC蛍光は、p6E6E7およびp11E6E7の発現を裏付ける（B）。DAPI蛍光は、ヘキスト染色による核局在を裏付ける。

【図3】図3は、IFN-ELISpotアッセイが、C57BL/6マウスにおけるp6E6E7（A）およびp11E6E7（B）による強い細胞性反応の誘導を示す。隔週で3回の免疫化後に、それぞれのグループのマウス（グループにつき5匹）から単離した脾細胞を用いてアッセイを行った。各免疫化は、コンストラクトあたり20μgからなっていた。組み合わせグループのマウスは、ワクチン接種あたり合計40μgのDNAに関してコンストラクトあたり20μgでp6E6E7とp11E6E7の両方を受け取った。DNAをIM注射により投与し、その後、電気穿孔を行った（*はP<0.0001を示し、†はP=0.0001を示す）。

40

【図4】図4は、優性のエピトープを特徴づけるために、個々のペプチドを用いて追加のIFN-ELISpotアッセイを行った。免疫したマウスから単離した脾細胞および陰性対照を、完全なHPV6E6/E7融合タンパク質（A）またはHPV11E6/E7融合タンパク質（B）にまたがる重複ペプチドで刺激した。

【図5A】図5Aは、細胞内サイトカイン染色によって特徴づけられる抗原特異的T細胞

50

によるサイトカイン産生を表す。p 6 E 6 E 7で免疫したマウスから単離した脾細胞を、R 1 0 成長培地、P M A、またはコンセンサス遺伝子のペプチドで4時間刺激し、その後、表面マーカーおよび細胞内マーカーで染色した。上のドットスポットは、バックグラウンドを差し引いた全C D 4 + 細胞またはC D 8 + 細胞のいずれかが産生するI F N - 、I L - 2、およびT N F - の割合の差異を示す。アスタリスクを有するプロットのP値は、陰性対照群の平均値が0であるために決定することができなかった。

【図5B】図5Bは、細胞内サイトカイン染色によって特徴づけられる抗原特異的T細胞によるサイトカイン産生を表す。p 1 1 E 6 E 7で免疫したマウスから単離した脾細胞を、R 1 0 成長培地、P M A、またはコンセンサス遺伝子のペプチドで4時間刺激し、その後、表面マーカーおよび細胞内マーカーで染色した。上のドットスポットは、バックグラウンドを差し引いた全C D 4 + 細胞またはC D 8 + 細胞のいずれかが産生するI F N - 、I L - 2、およびT N F - の割合の差異を示す。アスタリスクを有するプロットのP値は、陰性対照群の平均値が0であるために決定することができなかった。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書で使用される「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」という語句は、1つの核酸分子が別の核酸分子とハイブリダイズするが、他の配列とはハイブリダイズしない条件を表す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる環境において様々である。より長い配列は、より高温で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHにおける特異的配列の熱融解点(T_m)より約5℃低く選択される。T_mは、標的配列と相補的なプローブの50%が、平衡状態でこの標的配列とハイブリダイズする(規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度の下での)温度である。一般に、これらの標的配列はT_mにおいて過剰に存在するので、これらのプローブの50%が平衡状態で占有する。典型的には、ストリンジェントな条件は、pH 7.0~8.3において、塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的に約0.01~1.0Mのナトリウムイオン(または他の塩)であり、温度が、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10~50ヌクレオチド)に対して少なくとも約30℃であり、長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドに対して少なくとも約60℃である条件であろう。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定剤の付加によっても達成され得る。

【0016】

ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列相同性を、FASTA、BLASTおよびGapped BLAST(Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる)ならびにPAUP* 4.0b10ソフトウェア(D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)を用いて測定してもよい。「類似度のパーセンテージ」を、PAUP* 4.0b10ソフトウェア(D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts)を用いて計算する。コンセンサス配列の平均類似度を、系統樹の全配列と比較して計算する。

【0017】

簡潔に述べると、Basic Local Alignment Search Toolを表すBLASTアルゴリズムは、配列類似度の決定に適している(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる)。BLAST解析を行うソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センター(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公表されている。このアルゴリズムは、データベース配列中の同一の長さのワードと整列させた時に、ある正の値の域値スコア(positive-valued threshold score) Tと一致するかまたはそれを満足させる問い合わせ配列中の長さWの短いワードを同定することによって、ハイスコアな配列の対(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア域値(neigh

10

20

30

40

50

borhood word score threshold) と称される (Altschul et al., 前出)。これらの最初の近隣ワードヒットは、それらを含む HSP を見出す検索を開始するための種として機能する。このワードヒットは、累積のアライメントスコアが増加することができる限り、各配列に沿って両方向に拡大される。各方向のワードヒットの拡大は、以下の場合に停止される：1) 累積のアライメントスコアが、その最大達成値から X 量低下する場合；2) 1 つ以上の負のスコア残基アライメント (negative-scoring residue alignments) の蓄積により、累積スコアが 0 以下になる場合；または 3) いずれかの配列の末端に到達する場合。Blast アルゴリズムパラメーター W、T および X は、アライメントの感度および速度を決定する。この Blast プログラムでは、初期設定として、ワード長 (W) が 11、BLOSUM62 スコアリングマトリックス (Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919 参照、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる) アライメント (B) が 50、期待値 (E) が 10、M = 5、N = 4、および両鎖の比較が使用される。この BLAST アルゴリズム (Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787、これは、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる) および Gapped BLAST は、2 つの配列間の類似度の統計解析を行う。この BLAST アルゴリズムによって提供される類似度の 1 つの測定は、2 つのヌクレオチド配列間の一致が偶然に生じる確立の指標を与える最小合計確立 (smallest sum probability (P(N))) である。例えば、試験核酸と他の核酸の比較における最小合計確立が約 1 未満、好ましくは約 0.1 未満、より好ましくは約 0.01 未満、および最も好ましくは約 0.001 未満である場合、核酸は別の核酸と類似するとみなされる。

【0018】

本明細書で使用される「遺伝子構築物」という用語は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む DNA または RNA 分子を表す。コード配列は、核酸分子が投与される個体の細胞において発現を指示することができる、プロモーターおよびポリアダニル化シグナルを含む調節要素と作動可能に連結される開始シグナルおよび終止シグナルを含む。

【0019】

本明細書で使用される「発現できる形態」という用語は、個体の細胞に存在する時に、コード配列が発現するように、タンパク質をコードするコード配列と作動可能に連結される必須の調節配列を含む遺伝子構築物を表す。

【0020】

免疫原によって誘導される細胞性免疫反応を高めるための多面的戦略から生じる改良型ワクチンを開示する。変更したコンセンサス配列を作製した。コドン最適化、RNA 最適化、および高効率な免疫グロブリンリーダー配列の付加を含む遺伝子変更も開示する。この新規の構築物を、対応するコドン最適化免疫原よりも強力で、広範な細胞性免疫反応を引き起こすように設計した。

【0021】

改良型 HPV ワクチンは、抗 HPV を誘導することができる免疫原として改良型ワクチンを特に効果的にさせるエピトープを有するタンパク質、およびそのようなエピトープを有するタンパク質をコードする遺伝子構築物に基づく。したがって、ワクチンは治療的または予防的に免疫反応を誘導し得る。一部の実施形態において、この免疫原を送達する手段には、DNA ワクチン、組み換えワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む組成物、弱毒化ワクチンまたは不活化ワクチンがある。一部の実施形態において、このワクチンは、1 つ以上の DNA ワクチン、1 つ以上の組み換えワクチン、1 つ以上のタンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む 1 つ以上の組成物、1 つ以上の弱毒化ワクチンおよび 1 つ以上の不活化ワクチンからなる群から選択される組み合わせを含む。

【0022】

10

20

30

40

50

一部の実施形態によると、ワクチンが個体に送達され、この個体の免疫システムの活性を調節し、それによって、HPVに対する免疫反応が高まる。このタンパク質をコードする核酸分子がこの個体の細胞に取り込まれると、このヌクレオチド配列がこれらの細胞において発現し、それによって、このタンパク質がこの個体に送達される。プラスミドなどの核酸分子上のこのタンパク質のコード配列を、組み換えワクチンの一部としておよび弱毒化ワクチンの一部として、単離したタンパク質またはベクターのタンパク質部分として送達する方法を提供する。

【0023】

HPVに対して予防的および/または治療的に個体を免疫化する組成物ならびに方法を提供する。

10

【0024】

この免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を送達するための組成物を、調節要素と作動可能に連結する。組成物には、この免疫原をコードするプラスミド、この免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む組み換えワクチン、本発明のタンパク質をコードするおよび/もしくは本発明のタンパク質を含む弱毒化病原体；本発明のタンパク質を含む不活化病原体；または本発明のタンパク質を含むリポソームもしくはサブユニットワクチンなどの組成物が含まれてもよい。本発明は、さらに、組成物を含む注射可能な医薬組成物に関する。

【0025】

配列番号1は、HPV6のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む。配列番号1は、配列番号1の5'末端にこのヌクレオチド配列と連結される配列番号9のIgEリーダー配列を含む。配列番号2は、HPV6のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列を含む。配列番号2は、コンセンサス免疫原配列のN末端に配列番号10のIgEリーダー配列を含む。このIgEリーダー配列は配列番号10であり、配列番号9によってコードされ得る。

20

【0026】

一部の実施形態において、ワクチンは、配列番号2または配列番号2をコードする核酸分子を含む。

【0027】

一部の実施形態において、配列番号1の断片は、786以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、830以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、856以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、865以上のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態において、本明細書で説明される断片などの配列番号1の断片は、IgEリーダー配列のコード配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態において、配列番号1の断片は、IgEリーダー配列のコード配列を含まない。

30

【0028】

一部の実施形態において、配列番号2の断片は、252以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、266以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、275以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、278以上のアミノ酸を含んでもよい。

【0029】

配列番号3は、HPV11のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む。配列番号3は、配列番号3の5'末端にこのヌクレオチド配列と連結される配列番号9のIgEリーダー配列を含む。配列番号4は、HPV11のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列を含む。配列番号4は、コンセンサス免疫原配列のN末端に配列番号10のIgEリーダー配列を含む。このIgEリーダー配列は配列番号10であり、配列番号9によってコードされ得る。

40

【0030】

一部の実施形態において、ワクチンは、配列番号4または配列番号4をコードする核酸分子を含む。

【0031】

50

一部の実施形態において、配列番号3の断片は、786以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、830以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、856以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、865以上のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態において、本明細書で説明される断片などの配列番号3の断片は、I g Eリーダー配列のコード配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態において、配列番号3の断片は、I g Eリーダー配列のコード配列を含まない。

【0032】

一部の実施形態において、配列番号4の断片は、252以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、266以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、275以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、278以上のアミノ酸を含んでもよい。

10

【0033】

配列番号5は、HPV33のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む。配列番号5は、配列番号5の5'末端にこのヌクレオチド配列と連結される配列番号9のI g Eリーダー配列を含む。配列番号6は、HPV33のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列を含む。配列番号6は、コンセンサス免疫原配列のN末端に配列番号10のI g Eリーダー配列を含む。このI g Eリーダー配列は配列番号10であり、配列番号9によってコードされ得る。

【0034】

一部の実施形態において、ワクチンは、配列番号6または配列番号6をコードする核酸分子を含む。

20

【0035】

一部の実施形態において、配列番号5の断片は、746以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、787以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、812以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、820以上のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態において、本明細書で説明される断片などの配列番号5の断片は、I g Eリーダー配列のコード配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態において、配列番号5の断片は、I g Eリーダー配列のコード配列を含まない。

