

(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2005-526520

(P2005-526520A)

(43) 公表日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
A61K 35/76
A61K 39/00
A61K 48/00
A61P 35/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 35/76
A 61 K 39/00
A 61 K 48/00
A 61 P 35/00

Z N A A
H

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 5
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-508299 (P2004-508299)
(86) (22) 出願日 平成15年5月23日 (2003.5.23)
(85) 翻訳文提出日 平成16年12月28日 (2004.12.28)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2003/005594
(87) 國際公開番号 WO2003/100060
(87) 國際公開日 平成15年12月4日 (2003.12.4)
(31) 優先権主張番号 0212046.7
(32) 優先日 平成14年5月24日 (2002.5.24)
(33) 優先権主張國 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 ウエルカム
ハウス (番地なし)
Glaxo Wellcome House,
Berkeley Avenue Greenford,
Middlesex UB6 0NN, Great Britain
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 苞輔

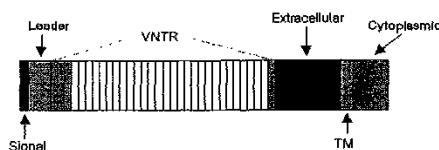
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VNTR反復ユニットの数が減少したMUC-1抗原

(57) 【要約】

本発明は、MUC-1を発現する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ールに有用な新規核酸構築物に関する。特に、核酸はDNAであって、DNA構築物は10個未満の完全反復ユニットを有するMUC-1誘導体をコードする遺伝子を含む。本発明はさらに、前記構築物を含む医薬組成物、特に粒子によるデリバリーに適合した医薬組成物、それらを作製する方法、および医薬におけるそれらの使用を提供する。この核酸によってコードされる新規タンパク質およびこのタンパク質を含有する医薬組成物も提供する。

MUC1 constructs - Introduction



Key

- Signal sequence
- ▨ Leader sequence
- ▨ Atypical VNTR Repeat units
- ▨ Perfect VNTR repeat units
- ▨ Non-VNTR extracellular domain
- ▨ Transmembrane domain
- ▨ Cytoplasmic domain

Abbreviations

- | | |
|------|--------------------------------------|
| TM | transmembrane domain |
| CYT | cytoplasmic domain |
| ss | signal sequence |
| VNTR | variable of number of tandem repeats |

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

*in vivo*で免疫応答を生じる能力を有し、全長MUC-1より組換えを起こしにくい分子である、MUC-1抗原をコードする核酸分子。

【請求項 2】

1から15個までのVNTR完全反復ユニットを含むMUC-1抗原をコードする核酸分子。

【請求項 3】

8個未満の完全VNTR反復配列を含む、請求項2に記載の核酸分子。

【請求項 4】

少なくとも1個のVNTRが変異してグリコシル化の可能性が低下した、請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸分子。 10

【請求項 5】

次の群：FLSFHISNL、NSSLEDPSTDYYQELQRDISEおよびNLTISDVSVから選択されるエピトープをコードする配列を組み込んだ、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記分子がDNA分子である、請求項1～5のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

請求項6に記載のDNA分子を含むプラスミド。

【請求項 8】

請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸分子によってコードされるタンパク質。 20

【請求項 9】

請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸分子、または請求項7に記載のプラスミド、または請求項8に記載のタンパク質、および製薬上許容される賦形剤、希釈剤もしくは担体を含む医薬組成物。

【請求項 10】

前記担体が微粒子である、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記微粒子が金である、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

アジュvantを含む、請求項9～11のいずれか1項に記載の医薬組成物。 30

【請求項 13】

医薬において使用するための、請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸、請求項7に記載のプラスミド、請求項8に記載のタンパク質、または請求項9～12のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

MUC-1を発現する腫瘍の治療もしくは予防のための薬剤の調製における、請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸の使用。

【請求項 15】

MUC-1を発現する腫瘍の治療もしくは予防のための薬剤の製造における、請求項8に記載のタンパク質の使用。 40

【請求項 16】

安全で有効な量の、請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸、請求項7に記載のプラスミド、または請求項8に記載のタンパク質を投与することを含む、腫瘍もしくは転移を治療または予防する方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、MUC-1発現腫瘍の治療および予防を目的とする核酸ワクチン接種プロトコールに有用な新規核酸構築物に関する。詳細には、核酸はDNAであって、このDNA構築物は、10個未満の完全な反復ユニットを有するMUC-1誘導体をコードする遺伝子を含む。本発明 50

はさらに、前記構築物を含む医薬組成物、特に、粒子による送達に適合する医薬組成物、そうした組成物の製造方法、および医薬におけるその使用を提供する。この核酸によってコードされる新規タンパク質およびそれらを含有する医薬組成物も提供する。

【背景技術】

【0002】

上皮細胞ムチンMUC-1(エピシアリンまたは多形性上皮性ムチン、PEMとしても知られている)は、多くの上皮細胞表面で発現される高分子量の糖タンパク質である。このタンパク質は、細胞質側尾部、膜貫通ドメイン、およびプロリン、セリンおよびスレオニン残基を高い比率で含む20アミノ酸モチーフの縦列反復配列(反復数は可変)(本明細書ではVNTRモノマーと称するが、VNTRエピトープまたはVNTR反復としても知られている)からなる。反復数はMUC-1遺伝子座における遺伝子多型のために一定しないが、もっとも高頻度には30-100回の範囲内である(Swallowら、1987、Nature 328:82-84)。正常導管上皮において、MUC-1タンパク質は導管腔に露出した、細胞の頂端面にのみ見出される(Grahamら、1996、Cancer Immunol Immunother 42:71-80; Barratt-Boyesら、1996、Cancer Immunol Immunother 43:142-151)。MUC-1分子の最も際だった特徴の1つは、その多数のO-グリコシル化である。それぞれのMUC-1 VNTRモノマー内に利用可能なO-グリコシル化部位が推定で5箇所存在する。下記の番号付与方式にしたがって、これらはThr-4, Ser-10, Thr-11, Ser-19およびThr-20である。

【0003】

VNTRは、下記の配列を有する典型的もしくは完全な反復配列、または20アミノ酸にわたって2,3の相違を含む上記の完全な反復配列からの小変異として特徴づけることができる：

下記は完全な反復配列である。

【0004】

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

下線を付したアミノ酸は示されたアミノ酸残基に置き換えることができる。

【0005】

不完全な反復配列は、上記の共通配列に対して異なるアミノ酸置換を有し、アミノ酸レベルでの同一性は55-90%である。4個の不完全な反復配列を下記に示し、置換に下線を付す：

APDTRPAPGSTAPPAHGVTS - 完全な反復配列

APATEPASGSAATWGQDVTS - 不完全な反復配列1

VPVTRPALGSTTPPAHDVTS - 不完全な反復配列2

APDNKPAPGSTAPPAHGVTS - 不完全な反復配列3

APDNRPALGSTAPPVHNVTS - 不完全な反復配列4

【0006】

野生型MUC-1の不完全な反復配列は完全な反復領域に隣接する。上記のような上皮細胞の新生物性形質転換によって生じる悪性の癌において、いくつかの変化がMUC-1の発現に影響を及ぼす。このタンパク質の偏向した発現が失われ、形質転換細胞の全表面に広がって見出される。MUC-1の総量も増加し、しばしば10倍以上となる(Strous & Dekker, 1992, Crit Rev Biochem Mol Biol 27:57-92)。最も重要なことは、O-結合糖鎖の量および質が著しく変化することである。セリンおよびスレオニン残基のグリコシル化が少なくなる

10

20

30

40

50

。認められる糖鎖は異常に短くなり、腫瘍関連糖鎖抗原STnを生成する (Lloydら、1996, J Biol Chem, 271:33325-33334)。このような糖鎖形成の変化の結果として、予め糖鎖によってスクリーニングされた、MUC-1のペプチド鎖上のさまざまなエピトープが到達可能となる。このようにして到達可能となったあるエピトープの1つは、20アミノ酸VNTR完全モノマーのそれぞれに存在する配列APDTR (図2中Ala8-Arg12) によって形成される (BurcHELLら、1989, Int J Cancer 44:691-696)。

