

(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2007-505601

(P2007-505601A)

(43) 公表日 平成19年3月15日(2007.3.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-525796 (P2006-525796)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月13日 (2004. 9. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年4月26日 (2006. 4. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/010323
 (87) 国際公開番号 W02005/025612
 (87) 国際公開日 平成17年3月24日 (2005. 3. 24)
 (31) 優先権主張番号 0321614.0
 (32) 優先日 平成15年9月15日 (2003. 9. 15)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 Glaxo Wellcome Hous
 e, Berkeley Avenue G
 reenford, Middlesex
 UB6 ONN, Great Brita
 in
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、MUC-1発現腫瘍の治療および予防のための核酸ワクチン接種プロトコルにおいて有用な、新規核酸構築物に関する。特に該構築物は、典型的にはヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)由来である熱ショックタンパク質遺伝子HSP70とMUC-1またはその誘導体との融合体を含む。本発明はさらに、該構築物およびタンパク質を含む医薬組成物、特に粒子媒介送達に適した医薬組成物、それらを製造するための方法、ならびにそれらの医療における使用、特にMUC-1発現腫瘍の治療における使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

MUC-1発現腫瘍を認識しうる免疫応答をin vivoで惹起しうるMUC-1タンパク質またはその誘導体をコードする核酸分子であって、該核酸が熱ショックタンパク質またはその断片をさらにコードする核酸分子。

【請求項 2】

前記熱ショックタンパク質がマイコバクテリウム(Mycobacterium)由来のものである、請求項 1 記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記熱ショックタンパク質がHSP70である、請求項 1 または 2 記載の核酸分子。

10

【請求項 4】

15個未満の完全反復配列単位を持つ請求項 1 記載のMUC-1誘導体をコードする核酸分子。

【請求項 5】

完全反復配列を持たない、請求項 4 記載の核酸分子。

【請求項 6】

シグナル配列を欠く、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

以下の群：FLSFHISNL、NSSLEDPSTDYYQELQRDISEおよびNLTISDVSVからの配列を 1 つ以上コードする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

20

【請求項 8】

T-ヘルパーエピトープをコードする異種配列をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸分子であって、該分子によりコードされるタンパク質がそのC末端にMUC-1成分を有する核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸分子であって、該分子によりコードされるタンパク質がそのN末端にMUC-1成分を有する核酸分子。

【請求項 11】

30

コドン使用パターンが、高発現ヒト遺伝子のコドンの偏りにより近づくように変更されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

DNA分子である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸によりコードされるタンパク質。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のDNA分子を含むプラスミド。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の核酸または請求項 13 記載のタンパク質または請求項 14 記載のプラスミドおよび製薬上許容しうる賦形剤、希釈剤または担体を含む医薬組成物。

40

【請求項 16】

前記担体が微粒子である、請求項 15 記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記微粒子が金である、請求項 16 記載の医薬組成物。

【請求項 18】

アジュバントをさらに含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

医療に使用するための、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 13 記載

50

のタンパク質、請求項 1 4 記載のプラスミド、または請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

MUC-1発現腫瘍の治療または予防のための医薬品の調製における、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の核酸または請求項 1 3 記載のタンパクまたは請求項 1 4 記載のプラスミドの使用。

【請求項 2 1】

安全かつ有効な量の、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の核酸、請求項 1 2 記載のタンパク質、または請求項 1 4 記載のプラスミドを投与することを含む、腫瘍を治療または予防する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、MUC-1発現腫瘍の治療および予防のための核酸ワクチン接種プロトコルにおいて有用な、新規核酸構築物に関する。特に、本発明はさらに、かかる構築物によりコードされる新規タンパク質に関係する。特に該構築物は、典型的にはヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)由来である熱ショックタンパク質遺伝子HSP70とMUC-1またはその誘導体との融合体を含む。本発明はさらに、該構築物およびタンパク質を含む医薬組成物、特に粒子媒介送達 (particle mediated delivery) に適した医薬組成物、それらを製造するための方法、ならびにそれらの医療、特にMUC-1発現腫瘍の治療における使用を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

上皮細胞ムチンMUC-1(エプシアリンまたは多型上皮ムチン、すなわちPEMとしても知られている)は、多くの上皮細胞上で発現される高分子量糖タンパク質である。該タンパク質は、細胞質尾部、膜貫通ドメイン、ならびにプロリン、セリンおよびトレオニン残基を高い割合で含む20アミノ酸のモチーフ(本明細書中ではVNTRモノマーと呼ぶが、VNTRエピトープまたはVNTR反復配列としても知られている)の可変数の縦列反復配列で構成されている。その反復配列の数は、MUC-1遺伝子座における遺伝的多型によって変動するが、30 ~ 100の範囲内にあることが最も多い(Swallowら、1987, *Nature* 328:82-84)。正常な管上皮では、MUC-1タンパク質は、導管腔に曝されているこの細胞の先端表面上にのみ見出される(Grahamら、1996, *Cancer Immunol Immunother* 42:71-80; Barratt-Boyesら、1996, *Cancer Immunol Immunother* 43:142-151)。MUC-1分子の最も顕著な特徴の1つは、その広範なO結合型グリコシル化である。各MUC-1 VNTRモノマー内に、利用可能なO結合型グリコシル化部位が5箇所存在する。

【0 0 0 3】

VNTRは、典型的すなわち完全な反復配列、および完全な反復配列にその20個のアミノ酸中に2~3箇所の違いを含むわずかな変更を有する不完全な(非典型的)反復配列として特徴付けることができる。以下は完全な反復配列の配列である。

【0 0 0 4】

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	P	<u>D</u>	<u>T</u>	R	P	A	P	G	S	T	A	P	<u>P</u>	A	H	G	V	T	S
				E		S							T						
													A						
													Q						

【0 0 0 5】

下線を引いたアミノ酸は、その下に示すアミノ酸残基に置換されていてもよい。

【0006】

不完全反復配列は、前記共通配列に対して異なるアミノ酸置換を有するものの、アミノ酸レベルで55～90%の同一性を示す。置換部位に下線を引いた4つの不完全反復配列を以下に示す。

APDTRPAPGSTAPPAHGVTS - 完全反復配列

APATEPASGSAATWGQDVTS - 不完全反復配列1

VPVTRPALGSTTPPAHDVTS - 不完全反復配列2

APDNKPAPGSTAPPAHGVTS - 不完全反復配列3

APDNRPALGSTAPPVHNVTS - 不完全反復配列4

10

【0007】

野生型の不完全反復配列 - Muc-1は、完全反復配列領域に隣接している。これらの上皮細胞の悪性形質転換により生じる悪性癌腫では、幾つかの変化がMUC-1の発現に影響を及ぼす。タンパク質の極性発現が失われており、該タンパク質は形質転換細胞の表面全体にわたって見出される。MUC-1の総量も増加し、しばしば10倍以上になる(Strous & Dekker, 1992, Crit Rev Biochem Mol Biol 27:57-92)。最も注目すべきは、O結合型糖鎖の量および質が著しく変化することである。グリコシル化されるセリンおよびトレオニン残基が減る。見出されるそれらの糖鎖は異常に短くなっており、これが腫瘍関連糖鎖抗原STnを生み出す(Lloydら、1996, J Biol Chem, 271:33325-33334)。これらのグリコシル化変化の結果として、予め糖鎖により選別しておいたMUC-1ペプチド鎖上の種々のエピトープが利用可能となる。このように利用可能となるあるエピトープは、各々20個のアミノ酸からなるVNTR完全モノマー中に存在する配列APDTR(Ala 8～Arg 12)によって形成されている(Burchellら、1989, Int J Cancer 44:691-696)。

20

【0008】

MUC-1におけるこれらの変化が、腫瘍上に発現された前記形態のMUC-1に対する免疫系を活性化しうるワクチンが上皮細胞性腫瘍、さらにはMUC-1が見出される他の細胞型(例えば、T細胞リンパ球)に対して有効でありうることを意味することは明らかである。異常タンパク質を発現する細胞を死滅させるために免疫系で利用される主なエフェクター機構のうちの1つは細胞傷害性Tリンパ球免疫応答(CTL's)であり、この応答は、抗体応答と同様に、腫瘍を治療するためのワクチンにおいて望ましい。優れたワクチンは、免疫応答の全ての系統を活性化する。しかし、TheratopeまたはBLP25(Biomira Inc, Edmonton, Canada)などの現在の糖鎖ワクチンおよびペプチドワクチンは免疫応答の1系統(それぞれ体液性および細胞性応答)を優先的に活性化するので、よりバランスのとれた応答を引き出すためにより優れたワクチンの設計が望まれる。

30

【0009】

核酸ワクチンは、それらを大量に製造することが容易であるという点で、従来のタンパク質ワクチン接種に比べて数多くの利点を持つ。少量投与しただけでもそれらが強い免疫応答を誘導することが報告されており、またそれらは抗体応答だけでなく細胞傷害性Tリンパ球免疫応答も誘導することができる。

【0010】

熱ショックタンパク質(HSP)は、より一般的にはストレスタンパク質として知られるタンパク質群のメンバーであり、細胞の生存に不可欠な多くの機能を持っている。それらは、多様なタンパク質およびペプチドと相互作用するそれらの能力を介して、生得的および適応的免疫応答の両方に関与する。HSPは広く保存されており、原生動物である熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)、大腸菌(*E.coli*)などの細菌、マイコバクテリア(*Mycobacteria*)および高等生物といった多様な生物中に存在している。細菌では、主なストレスタンパク質はHSP60およびHSP70であり、これらはストレスを受けた細胞中に非常に高濃度で(最高で25%まで)蓄積されるが、通常的环境では細胞タンパク質の5%未満を占める。HSPは10種のファミリーのうちの1つに分類することが可能であり、各ファミリーは1～5個のごく近縁なメンバーで構成されている(詳しい総説については、Srivastava, Natu

40

50

re Reviews Immunology (2002) 2:185-194を参照されたい)。主なHSPファミリーの一部としては、HSP60群(HSP60、HSP65、GROEL)、HSP70群(DNAK/HSP70、HSP72/73/110、GRP78/170)、HSP90群(gp96、HSP86、HTPG、HSC84)および低分子量HSP群(HSP10/16/20/25/26/27、GROES、クリスタリン)が挙げられる。

【0011】

米国特許第6,335,183号には、細菌のストレスタンパク質を利用することにより個々の免疫応答をモジュレートする方法が開示されている。かかるストレスタンパク質とHIV gagとを含む融合組成物について言及されている。

【特許文献1】米国特許第6,335,183号

【非特許文献1】Grahamら、1996, Cancer Immunol Immunother 42:71-80

10

【非特許文献2】Barratt-Boyesら、1996, Cancer Immunol Immunother 43:142-151

【非特許文献3】Strous & Dekker, 1992, Crit Rev Biochem Mol Biol 27:57-92

【非特許文献4】Lloydら、1996, J Biol Chem, 271:33325-33334

【非特許文献5】Burchellら、1989, Int J Cancer 44:691-696

【発明の開示】

【0012】

発明の概要

本発明は、MUC-1発現腫瘍を認識しうる免疫応答をin vivoで惹起しうるMUC-1タンパク質または誘導体をコードする核酸分子であって、該分子がMUC-1成分に対する免疫応答を修飾しうる熱ショックタンパク質(HSP)またはその断片をさらにコードする核酸分子を提供する。該断片がHSPのATPアーゼドメイン由来のドメインIIを含有していることが好ましい。

20

【0013】

1つの実施形態では、核酸は、反復配列(完全および不完全なもの)単位を欠いた上記MUC-1誘導体をコードする。

【0014】

ある代替実施形態では、核酸配列は完全反復配列のみを欠く。さらに別の実施形態では、核酸構築物は1~15個の完全反復配列、好ましくは7個の完全反復配列を含有する。

【0015】

本発明のある実施形態では、MUC-1誘導体は、野生型MUC-1のコドンを変更したものであってもよい。特に、より好適な実施形態の非完全反復配列領域は、非完全反復配列領域に対して少なくとも0.65%でありかつ80%未満の同一性を示すRSCU(同義コドン相対使用頻度またはコード指数(Codin Index: CI)を持つ。

30

【0016】

かかる構築物は、MUC-1発現腫瘍細胞を認識する細胞性応答および抗体応答の両方を惹起することができる。HSPに融合することで、MUC-1に対する免疫応答の動態および機能性が改善される。