【0036】

一部の実施形態において、配列番号6の断片は、235以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、248以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、256以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、259以上のアミノ酸を含んでもよい。

30

【0037】

配列番号7は、HPV58のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む。配列番号7は、配列番号7の5'末端にこのヌクレオチド配列と連結される配列番号9のI g Eリーダー配列を含む。配列番号8は、HPV58のE6およびE7タンパク質のコンセンサス免疫原のアミノ酸配列を含む。配列番号8は、コンセンサス免疫原配列のN末端に配列番号10のI g Eリーダー配列を含む。このI g Eリーダー配列は配列番号10であり、配列番号9によってコードされ得る。

【0038】

一部の実施形態において、ワクチンは、配列番号8または配列番号8をコードする核酸分子を含む。

40

【0039】

一部の実施形態において、配列番号7の断片は、752以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、794以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、819以上のヌクレオチドを、一部の実施形態において、827以上のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態において、本明細書で説明される断片などの配列番号7の断片は、I g Eリーダー配列のコード配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態において、配列番号7の断片は、I g Eリーダー配列のコード配列を含まない。

【0040】

一部の実施形態において、配列番号8の断片は、235以上のアミノ酸を、一部の実施

50

形態において、249以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、257以上のアミノ酸を、一部の実施形態において、260以上のアミノ酸を含んでもよい。

【0041】

一部の実施形態によると、免疫原に対する免疫反応を個体において誘導する方法は、HPV6のE6およびE7、HPV11のE6およびE7、HPV33のE6およびE7、HPV58のE6およびE7からなる群から選択されるコンセンサス免疫原のアミノ酸配列、それらの機能的断片、ならびにそれらの発現できるコード配列をこの個体に投与することを含む。一部の実施形態は、HPV6のE6およびE7、HPV11のE6およびE7、HPV33のE6およびE7、HPV58のE6およびE7からなる群から選択されるコンセンサス免疫原のアミノ酸配列、ならびにそれらの断片をコードする単離した核酸分子を含む。一部の実施形態は、HPV6のE6およびE7、HPV11のE6およびE7、HPV33のE6およびE7、HPV58のE6およびE7からなる群から選択されるコンセンサス免疫原のアミノ酸配列、ならびにそれらの断片をコードする組み換えワクチンを含む。一部の実施形態は、HPV6のE6およびE7、HPV11のE6およびE7、HPV33のE6およびE7、HPV58のE6およびE7からなる群から選択されるコンセンサス免疫原のアミノ酸配列、ならびにそれらの断片を含むサブユニットワクチンを含む。一部の実施形態は、HPV6のE6およびE7、HPV11のE6およびE7、HPV33のE6およびE7、HPV58のE6およびE7からなる群から選択されるコンセンサス免疫原のアミノ酸配列、ならびにそれらの断片を含む弱毒化生ワクチンおよび/または不活化ワクチンを含む。

10

20

【0042】

一態様において、本明細書のワクチンは、頭頸部癌の形態、および耳鼻咽喉科疾患の他の形態と主に関連することが見出された、HPVサブタイプに対する免疫反応を引き起こすワクチンであり、特に、これらのワクチンには、HPV6のE6およびE7ならびにHPV11のE6およびE7、好ましくはその両方が含まれる。

【0043】

別の態様において、本明細書のワクチンは、例えば、米国外の患者、より具体的には、アジアの患者の子宮頸癌の形態と主に関連することが見出された、HPVサブタイプに対する免疫反応を引き起こすワクチンであり、特に、これらのワクチンには、HPV33のE6およびE7ならびにHPV58のE6およびE7、好ましくはその両方が含まれる。

30

【0044】

改良型ワクチンは、抗HPV免疫反応を誘導することができる免疫原として改良型ワクチンを特に効果的にさせるエピトープを有するタンパク質、およびそのようなエピトープを有するタンパク質をコードする遺伝子構築物を含む。したがって、治療的または予防的に免疫反応を誘導するために、ワクチンを提供することができる。一部の実施形態において、この免疫原を送達する手段には、DNAワクチン、組み換えワクチン、タンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む組成物、弱毒化ワクチンまたは不活化ワクチンがある。一部の実施形態において、このワクチンは、以下からなる群から選択される組み合わせを含む：1つ以上のDNAワクチン、1つ以上の組み換えワクチン、1つ以上のタンパク質サブユニットワクチン、この免疫原を含む1つ以上の組成物、1つ以上の弱毒化ワクチン、1つ以上の不活化ワクチン。

40

【0045】

本発明の態様は、プラスミドなどの核酸分子上のタンパク質コード配列を、組み換えワクチンの一部として、弱毒化ワクチンの一部として、単離したタンパク質またはベクターのタンパク質部分として送達する方法を提供する。

【0046】

本発明の一部の態様によると、予防的におよび/または治療的に個体を免疫化する組成物ならびに方法が提供される。

【0047】

DNAワクチンは、米国特許第5,593,972号、同第5,739,118号、同

50

第5,817,637号、同第5,830,876号、同第5,962,428号、同第5,981,505号、同第5,580,859号、同第5,703,055号、同第5,676,594号、および本明細書で引用する優先出願に記載されており、これらは参照により各々が本明細書に組み込まれる。それらの出願に記載される送達プロトコルに加えて、DNAを送達する代替方法は、米国特許第4,945,050号および同第5,036,006号に記載されており、これらは両方とも参照により本明細書に組み込まれる。

【0048】

本発明は、改良型弱毒化生ワクチン、改良型不活化ワクチン、および抗原をコードする外来遺伝子を送達するために組み換えベクターを使用する改良型ワクチン、さらにサブユニットワクチンおよび糖タンパク質ワクチンに関する。弱毒化生ワクチン、組み換えベクターを使用して外来抗原を送達するワクチン、サブユニットワクチンおよび糖タンパク質ワクチンの例は、米国特許第4,510,245号、同第4,797,368号、同第4,722,848号、同第4,790,987号、同第4,920,209号、同第5,017,487号、同第5,077,044号、同第5,110,587号、同第5,112,749号、同第5,174,993号、同第5,223,424号、同第5,225,336号、同第5,240,703号、同第5,242,829号、同第5,294,441号、同第5,294,548号、同第5,310,668号、同第5,387,744号、同第5,389,368号、同第5,424,065号、同第5,451,499号、同第5,453,364号、同第5,462,734号、同第5,470,734号、同第5,474,935号、同第5,482,713号、同第5,591,439号、同第5,643,579号、同第5,650,309号、同第5,698,202号、同第5,955,088号、同第6,034,298号、同第6,042,836号、同第6,156,319号および同第6,589,529号に記載されており、これらは参照により各々が本明細書に組み込まれる。

【0049】

細胞に取り込まれると、この遺伝子構築物（複数可）は、機能している染色体外分子としてこの細胞内に存在したままであってもよく、かつ/またはこの細胞の染色体DNAに組み込まれてもよい。DNAは細胞内に導入されてもよく、そこで、1つまたは複数のプラスミドの形態の別々の遺伝物質として留まる。あるいは、染色体に組み込むことができる直鎖DNAを、この細胞に導入してもよい。この細胞にDNAを導入する場合、染色体へのDNA組み込みを促進する薬剤を加えてもよい。組み込みを促進するのに有用なDNA配列が、このDNA分子に含まれてもよい。あるいは、RNAをこの細胞に投与してもよい。セントロメア、テロメアおよび複製開始点を含む直鎖ミニ染色体としてこの遺伝子構築物を提供することも考えられる。遺伝子構築物は、細胞内で生存する弱毒化された生の微生物または組み換え微生物ベクターの遺伝物質の一部のままであってもよい。遺伝子構築物は、組み換えウイルスワクチンのゲノムの一部であってもよく、ここで、この遺伝物質はこの細胞の染色体に組み込まれるかまたは染色体外に留まるかのいずれかである。遺伝子構築物は、核酸分子の遺伝子発現に必要な調節要素を含む。これらの要素には、プロモーター、開始コドン、終止コドン、およびポリアデニル化シグナルが含まれる。さらに、大抵、エンハンサーは、標的タンパク質または免疫調節タンパク質をコードする配列の遺伝子発現に必要とされる。これらの要素は、所望のタンパク質をコードする配列に作動可能に連結されること、およびこれらの調節要素は、これらが投与される個体において作動可能であることが必要である。

【0050】

開始コドンおよび終止コドンは、一般に、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部であると考えられる。しかし、これらの要素は、この遺伝子構築物が投与される個体において機能的であることが必要である。開始および終止コドンはコード配列と共にフレームの中になければならない。

【0051】

10

20

30

40

50

使用されるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルは、個体の細胞内で機能的でなければならない。

【0052】

本発明を実行するのに有用な、特にヒトの遺伝子ワクチンの産生において有用なプロモーターの例として、シミアンウイルス40 (SV40) プロモーター、マウス乳ガンウイルス (MMTV) プロモーター、BIV 末端反復配列 (LTR) プロモーターなどのヒト免疫不全ウイルス (HIV) プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、ALV プロモーター、CMV 最初期プロモーターなどのサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、エプスタイン・バーウイルス (EBV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターならびにヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチンおよびヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子由来のプロモーターが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0053】

本発明を実行するのに有用な、特にヒトの遺伝子ワクチンの産生において有用なポリアデニル化シグナルの例として、SV40 ポリアデニル化シグナルおよびLTR ポリアデニル化シグナルが挙げられるが、それらに限定されない。特に、プラスミド pCEP4 (Invitrogen, San Diego CA) 内に存在し、SV40 ポリアデニル化シグナルと称されるSV40 ポリアデニル化シグナルを使用する。

【0054】

DNA 発現に必要な調節要素に加えて、他の要素もこのDNA 分子の中にも含まれてもよい。かかる追加の要素はエンハンサーを含む。このエンハンサーは、以下を含む群から選択されてもよいがそれらに限定されない：ヒトアクチンエンハンサー、ヒトミオシンエンハンサー、ヒトヘモグロビンエンハンサー、ヒト筋肉クレアチンエンハンサーならびにCMV、RSV およびEBV のエンハンサーなどのウイルスエンハンサー。

20

【0055】

遺伝子構築物は、染色体外にこの遺伝子構築物を維持し、細胞内でこの構築物の複数のコピーを産生するために、哺乳類複製開始点が供給され得る。インビトロジェン (San Diego, CA) のプラスミド pVAX1、pCEP4 および pREP4 は、組み込まれることなく、高コピーのエピソーム複製を行うエプスタイン・バーウイルス複製開始点および核抗原EBNA-1 コード領域を含む。

30

【0056】

免疫化の適用に関連するいくつかの好ましい実施形態において、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および追加として、かかる標的タンパク質に対する免疫反応をさらに高めるタンパク質の遺伝子を含む核酸分子 (複数可) を送達する。かかる遺伝子の例として、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、血小板由来増殖因子 (PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、上皮細胞増殖因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MHC、CD80、CD86 およびシグナル配列が除去され、任意でIgE のシグナルペプチドを含むIL-15を含むIL-15などの他のサイトカインならびにリンホカインをコードする遺伝子が挙げられる。有用であり得る他の遺伝子には、MCP-1、MIP-1、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18の突然変異型、CD40、CD40L、血管増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、不活性NIK、SAPK、SAPK-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、N