【0007】

MUC-1におけるこのような変化が、腫瘍表面に発現される形のMUC-1に対して免疫系を活性化することができるワクチンが上皮細胞腫瘍、およびMUC-1が認められるまったく別の細胞型、たとえばT細胞リンパ球に対して有効であり得ることを意味するのは明白である。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が利用する主要なエフェクターメカニズムの1つが細胞傷害性Tリンパ球免疫応答 (CTL) であって、この応答は抗体応答と同様に、腫瘍を治療するワクチンとして望ましい。すぐれたワクチンとは免疫応答のあらゆる武器を活性化するものであろう。しかしながら、現行の糖 (carbohydrate) およびペプチドのワクチン、たとえばTheratopeまたはBLP25(Biomira Inc, Edmonton, Canada)は免疫応答の一方の武器 - 体液性ならびに細胞性応答をそれぞれ優先して活性化するため、それよりすぐれたワクチンデザインは、いっそうバランスのとれた応答を生じることが望ましい。

【0008】

核酸ワクチンは、大量生産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を越える多くの利点を提供する。少量の投与であっても、核酸ワクチンは強力な免疫応答を誘導することが報告されており、抗体応答のみならず細胞傷害性Tリンパ球免疫応答を誘導することができる。

【0009】

しかしながら、全長MUC-1は非常に繰り返しの多い配列のために取り扱いが非常に難しく、それは非常に組換えを生じやすいからであるが、こうした組換えの発生は生物薬剤開発における重大な問題を引き起こす。さらにVNTR領域のGCに富んだ性質は、配列決定を困難にする。その上、調節上の理由で、DNA構築物の性質を完全に明らかにする必要がある。このように高頻度の反復構造を有する分子を配列決定することは大いに問題がある。野生型MUC-1にいくつの反復ユニットがあるのか正確にわからないことを考慮すると、全長MUC-1の特徴を明確に示すことが不可能であるために、規制当局の認可を受けられなくなる。

【0010】

MUC-1 VNTR領域は、免疫優性エピトープを含むと考えられる。驚くべきことに、本発明者等は、VNTRの数を減らして野生型全長MUC-1と同等の抗腫瘍活性を有する免疫原性構築物を作製できることを発見した。本発明の構築物は安定である。特に、この構築物は、それぞれが10-14時間持続する9回の継代の経過にわたって大腸菌 (E. coli) の培養物として増殖させた場合、増殖特性、プラスミドの保有およびプラスミドの性質という点で安定である。

【発明の開示】

【0011】

本発明は、MUC-1抗原をコードする核酸配列を提供するものであって、この抗原は *in vivo* で免疫応答を引き起こす能力を有し、安定であって、全長MUC-1に関して組換えの起こりやすさは低下した。安定性は、明確な形態のプラスミドの量を基準とする。大量培養で増殖させた後に、組換えを生じやすい形の混入は、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル上で測定して、肉眼で視覚化したときに、2.0%未満であることが好ましい。大量とは、一般的に、1リットルよりも大規模に増殖させる場合を意味する。プラスミドコピーが継代の期間を通じて安定に保持されることもまた別の安定性の尺度となる。プラスミドのコピー数は、特に継代1から9まで、継代回数を通じて増加することが好ましい。プラスミドのコピー数は9回の継代を通じて約10%, 20%, 30%, 35%, 40%, もっとも好ましくは約50

10

20

30

40

50

%、増加することが好ましい。特別な実施形態において、本発明は1から15個まで、好ましくは1から10個の間の完全なVNTR反復ユニットを有する構築物を提供する。8個未満の完全な反復配列が存在することが好ましい。好ましい実施形態はそれぞれ1、2、3、4、5、6、および7個の反復配列を有するDNA構築物を提供する。本発明の特定の実施形態において、不完全な反復領域が保持される。1または7個の完全な反復配列を含む構築物が好ましい。こうした構築物によってコードされるタンパク質は新規であって、本発明の一態様を形成する。

【0012】

本発明の別の態様において、核酸配列はプラスミドの形のDNA配列である。好ましくは、プラスミドはスーパーコイル状である。

10

【0013】

本発明のもう一つの態様において、本明細書に記載の核酸配列、および製薬上許容される賦形剤、希釈剤もしくは担体を含む医薬組成物が提供される。

【0014】

好ましくは、担体は金ビーズであり、医薬組成物は粒子を介したドラッグデリバリーによる送達に従う。

【0015】

さらに別の実施形態において、本発明は医薬で用いるための医薬組成物および核酸構築物を提供する。詳細には、MUC-1発現腫瘍の治療または予防に用いるための医薬の製造における、本発明の核酸構築物が提供される。

20

【0016】

本発明はさらに、本明細書に記載の組成物もしくは核酸を安全でしかも有効な量投与することによって、MUC-1発現腫瘍、特に乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌（特に非小細胞肺癌）、胃癌および他の消化器（胃腸）癌に罹患した患者、または罹りやすい患者を治療する方法を提供する。

【0017】

また別の実施形態において、本発明は、本発明の核酸構築物またはタンパク質を製薬上許容される賦形剤、希釈剤、または担体と混合することによって本明細書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】

30

【0018】

本明細書に記載のように、本発明の核酸構築物は典型的には15個未満の、より典型的には10個未満の完全反復配列を有する。野生型MUC-1（図1を参照されたい）は、シグナル配列、リーダー配列、不完全または異型のVNTR、完全なVNTR領域、さらに異型の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む。

【0019】

本発明の好ましい実施形態は、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2個未満の反復配列を有する。特に好ましい構築物は、1、2、もしくは7個の完全な反復配列を有する。

【0020】

非VNTR細胞外ドメインはVNTRの5'側に約80個のアミノ酸、および3'側に190-200個のアミノ酸である。本発明のすべての構築物は、この領域に由来する少なくとも1つのエピトープを含む。エピトープは通常、最低7個のアミノ酸配列から形成される。したがって、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つのエピトープを包含する。好ましくはほぼすべての、または一層好ましくはすべての非VNTRドメインが含まれる。構築物が、配列FLSFHISNL, NSSLEDPSTDYYQELQRDISEまたはNLTISDVSVを含む少なくとも1つのエピトープを含むことが特に好ましい。2個、好ましくは3個のエピトープ配列が構築物に組み込まれていることがさらに好ましい。

40

【0021】

好ましい実施形態において、構築物はN末端リーダー配列を含む。シグナル配列、膜貫

50

通ドメインおよび細胞質ドメインは、構築物内でそれぞれ個別に任意である。すべてが存在してもよく、1つ以上を欠いてもよい。

【0022】

本発明の好ましい構築物は下記の通りである：

- 1) 7 VNTR MUC-1 (すなわち7個の完全な反復配列のみを有する完全なMUC-1)
- 2) 7 VNTR MUC-1 ss (シグナル配列を欠く以外は1の通り)
- 3) 7 VNTR MUC-1 TM CYT (膜貫通および細胞質ドメインを欠く以外は1の通り)
- 4) 7 VNTR MUC-1 ss TM CYT (シグナル配列を欠く以外は3の通り)

【0023】

2 VNTRもしくは1 VNTRしか含まないが上記1から4までと等価な構築物も好ましい。そのような構築物のVNTRは、本明細書の上記に記載の完全な反復配列を有する。ある実施形態において、1個以上のVNTRユニットを変異させて、グリコシリ化部位を変化させることによってグリコシリ化の可能性を低下させる。変異は置換が好ましいが、挿入もしくは欠失とすることもできる。典型的には、少なくとも1個のスレオニンまたはセリンが、バリン、イソロイシン、アラニン、アスパラギン、フェニルアラニンもしくはトリプトファンで置換される。野生型VNTRモノマーにおいて、それぞれのMUC-1 VNTRモノマー内部に利用可能な5個の推定0-グリコシリ化部位が存在する。これらは、(上記の番号付けを参照されたい) Thr-4, Ser-10, Thr-11, Ser-19およびThr-20である。このように、少なくとも1個の、好ましくは2もしくは3個またはそれより多くの、好ましくは少なくとも4個の残基が上記のようなアミノ酸で置換されることが好ましい。