【0017】

前記構築物には、低グリコシル化変異体などの変更された反復配列(VNTR単位)をさらに含有させることができる。組込みうる外来T細胞エпитープとしては、細菌のタンパク質および毒素ならびにウイルス供給源などに由来するT-ヘルパーエпитープ、例えばジフテリア(Diphtheria)または破傷風(Tetanus)由来のT-ヘルパーエпитープ、例えばP2およびP30、またはB型肝炎抗原由来のエピトープが挙げられる。これらを本発明のMUC-1構築物の内部または一方の末端に組み込んでもよい。

40

【0018】

熱ショックタンパク質は、典型的には細菌性であり、典型的には大腸菌(E.coli)またはマイコバクテリウム(Mycobacterium)のタンパク質、好ましくはHSP70、より好ましくはヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)由来のHSP70である。HSP70群のメンバーとしては、DNAK.HSP70、HSP72/73/110、GRP78/170が挙げられる。本発明で使用することが意図される他のHSPタンパク質としては、HSP60群(HSP60、HSP65 GROEL)、HSP90群および小HSP

50

群からのものが挙げられる。

【0019】

本発明のさらなる態様では、核酸配列はプラスミド形態のDNA配列である。好ましくは、該プラスミドはスーパーコイル状である。

【0020】

本発明のヌクレオチド分子によりコードされるタンパク質は、新規であり、かつ本発明の1態様を成す。

【0021】

本発明のさらなる態様では、本明細書中に記載した核酸配列またはタンパク質と製薬上許容しうる賦形剤、希釈剤または担体とを含む医薬組成物を提供する。

10

【0022】

好ましくは、核酸投与の場合、前記担体は金ビーズであり、また前記医薬組成物は粒子媒介薬物送達による送達に適している。

【0023】

さらに別の実施形態では、本発明は、医療に使用するための医薬組成物および核酸構築物を提供する。特に、MUC-1発現腫瘍の治療または予防に使用するための医薬品の製造における、本発明の核酸構築物を提供する。

【0024】

本発明はさらに、安全かつ有効な量の本明細書中に記載の核酸またはタンパク質組成物を投与することによりMUC-1発現腫瘍、特に乳癌、肺癌(特に非小細胞肺癌)、前立腺癌、胃癌および他のGI(消化器)癌に罹患しているかまたは罹患しやすい患者を治療する方法を提供する。

20

【0025】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸構築物、プラスミドまたはタンパク質を製薬上許容しうる賦形剤、希釈剤または担体と混合することにより本明細書中に記載の医薬組成物を製造する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

発明の詳細な説明

本発明は、MUC-1発現腫瘍を認識しうるMUC-1タンパク質またはその誘導体をコードする核酸分子であって、その配列がMUC-1成分に対する免疫応答を改変しうる熱ショックタンパク質またはその断片をさらにコードする核酸分子を提供する。

30

【0027】

好ましくは、その熱ショックタンパク質は、マイコバクテリウム(Mycobacterium)、典型的にはヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)に由来するHSP、より典型的にはヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)のHSP70である。

【0028】

HSP70をMUC-1分子のいずれの末端に融合してもよいが、MUC-1成分がC末端側にある方がこのタンパク質がより安定するので好ましい。その構築物がMUC-1シグナル配列を含むのであれば、これをHSPのN末端に配置すればよい。

40

【0029】

MUC-1成分は全長野生型遺伝子を含んでいてもよいが、15VNTR単位未満の短い誘導体を使用の方が好ましい。

【0030】

野生型MUC-1分子はシグナル配列、リーダー配列、不完全または非典型的VNTR、完全VNTR領域、追加の非典型的VNTR、非VNTR細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含有する。

【0031】

非VNTR細胞外ドメインは、VNTRの5'側にある約80個のアミノ酸とVNTRの3'側にある190~200個のアミノ酸である。本発明の構築物はいずれも、この領域に由来する少なくとも1

50

つのエピトープを含む。1つのエピトープは、典型的には少なくとも7個のアミノ酸から形成される。従って、本発明の構築物は、非VNTR細胞外ドメインに由来する少なくとも1つのエピトープを含む。好ましくは実質的に全て、またはより好ましくは全ての非VNTRドメインが含まれる。構築物が、次の配列：FLSFHISNL、NSSLEDPSTDYYQELQRDISE、またはNLTI SDVSVにより構成されるエピトープを含有することが特に好ましい。2つ、好ましくは3つ全てのエピトープ配列を構築物中に組み入れることがより好ましい。

【0032】

好適な実施形態では、前記構築物はN末端リーダー配列を含む。シグナル配列、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインは、全て別々に存在または欠失していてもよい。存在するのであれば、これらの領域は全て改変されていることが好ましい。

10

【0033】

本発明による好適な構築物は、

- 1) HSP70 - MUC-1 (すなわち、完全反復配列を含まない全長MUC-1)
- 2) HSP70 - MUC-1 ss (1と同様であるが、シグナル配列を欠く)
- 3) HSP70 - MUC-1 TM CYT (1と同様であるが、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠く)
- 4) HSP70 - MUC-1 ss TM CYT (3と同様であるが、シグナル配列を欠く)

である。

【0034】

同様に好適なのは、上記1～4と等価であるが不完全MUC-1反復配列単位を欠く構築物である。かかる構築物をHSP-gutted-MUC-1と呼ぶ。

20

ある実施形態では、グリコシル化部位を変更することにより1つ以上の不完全VNTR単位を変異させて、グリコシル化が生じる可能性を低くする。この変異は、好ましくは置換であるが、挿入または欠失であってもよい。典型的には、少なくとも1つのトレオニンまたはセリンをバリン、イソロイシン、アラニン、アスパラギン、フェニルアラニンまたはトリプトファンで置換する。従って、少なくとも1つ、好ましくは2つまたは3つ以上を上記アミノ酸で置換することが好ましい。

【0035】

他の好適な構築物は、上記構築物と等価であるが、1～15個、好ましくは2～8個、最も好ましくは7個のVNTR(完全)反復配列単位を含む構築物である。

30

【0036】

さらなる実施形態では、前記のgutted MUC-1核酸に、そのリーダー配列と細胞外ドメインとの接合部位にて制限部位を与える。典型的には、この制限部位はNheI部位である。これをクローニング部位として利用することにより、例えば、グリコシル化変異体(すなわち、VNTR領域を変異させて0-グリコシル化部位を除去したもの)を含む他のペプチドをコードする配列、あるいは破傷風毒素由来のP2もしくはP30などのT-ヘルパーエピトープまたは野生型VNTR単位をコードする異種配列を挿入することができる。

【0037】

DNA暗号には4種の文字(A、T、CおよびG)があり、これらを用いてアミノ酸を表す3文字の「コドン」を綴る。すなわち、タンパク質は生物の遺伝子中に暗号化されている。直鎖状のコドン配列は、そのDNA分子に沿って、それらの遺伝子によりコードされるタンパク質中の直鎖状のアミノ酸配列へと翻訳される。暗号は高度に縮重していて、61種のコドンが20種の天然アミノ酸をコードし、また3種のコドンが「終結」シグナルを表している。従って、大部分のアミノ酸は2種以上のコドンによってコードされている。現に、幾つかのアミノ酸は4種以上の異なるコドンによってコードされている。

40

【0038】

所与のアミノ酸をコードするために2種以上のコドンを利用しうる場合、生物のコドン使用パターンは極めて非無作為的である。異なる種はそれらのコドン選択時に異なる偏りを示し、さらには単一種においても、高および低レベルで発現される遺伝子間ではコドンの利用状況が明らかに異なる場合がある。この偏りはウイルス、植物、細菌および哺乳動

50

物の細胞で異なっており、一部の種は他の種と比べて無作為コドン選択とは言えない程強い偏りを示す。例えば、ヒトおよび他の哺乳動物は、ある種の細菌またはウイルスほど強い偏りを示さない。このような理由から、大腸菌(E.coli)で発現される哺乳動物の遺伝子または哺乳動物細胞で発現されるウイルスの遺伝子は、効率的な発現にとって不適当なコドン分布を持つ可能性が非常に高い。発現が生じるはずの宿主では滅多に見られないコドンクラスターが異種DNA配列に存在することは、該宿主における異種発現レベルが低いことを予め示すものであると考えられている。

【0039】

結論としては、特定の原核生物宿主(例えば、大腸菌(E.coli)もしくは酵母)または真核生物宿主が好むコドンを、同一タンパク質をコードするが野生型配列とは異なるように改変すればよい。このコドン改変プロセスは、天然配列のコドンの一部または全部が改変されている、手作業またはコンピュータソフトウェアにより作成した配列を含んでいてもよい。幾つかの方法が公開されている(Nakamuraら、Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215; 国際公開第98/34640号)。この発明による1つの好適な方法は、Syngene法、すなわちCalcgene法の変法(R.S.HaleおよびG Thompson (Protein Expression and Purification Vol. 12 pp.185-188 (1998)))である。

【0040】

このコドン改変プロセスは、以下：1)殆どまたは余り使用されないコドンをより頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって遺伝子産物の発現を改善すること、2)制限酵素部位を除去するかまたは含めることにより下流のクローニングを容易にすること、3)DNAベクター中の挿入配列とゲノム配列との間で相同的組換えが生じる可能性を低くすること、および4)ヒトにおける免疫応答を改善すること、の利点を一部または全て備えうる。都合の良いことに、本発明の配列は、組換えが生じる可能性は低いが野生型配列と少なくとも同じレベルまで発現される。コドン改変配列を作成するためにSynGeneプログラムで使用するアルゴリズムの性質により、よく似た役割を果たす極めて多くの異なるコドン改変配列を作成することができる。簡単に言うと、統計的手法を用いてコドンを割り当てることにより、 α -アクチンなどの高発現ヒト遺伝子に本来見られるコドン頻度に近い頻度を持つ合成遺伝子を得る。

【0041】

本発明のある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、そのコドン使用パターンが、MUC-1に典型的なものから、標的とする高発現ヒト遺伝子のコドンの偏りにより近くなるように変更されている。「コドン使用係数(codon usage coefficient)」は、所与のポリヌクレオチド配列のコドンパターンが標的種のもものとどれ程よく似ているかを示す尺度である。コドン出現頻度は、多くの種の高発現遺伝子に関する文献資料から導き出すことができる(例えば、Nakamuraら、Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215を参照されたい)。61種のコドン各々のコドン出現頻度(選択した遺伝子群の1000個のコドンあたりに出現するその出現回数として表される)を20種の天然アミノ酸各々に対して標準化することにより、各アミノ酸に対して最も頻繁に使用されるコドンの値を1とし、また余り一般的ではないコドンの頻度は0~1となるように縮小する。このようにして、標的種の高発現遺伝子に対して、61種のコドン各々に1以下の値を割り当てる。具体的なポリヌクレオチドについてコドン使用係数を算出する場合は、標的種の高発現遺伝子に対して、この具体的なポリヌクレオチドの各コドンの縮小値に注目し、これらの値全ての幾何平均をとる(これらの値の自然対数の合計をコドンの総数で割って真数をとる)。この係数は0~1の値をとり、該係数が大きいほど、該ポリヌクレオチド中のより多くのコドンが頻繁に使用されていることになる。ポリヌクレオチド配列がコドン使用係数1を持つ場合は、その全てのコドンが標的種の高発現遺伝子について「最も頻繁に使用される」コドンである。

【0042】

本発明によれば、ポリヌクレオチドのコドン使用パターンは、好ましくは特定のアミノ酸に対して使用されるコドンのうち10%に満たないコドンを除外する。同義コドン相対使用頻度(RSCU)値は、観察されるコドンの数を、あるアミノ酸に対して全てのコドンが同じ

10

20

30

40

50

頻度で使用されると考えた場合に期待される数で割ったものである。本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、標的生物の高発現遺伝子において0.2未満のRSCU値を示すコドンを含まない。本発明のポリヌクレオチドは、高発現ヒト遺伝子に対して、通常は0.6より高く、好ましくは0.65より高く、最も好ましくは0.7より高いコドン使用係数を持つ。ヒトのコドン使用頻度表はGenBankで入手することもできる。

【0043】

比較すると、高発現 アクチン遺伝子は0.747というRSCUを持つ。

【0044】

ホモサピエンスのコドン使用頻度表を以下に示す：

ヒト(高発現)遺伝子のコドン使用頻度1/24/91(human_high.cod)