40

50

FkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKリガンド、Ox40、Ox40リガンド、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2およびそれらの機能的断片をコードする遺伝子が含まれる。

【0057】

何らかの理由で、この遺伝子構築物を受け取る細胞を除去することが望ましい場合、細胞破壊の標的として機能を果たす追加の要素を加えてもよい。発現できる形態のヘルペスチミジンキナーゼ(tk)遺伝子を、この遺伝子構築物に含めることができる。薬剤ガンシクロビルはこの個体に投与され得、かつこの薬剤はtkを産生する全細胞を選択的に死滅させるため、この遺伝子構築物を有する細胞の選択的破壊のための手段をもたらす。

10

【0058】

タンパク質産生を最大限するために、この構築物が投与される細胞における遺伝子発現に十分に適した調節配列を選択してもよい。さらに、細胞内で最も効率的に転写されるコドンを選択してもよい。当業者は、細胞内で機能的なDNA構築物を作製することができる。

【0059】

一部の実施形態において、本明細書記載のタンパク質のコード配列がIgEシグナルペプチドと連結される遺伝子構築物を提供し得る。一部の実施形態において、本明細書記載のタンパク質は、IgEシグナルペプチドと連結される。

20

【0060】

タンパク質が用いられる一部の実施形態において、例えば、当業者は、周知の技術を用いて、本発明のタンパク質を産生および単離することができる。タンパク質が用いられる一部の実施形態において、例えば、当業者は、周知の技術を用いて、本発明のタンパク質をコードするDNA分子を、周知の発現系で使用するための市販の発現ベクターに挿入することができる。例えば、市販のプラスミドpSE420(Invitrogen, San Diego, Calif.)を大腸菌(E.coli)におけるタンパク質産生のために使用してもよい。例えば、市販のプラスミドpYES2(Invitrogen, San Diego, Calif.)を、酵母のサッカロマイセス・セレビシエ(S.cerevisiae)株における(タンパク質)産生のために使用してもよい。例えば、市販のMAXBAC(商標)完全パキユロウイルス発現系(Invitrogen, San Diego, Calif.)を昆虫細胞における(タンパク質)産生のために使用してもよい。例えば、市販のプラスミドpcDNA IまたはpcDNA3(Invitrogen, San Diego, Calif.)を、チャイニーズハムスター卵巣細胞などの哺乳類細胞における(タンパク質)産生のために使用してもよい。当業者は、これらの市販の発現ベクターおよび発現系または他のものを使用して、通例の技術およびすぐに入手できる出発物質によりタンパク質を産生することができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)参照、これは参照により本明細書に組み込まれる)。従って、所望のタンパク質を原核細胞系および真核細胞系の両方において調製することができ、このタンパク質の一連のプロセシング型をもたらすことができる。

30

40

【0061】

当業者は、他の市販の発現ベクターおよび発現系を使用してもよく、または周知の方法およびすぐに入手できる出発物質を用いてベクターを産生してもよい。プロモーターおよびポリアデニル化シグナル、ならびに好ましくはエンハンサーなどの必須の制御配列を含む、様々な種類の宿主に対する発現系は、すぐに入手でき、当業で知られている。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)参照。遺伝子構築物は、この構築物がトランスフェクト

50

される細胞株において機能的であるプロモーターと作動可能に連結されるタンパク質コード配列を含む。構成的プロモーターの例として、サイトメガロウイルスまたはSV40のプロモーターが挙げられる。誘導できるプロモーターの例として、マウス乳腺白血病ウイルスまたはメタロチオニンプロモーターが挙げられる。当業者は、すぐに入手できる発現物質から、本発明のタンパク質をコードするDNAで細胞をトランスフェクトするのに有用な遺伝子構築物を容易に作製することができる。このタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを用いて、適合性宿主を形質転換し、その後、外来DNAの発現が起こる条件下で培養し、維持する。

【0062】

産生させたタンパク質を、必要に応じて、かつ当業者に知られるように、これらの細胞を溶解するまたは培地から回収することによって、培養物から回収した。当業者は、周知の方法を用いて、かかる発現系を用いて産生されるタンパク質を単離することができる。上記の特異的タンパク質と特異的に結合する抗体を用いて天然源からタンパク質を精製する方法を、組み換えDNA法によって産生されるタンパク質の精製に同様に適用してもよい。

10

【0063】

組み換え技術によるタンパク質産生に加えて、自動化ペプチド合成機も使用して、本質的には純粋な単離されるタンパク質を産生してもよい。かかる技術は当業者に周知であり、置換を有する誘導体がDNAにコードされるタンパク質産生において供給されない場合に有用である。

20

【0064】

DNA注射(DNAワクチン接種とも称される)、組み換えアデノウイルス、組み換えアデノウイルス関連ウイルスおよび組み換えワクシニアなどの組み換えベクターを含むいくつかの周知の技術のいずれかを用いて、これらの核酸分子を送達してもよい。

【0065】

投与経路には、筋肉内経路、鼻腔内経路、腹腔内経路、皮内経路、皮下経路、静脈内経路、動脈内経路、眼球内経路、および経口経路、ならびに粘膜組織への吸入剤もしくは坐薬による、例えば、膣、直腸、尿道、頬および舌下の組織への洗浄による局所的経路、経皮的経路が含まれるが、それらに限定されない。好ましい投与経路には、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射および皮下注射が含まれる。遺伝子構築物は、電気穿孔の方法および装置、従来の注射器、無針注射器具、または「微粒子衝撃遺伝子銃」を含むがそれらに限定されない手段により投与されてもよい。

30

【0066】

これらのDNAワクチンの送達を促進するのに好ましい電気穿孔装置および電気穿孔法の例には、Draghia-Akliraによる米国特許第7,245,963号、Smithらにより出願された米国特許公開第2005/0052630号(これらの内容は、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる)に記載される例が含まれる。35 USC 119(e)条の下、2006年10月17日に出願された米国特許仮出願第60/852,149号および2007年10月10日に出願された米国特許仮出願第60/978,982号の利益を主張する、2007年10月17日に出願された同時係属で共同所有の米国特許出願第11/874072号(これらの全ては、この全体が本明細書に組み込まれる)に提供されるDNAワクチンの送達を促進する電気穿孔装置および電気穿孔法も好ましい。

40

【0067】

以下は、電気穿孔技術を用いた実施形態の例であり、上記で論じた特許参考文献の中で詳細に論じられる:電気穿孔装置は、使用者により事前に設定された電流入力と同じような定電流を生み出すエネルギーのパルスを、哺乳類の所望の組織へ送達するように配置され得る。この電気穿孔装置は、電気穿孔構成要素および電極集合体またはハンドル集合体を含む。この電気穿孔構成要素は、制御装置、電流波形発生器、インピーダンス試験器、波形自動記録装置、入力要素、状況報告要素、伝達ポート、記録構成要素、電源、および

50

電源スイッチを含む電気穿孔装置の1つ以上の様々な要素を含み、かつ組み込むことができる。この電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の1つの要素として機能することができ、他の要素は、この電気穿孔構成要素と連通する別々の要素（または構成要素）である。一部の実施形態において、この電気穿孔構成要素は、電気穿孔装置の2つ以上の要素として機能することができ、それは、この電気穿孔構成要素から分離する電気穿孔装置のさらに他の要素と連通することができる。これらの要素は1つの装置として、または互いに連通する別々の要素として機能することができるので、改良型HPVワクチンを送達するためにこの電気穿孔技術を用いることは、1つの電気機械装置または機械装置の一部として存在する電気穿孔装置の要素に限定されない。この電気穿孔構成要素は、所望の組織に定電流を生み出すエネルギーパルスを送達することができ、フィードバック機構を含む。電極集合体は、空間的配置に複数の電極を有する電極アレイを含み、ここで、この電極集合体は、この電気穿孔構成要素からエネルギーパルスを受け取り、電極を通して所望の組織にエネルギーパルスを送る。複数の電極の少なくとも1つは、エネルギーパルスの送達の間は中性であり、所望の組織のインピーダンスを測定し、この電気穿孔構成要素へインピーダンスを伝える。このフィードバック機構は、測定されるインピーダンスを受け取ることができ、この電気穿孔構成要素によって送達されるエネルギーパルスを調節し、定電流を維持することができる。

10

【0068】

一部の実施形態において、複数の電極は、分散的パターンでエネルギーパルスを送達することができる。一部の実施形態において、複数の電極は、プログラムされた順番の下で、電極制御を介して分散的パターンでエネルギーパルスを送達することができ、使用者が、プログラムされた順番を電気穿孔構成要素に入力する。一部の実施形態において、プログラムされた順番は、順に送達される複数のパルスを含み、複数のパルスの各パルスは、インピーダンスを測定する1つの中性極と共に少なくとも2つの活性電極によって送達され、複数のパルスの次のパルスは、インピーダンスを測定する1つの中性極と共に少なくとも2つの活性電極の別の1つによって送達される。

20

【0069】

一部の実施形態において、このフィードバック機構は、ハードウェアまたはソフトウェアのいずれかによって実行される。好ましくは、このフィードバック機構は、アナログ閉ループ回路によって行われる。好ましくは、このフィードバックは、毎50 μ s、20 μ s、10 μ sまたは1 μ sで生じるが、好ましくはリアルタイムなフィードバックつまり瞬時的（すなわち、反応時間を決定するために利用できる技術によって決定されるような事実上瞬時的）である。一部の実施形態において、中性電極は、所望の組織においてインピーダンスを測定し、インピーダンスをこのフィードバック機構へ伝達し、このフィードバック機構はインピーダンスに回答し、事前設定電流と同じような値で定電流を維持するためにエネルギーパルスを調節する。一部の実施形態において、このフィードバック機構は、エネルギーパルス送達の間、連続的にかつ瞬時的に定電流を維持する。

30

【0070】

一部の実施形態において、この核酸分子を、ポリヌクレオチド機能エンハンサーまたは遺伝子ワクチン促進剤の投与と併用して、これらの細胞に送達する。ポリヌクレオチド機能エンハンサーは、米国特許第5,593,972号、同第5,962,428号および1994年1月26日に提出された国際出願第PCT/US94/00899号に記載されており、これらは参照により各々が本明細書に組み込まれる。遺伝子ワクチン促進剤は、1994年4月1日に提出された米国特許第021,579号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。核酸分子と併用して投与する助剤を、核酸分子の投与前後に、この核酸分子との混合物として投与するか、または別々に、同時に投与してもよい。さらに、トランスフェクション剤および/または複製剤および/または炎症性薬剤として機能し得、かつGVFと一緒に投与され得る他の薬剤には、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、GM-CSF、血小板由来増殖因子(PDGF)、TNF、上皮細胞増殖因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、

40

50

IL-12およびIL-15などの増殖因子、サイトカインおよびリンホカイン、ならびに線維芽細胞増殖因子、免疫刺激複合体（ISCOMS）などの表面活性剤、フロイント不完全アジュバンド、モノホスホリルリピドA（WL）を含むLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体およびスクアレンスクアレンなどの小胞が含まれ、かつヒアルロン酸も、この遺伝子構築物と併用して投与に使用してもよい。一部の実施形態において、免疫調節タンパク質を、GVFとして使用してもよい。一部の実施形態において、この核酸分子はPLGと関連して提供され、送達および取り込みを高める。