10

20

【0024】

好ましい置換は下記を包含する：

| | |
|--------|-----------|
| Thr-4 | Val |
| Ser-10 | Ala |
| Thr-11 | IleまたはVal |
| Ser-19 | Val |
| Thr-20 | Ala |

【0025】

もう一つの実施形態において、MUC-1構築物は異種性T細胞エピトープをコードする核酸配列を有する。こうしたエピトープは、細菌のタンパク質および毒素、たとえば破傷風毒素およびジフテリア毒素に由来するT細胞エピトープを包含する。例えば破傷風毒素由来のP2およびP30エピトープである。こうしたエピトープはもっと長い配列の一部であってもよい。エピトープを核酸分子内に、または本発明の配列の3'もしくは5'末端に組み込むことができる。

30

【0026】

たとえばB型肝炎コア抗原もしくは結核に由来するような他の融合パートナーを検討することができる。ある実施形態において、融合パートナーは結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) RA12、MTB32Aの部分配列 (アミノ酸192から323) 由来である (*Skeikyら、Infection and Immunity* (1999) 67:3998-4007)。

40

【0027】

さらに他の免疫学的融合パートナーは、たとえばB型インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae* B) 由来のタンパク質D (W091/18926) または肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) に由来するLYTAの一部 (典型的にはC末端部分) を包含する (*Biotechnology* 10:795-798, 1992)。

【0028】

本発明のもう1つの態様によれば、本発明のポリヌクレオチド配列を含んでなり、その発現を指示することができる発現ベクターが提供される。このベクターは細菌、昆虫もしくは哺乳類の細胞、とりわけヒト細胞において異種DNAの発現を推し進めるのに好適であると考えられる。

【0029】

50

本発明のさらに別の態様によれば、本発明のポリヌクレオチド配列を包含する宿主細胞、または本発明の発現ベクターが提供される。宿主細胞は、細菌、たとえば大腸菌、哺乳類、たとえばヒト、または昆虫細胞とすることができる。本発明のベクターを包含する哺乳類細胞は、*in vitro*でトランスフェクトされた培養細胞とすることができるが、ベクターを哺乳動物に投与することによって*in vivo*でトランスフェクトすることもできる。

【0030】

本発明はさらに本発明のポリヌクレオチド配列を含む医薬組成物を提供する。この組成物はDNAベクターを含むことが好ましい。好ましい実施形態において、組成物はベクターを包含するDNAでコーティングされた複数の粒子、好ましくは金粒子、を含んでなり、そのベクターは本発明のポリヌクレオチド配列をコードするが、ここでその配列は本明細書に記載のMUC-1アミノ酸配列をコードする。他の実施例において、組成物は製薬上許容される賦形剤および本発明のDNAベクターを含む。

【0031】

組成物はアジュバントを含有することもできるが、あるいは組成物をアジュバントもしくは免疫賦活剤と同時に、または続けて投与することができる。

【0032】

このように、本発明のベクターが免疫賦活剤とともに利用されることは本発明の実施態様の1つである。免疫賦活剤は、本発明の核酸ベクターと同時に投与されることが好ましく、好ましい実施形態においては併せて製剤化される。こうした免疫賦活剤は下記を包含する（しかしこの一覧は網羅的なものではなく、他の薬剤を除外するものではない）：合成物質イミダゾキノリン、たとえばimiquimod [S-26308, R-837]、（Harrisonら、「単独、または糖タンパク質ワクチンと組み合わせてimiquimodを用いた再発性HSV疾患の縮小（Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine）」Vaccine 19: 1820-1826, (2001)）；およびresiquimod [S-28463, R-848]（Vasilakosら、「免疫応答修飾剤R-848のアジュバント活性：CpG ODNとの比較（Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN）」Cellular immunology 204: 64-74(2000)）、抗原提示細胞およびT細胞表面で構成的に発現されるカルボニルおよびアミンのシップ塩基、たとえばtucaresol (Rhodes, J.ら、「共刺激性シップ塩基形成剤による免疫系の治療的増強（Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs）」Nature 377: 71-75(1995))、サイトカイン、ケモカインおよびタンパク質またはペプチドのいずれかとしての共刺激分子、これは前炎症性サイトカイン、たとえばインターフェロン、特にインターフェロンおよびGM-CSF, IL-1、IL-1、TGF- およびTGF-、Th1誘導物質、たとえばインターフェロン、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、およびIL-21、Th2誘導物質、たとえば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、たとえばMCP-1、MIP-1、MIP-1、RANTES、TCA-3、CD80、CD86、およびCD40L、他の免疫賦活性ターゲティングリガンド、たとえばCTLA-4およびL-セレクチン、アポトーシス促進タンパク質およびペプチド、たとえばFas (49)、合成脂質ベースのアジュバント、たとえばvaxfectin (Reyesら、「vaxfectinは抗原特異的抗体力値を上昇させ、プラスミドDNA免疫化に対するTh1型免疫応答を維持する（Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization）」, Vaccine 19:3778-3786)、スクアレン、-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., 「エンドトキシン、Toll様受容体4、及び先天性免疫の求心性limb (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、「有効な皮内遺伝子免疫に必要な免疫刺激DNA配列 (Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization)」, Science 273 (5273):352-354(1996)、Hemmi, H.ら、「Toll様受容体は細菌DNAを認識する (A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA)」, Nature 408: 740-745, (2000)、およびToll受容体のTh1誘導サイトカイン産生のきつ

10

20

30

40

50

かけとなる可能性のある他のリガンド、たとえば合成ミコバクテリアリポタンパク質、ミコバクテリアタンパク質p19、ペプチドグリカン、ティコ酸およびリピドA。他の細菌に由来する免疫賦活タンパク質は、コレラ毒素、大腸菌毒素およびその変異型トキソイドを包含する。

【 0 0 3 3 】

主としてTh1型応答を引き起こす特定の好ましいアジュバントは、たとえば、モノホスホリル リピドAのようなリピドA誘導体、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を包含する。MPL(登録商標)アジュバントは、Corixa Corporation (Seattle, WA) から入手できる(たとえば米国特許第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)。CpG含有オリゴヌクレオチド(このCpGジヌクレオチドはメチル化されていない)も、主にTh1応答を誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは広く知られており、たとえばW096/02555、W099/33488および米国特許第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、例えばSatoら、Science 273:352, 1996によって記載されている。別の好ましいアジュバントは、Quil Aのようなサポニン、もしくはQS21およびQS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)を含めたその誘導体；エスシン(Escin)；ジギトニン(Digitonin)；またはカスミソウ(Gypsophila)もしくはキノア(Chenopodium Quinoa)サポニンを含む。

【 0 0 3 4 】

MUC-1発現腫瘍、または転移の治療もしくは予防に本発明のポリヌクレオチドもしくはタンパク質を使用すること、または本発明のベクターを使用することも提供される。

【 0 0 3 5 】

本発明はまた、MUC-1発現腫瘍、それに伴う転移を含めたあらゆる症状、または疾患を治療し、または予防する方法を提供するが、その方法は本発明のポリヌクレオチド、ベクターもしくは医薬組成物を有効量投与することを含む。医薬組成物の投与は、たとえば「プライム・ブースト」治療的ワクチン接種法において、1回または複数回の個別の投与の形をとることができる。ある特定の場合には、「プライム」ワクチン接種は、本発明のポリヌクレオチドの、粒子を介したDNA送達によることができるが、プラスミド由来ベクターに組み込まれることが好ましく、さらに「ブースト」は、同じ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、またはアジュバント中のタンパク質によるブースティングによることができる。逆に、プライミングが、ウイルスベクターを用いて、またはタンパク質製剤、典型的にはアジュバント中に調剤されたタンパク質を用いて行われ、ブーストは本発明のDNAワクチンとすることもできる。

【 0 0 3 6 】

上記のように、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。こうした発現ベクターは、分子生物学の分野では日常的に構築されているが、タンパク質の発現を可能にするために必要であると考えられ、正しい向きで配置される、たとえば、プラスミドDNA、ならびに適当なイニシエーター、プロモーター、エンハンサーおよび他の因子(たとえばポリアデニル化シグナル)の使用が必要となる。他の適当なベクターは当業者には明らかであろう。これに関する一例として、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 第2版, CSH Laboratory Press. (1989)に言及しておく。