アミノ酸	コドン	数	/1000	比率	..	
Gly	GGG	905.00	18.76	0.24		
Gly	GGA	525.00	10.88	0.14		
Gly	GGT	441.00	9.14	0.12		
Gly	GGC	1867.00	38.70	0.50		
Glu	GAG	2420.00	50.16	0.75		
Glu	GAA	792.00	16.42	0.25		
Asp	GAT	592.00	12.27	0.25		
Asp	GAC	1821.00	37.75	0.75		20
Val	GTG	1866.00	38.68	0.64		
Val	GTA	134.00	2.78	0.05		
Val	GTT	198.00	4.10	0.07		
Val	GTC	728.00	15.09	0.25		
Ala	GCG	652.00	13.51	0.17		
Ala	GCA	488.00	10.12	0.13		
Ala	GCT	654.00	13.56	0.17		
Ala	GCC	2057.00	42.64	0.53		30
Arg	AGG	512.00	10.61	0.18		
Arg	AGA	298.00	6.18	0.10		
Ser	AGT	354.00	7.34	0.10		
Ser	AGC	1171.00	24.27	0.34		
Lys	AAG	2117.00	43.88	0.82		
Lys	AAA	471.00	9.76	0.18		
Asn	AAT	314.00	6.51	0.22		
Asn	AAC	1120.00	23.22	0.78		40
Met	ATG	1077.00	22.32	1.00		
Ile	ATA	88.00	1.82	0.05		
Ile	ATT	315.00	6.53	0.18		
Ile	ATC	1369.00	28.38	0.77		
Thr	ACG	405.00	8.40	0.15		
Thr	ACA	373.00	7.73	0.14		
Thr	ACT	358.00	7.42	0.14		
Thr	ACC	1502.00	31.13	0.57		50

Trp	TGG	652.00	13.51	1.00	
End	TGA	109.00	2.26	0.55	
Cys	TGT	325.00	6.74	0.32	
Cys	TGC	706.00	14.63	0.68	
End	TAG	42.00	0.87	0.21	
End	TAA	46.00	0.95	0.23	
Tyr	TAT	360.00	7.46	0.26	
Tyr	TAC	1042.00	21.60	0.74	10
Leu	TTG	313.00	6.49	0.06	
Leu	TTA	76.00	1.58	0.02	
Phe	TTT	336.00	6.96	0.20	
Phe	TTC	1377.00	28.54	0.80	
Ser	TCG	325.00	6.74	0.09	
Ser	TCA	165.00	3.42	0.05	
Ser	TCT	450.00	9.33	0.13	
Ser	TCC	958.00	19.86	0.28	20
Arg	CGG	611.00	12.67	0.21	
Arg	CGA	183.00	3.79	0.06	
Arg	CGT	210.00	4.35	0.07	
Arg	CGC	1086.00	22.51	0.37	
Gln	CAG	2020.00	41.87	0.88	
Gln	CAA	283.00	5.87	0.12	
His	CAT	234.00	4.85	0.21	
His	CAC	870.00	18.03	0.79	30
Leu	CTG	2884.00	59.78	0.58	
Leu	CTA	166.00	3.44	0.03	
Leu	CTT	238.00	4.93	0.05	
Leu	CTC	1276.00	26.45	0.26	
Pro	CCG	482.00	9.99	0.17	
Pro	CCA	456.00	9.45	0.16	
Pro	CCT	568.00	11.77	0.19	
Pro	CCC	1410.00	29.23	0.48	40

【 0 0 4 5 】

従って、好適な実施形態では、本発明のポリヌクレオチドを改変することにより、アクチンなどの高発現ヒト遺伝子の使用頻度にさらに似せる。

【 0 0 4 6 】

MUC-1成分の非VNTR単位はコドン改変されていることが好ましい。VNTR単位が存在する場合、該VNTR単位は改変されていなくてもよい。コドン改変配列は、好ましくはその80%未満がMuc-1の対応する非VNTR単位と同一である。HSP成分を改変することもできるが、その必要は無い。

【 0 0 4 7 】

ポリヌクレオチド配列同士を比較する場合、後述するように、最大級の一致が得られる 50

ようにアラインメントしたときに2つの配列中のヌクレオチド配列が同一であれば、その2つの配列は「同一である」という。

【0048】

2配列間の比較は、典型的には、これらの配列を比較ウィンドウの範囲で比較し、配列類似性を有する局所領域を特定かつ比較することによって実施する。本明細書で使用する「比較ウィンドウ」とは、少なくとも約20、通常は30～約75、40～約50の連続した位置からなるセグメントを指しており、該セグメント内で、ある配列と、同数の連続した位置を有する参照配列とが、これら2配列が最適にアラインメントされてから比較されうる。

【0049】

従って本発明では、コドン改変された非反復領域と非反復領域との間の比較のための最適な配列アラインメントは、SmithおよびWaterman (1981) Add. APL. Math 2:482の局所同一性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の同一性アラインメントアルゴリズムにより、PearsonおよびLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索法により、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetic sソフトウェアパッケージ(Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)に含まれるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)のコンピュータによる実行により、または目視検査により、行うことができる。

【0050】

配列同一性%および配列類似性%を決定するのに適したアルゴリズムの好適な1例はBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschulら(1977) Nucl. Acid s Res. 25:3389-3402およびAltschulら(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0を、例えば、本明細書中に記載したパラメータと共に使用することにより、本発明のポリヌクレオチドの配列同一性%を決定することができる。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、米国バイオテクノロジー情報センターを通じて公的に入手することができる。

【0051】

本発明のさらなる態様によれば、本発明によるポリヌクレオチド配列を含み、かつその発現を誘導しうる発現ベクターが提供される。該ベクターは、細菌、昆虫または哺乳動物の細胞、特にヒト細胞における異種DNAの発現を駆動するのに適しうる。

【0052】

本発明のさらなる態様によれば、本発明によるポリヌクレオチド配列、または本発明による発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。宿主細胞は、細菌(例えば大腸菌(E.coli))、哺乳動物(例えばヒト)の細胞であってもよいし、昆虫細胞であってもよい。本発明によるベクターを含む哺乳動物細胞は、in vitroでトランスフェクトされた培養細胞であってもよいし、該哺乳動物に該ベクターを投与することによりin vivoでトランスフェクトされたものであってもよい。

【0053】

本発明のヌクレオチドによりコードされるタンパク質もまた本発明の一部に含める。本発明はさらに、本発明によるポリヌクレオチド配列を含む医薬組成物を提供する。好ましくは、該組成物はDNAベクターを含む。好適な実施形態では、該組成物は、本明細書中に記載のMUC-1アミノ酸配列をコードする配列である本発明のポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含むDNAでコーティングした、複数の粒子、好ましくは金粒子を含む。代替実施形態では、該組成物は、製薬上許容しうる賦形剤および本発明によるDNAベクターを含む。

【0054】

あるいは、医薬組成物は、本発明のタンパク質および製薬上許容しうる賦形剤を含む。該組成物はさらにアジュバントを含んでもよいし、または該組成物をアジュバントもしくは免疫刺激薬とともに同時もしくは連続的に投与してもよい。

【0055】

従って、本発明のヌクレオチド、ベクターまたはタンパク質をアジュバントまたは免疫

10

20

30

40

50

賦活薬と共に利用することは、本発明の1実施形態である。核酸投与の場合は免疫賦活薬を本発明の核酸ベクターと同時に投与することが好ましく、また好適な実施形態ではこれらと一緒に製剤化する。かかる免疫賦活薬としては(このリストは決して網羅的なものではなく、他の薬剤を除外するものでもないが)、イミキモド(imiquimod)[S-26308, R-837]、(Harrisonら、'Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a Oligoproteins vaccine', Vaccine 19: 1820-1826, (2001))およびレシキモド(resiquimod)[S-28463, R-848] (Vasilakosら、'Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN', Cellular immunology 204: 64-74 (2000).)などの合成イミダゾキノリン、ツカレソール(tucareol)(Rhodes, J.ら、'Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs', Nature 377: 71-75 (1995))などの抗原提示細胞およびT細胞表面上に構成的に発現されるカルボニルおよびアミンの Schiff 塩基、サイトカイン、ケモカインならびにタンパク質もしくはペプチドである共刺激分子が挙げられ、これには前炎症性サイトカイン(例えば、インターフェロン、特定のインターフェロン、GM-CSF、IL-1、IL-1、TGF- β およびTGF- β)、Th1インデューサー(例えば、インターフェロン、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18およびIL-21)、Th2インデューサー(例えば、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10およびIL-13)ならびに他のケモカインおよび共刺激遺伝子(例えば、MCP-1、MIP-1、MIP-1、RANTES、TCA-3、CD80、CD86およびCD40L)、他の免疫刺激標的化リガンド(例えば、CTLA-4およびL-セレクトリン)、アポトーシス刺激タンパク質およびペプチド(例えば、Fas(49))、合成脂質ベースのアジュバント(例えば、ヴァクスフェクチン(vaxfectin)(Reyesら、'Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization', Vaccine 19: 3778-3786)、スクアレニン、 α -トコフェロール、ポリソルベート80、DOPCおよびコレステロール)、内毒素[LPS], Beutler, B., 'Endotoxin, 'Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity', Current Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000))、CpGオリゴ-およびジ-ヌクレオチド(Sato, Y.ら、'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization', Science 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H.ら、'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', Nature 408: 740-745, (2000)、ならびにToll受容体を刺激してTh1-誘導サイトカインを産生させる他の潜在リガンド(例えば、合成マイコバクテリアリポタンパク質、マイコバクテリアタンパク質p19、ペプチドグリカン、テイコ酸およびリピドA)が含まれる。コレラ毒素、大腸菌(E.coli)毒素およびその変異類毒素などの他の細菌性免疫賦活タンパク質を利用することもできる。

【0056】

タンパク質抗原に対してTh1優勢型応答を引き出す特定の好適なアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピドA、または好ましくは3-デ-0-アシル化モノホスホリルリピドAなどのリピドA誘導体が挙げられる。MPL(登録商標)アジュバントは、Corixa Corporation(Seattle, WA; 例えば、米国特許第4,436,727号、第4,877,611号、第4,866,034号および第4,912,094号を参照されたい)から入手できる。CpG含有オリゴヌクレオチド(そのCpGジヌクレオチドはメチル化されていない)もまた、Th1優勢型応答を誘導する。かかるオリゴヌクレオチドは周知であり、例えば、国際公開第96/02555号、国際公開第99/33488号ならびに米国特許第6,008,200号および第5,856,462号に記載されている。免疫賦活性DNA配列もまた、例えば、Satoら(Science 273:352, 1996)により記載されている。別の好適なアジュバントとしては、Quil A、もしくはQS21およびQS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)などのその誘導體、エスシン(Escin)、ジギトニン、またはカスミソウ属(Gypsophila)もしくはキノア(Chenopodium quinoa)のサポニンといった、サポニンが挙げられる。

【0057】

MUC-1発現腫瘍または転移の治療または予防における、本発明のポリヌクレオチドの使用または本発明のベクターの使用もまた提供される。

【0058】

本発明はさらに、有効量の本発明によるポリヌクレオチド、ベクターまたは医薬組成物を投与することを含む、MUC-1発現腫瘍、これに伴う何らかの症状または疾患(例えば、転移)を治療または予防する方法も提供する。医薬組成物の投与は、例えば「一次免疫 - 追加免疫」の治療的ワクチン接種計画においては、1回以上の個別投与という形をとることができる。ある場合には、「一次」ワクチン接種は、好ましくはプラスミド由来のベクター中に組み入れた本発明によるポリヌクレオチドの粒子媒介DNA送達によるものでよく、また「追加免疫」は同一ポリヌクレオチド配列を含む組換えウイルスベクターの投与によるものであっても、アジュバント中の本発明のタンパク質を用いた追加免疫によるものであってもよい。逆に、一次免疫がウイルスベクターまたはタンパク質製剤(典型的には、アジュバント中に製剤化したタンパク質)によるものであり、また追加免疫が本発明のDNAワクチンによるものであってもよい。

10

【0059】

上記の通り、本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含む発現ベクターを包含する。かかる発現ベクターは分子生物学の分野で日常的に構築されており、例えば、プラスミドDNAと、タンパク質を発現させるために必要である場合がありかつ正しい向きに配置される適切なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー、および例えばポリアデニル化シグナルなどの他のエレメントとの使用を含みうる。他の適切なベクターは、当業者には自明であろう。この点に関するさらなる具体例として、本発明者らはSambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 第2版、CSH Laboratory Press, (1989)を参照する。