【0071】

本発明による医薬組成物は、約1ng～約2000μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態において、本発明による医薬組成物は、約5ng～約1000μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約10ng～約800μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約0.1～約500μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約1～約350μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約25～約250μgのDNAを含む。いくつかの好ましい実施形態において、これらの医薬組成物は、約100～約200μgのDNAを含む。

10

【0072】

本発明による医薬組成物を、使用する投与方法に従って処方する。医薬組成物が注射可能な医薬組成物である場合において、注射可能な医薬組成物は無菌であり、発熱物質も粒子も含まない。好ましくは、等張製剤を使用する。一般に、等張にするための添加剤には、塩化ナトリウム、D型グルコース、マンニトール、ソルビトールおよび乳糖が含まれ得る。場合によっては、リン酸緩衝食塩水などの等張液が好ましい。安定剤には、ゼラチンおよびアルブミンが含まれる。一部の実施形態において、血管収縮剤をこの製剤に加える。

20

【0073】

本発明の一部の実施形態によると、免疫反応を誘導する方法が提供される。このワクチンは、タンパク質に基づく、弱毒化生ワクチン、細胞ワクチン、組み換えワクチンまたは核酸もしくはDNAワクチンであってもよい。一部の実施形態において、粘膜免疫反応を誘導する方法を含む、免疫原に対する免疫反応を個体において誘導する方法は、CTACKタンパク質、TECKタンパク質、MECタンパク質およびそれらの機能的断片またはそれらの発現できるコード配列のうちの一つ以上を、本発明のタンパク質をコードする単離した核酸分子および/または本発明のタンパク質をコードする組み換えワクチン、および/または本発明のタンパク質のサブユニットワクチンおよび/または弱毒化生ワクチンおよび/または不活化ワクチンと組み合わせ、この個体に投与することを含む。CTACKタンパク質、TECKタンパク質、MECタンパク質およびそれらの機能的断片のうちの一つ以上を、免疫原をコードする単離した核酸分子；および/もしくは免疫原をコードする組み換えワクチンおよび/もしくは免疫原を含むサブユニットワクチンおよび/もしくは弱毒化生ワクチンおよび/もしくは不活化ワクチンの投与前に、それらの投与と同時に、またはそれらの投与の後に投与してもよい。一部の実施形態において、CTACK、TECK、MECおよびそれらの機能的断片からなる群から選択される一つ以上のタンパク質をコードする単離した核酸分子を、この個体に投与する。

30

40

【0074】

本発明を、以下の実施例においてさらに説明する。これらの実施例は本発明の好ましい実施形態を示すが、単なる説明の目的で与えられるということが理解されるべきである。上記の説明およびこれらの実施例から、当業者は本発明の本質的特徴を突き止めることができ、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な使用および条件に本発明を適用するために、本発明の様々な変更および改良を行うことができる。したがって、本明細書に示され、記載される改良に加えて、本発明の様々な改良は、先の記載から当業者に明らかになるであろう。かかる改良は、添付の特許請求の範囲に入ることも意図される。

50

【0075】

米国特許、米国特許出願、および本開示の全体を通して引用される参考文献の各々は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0076】

実施例

本発明を、さらに以下の実施例で定義する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すが、例示のみの目的で与えられることを理解されたい。上記の説明およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、本発明の本質的特徴を確認することができ、様々な使用および条件に適合させるために、本発明の様々な変化および変更を行うことができる。したがって、本明細書に示し、記載したものに加えて、前述の記載から本発明の様々な変更が当業者には明らかであろう。このような変更は、添付の特許請求の範囲内であることも意図される。

10

【0077】

実施例 1

HPV6およびHPV11のE6/E7のワクチン設計ならびに発現

HPV6およびHPV11のE6/E7コンセンサスに基づく融合免疫原の構築

HPV6型またはHPV11型のE6/E7遺伝子配列をGeneBankから収集し、コンセンサスE6およびE7のヌクレオチド配列を、多重アライメントを行った後に取得した。HPV6のE6またはE7タンパク質のコンセンサス配列を、それぞれ98個または20個の配列から作製し、HPV11のE6またはE7タンパク質のコンセンサス配列を、それぞれ76個または13個の配列から作製した。系統発生的研究に適用される多重アライメント手順には、Clustal X(2.0版)の適用が含まれていた。図1Aおよび図1Bに示す通り、HPV株間であって、それらのE6およびE7タンパク質の同じ型に属するHPV株間で配列分散が約0~2%存在した。しかし、遺伝距離は、HPV6とHPV11の間でE6タンパク質では19.3%まで、E7タンパク質では16.3%まで上げることができた。系統発生分析のこれらの結果に基づいて、2つの型特異的なE6/E7コンセンサスDNAワクチンを開発した。

20

【0078】

コンセンサスE6/E7融合配列を作製した後に、いくつかの変更を行った(図1C)。発現を促進させるために、高性能リーダー配列を開始コドンの上流にインフレームで融合した。コドンおよびRNAの最適化も、以前に記載されたとおりに行った(J. Yan, et al., Cellular immunity induced by a novel HPV18 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques, Vaccine. 26(2008)5210-5215; および J. Yan, et al., Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen, Vaccine. 27(2009)431-440)。適切なタンパク質フォールディングおよび良好なCTLプロセッシングのために、細胞内タンパク質分解切断部位をE6およびE7タンパク質の間に導入した。遺伝子工学処理した合成6E6E7遺伝子と11E6E7遺伝子の両方は、長さが840bpであった。さらなる研究のために、配列を確認した合成遺伝子を、それぞれpVAX発現ベクターのBamHIおよびXhoI部位にサブクローニングした。コンセンサスヌクレオチド配列を翻訳することによって、コンセンサスアミノ酸配列を取得した。

30

40

【0079】

HPV6および11のコンセンサスE6配列ならびにHPV6および11のコンセンサスE7配列を取得した後に、コドン最適化およびRNA最適化を以前に記載された通りに行った(J. Yan, et al., Vaccine. 26(2008)5210-5215; および J. Yan, et al., Induction, Vaccine. 27(2009)4

50

31-440)。HPV6型または11型のコンセンサスE6/E7融合タンパク質のいずれかをコードする融合遺伝子(6E6E7または11E6E7)を合成し、配列を確認した。合成した6E6E7または11E6E7を、BamHIおよびXhoIで消化し、サイトメガロウイルス最初期プロモーターの制御下の発現ベクターpVAX(インビトロジェン社)にクローニングし、これらのコンストラクトをp6E6E7またはp11E6E7と命名した。

【0080】

293T細胞を6ウェルプレートで培養し、FuGENE6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science社、インディアナ州インディアナポリス)を用いてpVAX、p6E6E7、またはp11E6E7でトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、これらの細胞を、改変RIPA細胞溶解緩衝液を用いて溶解させ、細胞可溶化液を回収した。抗HAモノクローナル抗体(Sigma-Aldrich社、ミズーリ州セントルイス)を用いてウエスタンブロット解析を行い、ECLTMウエスタンブロット解析システム(Amersham社、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Sigma-Aldrich社、ミズーリ州セントルイス)で可視化した。

10

【0081】

p6E6E7およびp11E6E7の発現を確認するために、ヒト横紋筋肉腫細胞(RD細胞)を用いて間接免疫蛍光アッセイを行った。チャンバースライドで培養したRD細胞を、Turbofectin 8.0(Origene社、メリーランド州ロックビル)を用いてpVAX、p6E6E7またはp11E6E7でトランスフェクトした。その後、これらの細胞をPFAで固定し、PBS中0.1%Triton-Xで透過処理した。これらの細胞を、1次抗体および2次抗体と1~2時間それぞれインキュベートし、2回のインキュベーションの間に、グリシンおよびBSAを補充したPBSで洗浄した。使用した1次抗体および2次抗体は、それぞれモノクローナルマウス抗HA(Sigma-Aldrich社、ミズーリ州セントルイス)およびFITC結合抗マウスIgG(Abcam社、マサチューセッツ州ケンブリッジ)であった。ヘキスト染色も行って、細胞核を識別し、RD細胞を局在化させた。全てのインキュベーションが完了した後に、これらの細胞をマウントとし、ガラススライドをFluoromount-G(Southern Biotech社、アラバマ州バーミングハム)で固定した。これらの試料を、共焦点顕微鏡(CDB Microscopy Core、ペンシルベニア大学、細胞発生生物学、ペンシルベニア州フィラデルフィア)を用いて観察し、撮像した。

20

30

【0082】

実施例2

マウスおよび処置群の免疫化

6~8週齢の雌のC57BL/6マウスをこの実験に用いた。マウスを、ジャクソン研究所(メイン州バーハーバー)から入手した。これらのマウスを、米国国立衛生研究所およびペンシルベニア大学の施設内動物管理使用委員会(IACUC)の方針に従って、ペンシルベニア大学の動物資源研究所に収容し、維持した。これらの実験で用いたマウスを、免疫化のために4群に分けた。マウスをp6E6E7、p11E6E7、または両方のコンストラクトで免疫化し、pVAX群を陰性対照とした。

40

【0083】

DNAワクチン接種および電気穿孔法

各マウスに、14日の間隔を空けて各DNAプラスミド20µgを3回投与した。p6E6E7とp11E6E7との両方を接種される群のマウスは、ワクチン接種あたり両方のプラスミド20µg、合計40µgのDNAを接種された。これらのDNAコンストラクトを、右大腿四頭筋への筋肉注射により投与し、その後、短形波をCELLECTRA(商標)エレクトロポレーター(Inovio Pharmaceuticals社、ペンシルベニア州ブルーベル)により生成させた。このエレクトロポレーターを、52ms/パルス、0.2アンペアで、1秒遅れの間隔で2つの電気パルスを送るように構成した

50

。電気穿孔手順は、以前に記載された通りに行った(12、13)。

【0084】

IFN - ELISpotアッセイ

治療群と対照群との両方のマウスを、3回目の免疫化の1週間後に屠殺した。脾臓を各マウスから採取し、10% FBSおよび抗生物質を含むRPMI-1640培地(R10)に移した。ストマッカー(Seward Laboratory Systems社、ニューヨーク州ボヘミア)を用いて、脾臓を粉碎し、その後、セルストレーナーを通して移し、ACK溶解緩衝液に懸濁させた。赤血球を除去した後、脾細胞を単離し、R10培地に懸濁した。高タンパクIP96-ウェルマルチスクリーン(Multiscreen)(商標)プレート(ミリポア社、マサチューセッツ州ベッドフォード)を、モノクローナルマウスIFN- 捕捉抗体(R&Dシステムズ社、ミネソタ州ミネアポリス)で予めコーティングし、4 で一晩インキュベートした。1×XPBSで3回洗浄した後、これらのプレートを1×PBS中1%BSAおよび5%スクロースで、周囲温度で2時間ブロッキングした。R10培地中の単離した脾細胞を計数し、ウェル当たり 2×10^5 細胞で3連のウェルに添加した。HPV6およびHPV11のコンセンサスE6/E7配列に及び2組のペプチドを、DMSO(USA GenScript社、ニュージャージー州ピスカタウェイ)で再構成した。これらのペプチドは15個のアミノ酸配列を含み、そのうちの8残基が各シーケンシャルペプチドと重複していた。HPV6および11のペプチドを、それぞれDMSO中 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で2つのプール(一方のプールはE6、別のプールはE7)に分けた。陽性対照および陰性対照用のウェルに、それぞれ、ペプチドの代わりにコンカナバリンA(Sigma-Aldrich社、ミズーリ州セントルイス)およびR10培地を入れた。その後、プレートを、5%のCO₂雰囲気インキュベーターに入れた。37 で24時間インキュベーションした後、これらのウェルを1×PBSで洗浄した。ビオチン化抗マウスIFN- 検出抗体(R&Dシステムズ社、ミネソタ州ミネアポリス)を各ウェルに添加し、次いで、4 で一晩インキュベートした。その後、これらのプレートを洗浄し、ストレプトアビジン-APおよびBCIP/NBTプラス(R&Dシステムズ社、ミネソタ州ミネアポリス)を用いて、R&Dシステムズが提供する発色プロトコールにより処理した。これらのウェルを一晩空気乾燥し、ウェル内部のスポットを、ELISpotプレートリーダーシステムによりImmunoSpot(登録商標)3およびImmunoSpot(登録商標)4のソフトウェアを用いてスキャンし、計数した(Cellular Technology Ltd.、オハイオ州シェーカーハイツ)。報告されたスポット形成細胞数を変換し、演算を使用して、 1×10^6 個の脾細胞あたりのスポット形成単位を示した。