【 0 0 3 7 】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチド、またはベクター内で本発明に使用するポリヌクレオチドは、機能しうるように制御配列に連結されるが、ここでこの制御配列は宿主細胞によるコード配列の発現を準備する能力を有し、すなわちこのベクターが発現ベクターである。「機能しうるように連結される」という表現は、記載された成分が、それらが意図したように機能することを可能にする関係において存在するように、並置することを指す。機能しうるように連結された、プロモーターのような制御配列は、制御配列と両立しうる条件下でコード配列の発現が達成されるように配置される。

【 0 0 3 8 】

ベクターは、たとえばプラスミド、人工染色体(例:BAC, PAC, YAC)、ウイルス、も

10

20

30

40

50

しくはファージベクターとすることができますが、これらは複製開始点、選択可能なものとしてポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、および選択可能なものとしてプロモーターのレギュレーターを備えている。ベクターは1以上の選択マーカー遺伝子、たとえば細菌プラスミドの場合にはアンピシリンもしくはカナマイシン耐性遺伝子、あるいは真菌ベクターについては耐性遺伝子を含むことができる。ベクターを *in vitro* で、たとえば DNA もしくは RNA を作製するために使用することができるが、あるいは、ベクターを用いて、たとえばベクターによってコードされたタンパク質を生産するために、宿主細胞（たとえば哺乳類宿主細胞）をトランスフェクトもしくは形質転換することができる。たとえば、遺伝子治療の DNA ワクチン接種法において、ベクターを *in vivo* での使用に適合させることもできる。

10

【0039】

プロモーターおよび他の発現調節シグナルを、発現を行う予定の宿主細胞に適合するように選択することができる。たとえば、哺乳類プロモーターは、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を包含するが、前者はカドミウムのような重金属に反応して誘導される。SV40 ラージ T 抗原プロモーター、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) も使用することができる。これらのプロモーターはいずれも文献に多く記載され、当技術分野で容易に利用できる。

20

【0040】

好みしいプロモーター成分は、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。したがって、HCMV IE 初期プロモーターの制御のもとに本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0041】

適当なウイルスベクターの例としては、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアもしくはアルファ-ウイルスベクター、ならびにレトロウイルス（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める）が挙げられる。これらのウイルスを用いた遺伝子導入法は当業者に知られている。レトロウイルスベクターはたとえば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ために使用することができるが、ただしそういった組換えは好みしくはない。それに対して複製欠損アデノウイルスベクターはエピソームとしてとどまり、したがって一過性発現を可能にする。たとえばサブユニットワクチンとして使用する目的で、またはイムノアッセイに使用する目的で、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる HIV タンパク質を大量に生産するために、昆虫細胞、ヒト細胞、もしくは細菌において発現を推進する能力を有するベクター（昆虫細胞ではたとえばバキュロウイルスベクター）を使用することができる。全長ワクシニア構築物を生成するこれまでの試みは成功しなかったので、本発明のポリヌクレオチドはウイルスワクチンに特に有用である。

30

【0042】

本発明のポリヌクレオチドは、コードされたタンパク質の発現による生産に有用であって、その発現は *in vitro*、*in vivo*、もしくは *ex vivo* で行うことができる。したがって、ヌクレオチドはたとえば収率を上げるように組換えタンパク質合成に関与し、あるいは実際、DNA ワクチン接種法に利用されて、それ自体で治療薬として用途を見出すことができる。本発明のポリヌクレオチドが *in vitro* または *ex vivo* で、コードされたタンパク質の生産に使用される場合、細胞、たとえば細胞培養における細胞は、発現されるべきポリヌクレオチドを含むように改変されることになる。こうした細胞は、一過性の、または好みしくは安定した哺乳類細胞株を包含する。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って改変することができる細胞の特別な例は、哺乳類 HEK293T、CHO、HeLa、293 および COS 細胞を包含する。選択される細胞株は、安定であるだけでなく、成熟した糖鎖形成、および細胞表面でのポリペプチド発現を可能にする細胞株であることが好みしいと考えられる。形質転換された卵母細胞において発現を達成することができる。トランスジ

40

50

エニック非ヒト動物、好ましくはマウス、の細胞において、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ことができる。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。

【0043】

本発明はさらに、哺乳類被験体にワクチン接種する方法を提供するが、その方法は、被験体に有効量のそのようなワクチンもしくはワクチン組成物を投与することを含む。DNAワクチン、ワクチン組成物および免疫療法剤に用いる発現ベクターはプラスミドベクターとすることがもっとも好ましいと考えられる。

【0044】

DNAワクチンは「裸のDNA」の形で、たとえば注射器や高圧噴射によっ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ともに製剤されたDNAの形で、または粒子によるDNAデリバリー(PMDD)によって、投与することができる。これらのデリバリーシステムはすべて当技術分野でよく知られている。たとえば、ウイルスベクターデリバリーシステムを用いて、ベクターを哺乳動物に導入することができる。

【0045】

筋肉内、皮下、腹腔内もしくは静脈内といった多くの経路で本発明の組成物を送達することができる。

【0046】

好ましい実施形態において、組成物は皮内に送達される。詳細には、組成物は遺伝子銃(特に微粒子銃)投与法によって投与されるが、この技法は粒子(たとえば金)上にベクターをコーティングすることを含み、その後表皮内に高圧で投与される;たとえばHaynesら、J Biotechnology 44: 37-42 (1996)に記載のとおりである。

【0047】

説明のためのある実例において、ガス駆動型の粒子加速は、Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK)およびPowderject Vaccines Inc. (Madison, WI)製の製品のような装置を用いて達成されるが、そのいくつかの例が、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、針なし(needle-free)のデリバリーアプローチを提示するが、ここでポリヌクレオチドのような微細粒子の乾燥粉末製剤は、手で持てる装置によって生じるヘリウムガス噴射の中で高速に加速され、対象となる標的組織内に、典型的には皮膚内に粒子を推し進める。粒子は、0.4-4.0 μmの金粒子であることが好ましく、0.6-2.0 μmの粒径であることが一層好ましいが、DNA複合体はこれらの粒子表面にコーティングされたのち、「遺伝子銃」の中に取り付けるためのカートリッジもしくはカセット内に入れられる。

【0048】

関連した実施形態において、本発明の組成物のガス駆動型ニードルレス注入に役立つと考えられる他の装置および方法は、Bioject, Inc. (Portland, OR)によって提供される装置および方法を含むが、その例の一部は米国特許第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号に記載される。

【0049】

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考えられる量で投与される。投与すべき量は一般に、1用量当たりヌクレオチド1ピコグラムから1ミリグラムまでの範囲内であって、粒子によるデリバリーについては1ピコグラムから10マイクログラムまでが好ましく、他の経路については10マイクログラムから1ミリグラムまでが好ましい。正確な量は、免疫処置を受ける患者の体重、および投与経路によってかなり変動する可能性がある。

【0050】

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を、1回限りの方式で投与すること、または、たとえば1から7回までの回数、好ましくは1から4回までの回数で、

10

20

30

40

50

約1日から約18ヶ月までの間の間隔をおいて、繰り返して投与することが可能である。しかしながら、この治療計画も前と同じく、患者の身体サイズ、治療／予防しようとする疾病、投与されるヌクレオチド配列の量、投与経路、および熟練した医者にとって明白な他のファクターに応じて、かなり変動すると考えられる。患者は総合的な治療計画の一部として1以上の他の抗ガン剤の投与を受けることができる。

【0051】

裸のポリヌクレオチドもしくはベクターを患者に導入するために適した技法は、適当な媒介物による局所適用も包含する。核酸を局所的に皮膚に、または粘膜表面に投与することができるが、後者はたとえば、鼻内、経口、腔内もしくは直腸内投与による。裸のポリヌクレオチドもしくはベクターは、製薬上許容される賦形剤、たとえばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）と共に存することができる。ブピバカインのような促進剤をDNA製剤中に含めて、または別々に使用することによって、DNAの取り込みをさらに容易にすることができる。核酸を受容者に直接投与する他の方法には、超音波、電気刺激、エレクトロポレーションおよび米国特許第5,697,901号に記載の微量接種がある。