20

【0060】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチド、または本発明でのベクター中での使用は、宿主細胞によるコード配列の発現をもたらす制御配列に、機能しうる形で連結されている。すなわち、該ベクターは発現ベクターである。「機能しうる形で連結されている(operably linked)」という用語は、記載された成分同士が、それらの意図された様式で機能することが可能な関係にある並置状態を指す。コード配列に「機能しうる形で連結されている」プロモーターなどの調節配列は、該コード配列の発現が該調節配列に適合する条件下で達成されるように配置されている。

【0061】

ベクターは、例えば、複製起点、任意でポリヌクレオチド発現用のプロモーター、および任意で該プロモーターのレギュレーターを備えた、プラスミド、人工染色体(例えば、BAC、PAC、YAC)、ウイルスまたはファージベクターとすることができる。該ベクターは、1つ以上の選択マーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合はアンピシリンもしくはカナマイシン耐性遺伝子、または真菌ベクターの場合は耐性遺伝子を含有していてもよい。ベクターを、例えばDNAもしくはRNAの産生を目的としてin vitroで使用してもよく、または例えば該ベクターによりコードされるタンパク質の産生を目的として宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)をトランスフェクトもしくは形質転換するために使用してもよい。また該ベクターは、in vivoで、例えばDNAワクチン接種または遺伝子療法の方法で使用するのに適合させたものであってもよい。

30

【0062】

プロモーターおよび他の発現調節シグナルは、その中で発現が予定されている宿主細胞に適合するように選択することができる。例えば、哺乳動物のプロモーターとしては、カドミウムなどの重金属に応じて誘導されうるメタロチオネインプロモーター、およびアクチンプロモーターが挙げられる。SV40ラージT抗原プロモーターなどのウイルスプロモーター、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期(IE)プロモーター、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルスプロモーター、またはHPVプロモーター、特にHPV上流調節領域(URR)を使用してもよい。これらのプロモーターは全て十分に記載されており、当分野では容易に入手することができる。

40

【0063】

好適なプロモーターエレメントは、イントロンAを欠くがエキソン1を含むCMV前初期プロモーターである。従って、HCMV IE初期プロモーターの制御下で本発明のポリヌクレオ

50

チドを含むベクターが提供される。

【0064】

適切なウイルスベクターの具体例としては、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアまたは γ -ウイルスベクター、ならびにレンチウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスを含むレトロウイルスが挙げられる。これらのウイルスを利用する遺伝子導入技術は当業者に公知である。例えば、レトロウイルスベクターを使用することにより本発明のポリヌクレオチドを宿主ゲノム内に安定に組み込むことができるが、かかる組換えは好ましくない。一方、複製欠損アデノウイルスベクターはエピソームのままであるため、一過性発現が可能となる。昆虫細胞(例えば、バキュロウイルスベクター)、ヒト細胞または細菌で発現を駆動しうるベクターを使用して、例えばサブユニット・ワクチンとして、またはイムノアッセイで使用するための、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるHIVタンパク質を多量に産生させてもよい。全長ワクシニア構築物を作成するためのこれまでの試みは失敗に終わっているため、本発明のポリヌクレオチドはウイルスワクチンにおいて特に有用である。

10

【0065】

弱毒化したサルモネラ菌(*Salmonella*)またはリステリア菌(*Listeria*)などの細菌ベクターを使用してもよい。本発明によるポリヌクレオチドは、*in vitro*、*in vivo*または*ex vivo*で引き起こすことが可能な発現によるコードタンパク質の産生において有用である。このため、該ヌクレオチドを、例えば収率を上げるために組換えタンパク質合成に用いることもできる。または実際にDNAワクチン接種技術に利用される治療薬としてのそれら単独での用途を見出すこともできる。本発明のポリヌクレオチドをコードタンパク質の*in vitro*または*ex vivo*での産生に使用する場合は、例えば細胞培養物中の細胞を改変して、発現させようとするポリヌクレオチドを含有させる。かかる細胞としては、一過性の、または好ましくは安定した哺乳動物細胞系が挙げられる。本発明のポリペプチドをコードするベクターの挿入により改変しうる細胞の具体例としては、哺乳動物のHEK293T、CHO、HeLa、293およびCOS細胞が挙げられる。好ましくは、選択される細胞系は、安定しているだけでなく、ポリペプチドの成熟グリコシル化と細胞表面発現をも可能とする細胞系である。発現は、形質転換した卵母細胞において達成してもよい。ポリペプチドは、トランスジェニック非ヒト動物(好ましくはマウス)の細胞で、本発明のポリヌクレオチドから発現させてもよい。本発明のポリヌクレオチドからポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト動物は、本発明の範囲に含まれる。

20

30

【0066】

本発明はさらに、哺乳動物被験体に有効量のかかるワクチンまたはワクチン組成物を投与することを含む、該哺乳動物被験体にワクチン接種する方法を提供する。最も好ましくは、DNAワクチン、ワクチン組成物および免疫療法薬に使用するための発現ベクターは、プラスミドベクターである。

【0067】

DNAワクチンは、「裸のDNA(naked DNA)」の形で、例えば、注射器または高圧噴流を利用して投与される液体製剤として、またはリポソームもしくは刺激性トランスフェクションエンハンサーと共に製剤化したDNAとして、または粒子媒介DNA送達(PMDD)により、投与してもよい。これらの送達系はいずれも当分野で周知である。ベクターは、例えばウイルスベクター送達系により哺乳動物に導入してもよい。

40

【0068】

本発明の組成物は、筋内、皮下、腹腔内、静脈内経路といった多くの経路により、または粘膜経路(例えば、鼻腔内経路)を介して送達することができる。

【0069】

好適な実施形態では、前記組成物を皮内に送達する。特に、前記組成物を、例えばHaynesら、*J Biotechnology* 44: 37-42 (1996)に記載されているような、ベクターをビーズ(例えば、金)上にコーティングしてこれを高圧下で表皮内に投与することを含む遺伝子銃(特に粒子衝撃)投与技術により送達する。

50

【0070】

ある具体例では、ガス駆動式の粒子加速はPowderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK)およびPowderject vaccine Inc. (Madison, WI)が製造したもののような装置を用いて達成することが可能であり、その幾つかの具体例は米国特許第5,846,796号、第6,010,478号、第5,865,796号、第5,584,807号および欧州特許第0500 799号に記載されている。このアプローチは、ポリヌクレオチドなどの微粒子の乾燥粉末製剤を、手動操作式の装置で発生させたヘリウムガス噴流内で高速に加速させることにより、該粒子を目的の標的組織(典型的には皮膚)内へと発射する無針送達法を提供する。粒子は、好ましくは直径が $0.4 \sim 4.0 \mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.6 \sim 2.0 \mu\text{m}$ の金ビーズであり、これらにDNAコンジュゲートをコーティングしてから、「遺伝子銃」内に配置するためのカートリッジまたはカセット内に入れる。 10

関連する実施形態では、本発明の組成物のガス駆動式無針注射にとって有用でありうる他の装置および方法としてBioject, Inc. (Portland, OR)により提供されているものが挙げられ、その幾つかの具体例が米国特許第4,790,824号、第5,064,413号、第5,312,335号、第5,383,851号、第5,399,163号、第5,520,639号および第5,993,412号に記載されている。

【0071】

核酸ワクチンは、極微針(micro needles)を用いて送達してもよく、本発明の組成物でコーティングしても、または貯蔵容器から該極微針を介して送達してもよい。

【0072】

抗原ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターは、予防上または治療上有効となるような量で投与する。投与する量は、投与当たり、一般に1ピコグラム～1ミリグラム、好ましくは、粒子媒介送達の場合は1ピコグラム～10マイクログラム、また他の経路の場合は10マイクログラム～1ミリグラムのヌクレオチドの範囲とする。正確な量は、免疫しようとする患者の体重と投与経路によって大幅に変動しうる。 20

【0073】

抗原ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む免疫原成分は、1回だけ、または約1日～約18ヶ月の間隔で繰り返し(例えば1～7回、好ましくは1～4回)、投与することができる。しかし、前記と同様に、この治療計画は、患者の大きさ、治療/防御しようとする疾患、投与するヌクレオチド配列の量、投与経路、および熟練医師には自明の他の因子によってかなり変わるだろう。患者は、該患者の治療計画全体の一環として、1つ以上の他の抗癌剤を投与される場合がある。 30

【0074】

裸のポリヌクレオチドまたはベクターを患者に導入するための適切な技術としては、適当なビヒクルを用いた局所投与も挙げられる。核酸を皮膚へ、または例えば鼻腔内、経口、腔内もしくは直腸内投与により粘膜表面へ、局所的に投与してもよい。裸のポリヌクレオチドまたはベクターを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの製薬上許容しうる賦形剤と共に存在させてもよい。DNAの取り込みは、プピバカインなどの促進剤をDNA製剤とは別に、またはDNA製剤中に含めた形で使用することにより、さらに促進してもよい。核酸をレシピエントに直接投与する他の方法としては、超音波、電気刺激、電気穿孔および米国第5,697,901号に記載されているマイクロシーディング(microseeding)が挙げられる。 40

【0075】

核酸構築物の取り込みは、幾つかの公知トランスフェクション技術、例えばトランスフェクション剤の使用を含むそうした技術によって高めてもよい。これらの薬剤の具体例としては、カチオン剤、例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストランならびにリポフェクタント(lipofectants)、例えば、リポフェクタム(lipofectam)およびトランスフェクタム(transfectam)が挙げられる。投与する核酸の用量は変更することができる。

【0076】

本発明の核酸配列は、形質転換細胞を介して投与してもよい。かかる細胞としては、被験体から回収した細胞が挙げられる。本発明の裸のポリヌクレオチドまたはベクターをか 50

かる細胞にin vitroで導入することができるし、またこの形質転換細胞を後ほど被験体に戻すことができる。本発明のポリヌクレオチドを相同組換え事象によって細胞に既存の核酸中に組み込んでよい。必要であれば、形質転換細胞をin vitroで増殖させてもよいし、また得られた細胞の1個以上を本発明に使用してもよい。細胞は、公知の外科的または顕微手術的技術(例えば、移植、微量注入など)により患者の適当な部位に提供することができる。

【実施例】

【0077】

次に、下記実施例を参照することによって本発明を説明する。

【0078】

実施例

序論

下記実験により、ヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)熱ショックタンパク質70(HSP70)を使用してMUC-1誘導体に対する細胞免疫応答を高めることを実証する。HSP70遺伝子をMUC1のN-またはC末端に融合させた一連の構築物を作成した。これらの様々な融合構築物の安定性と免疫原性の両方に有意な差が見られた。HSP70へ融合することにより、MUC1に対する免疫応答の動態および機能性が改善される。

【0079】

材料および方法

1. N-末端発現カセット融合用のヒト型結核菌(*M. tuberculosis*)HSP70発現ベクターの構築

出発ベクターJNW340、JNW358、JNW640およびJNW656は、英国特許出願第02/12046.47号に記載されている。これら全ての構築物間の関係の概略図を補遺Cに示す。

【0080】

ヒト型結核菌(*M. tuberculosis*)(MTB)HSP70遺伝子は、PCRプライマー2039HSP70および2041HSP70(補遺Aを参照されたい)を使用して、CSU93株(GSK, Stevenage, UK)のゲノムDNAからPCR増幅した。PCR断片をXbaIおよびXhoIで制限切断し、ベクターpVAC(NheI-XhoIで制限切断しておいたもの)に連結し、さらにプライマー2042HSP70-2059HSP70を使用してその配列を確認した。この確認済みの構築物をJNW266と名付けた。この構築物は、全長HSP70遺伝子と併せて、そのN末端に融合カセットを挿入するためのNheI、EcoRIおよびAscIクローニング部位を含有する(完全配列については図1を参照されたい)。HSP70の発現は、一過性トランスフェクションアッセイを利用してin vitroで確かめた。抗-HSP70モノクローナル抗体であるIT41(世界保健機関)を用いた全細胞溶解物のウェスタンブロットにより、MTB HSP70タンパク質とサイズが一致する、約70kDaのシグナルバンドの存在が明らかとなった(図2を参照されたい)。