10

20

30

【0085】

それらの感度及びT細胞活性を示す能力を前提として、IFN - ELISpotアッセイを用いて、HPV6または11のE6およびHPV6または11のE7ペプチドのいずれかでの刺激に反応して、抗原特異的なIFN- 分泌細胞数を決定した。

【0086】

図3Aおよび3Bに示すように、p6E6E7で免疫したマウスのSFU/106脾細胞の平均数は1442.8であり、p11E6E7で免疫したマウスのSFU/106脾細胞の平均数は2845であり、これらは全て、陰性対照群を著しく上回っていた。したがって、p6E6E7およびp11E6E7の両方は、マウスにおいて強力な型特異的E6およびE7特異的免疫反応を誘発するのに有効であった。

40

【0087】

興味深いことに、交差反応性の細胞性免疫反応も、p6E6E7またはp11E6E7での免疫化により誘導された。p11E6E7で免疫化したマウスにおけるHPV6のE6/E7ペプチドに対するSFU/106脾細胞の添加頻度は、552.8SFU/106脾細胞であり、p6E6E7で免疫化したマウスにおけるHPV11のE6/E7特異的免疫反応は、888.3SFU/106脾細胞であった。HPV6または11のE6タンパク質は、約80%の同一性を共有し、HPV6または11のE7タンパク質は、約8

50

4%の同一性を共有した。HPV6または11のE6抗原とHPV6または11のE7抗原の間にはいくつかの共有免疫エピトープが存在し得る。IFN- γ ELISpotアッセイから観察される交差反応性は、HPV6およびHPV11のE6抗原とHPV6およびHPV11のE7抗原との間に共有免疫エピトープがあることを示した。

【0088】

p6E6E7とp11E6E7（組み合わせ群）の両方を受け取ったマウスの脾細胞も、これらの2つのコンストラクトを一緒に免疫化する場合に、任意の免疫干渉があるか否かを調べるために、上記のELISpotアッセイに供した（図3Aおよび図3B）。HPV6のE6およびE7ペプチドに対する組み合わせ群の平均値は、1670SFU/106脾細胞（ μ = 55.7、 $P < 0.001$ ）であった。HPV11のE6およびE7ペプチドに対する脾細胞の同じグループは、2010SFU/106脾細胞（ μ = 247.8、 $P = 0.002$ ）をもたらした。これらのデータは、2つのコンストラクトでの同時免疫化が、HPV6およびHPV11に対して統計的に有意なE6およびE7特異的細胞性反応を誘発することができ、これらの反応は互いに干渉しないことを示唆する。

10

【0089】

エピトープマッピング

E6/E7コンセンサス抗原内の免疫優性ペプチドを決定するために、エピトープマッピング試験を行い、ペプチドプール内の優性エピトープを決定した（図4Aおよび図4B）。これらの試験は、前述のIFN- γ ELISpotアッセイと同様に行った。プールの代わりに、個々のペプチドを用いて、脾細胞を刺激した。

20

【0090】

この単一ペプチド分析に用いた各ペプチドは、HPV6またはHPV11のE6抗原およびHPV6またはHPV11のE7抗原の部分的に重複する断片を示した。マッピングデータは、配列番号11のペプチド7（TAEIYSYAYKQLKVL）が、HPV6のE6およびE7免疫原の優性エピトープであることを示した（図4A）。配列番号11のTAEIYSYAYKQLKVLは、NIH BIMASによって入手可能なHLA結合予測ソフトウェアによって制限されるH2-Kbであることが確認された8mer、9mer、10merのアミノ酸エピトープをそれぞれ含んでいた。さらに、HPV11のE6およびE7特異的T細胞免疫反応について記載する（図4B）。また、HPV11のE6およびE7の重複断片を用いてペプチド分析も行った。エピトープマッピングにより、HPV11のE6およびE7抗原の優性エピトープが、配列番号12のペプチド7（TAEIYAYAYKNLKV）および配列番号13のペプチド27（HCYEQLLEDSSSEDEV）であることが示された。HPV6エピトープマッピングアッセイにおけるペプチド7と同様に、BIMAS HLA結合予測ソフトウェアにより、配列番号12のTAEIYAYAYKNLKVがH2-Kb制限エピトープであることが確認された。NIH NIAIDが提供する別のHLA結合ペプチドデータベース、免疫エピトープデータベースおよび分析リソースは、配列番号13のHCYEQLLEDSSSEDEVがH2-Kb制限エピトープであることを確認した。準有意の3つの免疫ペプチドである配列番号14の番号6（FCKNALTTAEIYSYA）、配列番号15の番号9（LFRGGYPYAAACCL）、および配列番号16の番号13（YAGYATTVEEETKQD）を、このエピトープマッピング研究を経て同定した。

30

40

【0091】

細胞内サイトカイン染色

IFN- γ ELISpotアッセイによって示される高い免疫反応を考慮して、p6E6E7およびp11E6E7により誘導される細胞性反応のより包括的な概要を提供するために、細胞内サイトカイン染色アッセイを行った。免疫化したマウス群および未処理のマウス群の脾細胞を単離し、5%CO₂環境中、37°Cで4時間、HPV6およびHPV11のE6ならびにHPV6およびHPV11のE7領域にまたがるペプチドで刺激した。このアッセイにおいて陽性対照および陰性対照を、それぞれ、ホルボール12-ミリステート13-アセテート（PMA）およびR10細胞培地中に細胞を入れることによ

50

て用いた。インキュベーション後、これらの細胞を最初にV i V i D染料 (I n v i t r o g e n社、カリフォルニア州カールズバッド) で染色し、生細胞および死細胞を区別し、次いで、全細胞を、A P C - C y 7ハムスター抗マウスC D 3 e、P e r C P - C y 5 . 5ラット抗マウスC D 4、およびA P Cラット抗マウスC D 8 a (B D B i o s c i e n c e s社、カリフォルニア州サンディエゴ)、の表面マーカー抗体で染色した。その後、これらの細胞を、C y t o f i x / C y t o p e r mキット (B D B i o s c i e n c e s社、カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて固定した。製造業者のプロトコールに従って固定した後、これらの細胞を、A l e x a F l u o r 7 0 0ラット抗マウスI F N - 、P E - C y 7ラット抗マウスT N Fクローン、およびP Eラット抗マウスI L - 2 (B D B i o s c i e n c e s社、カリフォルニア州サンディエゴ) の細胞マーカー抗体で染色した。染色後、これらの細胞を、2 %パラホルムアルデヒドを含むP B S溶液で固定した。調製した細胞を、B D F A C S D i v aソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s社、カリフォルニア州サンノゼ) が搭載されたL S R I Iフローサイトメーターを用いて得た。取得したデータを、F l o w J oソフトウェア (T r e e S t a r、オレゴン州アッシュランド) の最新バージョンを使用して分析した。C D 4 + およびC D 8 + のイベントを、F S C - A対F S C - Hからのシングレット、F S C - A対S S C - Aからの全脾細胞、V i V i D染料 (P a c i f i c B l u e社) 対S S C - Aからの生細胞、C D 3 (A P C - C y 7) 対S S C - AからのC D 3 + 細胞、C D 4 (P e r C P - C y 5 . 5 : 陽性 - C D 4 +、陰性 - C D 8 +) 対S S C - AからのC D 4 + またはC D 8 + というゲートの順番を用いて単離した。最後の2つの集団を、A l e x a F l u o r 7 0 0、P E - C y 7、およびP Eに対してゲーティングし、それぞれI L - 2、I F N - およびT N F - の産生の変化を観察した。

10

20

30

40

【0092】

細胞内サイトカイン染色データが、C D 4 + およびC D 8 + 細胞の反応により区別することができるように細胞をゲーティングした。H P V 6 E 6およびE 7特異的なペプチドで刺激した場合、p 6 E 6 E 7で免疫したマウスのI F N - 、T N F - 、およびI L - 2を産生する全C D 4 + 細胞の平均値は、それぞれ0 . 1 6 3 % (= 0 . 0 9)、0 . 0 0 3 % (= 0 . 0 7)、0 . 1 8 8 % (= 0 . 2 0)であった (図5 A)。マウスの同じグループのI F N - 、T N F - 、およびI L - 2を産生する全C D 8 + 細胞の平均値は、それぞれ3 . 3 2 3 % (= 1 . 3 9)、0 . 8 3 8 % (= 0 . 3 2)、および1 . 1 7 2 % (= 1 . 8 1)であった。同じ細胞内サイトカインデータを、H P V 1 1のE 6およびE 7抗原とのインキュベーション後にp 1 1 E 6 E 7で免疫したマウスの脾細胞を用いて収集した (図5 B)。p 1 1 E 6 E 7免疫化マウスの全C D 4 + 細胞のうち、I F N - を産生した細胞の平均値は0 . 0 5 1 % (= 0 . 0 4)、T N F - を産生した細胞の平均値は0 . 0 6 8 % (= 0 . 0 9)、I L - 2を産生した細胞の平均値は0 . 0 2 6 % (= 0 . 0 3 7)であった。さらに、p 1 1 E 6 E 7で免疫したマウスにおいて、I F N - 、T N F - 、およびI L - 2を産生した全C D 8 + 細胞の平均値は、それぞれ4 . 5 2 % (= 2 . 5 3)、2 . 0 8 % (= 1 . 5 6)、および0 . 2 1 % (= 0 . 2 2)であった。いくつかのパネルを除いて、処理群対それらのそれぞれの未処理群のサイトカイン産生細胞の割合は、8 9 %以上の信頼水準で統計的に有意であった。C D 4 + T細胞対C D 8 + T細胞のサイトカイン産生の程度の観察により、p 6 E 6 E 7およびp 1 1 E 6 E 7によって誘発される免疫反応は、全てのモデルにおいてそれらの細胞クリアランスと関連付けられるC D 8 + リンパ球の駆動に向かって大きく偏っていると結論付けることができる。

【0093】

統計分析

スチューデントt検定を行い、この研究で生じた全ての定量的データの統計的有意性を解析した。特に明示しない限り、p値を計算し、様々な信頼レベルで統計的有意性を決定した。