【0052】

いくつかの既知のトランスフェクション技術、たとえばトランスフェクション試薬の使用を含めた手法によって核酸構築物の取り込みを高めることができる。こうした試薬の例は、カチオン試薬、たとえばリン酸カルシウムおよびDEAE-デキストラム、ならびにリポフェクション剤（lipofectant）、たとえばリポフェクタム（lipofectam）およびトランスフェクタム（transfectam）を包含する。投与されるべき核酸の用量は変化することができる。

【0053】

本発明の核酸配列は、形質転換細胞を用いて投与することもできる。このような細胞は、被験者から収集された細胞を包含する。本発明の裸のポリヌクレオチドもしくはベクターをこのような細胞にin vitroで導入し、後に形質転換細胞を被験者に戻すことができる。本発明のポリヌクレオチドは、相同意的組換え現象によって、細胞内にすでに存在する核酸に組み込むことができる。形質転換細胞を、必要ならば、in vitroで増殖させて、1以上の得られた細胞を本発明に使用することができる。細胞は既知の外科的手法もしくは顕微手術法によって患者の適当な部位に与えられる（たとえば、移植、マイクロインジェクションなど）。

【実施例】

【0054】

1.1 構築物の作製

下記に詳述するすべての構築物の間の関係の概略図を図1に見出すことができる。

【0055】

1.2 全長MUC-1発現力セットの構築

MUC-1発現力セットの構築のための出発点は、プラスミドpcDNA3-FL-MUC-1（ICRF, London）であった。このプラスミドは、BamHI部位にクローニングされた全長MUC-1（FL-MUC1）cDNA力セットを含むpcDNA3バックボーン（Invitrogen）を有する。ICRFで行われた制限酵素切断地図作製に基づいて、MUC-1遺伝子は約32個のVNTRユニット（数の変動する縦列反復配列）を有する。MUC-1の存在は、プライマー2004MUC1-2014MUC1（付表A）を用いた蛍光シークエンシングによって確認された。FL-MUC1配列のもととなるMUC-1配列を図2に示す。クローニングプロセスの第1段階で、全長MUC-1 cDNA配列を含むBamHI断片を単離し、発現ベクターpcDNA3.1(+)/Hygro（Invitrogen）のBamHI部位にクローニングして、プラスミドJNW278を生じた。CMVプロモーターに対するこの断片の正しい向きを、PCRおよび蛍光シークエンシングによって確認した。

【0056】

クローニングの次の段階は、3'非翻訳領域（UTR）の除去、および今後のクローニング手順を容易にするための改善された制限酵素部位による置換を含むものであった。MUC-1断片を、プライマー2062MUC1および2063MUC1（付表A）を用いて、鋳型としてJNW278を使

10

20

30

40

50

用してPCRで増幅し、*Bst*XIおよび*Xho*Iによって切斷した。並行して、プラスミドJNW278を*Bst*XIおよび*Xho*Iによって切斷した。精製されたベクターバックボーンをPCR断片と連結して、プラスミドJNW314を生じた。制限酵素切斷分析および蛍光シーケンシングによって正しい配列が存在することが確認された。

【0057】

並行して、5'UTRを除去し、最適なコザック配列で置き換えて制限酵素部位を改良した。JNW278を*Nhe*I-*Xho*Iで切斷して、MUC-1 cDNA配列全体を除去した。MUC-1断片を、PCRプライマー-2060MUC1および2061MUC1(付表A)を用いてPCRで増幅し、*Nhe*Iおよび*Xho*Iによって切斷してベクターバックボーンに連結し、プラスミドJNW294を生じた。

【0058】

クローニングの次の段階において、JNW294を*Bsa*MIを用いて切斷し、2個の断片(約2.3kbpおよび3.2kbpのもの)を遊離した。これらの2断片のうち大きいもの(断片A)を分離して精製した。並行してJNW314を*Bsa*MIで切斷し、2個の断片のうち大きい方(断片B)を分離して精製した。断片AおよびBとともに連結してプラスミドJNW340を生じた。*Nhe*I-*Xho*Iを用いて、および別に*Xba*Iを用いて、制限酵素地図を作製することによって正しい向きを確認した。

【0059】

クローニングの最終段階で、*Nhe*Iおよび*Xho*Iによる制限酵素消化によってJNW340から発現カセットを分離し、約4kbpの断片を遊離させた。発現プラスミドpVAC1(Thomsen Immunology 95: 510P106, 1998)を*Nhe*I-*Xho*Iで切斷してMUC-1カセットと結合し、全長MUC-1発現プラスミドJNW358を生成した。MUC-1配列のCMVプロモーターに対する正しい方向性は制限酵素消化および蛍光シーケンシングによって確認された。MUC-1発現カセットの配列を図3に示す。

【0060】

1.3 1個のVNTRユニットを含むMUC-1ベクターの構築

1個のVNTRユニットを含むMUC-1ベクターを構築するための出発点はJNW278である。高度反復性VNTR DNA配列に特有の特徴は、反復ユニットのそれぞれに*Fse*I制限酵素切斷部位が存在することである。JNW278は*Fse*Iによって完全に制限消化され、ベクターバックボーンが分離され、再結合してプラスミドJNW283を生じた。制限酵素切斷分析、PCRおよび蛍光シーケンシングによって、単一のVNTRユニットの存在が確認された。JNW283のMUC-1配列を図2に示す。

【0061】

1.4 1個のVNTRユニットを含むMUC-1発現ベクターの構築

1個のVNTRユニットを含むMUC-1カセットを、JNW283から発現プラスミドpVAC内に移動するために、下記のクローニングステップを行った。クローニングの第1段階は5'および3'非翻訳領域(UTR)を除去すること、ならびに今後のクローニング手順を容易にするために改良された制限酵素切斷部位で置き換えることを含む。鑄型としてJNW283を使用して、プライマー-2060MUC1および2062MUC1を用いてMUC-1の断片をPCR増幅し、*Nhe*Iおよび*Xho*Iによって切斷した。並行して、プラスミドpVACを*Nhe*Iおよび*Xho*Iによって切斷した。精製されたベクターバックボーンをPCR断片と結合して、JNW322を生成した。制限酵素切斷分析および蛍光シーケンシングによって、正しい断片の存在を確認した。

【0062】

1.5 少数のVNTRユニットを含むMUC-1カセットの構築

少数のVNTRユニットを含むMUC-1発現カセットを構築するための出発点は、*Fse*Iによって線状にしたJNW283である。VNTRユニットは、プラスミドJNW278の*Fse*Iによる部分消化によって生成し、1個のVNTRユニットに相当する60bpから7個のVNTRユニットに対応する約420bpまで大きさのさまざまな短い断片のラダーを遊離する。JNW278の部分消化によって生じたVNTR断片のラダーを図7に示す。60-500bpの断片をゲル抽出によって精製し、*Fse*Iで線状としたJNW283と結合した。最初に、MUC-1のVNTR領域の5'および3'側にそれぞれ位置付けられるプライマー-2005 MUC1および2013 MUC1を用いて、クローンをPCRによってス

クリーニングした。複数のVNTRユニットを含むクローンがJNW283の1個のVNTRユニットに相当するPCR断片より大きいPCR断片を生じるようにPCRを組み立てた。PCR陽性クローンをさらに、制限酵素消化および蛍光シーケンシングによる分析に供し、存在するVNTRユニット数を確認した。このプロトコールを用いて、全部で7個のVNTRユニットを有するJNW319、および2個のVNTRユニットを有するJNW321を含めて多くの異なるプラスミドが得られた。JNW319およびJNW321の配列を図4および5に示す。JNW319のVNTRユニットは、より広範囲の集団に含まれる多形性を示す（星印で示す）。

【 0 0 6 3 】

1.6 7個のVNTRユニットを含むMUC-1発現ベクターの構築

7個のVNTRユニットを含むMUC-1カセットを発現プラスミドpVAC内に移動するために、下記のクローニングステップを行った。クローニングの第1段階は、3'非翻訳領域（UTR）の除去、および今後のクローニング手順を容易にするために改良された制限酵素切断部位で置き換えることを含む。プライマー2062MUC1および2063MUC1を用い、鋳型としてJNW278を使用してMUC-1の断片をPCR増幅し、BstXIおよびXholによって切断した。並行して、プラスミドJNW319をBstXIおよびXholによって切断した。精製されたベクターバックボーンをPCR断片と結合し、JNW622を生成した。制限酵素切断分析および蛍光シーケンシングによって正しい断片の存在を確認した。