【0081】

シグナルペプチド配列を含有する7×VNTR MUC1発現カセットおよび含有しない7×VNTR MUC1発現カセットをXbaI消化によりプラスミドJNW640(+シグナルペプチド)およびJNW645(-シグナルペプチド)から単離し、これらをJNW266のNheI部位間に連結することによって、プラスミドJNW661(+シグナルペプチド)およびJNW663(-シグナルペプチド)をそれぞれ作成した。FL-MUC1カセットを同様にプラスミドJNW340(+シグナルペプチド)から単離し、これをJNW266のNheI部位間に挿入することによってプラスミドJNW381を作成した。MUC1-HSP70構築物(JNW661およびJNW663)の配列を図3に示す。全構築物の概略図を補遺Bに示す。

【0082】

JNW661およびJNW663のCHO細胞への一過性トランスフェクションにより、前記のMUC1-HSP70融合タンパク質はin vitroでは不安定であること、また該融合タンパク質は2つの断片に切断されることが示される(図4Aおよび4B)。MUC1とHSP70断片のサイズは、切断部位がMUC-1のC末端部分に存在することを示唆しており、またこのことは、共翻訳性タンパク質分解プロセッシング(Parryら、(2001) Biochem. Biophys. Res. Com. 283: 715-720)を受け取るMUC-1中の切断部位に関する近年の報告と一致する。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

2. C末端発現カセット融合用のヒト型結核菌(M. tuberculosis)HSP70発現ベクターの構築

MUC1-HSP70融合タンパク質の安定性を改善するために、その2成分の順番を入れ替えた。しかし、これらの構築物では、MUC1を正確な細胞内プロセシング経路に導くのに重要なMUC1のシグナルペプチド配列が、融合タンパク質の中心部分に隠れてしまう。この問題を多少なりとも解決するために、C末端MUC1発現カセット融合用の2つの異なるベクターを構築した。1つ目はHSP70と併せてそのN末端にMUC1シグナルペプチド配列を含有するが、2つ目のベクターは該シグナルペプチド配列を持たない。HSP70のN末端にMUC1シグナルペプチド配列を挿入するために、プライマー2077MUC1および2078MUC1からオリゴヌクレオチド・リンカーを構築し、これをJNW266のNheI部位間に連結することにより、プラスミドJNW708を作成した。プラスミドJNW266およびJNW708のHSP70のC末端は、プライマー2075MUC1および2076MUC1を用いて該HSP70のC末端をPCR増幅することにより、MUC1発現カセットが組み込まれるように、遺伝子工学的に再操作した。このPCR断片をBlnIおよびXhoIで制限切断し、これを予めBlnIおよびXhoIで制限切断しておいたJNW266およびJNW708に連結することにより、プラスミドJNW716およびJNW719をそれぞれ作成した(図6)。7×VNTR MUC1発現カセット+/-シグナルペプチド配列は、JNW656(+シグナルペプチド)およびJNW659(-シグナルペプチド)からXbaI断片として単離し、これをJNW716およびJNW719のXbaI部位にクローニングすることにより、4つの新規ベクターJNW722、JNW723、JNW725およびJNW727を作成した。4つのベクターはいずれもMUC1をHSP70のC末端に持つが、シグナルペプチドに関しては異なる位置に持つ(補遺Bに示す)。

【 0 0 8 4 】

プラスミドJNW722、JNW723およびJNW727の一過性トランスフェクション分析により、これらの融合タンパク質がin vitroで安定であることを確認した(図4Aを参照されたい)。JNW725の発現は、ウェスタンブロットでは検出されなかった。CHO細胞の表面におけるMUC1発現(抗MUC-1抗体ATR1で染色してからFACS分析により測定した)という点では、プラスミドJNW722およびJNW727が最も高い発現レベルを示したので、これらをin vivo分析用に選択した。

【 0 0 8 5 】

構築物の試験：材料3.1 B16F0およびB16F0-MUC1腫瘍細胞

ヒトcDNA MUC1用の発現ベクターでトランスフェクトしたB16F0(マウス転移性黒色腫)は、GlaxoWellcome U.S.から入手した。細胞を、10%加熱不活性化ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン、100μg/mL ストレプトマイシンおよび1mg/mLのネオマイシン抗生物質(G148)を添加したDMEM中で接着単層として培養した。ELISPOTアッセイに使用するため、ヴェルセンを使用して細胞をフラスコから取り出し、放射線を照射した(16,000Rads)。

【 0 0 8 6 】

3.2 皮膚の遺伝子銃による免疫

プラスミドDNAを、塩化カルシウムおよびスベルミジンを使用して2μm直径の金ビーズ上に沈殿させた。これらの負荷ビーズを、以前に記載(Eisenbraunら、1993; Pertmerら、1996)された通りにテフゼルチューブにコーティングした。AcceII遺伝子送達系(PCT国際公開第95/19799号)を利用して粒子衝撃法を実施した。各プラスミドについて、雌のC56Bl/6マウスを、プラスミドを3回、0、21および42日目に投与することにより免疫した。各投与はDNA/金を用いた2回の衝撃から成るものとし、総投与量にして約4~5μgのプラスミドを与えた。

【 0 0 8 7 】

3.3 腫瘍細胞の注射

0.5×10^6 または 1.0×10^6 個の腫瘍細胞を、最後の免疫処置から2週間後に、麻酔をかけた動物の右側腹に皮下注射した。腫瘍の増殖は、週に2回、ノギスを使用して二次元で監

10

20

30

40

50

視した。腫瘍体積は、 $(a \times b^2)/2$ (a は最大直径、 b は最小直径を表す)として算出した。実験のエンドポイント(死亡)は、腫瘍の直径が15mmに達した時点と定義した。

【0088】

3.4 MUC1遺伝子産物に対するT細胞応答についてのELISPOTアッセイ

脾細胞の調製

脾臓を、追加免疫後7~14日目の免疫化動物から取得した。脾臓をスライドガラスに挟んですり潰すことにより処理し、細胞懸濁物を作成した。赤血球を塩化アンモニウム処理により溶解させてから細胞片を除去し、脾細胞の高純度な懸濁物を残した。該細胞を、ELISPOTアッセイに使用するためのRPMI完全培地中に 8×10^6 /mLの濃度で再懸濁した。

【0089】

ELISPOTアッセイ

プレート、 $15 \mu\text{g/mL}$ (PBS中)のラット抗マウスIFN またはラット抗マウスIL-2 (Pharmingen)でコーティングした。プレートを+4 で一晩コーティングした。使用前に該プレートをPBSで3回洗浄した。脾細胞を該プレートに 4×10^5 細胞/ウェルで加えた。ペプチドSAPDNRPAL (SAP)、TSAPDNRPA (TSA)およびPTTLASHS (PTT)を、それぞれ最終濃度10nM、 $1 \mu\text{M}$ および $1 \mu\text{M}$ でアッセイに使用した。ペプチドはGenemed Synthesisから入手した。放射線を照射した腫瘍細胞B16およびB16-MUC1を、腫瘍細胞：エフェクター比を1：4として使用した。ELISPOTアッセイを、IL-2 (10ng/mL)、IL-7(10ng/mL)の存在下またはサイトカイン非存在下で行った。各ウェル中の総量は $200 \mu\text{L}$ であった。ペプチドで刺激した細胞を含有するプレートは加湿37 インキュベーター内で16時間インキュベートし、また刺激物質として腫瘍細胞を含有するプレートは40時間インキュベートした。

ELISPOTアッセイプレートの現像

細胞を、水で1回(細胞を確実に溶解させるために1分間浸す)、さらにPBSで3回洗浄することにより、前記プレートから取り出した。ビオチン結合ラット抗マウスIFN またはIL-2 (Pharmingen)を、PBS中 $1 \mu\text{g/mL}$ で加えた。プレートを、振盪しながら室温で2時間インキュベートした。その後、プレートをPBSで3回洗浄してから、1/1000希釈のストレプトアビジンアルカリホスファターゼ(Caltag)を加えた。PBS中で3回洗浄した後、BCICP基質(Biorad)と共に15~45分間インキュベートすると、スポットが現れた。基質を水で洗い流し、プレートを乾燥させた。Brian Hayes, Asthma Cell Biology unit, GSKにより考案された画像解析システムを使用してスポットを数えた。

【0090】

3.5 CTLアッセイ

エフェクターを作成するための大量培養

刺激細胞に3000 radの放射線を照射し、 5×10^6 /mLで再懸濁した(刺激物質は、必要に応じてペプチドパルス脾細胞またはトランスフェクタントである)。刺激細胞を、CTLアッセイで使用する前に、IL-2 (10ng/mL)の存在下で少なくとも5~7日間、組織培養フラスコまたはプレート中でエフェクター細胞(脾細胞)と共に1:4の比率でインキュベートした。ペプチドを次の濃度(SAPは40nM、PTTは $4 \mu\text{M}$ およびTSAは $4 \mu\text{M}$)で加えた。

【0091】

エフェクター細胞の調製

エフェクター細胞を5~7日後に前記大量培養物から回収し、培地で3回洗浄し、RPMI完全培地中に 2.5×10^6 /mLで再懸濁した。 $100 \mu\text{L}$ のエフェクター細胞を、細胞密度を下げながらU底プレートに分注した。

【0092】

標的細胞のユウロピウム標識

標的細胞を完全培地、次いでHepesバッファー中で洗浄し、氷冷標識バッファー中に 1×10^7 /mLとなるように再懸濁した。該細胞を、頻りに振盪しながら氷上で40分間標識した。9mLの氷冷修復バッファーを細胞に加え、氷上でさらに5分間インキュベートした。次に、細胞を氷冷修復バッファーで3回、その後は冷たい培養培地で2回洗浄した。該細胞を最後に加温培養培地中に 1×10^7 /mLで再懸濁した。次に、この標的細胞に、必要に応じて37

10

20

30

40

50

で1時間、ペプチド (SAPIは160nM、PTTおよびTSAは10 μ M)をパルスした。使用に先立って、パルスした標的細胞を加温培養培地で2回洗浄し、加温培養培地中に5 \times 10⁴ /mLの濃度で再懸濁した。

【0093】

アッセイ

既にエフェクター細胞を含有する96ウェルプレートの全ウェルに、100 μ Lの標的細胞を加えた。該プレートを1000rpmで2分間遠心し、次いで37℃でインキュベートした。各時点で20 μ Lを回収し、別の96ウェルELISAプレートに移した。200 μ Lの増強溶液を各ウェルに加えた。プレートを振盪機に5分間載せてから、以下のユウロピウム・プログラムを使用してWallac Victorで読み取った。

10

【0094】

特異的細胞傷害性% = (試験放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出) \times 100

【0095】

試薬

RPMI完全培地：

RPMI + 10% FCS + 2mM グルタミン + 50 μ M 2-メルカプトエタノール

完全Hepesバッファー (pH 7.4)

50mM HEPEs、83mM NaCl、5mM KCl、2mM MgCl₂

ユウロピウム標識バッファー

200mLのHepes完全培地に以下を加えたもの：600mM EuCl₃、3mM DTPA、5mg 硫酸デキストラン

20

修復バッファー (pH 7.4)

500mLのHepes完全培地に以下を加えたもの：2mM CaCl₂、10mM D-グルコース

【0096】

3.6 ペプチド刺激に応答したT細胞からのIFN γ 産生を検出するためのフローサイトメトリー

脾細胞を4 \times 10⁶ /mLで再懸濁した。ペプチドを最終濃度10 μ Mで加え、IL-2を最終濃度10 ng/mLで加えた。細胞を37℃で3時間インキュベートし、プレフェルジンAを10 μ g/mLで加えてから、一晚インキュベートし続けた。細胞をFACSバッファー (PBS+2.5%FCS+0.1%アジド)で洗浄し、抗CD4 Cychromeおよび抗CD8 FITC (Pharmingen)で染色した。細胞を洗浄し、CaltagのFix and Permキットの培地Aで15分間固定し、その後洗浄してから、Fix and Permキットの培地B中に希釈した抗IFN γ PE (Pharmingen)を加えた。30分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、FACSCANを用いて分析した。試料当たり計500,000個の細胞を回収し、その後CD4およびCD8細胞にゲートをかけることにより、各ペプチドに応答してIFN γ を分泌する細胞集団を決定した。