【0094】

50

この研究は、DNAワクチンが、実績があり従来から使用されている他のワクチンプラットフォームを用いた実験で見出された免疫原性のレベルを達成することができる可能性の説得力のある証拠を示した。他の類似のE6およびE7特異的HPV DNAワクチン研究で測定された高レベルの細胞性反応は、予防的および治療的な抗腫瘍効果を示唆するデータと関連していた。ほとんどのHPV関連の研究および疾患の負荷モデルは、子宮頸癌に焦点を当てている。HPV6およびHPV11が、他のHPV血清型と同じくらい子宮頸癌と関係しないことを考慮すると、p6E6E7およびp11E6E7の治療効果は、完全に従来HPV疾患の負荷モデルを用いて評価することはできない。適切な疾患の負荷モデルが利用可能である場合、p6E6E7およびp11E6E7の保護ならびに治療の可能性を判断することは洞察に満ちている。したがって、ELISpotアッセイおよび細胞内サイトカイン染色によって定量化される高レベルのIFN- γ ならびにサイトカイン産生を調べることにより、p6E6E7およびp11E6E7の免疫原性の有効性を推測することができる。それにもかかわらず、そのようなレベルは、大きさが著しく強いこと、かつ2つのコンストラクトが、実質的なレベルの細胞性免疫反応を誘発するという見込みを示すことが見出された。HPV関連の悪性腫瘍が、一般に、複数の血清型の同時感染に続発しているため、ウイルスの異なる血清型を対象としたワクチンを組み合わせることの実現可能性をさらに調べる必要性が大いに存在する。T細胞の動態およびワクチン競争を調べるさらなる研究は、これらの2つのプラスミドの同時免疫化の効果をさらに特徴づけることを保証する。

10

【0095】

20

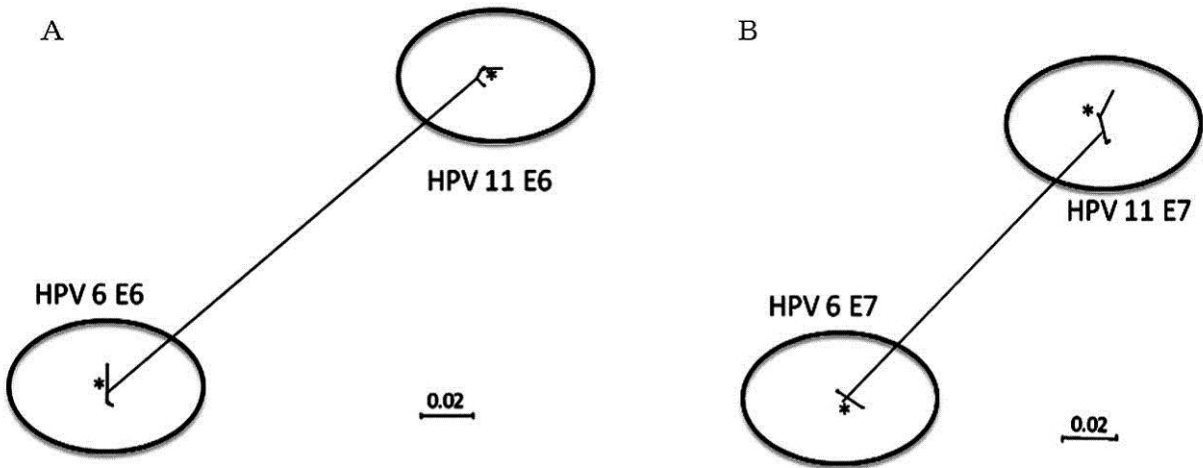
細胞内サイトカイン染色により、p6E6E7およびp11E6E7での免疫化は、かなりの割合のIFN- γ 、TNF- α 、およびIL-2を産生するT細胞を誘発することができることが示された。免疫系における現在知られている機能を考慮して、IFN- γ は、従来、細胞性免疫反応の指標として用いられてきた。これらの重要な役割のいくつかには、自然免疫および獲得免疫を調節し、刺激する能力が含まれる。さらに、IFN- γ の主な生産者は、IFN- γ 産生を、抗原に対する所定のワクチン曝露後の細胞免疫原性を測定するのに許容されるモードにさせるT細胞であることが広く認められている。TNF- α は、免疫系の調節に関与する別のサイトカインである。アポトーシスを誘導し、腫瘍増殖を調節するTNF- α の既知の能力により、TNF- α は、ワクチン接種後の免疫反応を特徴づける際に考慮すべき重要なパラメータになる。HPV6およびHPV11の潜在的な腫瘍増殖特性を考慮すると、TNF- α 産生はさらに興味深いものとなり得る。IL-2は、免疫系におけるT細胞の増殖および分化において中心的な役割を果たすことが観察されている別のシグナル伝達分子である。そのため、IL-2は、特定の免疫反応の程度および品質について更なる見解を得るために、他のサイトカインと組み合わせて検討される場合が多い。上記を考慮すると、p6E6E7での免疫化後の顕著な割合のIFN- γ 、TNF- α 、およびIL-2を産生するCD4+ならびにCD8+細胞は、このワクチンが、強力な免疫反応を誘導することに成功したことを示唆する。IL-2を分泌するCD4+細胞を除いて、p11E6E7で免疫化したマウスから単離した細胞についても同じ傾向が当てはまる。さらに、CD8+細胞が、免疫化マウスにおける免疫反応を著しく促進したこと(これらの2つのプラスミドの抗腫瘍効果を評価する上で重要な特性)を観察することは注目に値する。