【 0 0 6 4 】

クローニングの次の段階において、JNW294をBsaMIを用いて切断し、2つの断片（約2.3kbおよび3.2kbのもの）を遊離した。これら2つの断片のうち大きい方（断片A）を分離して精製した。並行して、JNW622をBsaMIで切断し、2つの断片のうち大きい方（断片C、約4kbの大きさ）を分離して精製した。断片AおよびCをともに結合して、プラスミドJNW640を生成した。XbaIによる制限酵素切断地図作製および蛍光シーケンシングによって正しい方向性を確認した。クローニングの最終段階で、MUC-1カセットをJNW640から、NheIおよびXholによる切断後に分離し、pVAC（やはりNheIおよびXholによって線状とした）と連結し、JNW656を生じた。MUC-1発現カセットの配列は蛍光シーケンシングによって確認されたが、それを図6に示す。

【 0 0 6 5 】

1.7 VNTRユニットの精製

JNW278（FL-MUC1）をFsalIによって消化した後、VNTRのラダーが遊離され、それは60bp（1個のVNTRユニットに相当）から420bp（7個のVNTRユニットに相当）にまで及ぶ。電気泳動後、断片をアガロースゲルから分離して精製した。図8はVNTRユニットの2つのラダーを示す。DNAマーカーはレーンAおよびDに示される。レーンBは60-240bpの範囲にあるVNTRユニットを表すラダーを示す。レーンCは180-420bpの範囲にあるVNTRユニットを表すラダーを示す。これらの断片をその後、FseIで線状としたJNW283内に連結して、2個、および7個のVNTRユニットを含むMUC-1遺伝子を構築した。3, 4, 5および6個のVNTRユニットを含む他の構築物を同様の方法で作製することができる（図7を参照されたい）。

【 0 0 6 6 】

2: 皮膚への遺伝子錠免疫化法のための構築物の調製

塩化カルシウムおよびスペルミジンを用いてプラスミドDNAを粒径2μmの金粒子上に沈澱させた。ロードされた粒子を、記載のように（Eisenbraumら、1993；Pertmerら、1996）テフゼルチューピングにコートした。粒子の打ち込みは、Accell遺伝子デリバリーシステムによって実施された（PCT WO 95/19799）。それぞれのプラスミドについて、雌C56B1/6マウスをプラスミドの3回投与（第0日、第21日および第42日）によって免疫化した。各回の投与はDNA/金による2回の打ち込みで構成され、総投与量約4-5μgのプラスミドを与えた。

【 0 0 6 7 】

2.1 筋肉内（i. m.）DNA免疫化

雌C57B1/6マウスを、筋肉内で後肢に、PBS中DNA 50μgを用いて、第0日、第21日および第42日に免疫化した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

2.2 腫瘍細胞注入

2通りの腫瘍退縮実験を行った。第1の実験では、最後の免疫化の2週間後に 0.5×10^6 の腫瘍細胞を麻酔したマウスの右側腹部に皮下注射した。第2の実験では、それよりかなり強いモデルを用いたが、ここでは動物は 1.0×10^6 細胞を受容した。1週間に2回、腫瘍の増殖を、2方向にノギスを用いてモニターした。腫瘍体積は $(a \times b^2)/2$ として算出されたが、ここでaは最大径を、bは最小径を表す。実験の終点（死亡）は腫瘍径が15 mmに達した時点と定義した。

【 0 0 6 9 】

3. 構築物のテスト3.1.1 材料および方法B16F0およびB16F0-MUC1腫瘍細胞

ヒトcDNA MUC-1の発現ベクターでトランスフェクトされたB16F0（ネズミ転移性黒色腫）をGlaxo Wellcome U.S.から入手した。10%熱失活ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシンおよび1mg/mlネオマイシン抗生物質（G148）を添加したDMEM中で細胞を付着単層として培養した。ELISPOTアッセイに使用するために、Verseneを用いて細胞をフラスコから取り出し照射した（16,000ラド）。

【 0 0 7 0 】

3.1.2 MUC-1を発現するEL4腫瘍細胞の構築

EL4細胞を、10% FCS、100U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、50 μM 2-メルカプトエタノールを含有するRPMI完全培地で培養した。JNW278（全長MUC-1）をFspIで線状とし、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）抽出によって精製した後、エタノール沈澱を行った。0.5ml RPMI完全培地中 2×10^7 細胞を、0.4mm BIORADキュベット内で20 μgの線状化DNAと混合した。320V、960 μFのエレクトロポレーションによって、細胞をトランスフェクトした。エレクトロポレーション後、細胞懸濁液を予め加温した30mlのRPMI完全培地に移し、24時間インキュベートして回収を可能にした。500 μg/mlハイグロマイシン含有RPMI完全培地中で、細胞を選択条件下におき、7-10日間インキュベートした。生存細胞を96穴底プレートに入れて希釈し、500 μg/mlハイグロマイシンを含むRPMI完全培地200 μl中に0.5細胞 / ウェルとした。8-10日後、クローンを24穴プレートに移した。この段階で、MUC-1発現プロファイルをフローサイトメトリーによって評価し、陽性で均一なクローンをその後の分析のために維持した。

【 0 0 7 1 】

3.2 MUC-1遺伝子産物に対するT細胞応答に関するElispotアッセイ3.2.1 脾細胞の調製

脾臓は免疫化した動物からブーストの7日後に得られたが、これは第28日もしくは第49日のいずれかであった。脾臓はスライドガラスに挟んで摺り合わせることによって処理して細胞懸濁液を作製した。赤血球は塩化アンモニウム処理によって溶解し、破片を除去して脾細胞の微細な懸濁液を残した。ELISPOTアッセイに使用するために、細胞を $8 \times 10^6 / ml$ の濃度でRPMI完全培地に再懸濁した。

【 0 0 7 2 】

3.3 ペプチドライブラリーのスクリーニング

MUC-1の全配列をカバーするペプチドライブラリーをMimotopesから購入した。ライブラリーは11アミノ酸だけ重なり合った116個の15merペプチドを含み、ペプチドはMUC-1の全配列をカバーした（縦列反復領域の1コピーを包含する）。ペプチドは184から299までの番号で表される。ペプチドライブラリーのスクリーニングのために、下記のプロトコールによってIFN-αおよびIL-2 ELISPOTにおいてペプチドは終濃度 $10 \mu M$ で使用した。IFN-ELISPOTのためにIL-2をアッセイに加え $10 ng/ml$ とした。スクリーニングに用いられる脾細胞は、第0、21および42日にFL MUC1で免疫化されたC57BL/6マウスもしくはCBAマウスから第49日に採取された。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

3.4 エピトープマッピング

C57BL/6マウスにおいて良好な反応性を示す2つのMUC-1領域を、更なる研究のために選択した。これらは、ペプチド222-225および238-239でカバーされる領域であった。フローサイトメトリー（下記のプロトコール）によって、これらのペプチドに反応してIFN を産生する細胞はCD8細胞であることが示された。エピトープをマッピングするために、さらに7または8アミノ酸だけ重なり合った8および9merペプチドをそれぞれMimotopesに注文した。これらを、上記のように免疫した動物から得られた脾細胞を用いてIFN ELISPOTで試験した。2つの免疫優性ペプチド、SAPDNRPALおよびPTTFLASHが同定された。