30

【0097】

3.7 一過性トランスフェクションアッセイ

様々なDNA構築物からのMUC1の発現は、プラスミドのCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞への一過性トランスフェクションとその後の全細胞タンパク質に対するウェスタンブロット法またはMUC1を発現した細胞膜のフローサイトメトリー分析により分析した。一過性トランスフェクションは、トランスフェクタム試薬(Promega)を使用し、製造業者のガイドラインに従って実施した。簡単に言うと、24ウェル組織培養プレートに、1mL DMEM完全培地 (DMEM、10% FCS、2mM L-グルタミン、ペニシリン100IU/mL、ストレプトマイシン100 μ g/mL)中ウェル当たり5 \times 10⁴ 個のCHO細胞を播き、37℃で16時間インキュベートした。0.5 μ gのDNAを25 μ Lの0.3M NaCl (1ウェルに十分な量)に加え、また2 μ Lのトランスフェクタムを25 μ LのMilli-Qに加えた。これらのDNAおよびトランスフェクタム溶液を穏やかに混合し、室温で15分間インキュベートした。このインキュベーション工程中に、細胞をPBSで1回洗浄し、150 μ Lの無血清培地 (DMEM、2mM L-グルタミン)で覆った。前記のDNA-トランスフェクタム溶液を細胞に滴下し、プレートを穏やかに振盪し、37℃で4~6時間インキュベートした。500 μ LのDMEM完全培地を加えてから、細胞をさらに37℃で48~72時間イン

40

50

キュベートした。

【0098】

3.8 MUC1プラスミドで一過性にトランスフェクトしたCHO細胞のフローサイトメトリー分析

一過性トランスフェクション後、前記CHO細胞をPBSで1回洗浄し、ヴェルセン(1:5000)/0.025%トリプシン溶液で処理することにより、細胞を懸濁液中に移した。トリプシン処理後、CHO細胞がペレット化したのでこれをFACSバッファー(PBS、4%FCS、0.01%アジ化ナトリウム)中に再懸濁した。一次抗体ATR1を最終濃度が15 μ g/mLとなるように加え、この試料を氷上で15分間インキュベートした。対照細胞は、ATR1の非存在下でFACSバッファーと共にインキュベートした。該細胞をFACSバッファーで3回洗浄し、10 μ Lの二次抗体ヤギ抗マウス免疫グロブリンFITC結合F(ab')₂(Dako, F0479)を含有する100 μ LのFACSバッファー中に再懸濁してから、氷上で15分間インキュベートした。二次抗体染色後、細胞をFACSバッファーで3回洗浄した。FACS分析はFACSscan (Becton Dickinson)を使用して実施した。試料当たり1000~10000個の細胞を、FSC(前方光散乱)およびSSC(積分光散乱)ならびに緑色(FL1)蛍光(積分蛍光の対数として表される)について同時に測定した。そのFCSが範囲外にある凝集体は除外して記録を作製した。データは、蛍光強度(X軸)に対する細胞の数(Y軸)としてプロットしたヒストグラムで表した。

10

【0099】

3.9 MUC1プラスミドで一過性にトランスフェクトしたCHO細胞のウェスタンブロット分析

一過性にトランスフェクトした前記CHO細胞をPBSで洗浄し、ヴェルセン(1:5000)/0.025%トリプシン溶液で処理することにより、細胞を懸濁液中に移した。トリプシン処理後、CHO細胞がペレット化したのでこれを50 μ LのPBS中に再懸濁した。等量の50mM DTT含有2 \times トリス-グリシンSDSサンプルバッファー(Invitrogen)を加え、この溶液を95 $^{\circ}$ Cまで5分間加熱した。1~20 μ Lの試料を4~20%トリス-グリシンゲル1.5mm (Invitrogen)上に負荷し、1 \times トリス-グリシンバッファー(Invitrogen)中で定電圧(125V)にて90分間電気泳動した。予め染色しておいた広範囲マーカー(New England Biolabs, #P7708S)を使用することにより、試料のサイズを測定した。電気泳動後、該試料を、Xcell III Blot Module (Invitrogen)、20%メタノール含有1 \times トランスファー・バッファー(Invitrogen)および25Vの定電圧を90分間使用して、予めメタノールで湿らせておいたImmobilon-P PVDF膜(Millipore)に転写した。該膜を、3%乾燥脱脂乳(Marvel)を含有するTBS-Tween (0.05%のTween 20を含有するトリス緩衝生理食塩水、pH 7.4)中で一晩ブロッキングした。一次抗体(ATR1)を1:100に希釈し、前記膜と共に室温で1時間インキュベートした。TBS-Tween中で十分に洗浄した後、二次抗体(#P0260, Dako)を3%乾燥脱脂乳を含有するTBS-Tween中に1:2000に希釈し、前記膜と共に室温で1時間インキュベートした。十分に洗浄した後、該膜をSupersignal West Pico化学発光基質(Pierce)と共に5分間インキュベートした。過剰な液体を除去し、該膜を2枚の食品包装用フィルム(cling film)の間に挟んで密封し、Hyperfilm ECLフィルム(Amersham Pharmacia Biotech)に1~30分間露光した。結核菌(M. tuberculosis)HSP70発現をプロービングするために、一次抗体(IT41、WHO)を1:100~1:500で、またその後の二次抗体を1:1000 (#A9309, Sigma)で使用した。

20

30

【0100】

結果

4.1 Hsp70融合構築物で免疫したマウスにおける予防的腫瘍防御

マウスをFL-MUC1 (JNW358)またはFL-MUC1-HSP70(JNW381)およびこれらに関連する対照(pVAC空ベクターおよびHSP70空ベクター、JNW266)で0、21および42日目に免疫し、腫瘍細胞の注射を56日目に行った。腫瘍は、材料および方法の所で記載した通り経時的に測定した。図7に見られるように、腫瘍防御は、FL-MUC1およびFL-MUC1-HSP70構築物を用いた場合はいずれもほぼ100%であったのに対し、対照群では30および40%であった。

【0101】

別の実験では、マウスを0日目に7 \times VNTR-MUC1-HSP70(JNW661)またはpVAC空ベクターで免疫し、腫瘍細胞を21日目に移植した。ワクチン接種群のマウスの防御は85%であったが

50

、対照群のマウスはいずれも腫瘍を担持していた(図8)。

【0102】

4.2 HSP70融合構築物で免疫したマウスにおける細胞応答

pVAC (空ベクター)、7×VNTR MUC1 (JNW656)、7×VNTR MUC1-HSP70(JNW661)および7×VNTR MUC1-HSP70 no ss (JNW663)で免疫した後の細胞性応答を、0日目のPMIDによる一次免疫後にELISPOTによって評価した。アッセイは、一次免疫後14日目に、ペプチド(SAP、TSAおよびPTTペプチド)ならびにB16MUC1腫瘍細胞を使用して脾細胞を再刺激することにより実行した。図9は、14日目の時点では、ペプチドELISPOTアッセイおよび腫瘍細胞のELISPOTアッセイ両方において、7×VNTR MUC1構築物はIFN 分泌を誘導しなかったのに対し、HSP70融合ベクター (JNW661およびJNW663)はいずれも十分なレベルのIFN 分泌を誘導したことを示す。

10

【0103】

4.3 HSP70融合構築物で免疫したマウスにおける細胞性応答の動態

図10は、IFN のELISPOTアッセイにより測定した、0および21日目にPMIDにより免疫した後のFL-MUC1 (JNW358)またはFL-MUC1-HSP70(JNW381)の応答の動態を示す。21日目以降の応答は非常に良く似ているが、HSP70成分を含めたことで14日目の一次応答が有意に増大している。

【0104】

4.4 HSP70融合構築物で免疫した後のCTL応答

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の応答を、前記HSP70融合構築物で免疫した後に評価した。リンパ球を追加免疫後7~14日目に回収し、様々なMUC1 CD8ペプチドエピトープ(SAP、TSA、PTT)で再刺激した。再刺激後、ユウロピウム放出アッセイで標的としてペプチドパルスしたEL4細胞を使用して、エフェクター細胞のCTL活性を調べた。図11は、7×VNTR MUC1による免疫は3種全てのペプチドに対してCTL応答を誘導し、そのCTL活性は7×VNTR-MUC1-HSP70±ssで免疫した後に上昇したことを示している。

20

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】発現ベクターJNW266からのヒト型結核菌(*M. tuberculosis*)HSP70の配列。RsrIIおよびXhoI部位には下線を引いてある。Kozak配列はイタリック体で示す。開始および終結コдонは太字で示す。枠で囲った配列は、MUC1発現カセットを挿入するためのリンカー領域を表す。HSP70遺伝子開始コドンには二重下線を引いてある。

30

【図2】発現ベクターJNW266からのヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)HSP70の発現。HSP70タンパク質は、モノクローナル抗体IT41を用いて検出した。2~100ngの組換えHSP70 (rHSP70)タンパク質を正の対照として使用した。

【図3】プラスミドJNW661およびJNW663によりコードされるMUC1-HSP70融合体のDNA配列。JNW661とJNW663のMUC1-HSP70発現カセットは、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外は同一であり、JNW663ではその配列が欠けている。

【図4A】MUC1に対するウェスタンブロットにより評価した、一過性トランスフェクションアッセイにおけるMUC1-HSP70構築物の発現。

【図4B】HSP70に対するウェスタンブロットにより評価した、一過性トランスフェクションアッセイにおけるMUC1-HSP70構築物の発現。

40

【図5-1】3'改変HSP70発現構築物JNW716およびJNW719のDNA配列。HSP70発現カセットであるJNW716およびJNW719は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ており、JNW716ではその配列が欠けている。いずれの構築物も、MUC1発現断片を受け入れるために、XbaI部位(下線部)を遺伝子の3'末に有している。

【図5-2】3'改変HSP70発現構築物JNW716およびJNW719のDNA配列。HSP70発現カセットであるJNW716およびJNW719は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ており、JNW716ではその配列が欠けている。いずれの構築物も、MUC1発現断片を受け入れるために、XbaI部位(下線部)を遺伝子の3'末に有している。

【図6-1】HSP70-MUC1発現構築物JNW722、JNW723、JNW725およびJNW727のDNA配列。こ

50

これらの構築物の概略図は補遺Bに示してある。HSP70-MUC1発現カセットJNW722、723、725および727は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ている。

【図6-2】HSP70-MUC1発現構築物JNW722、JNW723、JNW725およびJNW727のDNA配列。これらの構築物の概略図は補遺Bに示してある。HSP70-MUC1発現カセットJNW722、723、725および727は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ている。

【図6-3】HSP70-MUC1発現構築物JNW722、JNW723、JNW725およびJNW727のDNA配列。これらの構築物の概略図は補遺Bに示してある。HSP70-MUC1発現カセットJNW722、723、725および727は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ている。

10

【図6-4】HSP70-MUC1発現構築物JNW722、JNW723、JNW725およびJNW727のDNA配列。これらの構築物の概略図は補遺Bに示してある。HSP70-MUC1発現カセットJNW722、723、725および727は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ている。

【図6-5】HSP70-MUC1発現構築物JNW722、JNW723、JNW725およびJNW727のDNA配列。これらの構築物の概略図は補遺Bに示してある。HSP70-MUC1発現カセットJNW722、723、725および727は、枠で囲った配列(MUC1のシグナルペプチド配列に相当する)以外はよく似ている。

【図7】FL-MUC1(JNW358)およびFL-MUC1-HSP70(JNW381)、HSP70空ベクター(JNW266)およびpVAC空ベクターで免疫した後のマウスにおける腫瘍防御。

20

【図8】7×VNTR-MUC-HSP70(JNW661)およびpVAC空ベクターで免疫した後の予防的腫瘍防御。

【図9】pVAC空ベクター、7×VNTR MUC1(JNW656)、7×VNTR MUC1-HSP70(JNW661)および7×VNTR-MUC1 HSP70 no ss (JNW663)で免疫した後のIFN ELISPOT応答。個々のマウスから得た脾細胞をCD8ペプチドエピトープ(SAP、TSAおよびPTT)またはMUC1発現腫瘍細胞(B16MUC1)で再刺激した。

【図10】IFN ELISPOTにより測定した、pVAC空ベクター、FL-MUC1(JNW358)、HSP70空ベクター(JNW266)およびFL-MUC1-HSP70(JNW381)で0および21日目にPMIDにより免疫した後の免疫応答の動態。

30

【図11】7×VNTR MUC1(JNW656)、7×VNTR MUC1 HSP70(JNW661)および7×VNTR MUC1 HSP70 -ss (JNW663)で免疫した後のCTL活性。脾細胞をブースト後7～14日目に回収し、様々なペプチド(SAP、TSA、PTT)で再刺激した。ユウロピウムで標識しペプチドパルスしたEL4細胞を標的として使用した。