30

40

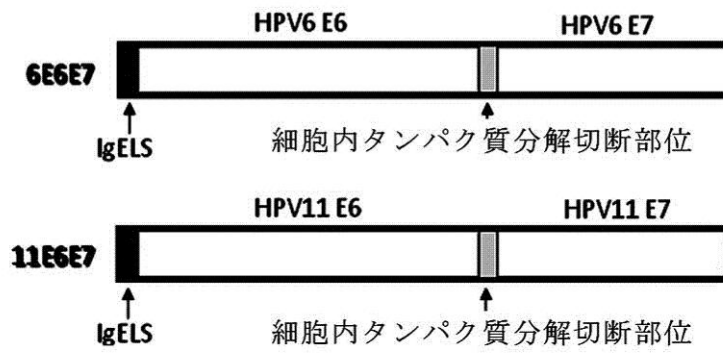
【 図 1 】

図1



C

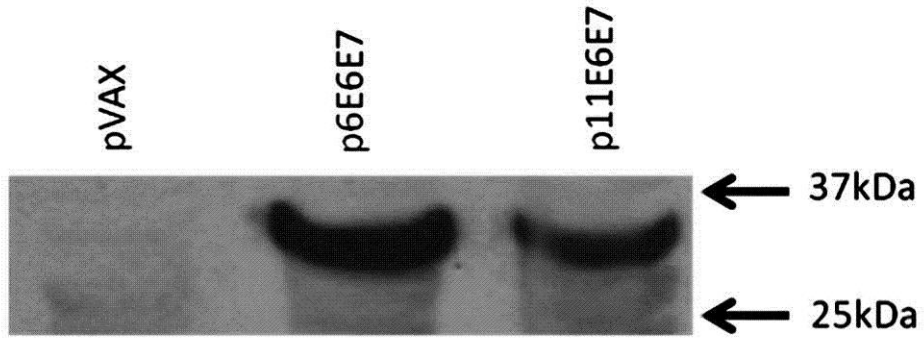
免疫原のデザイン



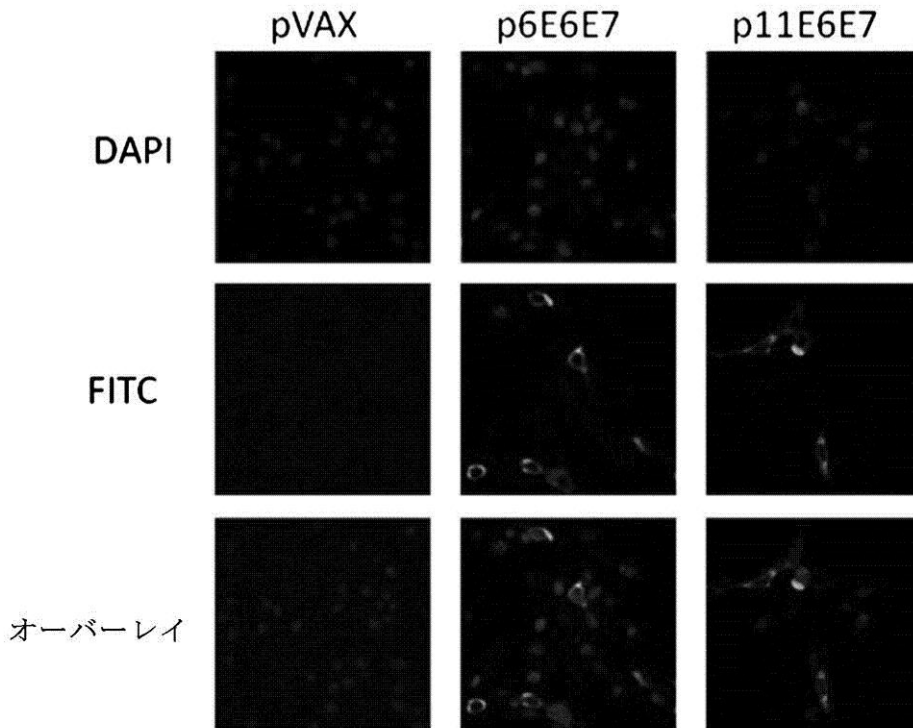
【 図 2 】

図2

A



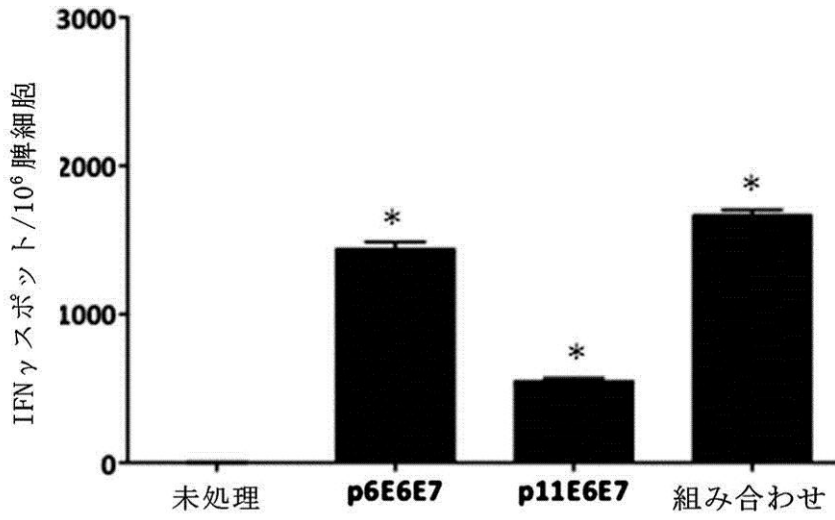
B



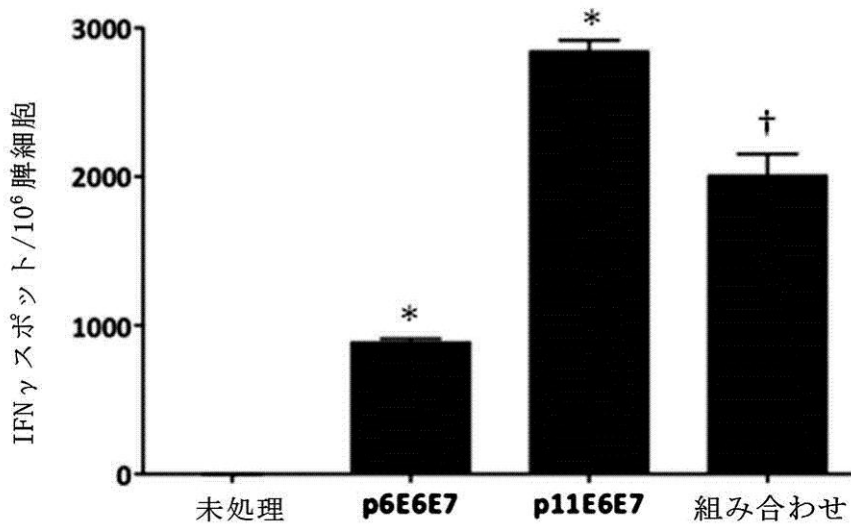
【図3】

図3

A



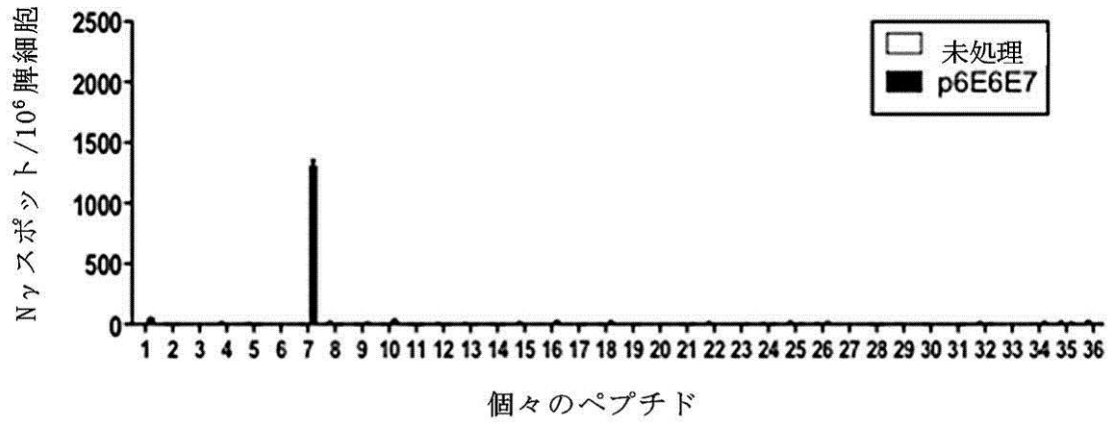
B



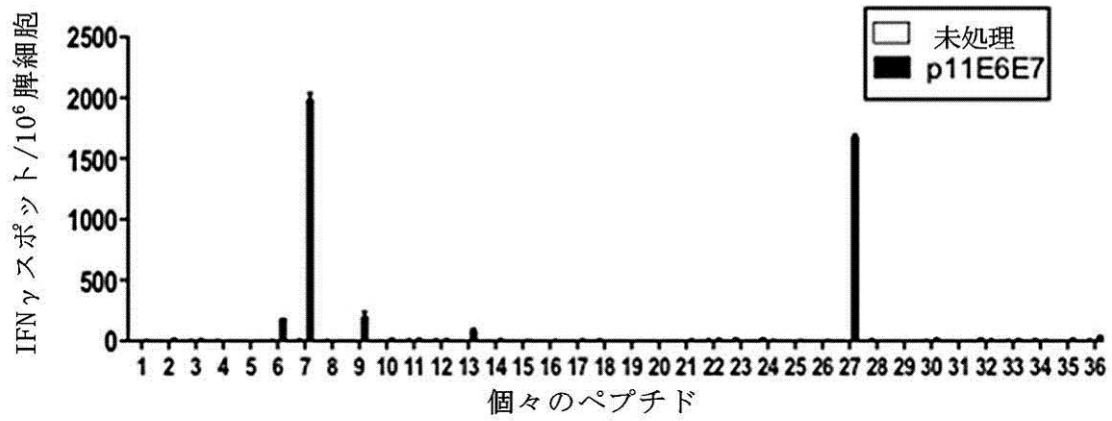
【図4】

図4

A

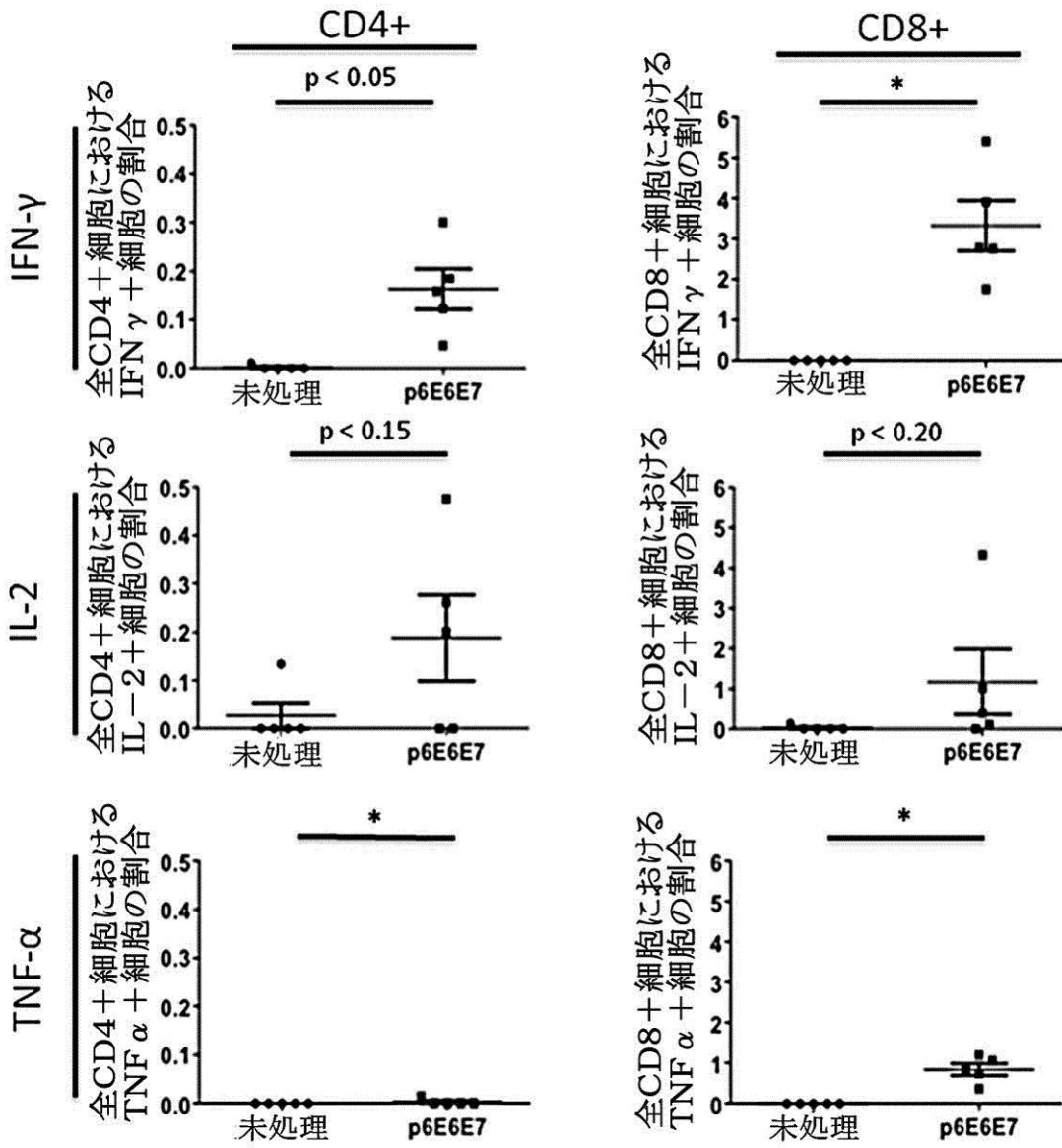


B



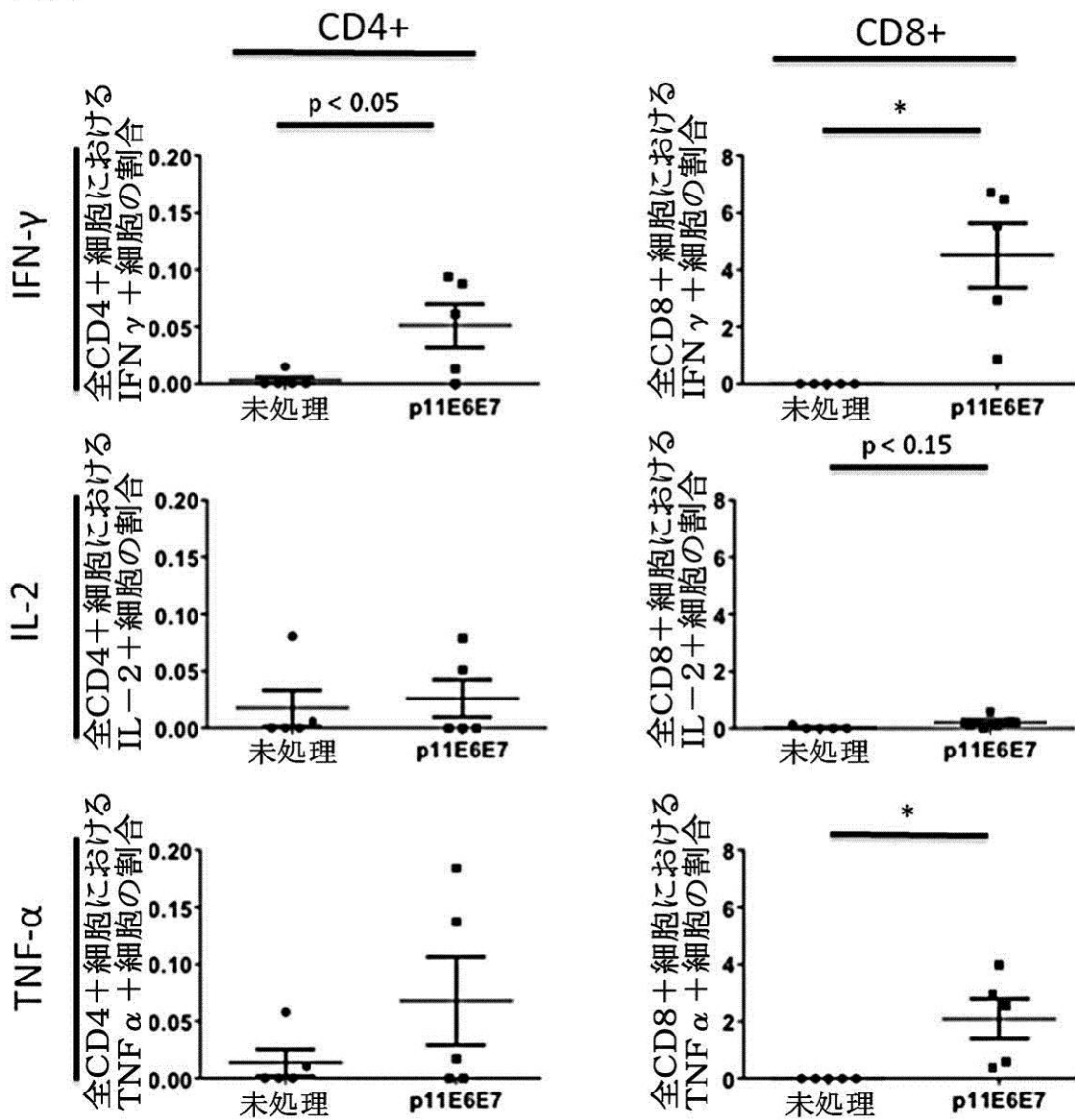
【図5A】

図5A



【 図 5 B 】

図5B



【 配列表 】

2014530610000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/55932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/12; A61K 39/00; C07H 21/04; C07K 1/00 (2012.01) USPC - 424/186.1, 424/199.1, 424/204.1; 424/192.1; 536/23.72; 530/350 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(8) - A61K 39/12; A61K 39/00; C07H 21/04; C07K 1/00 (2012.01) USPC - 424/186.1, 424/199.1, 424/204.1; 424/192.1; 536/23.72; 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - A61K 39/12; A61K 39/00; C07H 21/04; C07K 1/00 (2012.01) - see keyword below USPC - 424/186.1, 424/199.1, 424/204.1; 424/192.1; 536/23.72; 530/350 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: human, papillomavirus, HPV, nucleotide, polynucleotide, nucleic acid, sequence, amino acid, polypeptide, protein, peptide, vaccine, administer, encoding, plasmid, type 6, E6, E7, fusion, antigen, sequence, E6/E7, HPV-6		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/054482 A1 (Ertage) 20 May 2010 (20.05.2010), para [0003], [0022], [0039], and SEQ ID NO: 45	1-2, 6-7, and 8/(1-2, 6-7)
A	US 6,365,160 B1 (WEBB et al.) 02 April 2002 (02.04.2002), col 1, ln 5-9; col 2, ln 42-50; col 3, ln 43-52; col 4, ln 62-64; col 7, ln 18-19; col 12, ln 58-62; col 28, ln 28-32; and SEQ ID NOs: 23 and 24	1-2, 6-7, and 8/(1-2, 6-7)
A	MA et al. HPV and Therapeutic Vaccines: Where are We in 2010? Curr. Cancer Ther Rev, 2010, Vol 6, p. 81-103. Entire documentation, especially Abstract, and Table 1	1-2, 6-7, and 8/(1-2, 6-7)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 April 2012 (29.04.2012)		08 JUN 2012
Name and mailing address of the ISA/US		Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/55932

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. 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:

3. Claims Nos.: 9-14 and 20-22
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I-: claims 1-8, 23-26, drawn to a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding for an HPV antigen selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7; fragments thereof having 90% homology; and combinations thereof; or a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: nucleotide sequences that encode SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:8; nucleotide sequences that encode an amino acid fragment having at least 90% homology to SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:8, as indicated in claim 6, or a pharmaceutical composition comprising nucleotide sequences encoding for HPV antigen. The first named invention (claims 1-2, 6-8), is limited to the nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO: 1, or nucleotide sequences that encode SEQ ID NO: 2, which is encoded by the SEQ ID NO: 1 (Specification: pg 8 in 9-15). *****Continued in the extra sheet*****

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-2, 6-7, and 8/(1-2, 6-7), limited to nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO: 1 or encoding SEQ ID NO: 2

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/55932

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of Group I+) Applicant is invited to elect (an) additional nucleotide sequence(s), selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 3 including a nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 including a nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 7 including a nucleotide sequence encoding SEQ ID NO: 8, and a fragment of SEQ ID NO: 1, 3, 5, or 7, with a specified length of the fragment comprising nucleotides between the specified positions of the corresponding SEQ ID NO, as well as associated fragment length comprising amino acid residues between the specified positions of the corresponding SEQ ID NO: 2, 4, 6, or 8, respectively, to be searched by paying additional fee for each election. Note: If SEQ ID NO: 3 is elected, claims 23 and 24 will also be searched. If SEQ ID NOs: 5 and 7 are elected, claims 25 and 26 will also be searched. The exact number and the scope of additional claims will be searched will depend upon the election.

Group II+, claims 15-19, drawn to a protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 8; and fragments of sequences having at least 90% homology to SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 8. The first named invention (claims 15-16), is limited to the protein comprising SEQ ID NO: 2. Applicant is invited to elect an additional protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 8, and a fragment of SEQ ID NO: 2, 4, 6, or 8 with a specified length of the fragment comprising amino acid residues between the specified positions of the corresponding SEQ ID NO to be searched, by paying additional fee for each election.

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups II+ do not include the inventive concept of a nucleic acid molecule, as required by Groups I+.