【0074】

3.5 ELISPOTアッセイ

プレートを $15\mu\text{g/ml}$ (PBS中) ラット抗マウスIFN またはラット抗マウスIL-2 (Pharmingen) でコートした。プレートは +4 で一晩コートした。使用前に、プレートを3回PBSで洗浄した。プレートに脾細胞を 4×10^5 細胞 / ウェルとなるよう加えた。ペプチドSAPDNRP ALを終濃度 10nM としてアッセイに使用した。ペプチドPAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAGHGV (25merペプチド) は、終濃度 $25\mu\text{M}$ で使用された。これらのペプチドはGenemed Synthesisから入手した。ライブラリースクリーニングおよびエピトープマッピング研究から同定されたペプチドもELISPOTアッセイに使用した： $10\mu\text{M}$ 203 (DVTLAPATEPATEPA)、 $10\mu\text{M}$ 299 (LSYTN PAVAATSANL)、 $1\mu\text{M}$ PTTLASHS (Mimotopes)。照射を受けた腫瘍細胞B16, B16-MUC1およびEL4, EL4-278を腫瘍細胞：エフェクター比1:4で使用した。ELISPOTアッセイは、IL-2 (10ng/ml)の存在下、IL-7 (10ng/ml)の存在下、またはサイトカイン無しのいずれかの条件下で実施された。各ウェルの総量は $200\mu\text{l}$ とした。ペプチド刺激を受けた細胞を入れたプレートを、加湿された37 インキュベーターで16時間インキュベートし、一方、腫瘍細胞を刺激物質として含有するプレートは40時間インキュベートした。

【0075】

3.5.1 ELISPOTアッセイプレートの展開

水で1回（細胞の溶解を確実にするために1分間浸す）およびPBSで3回洗浄することによってプレートから細胞を除去した。ビオチン標識ラット抗マウスIFN もしくはIL-2 (Pharmingen)をPBS中 $1\mu\text{g/ml}$ として添加した。プレートを室温で2時間振盪しながらインキュベートした。その後プレートをPBSで3回洗浄した後、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ (Caltag)を $1/1000$ 希釈として加えた。PBSで3回洗浄した後、BCICP基質 (Biorad)とともに15-45分間インキュベートすることによってスポットが現れた。基質を水で洗い落としてプレートを乾燥させた。Brian Hayes, Asthma Cell Biology unit, GSKによって考案された画像解析システムによってスポットを計数した。

【0076】

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

脾細胞を再懸濁して $4\times10^6/\text{ml}$ とした。終濃度 $10\mu\text{M}$ のペプチドおよび終濃度 10ng/ml のIL-2を加えた。細胞を37 で3時間インキュベートし、Brefeldin Aを $10\mu\text{g/ml}$ となるよう添加してインキュベーションを一晩継続した。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。細胞を洗浄して、Caltag Fix and PermキットのMedium Aを用いて15分間固定し、その後、洗浄して、Fix and PermキットのMedium Bで希釈した抗IFN PE (Pharmingen)を添加した。30分インキュベートした後、細胞を洗浄して、FACSCANを用いて解析した。サンプル当たり全部で500,000個の細胞を集め、その後CD4および CD8細胞をゲートで制御してそれぞれのペプチドに反応してIFN を分泌する細胞数を測定した。

【0077】

3.7 MUC-1遺伝子産物に対する抗体のELISAアッセイ

第1, 21, 49および56日に静脈穿刺によって動物から血清サンプルを採り、抗MUC-1抗体の存在についてアッセイした。野生型MUC-01ペプチド配列 (2縦列反復配列に対応する40-mer、PAHGVTSAAPDTRPAPGSTAPPAGHVTSAAPDTRPAPGSTAP) $3\mu\text{g/ml}$ によって4 にて一晩コート

10

20

30

40

50

したNunc Maxisorpプレートを用いてELISAを行った。TBS-Tween (Tween 20を0.05%含有するTris緩衝生理食塩水、pH 7.4)で洗浄した後、プレートをTBS-Tweenバッファー中3% BSAを用いて室温で2時間ブロックした。すべての血清をTBS-Tweenバッファー中で1:100希釈して室温で1時間インキュベートした。HRP標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (#P0260, Dako) をTBS-Tweenバッファー中1:2000希釈となるように使用して抗体結合を検出した。プレートを再度洗浄して、結合した複合体をFast OPD呈色試薬 (Sigma, UK) を用いて検出した。3M硫酸の添加によって反応を終了させ、490nmでの吸光度を測定することによってOPD生成物を定量した。

【0078】

3.8 免疫化マウスの血清のフローサイトメトリー分析

上記ワクチンによって誘起された抗体が、腫瘍細胞を認識する能力を有することを実証するために、PMID免疫化マウスから得られた抗血清のサンプルを使用して、さまざまな腫瘍細胞株を標識し、その標識をフローサイトメトリーによって可視化した。細胞 (T47-D, MCF-7, EL4, EL4-278, B16F0およびB16F0MUC1; 1×10^6) を、5% FCSを添加したPBSバッファーで洗浄し、4 にて15分間、1:100希釈のマウス血清とともにインキュベートした。洗浄後、細胞を第2の抗体 (ヒツジ抗マウスIgG, Dako, Denmark, 1:50希釈) とともに同じ条件下でインキュベートした。対照細胞は第2段階の試薬による染色に先だって、第1段階の抗体の代わりにFACSバッファーとともにインキュベートした。FACS解析は、FACScan (Becton Dickinson)を用いて行った。サンプル当たり1000-10000細胞をFSC (前方散乱光)およびSSC (集積された散乱光)ならびに緑色 (FL1) 蛍光 (集積された蛍光の対数として表される)について同時に測定した。FCSが範囲から外れる凝集物を除いて記録を行った。腫瘍細胞表面に結合した異なるタイプのマウス血清について、データを細胞数 (Y軸) 対蛍光強度 (X軸) としてプロットされたヒストグラムとして表した。

【0079】

3.9 一過性トランスフェクションアッセイ

さまざまなDNA構築物からのMUC-1発現を、CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞へのプラスミドの一過性トランスフェクションとそれに続く全細胞タンパク質に関するウェスタンプローティング、または細胞膜発現MUC-1のフローサイトメトリー解析のいずれかによって、解析した。一過性トランスフェクションはTransfectam試薬 (Promega) を用いて、メーカーの指針にしたがって行った。簡単に述べると、24穴組織培養プレートにウェル当たり 5×10^4 のCHO細胞を1 ml DMEM完全培地 (DMEM, 10% FCS, 2mM L-グルタミン、ペニシリノグリコシド100IU/ml、ストレプトマイシン100μg/ml) 中としてシードし、37 にて16時間インキュベートした。0.5 μg DNAを25 μgの0.3M NaClに加え(1ウェルに足りる)、さらに2 μlのTransfectamを15 μlのMilli-Qに添加した。DNAおよびTransfectam溶液をそっと混合し、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ステップの間に、細胞をPBSで1回洗浄し、150 μlの無血清培地 (DMEM, 2mM L-グルタミン) でカバーした。DNA-Transfectam溶液を一滴ずつ細胞に加え、プレートを緩やかに振盪して37 にて4-6週間インキュベートした。500 μlのDMEM完全培地を加えて細胞をさらに48-72時間37 にてインキュベートした。

【0080】

3.10 MUC-1プラスミドによって一過性にトランスフェクトされたCHO細胞のフローサイトメトリー解析

一過性トランスフェクション後、CHO細胞をPBSで1回洗浄し、Versene (1:5000) / 0.025%トリプシン溶液で処理して細胞を懸濁液に変えた。トリプシン処理後、CHO細胞を沈殿させてペレット状とし、FACSバッファー (PBS, 4% FCS, 0.01%アジ化ナトリウム) に再懸濁した。一次抗体、ATR1を終濃度15 μg/mlとなるよう添加し、サンプルを氷上で15分間インキュベートした。対照細胞はATR1非存在下でFACSバッファーとともにインキュベートした。細胞をFACSバッファーで3回洗浄し、10 μlの二次抗体ヤギ抗マウス免疫グロブリンFITC標識F(ab')₂ (Dako, F0479)を含有する100 μl FACSバッファーに再懸濁して氷上で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。FACScan

10

20

30

40

50

(Becton Dickinson) を用いてFACS解析を行った。サンプル当たり1000-10000細胞をFSC(前方散乱光)およびSSC(集積された散乱光)ならびに緑色(FL1)蛍光(集積された蛍光の対数として表される)について同時に測定した。FCSが範囲から外れる凝集物を除いて記録した。データを細胞数(Y軸)対蛍光強度(X軸)としてプロットされたヒストグラムとして表した。