【図12】補遺A - オリゴヌクレオチドプライマー

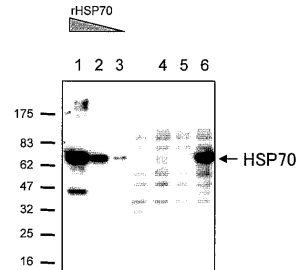
【図13】補遺B - 本研究で使用した構築物の概略図

【図14】補遺C - 本研究で使用した構築物の間の関係の概略図

【 圖 2 】

[illegible]

- 1 100ng HSP70 タンパク質
- 2 20ng HSP70 タンパク質
- 3 2ng HSP70 タンパク質
- 4 Mock
- 5 pCI 空ベクター
- 6 HSP70 空ベクター (JNW266)



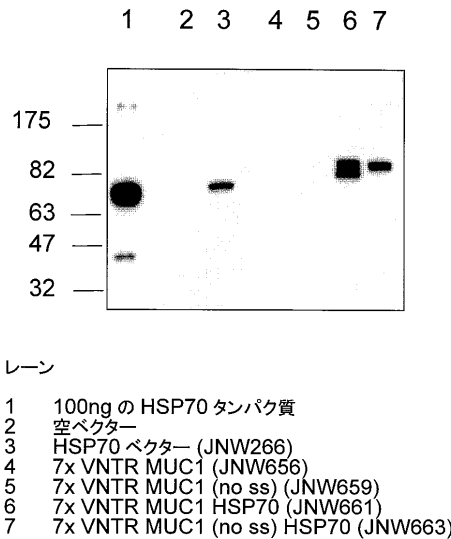
【 図 4 A 】

[illegible]

Western blot analysis of MUC1-HSP70 and HSP70-MUC1 complexes. The blot shows two rows of bands. The top row is labeled 'MUC1-HSP70' and 'HSP70-MUC1' with arrows pointing to specific bands. The bottom row is labeled 'MUC1-HSP70 & HSP70-MUC1' and 'MUC1' with arrows pointing to specific bands. Lanes are labeled A through H at the bottom.

A	JNW656
B	JNW659
C	JNW661
D	JNW663
E	JNW722
F	JNW723
G	JNW725
H	JNW727

【 図 5 - 1 】

[illegible]

JNW719

GCTAGACGGACCGGCCACCATGGCTAGCACACCGGGCACCCAGTCTCCTTCTCTCT
GCTGCTGCTCTCTACAGTGCCTACAGTCTGCTAGATGGCTCGTGGCGTGGGATCGA
CCTCGGGACACCAAGTCCGTCGTCTCGGTTCTGGAAAGGTGGCGACACCGGTCGTCTG
CGCCAACTCCGAGGCTCTCAGGACACCCCGTCAATTGTTCGCGTTCGCGCCGCAACGG
TGAGGTGCTGTGTGCGGCCAGCCGCCAAGAACCAGCGCGTGACCAAGCTGATTCGCAC
CGTGCCTCGCTCAAGCAGACATATGGGACCGCATCTGTCCTATAGAGATTGACGCCAA
GAATACACCGCGCCGGAGATCAGCGCCGCAATCTGTATGAAGTCTGAAGCGCAGCGC
CGAGGCCCTACTCTCGTGAAGACATTACCGACGCGGTTATCAGCAGCCGCGCTACTT
CAATGACCGCTGCGCTCAGGCGCCACCAAGGACGCGCGCGAGATCGCGCGGCTCAACGT
CTGTGGATGTCTCAA GCGCCGACCGACCGCGCCGCGCTGCGCTTACGCGCTCGACAAGG
CGAGAAGGAGCAGCGAATCTCTGTCTTCGATCTGGTGGTGGCACTTTCGACGTTTC
CCTCGTGGAGATCGGCGAGGGTGTGGTGTGGTCCGTCGCTCTCGGTTGACAACCA
CTTCGCGCGGACGACCTGGGACCAAGCGGGTGTCTGATTGGCTGGTGGACAAGTTCAA

【 図 6 - 1 】

AGGCACACGCGGCACAGATCTGACCAAGCAACAGATGGCGATGCAGCGCGCTGCGGGAG
AGCCCCCGCAGGAAGCGCAAGATCGAGCTGAGTCTGAGTTCAGTCCACCTGCAGCAACCT
GCCCTTACATACCGTGCAGCGCCAGCAAGAACCGCTGTTCTGACGAGACGAGCTGAC
CGCGCGCGGAGTTCACACCGGATCATTCAGCAACTCTGCGAGCGCATCGCAAGCCGCTT
CCAGTCGGGTGATCGCTGACACCGGCATTTCGGTGTGGAGATGCATCAGTTGTGCTCT
CGTGGTGSGTTTCAGCCCGGATCCCGCGGTGACCGATCTTGCTCAAGGAATCATCCGG
CGCAGCAAGACCCCAACAGGGCGCTCAACCCCGATGAGGTTGTCCGGTGGAGCGCTG
TCTGCAGSCGGCGCTCTCAAGGCGCGGTGAAGAACGTTCTGCTGTTGATGTTTAC
CCCGCTGAGCTCGGTTACGACAGCAAGGCGGGGTGATGACAGGCTCATTCAGCGCG
CAACACACAGATTCAGCAAGCGGCTCGGAGATTCTACACCGCGCAGACACCAAC
ACCGTTCGGTCAGATTCAGGTTATTCAGGGGAGCGGTGAGATTCGCGCGGCACACAA
GTTCTCGGGTCTTCAGCTGACCGGATCCCGCGCGCGCGGGGATTCGCA
GATCGAGGTCACTTTCGACATCGACGCCAACCGGCATTGTGCAGCTCAGCGCCCAAGGA
CAAGGACACCGGCAGAGAGAACCATCGAATTCAGGAGAGCTCGGCGCTTCGCTCAA
GAGGACATTACGCGCATCATCAAGACCGCGAAGCGACACCGGAGGAGATTCGCA
CGCTCGCGGAGGCGCGGATCTGTCGAATCAAGCCGAGACATTTGCTTACGACCGGA
GAGTTCTGCTCAAGAAACAGCGTGCAGCGCGGACGAGTTCTGAAGTACTTGAAGACAC
GCTGAACAAAGTTGATCCGCGGTGGCGAAGCAAGCGCAACTTGGCGGATCGGA
TATTTCGCCCATCAAGTCGCCGATGAGGAAGCTGGGCCAGGAGTTCGAGGCTCTGGG
CGACGCGATCTACAGACGAGCTGAGCTGCGTCTACAGGCCATTCGGCTTGCCCAAC
CGGCGCGGACGCGCGGCGCTGCCACCCCGGCTCGGCTGATGAGTTTGGACCGCGA
GGTGTGTCGACGACGCGCGGAGCGCAAGCTCATGATGATCTCAGG

[illegible]

【 図 6 - 3 】

CACAGGTGTCACTCGGCCCGGAGACAACAGGCGGGCCCGGGCTCCACGCGCCCCC
AGCCCAACGSGTGTCACTCGGCCCCGGAGACAACAGGCGGCCCGGGCTCCACGCGCCCC
CCGAGGCCACGSGTGTCACTCGGCCCGGAGACAACAGGCGGCCCGGGCTCCACGCG
GCCGCGAGCCCAACGSGTGTCACTCGGCCCGGAGACAACAGGCGGCCCGGGCTCCAC
CGCCGCCCAAGCCCAACGSGTGTCACTCGGCCCGGAGACAACAGGCGGCCCGGGCTCC
CAGCGGCCCGGAGCCCAACGSGTGTCACTCGGCCCGGAGACAACAGGCGGCCCGCTGGG
CGACGCGCCCTCCAGTCCCAACATGTCACTCGGCCCTCAGGCTGTGCATCAGGCTCT
AGCTCTCACTCTGGTGAGCAACGAGCCACTCTGCGAGCTTACCACCAACCCAGCCAG
CAAGAGCACTCCATTCTCAATTCCAGCCACCACCTGTGATACTCCTACCACCTTGC
CAGCCATAGCACACAGAGCTGATGCGGATGACACTCACCATACAGCGGTACCTCTCTC
CACTCTCTCAATACAGCACTCTTCCAGAGTGTCTACTGGGCTCTCTTCTTTTCTT
CTGCTCTTTTCACTATTTCAAACCTCAGITTAATTTCTCTCTGGAAGATCCCGACAC
CGACTACTACAGAGCTCGAGAGACAGTCTGTGAAATCTTTTTCAGATTATTA
ACAAGGGGGTTTTCTGGGCTCTCCAATATTAAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGTG
ACAAATTCAGTCTGGCCCTCCGAGAGAGTACCAATATGTCCAGACGGTGGAGACA
GTCTCAATGAGTATAAAGCGAAGACGCTCTGCATATAACCTACGATCTCAGAGCT
CAGCGTGAGTATGTGCATTTCTCTTCTGTCGCCAGTCTGGGGCTGGGGTGGCGG
CTGGGGCATCGCGCTCTGGTGGTCTGTGTGTCTGTGTGTCTGGTGTGCCCTTCTGCTA
TCTCATTTGCCCTTGGCTGTCTGTGCAGTGGCCGCGGAAGAACTACGGGCGAGCTGGACAT
CTTTCACGCGCGGATACACTACCATCTGTATGAGGAGATACCCCACTACCAACCA
TGGGCGCTATGTGCCCCTAGCAGTACGAGTACGAGTCTGAGGCCCTATGAGAAGGTTTTCG
AGGTATATGTGGGCGAGCGACTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGC
CACTCTGTCTGATGATCTGACG

JNW725

[illegible]

【 図 6 - 5 】

TGACCTCTCGGCCCGGAGCCAGCCGCGCCGCCCTCCACGCCCCCAAGCCGCGGTGTACCTCT
 GCGCCGCGACACACAGCGCCGCCGCGGCTACACGCCCGCCCGGCTGTACTCTCGCCGCCGGA
 GAGCGGCGCGCGCTGTGGGCTTCACGCGCTACCAATGTCACCTCGGCGCTCAGGCTCTGCATC
 AGGCTCAGCTCTTCACTTGTGTACACAGCGCACTCTGCAGGAGGTACCAACACCCGACAGCAG
 CACTCTCTCTCTCAATTCCAGCAGCACTCTGTGATACCTGCACACCTCTCGACAGCATAGCACA
 GAGCTGCAGTAGCAGTACCAATGACAGCACTGCTCTGCATCTCTCCAACTACAGCACTCTTCCCA
 TCTGCT
 GCGAGTCT
 TAAACAGAGGGGGTTTCTGGCGCTCTCCAAATTAAAGTTCAGCCGAGGATCTGATCTAATTC
 TCTGGGCTCTCCGAGAGGATACCATCATGATCTCCACAGAGTCGAGGACAGGTTGATCATGTA
 AAGAGCATCTCTGATTAAGTACGATGCTCAGAGCTCGAGCTGAGTGTGATGTGATCTTCTCTG
 CCAATCTCGGCTCTGGGCTGGGCTCGAGCTGGGGCTCTGCGCTCTCTGTGCTGTCTGTCTGTG
 GCGCT
 GCGGCT
 CCCCCCTCAGCTACGCTACGCTACGCTACGCTACGCTACGCTACGCTACGCTACGCTACGCT
 TTACACACACCGAGCGGTGACACCTCTCTGCAACCTTGTCTGAGTATGTCAG

10

FL-MUC1またはFL-MUC1-Hsp70で免疫したマウスをB16F0MUC1でチャレンジした際の腫瘍防御

無腫瘍マウス (%)

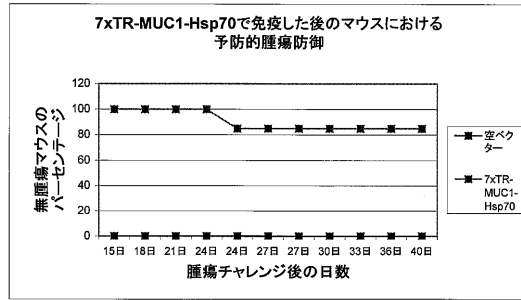
腫瘍チャレンジ後の日数

Legend:

- ◆ pVAC
- pVAC-FL-MUC1
- △ pVAC-Hsp70
- × pVAC-FL-MUC1-Hsp70

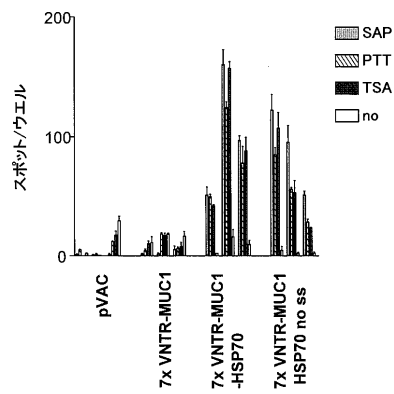
腫瘍チャレンジ後の日数	pVAC (%)	pVAC-FL-MUC1 (%)	pVAC-Hsp70 (%)	pVAC-FL-MUC1-Hsp70 (%)
6日	85	100	100	100
13日	65	100	65	100
21日	65	100	65	100
30日	65	100	65	100
37日	65	100	45	100
43日	65	100	45	100
50日	50	100	30	100

【図 8】



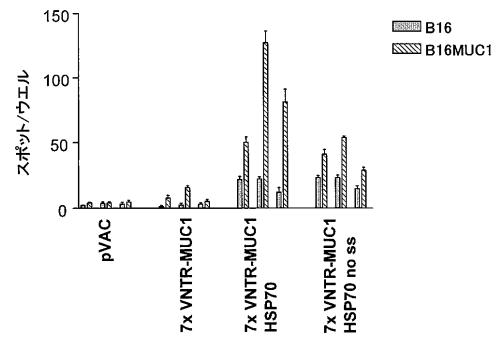
【図 9】

一次免疫後 14 日目

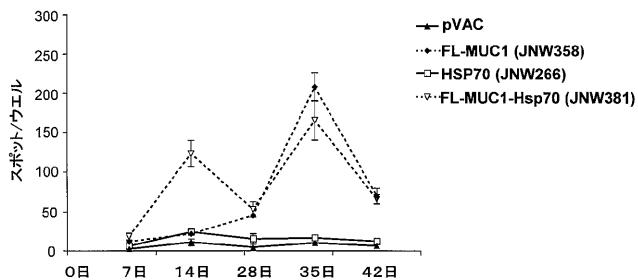


一次免疫後 14 日目

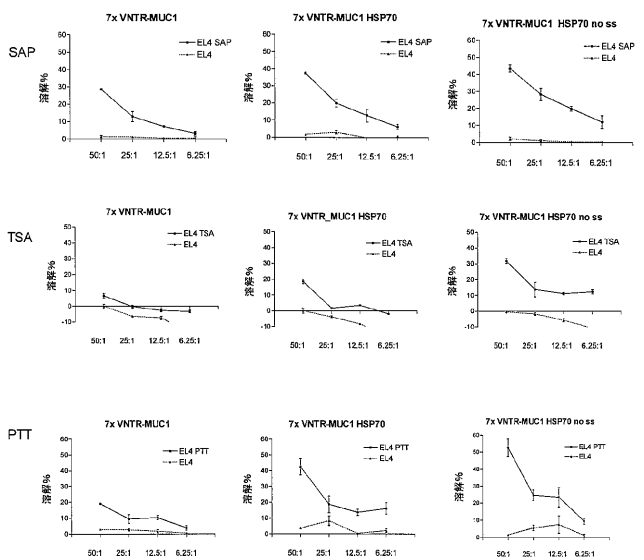
腫瘍細胞 ELISPOT (+ IL-2)



【図 10】

ペプチド(+ IL-2)を用いた動態-IFN γ ELISPOT

【図 11】



【 図 1 2 】

補遺A-オリゴヌクレオチドプライマー

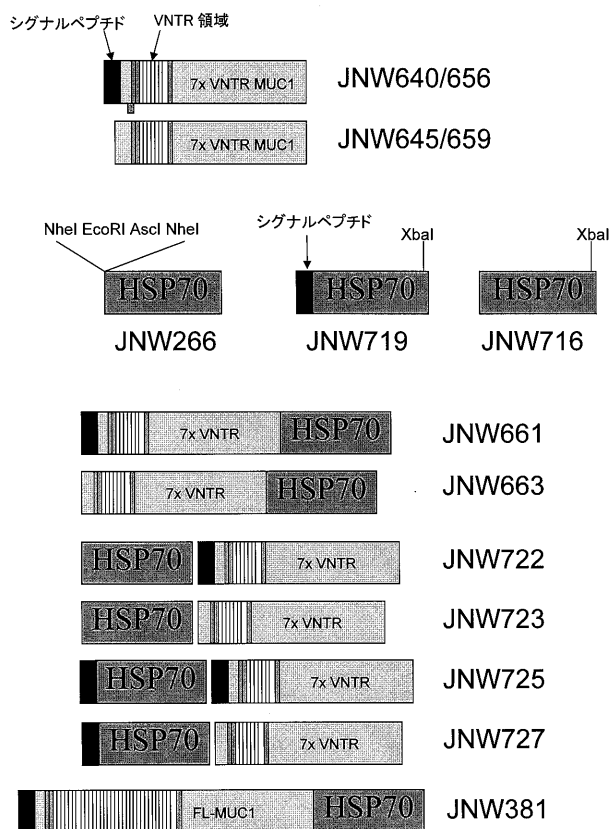
2059HSPT0 GTGTGCTTGAACCGAGCG
2059HSPT0 GGCGTCCTTGTTGGCCCTG
2057HSPT0 CTGGTCCAGAGTGTCGCC
2056HSPT0 CGGGTCTTGTGCGCGTCT
2055HSPT0 GGGTCTCTTGCGCCGTGTG
2054HSPT0 GGTGTGTGTCCGCGGTGG
2053HSPT0 CTTGCGGGTGCCCTGTCTC
2052HSPT0 AACACCCCTGGCGCTCAAGC
2051HSPT0 TTGCCCCGAGAGCTGCAGC
2050HSPT0 AGTCCGAGGCTCTGGGGC
2049HSPT0 GCGTGAAGCCGACGGGTGG
2048HSPT0 GACAGGCGGACCGCGGAGG
2047HSPT0 CCGACCGCGGACGACCAAC
2046HSPT0 ACCGGCGGAGGGAACCC
2045HSPT0 GACGCCGACAGGACCCG
2044HSPT0 GCGCACGAGCTGGGACCCGC
2043HSPT0 AGGCGCACTAGGAGCGCCG
2042HSPT0 CGCTCGTCTAAGCGACAC
2041HSPT0 GCGACGCGCTCTCGATCTCACTTGGCTCTCCCGGCGCTCG
2039HSPT0

GCCTCATAGACGAGCCGCGCCACCTAGCTAGCGAATTCGCGCGCGCCAGCTAGCAGTGCTCTGTGTCTGGGATGCG

2075MDC1 GCTTGATGTACCCCGCTAGAC
2076MDC1 GAGCTGTGATCTACCTAGACCTATGGCTCTCCGCGCGGTCTCG
2077MDC1 CTAGACGCGGAGCCAGCTCTCTTCTTCTGCTGCTGCTCTCAAGTGCTCAAGTGT
2078MDC1 CTAGCACTCTTAGAGCACTGTGGAGGACGACAGACGGAAGAGGACAGTGCTTCCCTGATGTG

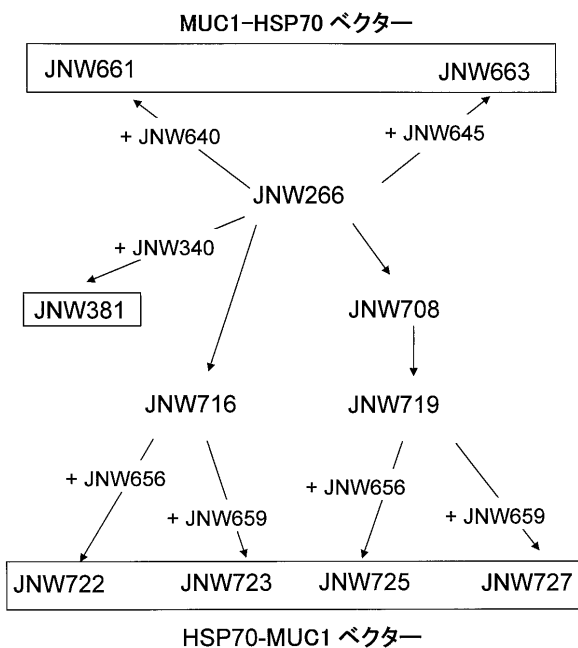
【 図 1 3 】

補遺B—本研究で使⽤した構築物の概略図



【 図 1 4 】

補遺C—本研究で使⽤した構築物間の関係の概略図



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/010323A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/00 C07K14/47

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 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/57068 A (APOSTOLOPOULOUS VASSO ; AUSTIN RES INST (AU); MCKENZIE IAN F C (AU); P) 9 August 2001 (2001-08-09) the whole document	1-21
Y	WO 01/29233 A (HUNG CHIEN FU ; WU TZYY CHOOU (US); UNIV JOHNS HOPKINS MED (US)) 26 April 2001 (2001-04-26) example 1	1-21
Y	WO 01/18035 A (TRANSGENE SA ; IMP CANCER RES TECHNOLOGY LTD (GB)) 15 March 2001 (2001-03-15) figure 11; examples 1-6	1-21
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2004

Date of mailing of the international search report

04/01/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/010323

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 335 183 B1 (YOUNG RICHARD A) 1 January 2002 (2002-01-01) cited in the application the whole document	1-21
Y	CHEN C-H ET AL: "ENHANCEMENT OF DNA VACCINE POTENCY BY LINKAGE OF ANTIGEN GENE TO ANHSP70 GENE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 60, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 1035-1042, XP000942003 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-21
A	SCHREIBER JOACHIM ET AL: "Binding of tumor antigen mucin (MUC1) derived peptides to the heat shock protein DnaK" ANTICANCER RESEARCH, vol. 20, no. 5A, September 2000 (2000-09), pages 3093-3098, XP009041794 ISSN: 0250-7005 the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/010323**Box 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:
Although claim 21 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.: —
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.: —
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/010323

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0157068	A	09-08-2001	US 6548643 B1 15-04-2003
			WO 0157068 A1 09-08-2001
			AU 2987701 A 14-08-2001
			CA 2399026 A1 09-08-2001
			EP 1257565 A1 20-11-2002
			JP 2003533181 T 11-11-2003
WO 0129233	A	26-04-2001	US 6734173 B1 11-05-2004
			AU 2299401 A 30-04-2001
			CA 2388045 A1 26-04-2001
			CN 1411512 T 16-04-2003
			EP 1222289 A2 17-07-2002
			JP 2004500047 T 08-01-2004
			WO 0129233 A2 26-04-2001
			US 2004086845 A1 06-05-2004
WO 0118035	A	15-03-2001	AU 7651500 A 10-04-2001
			CA 2383737 A1 15-03-2001
			WO 0118035 A2 15-03-2001
			EP 1210430 A2 05-06-2002
			JP 2003510094 T 18-03-2003
US 6335183	B1	01-01-2002	US 6338952 B1 15-01-2002
			US 2003073094 A1 17-04-2003
			US 6482614 B1 19-11-2002
			AT 212378 T 15-02-2002
			CA 2164298 A1 22-12-1994
			DE 69429723 D1 14-03-2002
			DE 69429723 T2 26-09-2002
			DK 700445 T3 13-05-2002
			EP 0700445 A1 13-03-1996
			JP 8510756 T 12-11-1996
			EP 1221488 A1 10-07-2002
			ES 2171454 T3 16-09-2002
			PT 700445 T 31-07-2002
			WO 9429459 A1 22-12-1994
			DE 68924162 D1 12-10-1995
			EP 0419569 A1 03-04-1991
			AT 127345 T 15-09-1995
			CA 1338778 C 10-12-1996
			WO 8912455 A1 28-12-1989

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 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/35 (2006.01)	C 0 7 K 14/35	

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

(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節

(72) 発明者 ハンブリン, ポール, アンドリュー
イギリス国 エスジー 1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ローチャ デル クラ, マリア デ ロス アンヘレス
イギリス国 エスジー 1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA36 CA03 CA05 CA07 DA02 HA17
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 MA01 NA14
ZB072 ZB212 ZB262
4C085 BA09 CC07 CC32 DD86 EE06 FF24 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB07 ZB21
ZB26
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA11 CA41 DA86 EA28 FA74