Among Groups I+, each SEQ ID NO having a nucleotide sequence that is structurally different from all others and encoding a HPV antigen that is different from all others (Specification: pg 10, in 17-18 - 'a consensus immunogen selected from the group consisting of HPV 6 E6 and E7, HPV 11 E6 and E7, HPV 33 E6 and E7, HPV 58 E6 and E7', which are represented by SEQ ID NOs: 1, 3, 5, and 7, respectively; pg 8-10). Furthermore, each fragment having at least 90% homology to each claimed SEQ ID NO, leads to different sequences. For a fragment having 786 nucleotides, there will be 88 potential fragments generated from SEQ ID NO: 1 (873-786+1=88) (pg 8, in 18-19 - 'fragments of SEQ ID NO: 1 may comprise 786 or more nucleotides', wherein SEQ ID NO: 1 has 873 nucleotides), therefore it requires a search of 88 fragments having 786 nucleotides for identifying a fragment of 786 nucleotide having at least 90% homology to the claimed SEQ ID NO: 1, especially the nucleotide sequences in this application are generated from alignment of multiple sequences from GenBank (Specification: pg 20, in 15-17 - 'The HPV type 6 or 11 E6 and E7 gene sequences were collected from GenBank, and the consensus E6 and E7 nucleotide sequences were obtained after performing multiple alignment'). For a nucleotide sequences that encode an amino acid fragment having at least 90% homology to SEQ ID NO: 2, there will be 118 potential fragments generated from SEQ ID NO: 1 (873-756+1=124) (pg 8, in 24-25 - 'fragments of SEQ ID NO: 2 may comprise 252 or more amino acids, wherein 252 amino acid is encoded by 756 nucleotides, and SEQ ID NO: 1 has 873 nucleotides, as discussed above), it requires a search of 118 fragments having 756 nucleotide encoding 252 amino acids of SEQ ID NO: 2 for identifying a fragment of 756 nucleotides encoding an amino acid having at least 90% homology to the claimed SEQ ID NO: 2.

Furthermore, among Groups II+, each SEQ ID NO having an amino acid sequence that is structurally and functionally different from all others and representing a HPV antigen that is different from all others (Specification: pg 10, in 17-18 - 'a consensus immunogen selected from the group consisting of HPV 6 E6 and E7, HPV 11 E6 and E7, HPV 33 E6 and E7, HPV 58 E6 and E7', which are represented by SEQ ID NOs: 2, 4, 6, and 8, respectively; pg 8-10). Moreover, each fragment having at least 90% homology to the claimed SEQ ID NO, leads to different amino acid sequences comprising different antigens. For an amino acid fragment having at least 90% homology to SEQ ID NO: 2, there will be 29 potential fragments generated from SEQ ID NO: 2 if the fragment having length of 252 amino acid residues (280-252+1=29) (pg 8, in 24-25 - 'fragments of SEQ ID NO: 2 may comprise 252 or more amino acids, wherein SEQ ID NO: 2 having 280 amino acid residues), it requires a search of 29 fragments having 252 amino acids of SEQ ID NO: 2 for identifying a fragment of 252 amino acid having at least 90% homology to the claimed SEQ ID NO: 2, especially the protein sequences in this application are generated from alignment of multiple sequences from GenBank (Specification: pg 20, in 17-18 - 'The consensus sequence of HPV 6 E6 or E7 proteins was generated from 98 or 20 sequences, respectively').

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of an amino acid fragment having at least 90% homology to SEQ ID NO: 2; and Group I+ further share the technical feature of nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding for an HPV antigen, the Groups II+ further share the technical feature of a protein comprising an amino acid sequence. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 6,365,160 B1 to WEBB et al. (hereinafter 'Webb') as follows:

*****Continued in the next extra sheet*****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/55932

Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

Webb discloses a protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: fragments of sequences having at least 90% homology to SEQ ID NO:2 (col 12, In 59-62 - 'amino acid sequences for ... E6/E7/E5a/E4 (CSL673.SEQ) are shown...SEQ ID Nos: ... 24', wherein SEQ ID NO: 24 comprising a region between amino acid residues 2-253 (252 amino acid fragment), that has the best local similarity of 95.7% to a region between amino acid residues 19-276 (258 a.a) of the claimed SEQ ID NO: 2; col 2, In 42-50 'isolated product, a polyprotein construct comprising at least two amino acid sequences fused ...of papillomavirus (PV) or ...fragment thereof, ... the E6 or E7 protein sequence'; col 7, In 18-19 - 'The polyprotein constructs ... are provided as isolated proteins').

Webb further discloses a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding for an HPV antigen (col 1, In 5-9 - 'polyprotein constructs comprising a plurality of papillomavirus (PV) amino acid sequences ... particularly human papillomavirus (HPV); col 4, In 62-64 - 'a nucleic acid molecule which encodes a polypeptide construct') and

—wherein the nucleotide sequence comprising a nucleotide encodes an amino acid fragment having at least 90% homology to SEQ ID NO:2 (col 12, In 58-62 - 'The DNA and corresponding amino acid sequences for ... E6/E7/E5a/E4 (CSL673.SEQ) are shown...SEQ ID Nos: ... 23 and 24, respectively', wherein SEQ ID NO: 23 comprising a region between nucleotide sequences 4-759, that encodes an amino acid fragments of 252 amino acid residues of SEQ ID NO: 24, that has the best local similarity of 95.7% to a region between amino acid residues 19-276 (258 a.a) of the claimed SEQ ID NO: 2; Sequence List, col 45-53, SEQ ID NO: 23 and SEQ ID NO: 24; Specification: pg 8, In 24-25 - 'fragments of SEQ ID NO:2 may comprise 252 or more amino acids'; pg 8, In 9-10 - 'SEQ ID NO: 1 comprises a nucleotide sequence that encodes a consensus immunogen of HPV 6 E6 and E7 proteins').

Webb further teaches different HPV antigen variants sharing the similarity with the disclosed HPV antigens (col 3, In 43-52 - 'the amino acid sequences in the polyprotein construct substantially correspond to the sequences of wild-type early ORF proteins of PV, ...variants include variants ...may have at least 50-60%, ... most preferably at least 90%, similarity to the wild-type amino acid sequences'; col 1, In 5-9 - 'polyprotein constructs comprising a plurality of papillomavirus (PV) amino acid sequences ... particularly human papillomavirus (HPV)'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note re item 4: Claims 9-14 and 20-22 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P 31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(74) 代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(72) 発明者 デイビッド ビー・ウェイナー
アメリカ合衆国, ペンシルベニア 1 9 0 6 6 , メリオン, ビーコン レーン 7 1 7

(72) 発明者 ヤン チアン
アメリカ合衆国, ペンシルベニア 1 9 0 8 3 , ヘイバーフォード, クラマー アベニュー 2 1 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA01 DA02 DA03 EA04 GA11 HA01 HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ10 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR39 QR55
QR79 QS34
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 CA53 MA16 MA56
MA65 MA66 NA14 ZB092 ZC782
4C085 AA03 BA76 CC01 CC08 DD62 EE01 GG01 GG03 GG04 GG05
GG06
4H045 AA10 AA20 AA30 CA01 DA86 EA31 FA74