【0081】

3.11 MUC-1プラスミドによって一過性にトランスフェクトされたCHO細胞のウェスタンプロット解析

一過性にトランスフェクトされたCHO細胞をPBSで洗浄し、Versene(1:5000)/0.025%トリプシン溶液で処理して細胞を懸濁液に変えた。トリプシン処理後、CHO細胞を沈澱させてペレット状とし、PBS 50 μlに再懸濁した。50 mM DTTを含有する2x TRIS-Glycine SDSサンプルバッファー(Invitrogen)を同量添加して、溶液を95 °Cにて5分間加熱した。サンプル1-20 μlを4-20% TRIS-Glycine Gel 1.5mm(Invitrogen)にロードし、1x TRIS-Glycineバッファー(Invitrogen)中で定電圧(125V)にて90分間電気泳動した。染色済み広範囲マーカー(New England Biolabs, #P7708S)を用いてサンプルをサイズで分類した。電気泳動後、Xcell III Blot Module(Invitrogen)、20%メタノール含有1x Transferバッファー(Invitrogen)、および90分間25Vの定電圧を用いて、予めメタノールで湿らせたImmobilon-P PVDF膜(Millipore)にサンプルを転写した。この膜を、4 °Cにて一晩、3%脱脂粉乳(Marvel)含有TBS-Tween(0.05% Tween 20を含有するTris緩衝生理食塩水、pH 7.4)中でブロックした。一次抗体(ATR1)を1:100に希釈し、膜とともに室温にて1時間インキュベートした。TBS-Tweenで十分に洗浄した後、二次抗体を3%脱脂粉乳(Marvel)含有TBS-Tweenで1:2000に希釈して膜とともに室温にて1時間インキュベートした。十分に洗浄した後、Supersignal West Pico Chemiluminescent基質(Pierce)とともに5分間インキュベートした。過剰な液体を除去し、膜を2枚のラップフィルムの間に挟んでシールし、Hyperfilm ECLフィルム(Amersham Pharmacia Biotech)に1-30分間曝露した。

【0082】

4. 結果

4.1 遺伝子錠および筋肉内注射の比較

プラスミドpcDNA3-FL-MUC1内のFL-MUC1発現力セットを、PMIDによって、および筋肉内注射によってマウスに投与した。

【0083】

4.2 抗体応答の比較

筋肉内注射による(マウスA-C)、およびPMIDによる(マウスD-F)免疫化後の抗MUC1抗体応答を図9に示す。その結果は、PMIDによる投与が速度論的により速くより強い抗体応答を引き起こし、3匹中3匹のマウスが第41日に応答することを示す。これに対して、筋肉内経路で免疫化されたマウスは1匹のみが第41日に良好な抗体応答を示した。第42日にさらにブーストした後でも、3匹のマウスのうち2匹がPMID免疫化マウスに匹敵するMUC-1抗体レベルを示すにすぎなかった。

【0084】

4.3 細胞性応答の比較

pcDNA3(空のベクター)もしくはpcDNA3-FL-MUC1でPMIDもしくは筋肉内(IM)免疫化後の細胞性応答を、第0日の一次免疫ならびに第21日および第42日の2回の追加免疫後にELISPOTによって評価した。アッセイは2回目の追加免疫後、13日目に行った。良好なH-2Kbエピトープとしてすでに文献に記載されているペプチドSAPDTRPAP(9.1)によって脾細胞を刺激した。図10のIFN-γ応答は、PMIDによって免疫されたマウスの100%がこのペプチドに対して検出可能な応答を示すが、一方、筋肉内免疫を受けたマウスでは応答は検出されなかつたことを示す。

【0085】

4.4 MUC-1構築物のin vitro発現 - ウェスタンプロット

図11は、さまざまなMUC-1構築物のCHO細胞への一過性トランスフェクション後の、MUC-

10

20

30

40

50

1に対する全細胞タンパク質のウェスタンプロットの結果を示す。データは、FL-MUC1構築物 (JNW358) が 83-175kDa にスメアを生じることを示すが、これは予想分子量 108kDa、および不均一であるが多数のVNTR構造のグリコシル化と矛盾しない。7x VNTR MUC-1構築物 (JNW656) はもう少し集中したスメアを生じ、約 65kDaあたりを中心とするが、これは予想分子量 (61kDa)、およびVNTR構造の不均一なグリコシル化と一致する。1x VNTR MUC-1構築物 (JNW332) はかすかな単一バンドを約 40kDa に生じ、単一のVNTRユニットの存在と合致する。

【 0 0 8 6 】

4.5 MUC-1構築物の *in vitro* 発現 - フローサイトメトリー

MUC-1構築物の CHO 細胞への一過性トランスフェクションの後、細胞表面での MUC-1 の発現を、MUC-1 VNTR に特異的な抗体 ATR1 を用いてフローサイトメトリーによって評価した。MUC-1 陽性細胞の割合は、FL-MUC1 (JNW358) でトランスフェクトされたサンプルについては 9.6%、7x VNTR MUC-1 でトランスフェクトされたサンプルについては 8.8%、さらに 1x VNTR MUC-1 (JNW332) でトランスフェクトされたサンプルについては 9.8% であった。このデータは、MUC-1 が細胞表面に移動して抗体 ATR1 によって検出される能力に VNTR の数が影響を与えないことを示唆する。

【 0 0 8 7 】

4.6 PMID免疫化後の FL-MUC1、7x VNTR MUC-1 および 1x VNTR MUC-1 に対する抗体応答

pVAC (空のベクター)、JNW358 (FL-MUC1)、JNW656 (7x VNTR MUC-1) および JNW332 (1x VNTR MUC-1) を用いた免疫化後の抗体応答を、第 0 日の PMID による初回免疫ならびに第 21 日および第 42 日の 2 回の追加免疫の後に ELISA によって評価した。図 12 は、第 56 日に採取された血清からの抗体応答を示す。空のベクターに対しては MUC1 特異的な応答は存在しなかったが、FL-MUC1 構築物および 7x VNTR MUC-1 構築物は、強力で同等の力値の MUC1 特異的抗体を生じた。これに対して、1x VNTR MUC-1 構築物はこれより低い力値の抗体応答を誘導した。図 12b は、FL-MUC1 および 7x VNTR MUC-1 に対する抗体応答の速度論は、やはり非常に類似しているが、一方、1x VNTR MUC-1 に対する応答は発現が遅く、プラトーに達するために第 42 日に 2 回目の追加免疫を必要とすることを示す。このデータは、VNTR ユニットの大半を欠失することが強力な MUC-1 特異的抗体応答の誘導に不利益とならないことを確認する。しかしながら、1x VNTR MUC-1 に対する抗体応答は、大きさおよび開始の速度論のいずれの点からも最適状態にはおよばない。

【 0 0 8 8 】

4.7 MUC-1免疫化マウスの血清による MUC-1 発現腫瘍細胞の認識

FL-MUC1、7x VNTR MUC-1 および 1x VNTR MUC-1 によって誘導される抗体が、腫瘍細胞表面に発現されたヒト MUC-1 の形を認識する能力を有することを確認するために、免疫化されたマウスから得られた血清を、フローサイトメトリーによってテストした。標的細胞は B16F0MUC1、ヒト MUC-1 を発現するよう操作された腫瘍細胞株とした。その結果は図 13 に示すように、FL-MUC1 免疫化マウス (JNW358)、7x VNTR MUC-1 免疫化マウス (JNW656) および 1x VNTR MUC-1 免疫化マウス (JNW332) から得られた血清は、B16F0MUC1 表面に発現された MUC-1 を認識する能力において等価であることを確認するものであり、多数の VNTR ユニットの除去が生理学的に適切な抗体応答の誘導に不利益とならないことを示唆する。

【 0 0 8 9 】

4.8 MUC-1ペプチドライブラーのスクリーニングによる C57BL/6マウスにおける MUC-1 からの新規 T 細胞エピトープの同定

JNW358 (FL-MUC1) を用いた PMID による第 0 日の免疫化、ならびに第 21 日および第 42 日の 2 回の追加免疫の後、ELISPOT アッセイを第 49 日に実施した。FL-MUC1 ライブラーからのペプチドを終濃度 10 μM でテストした。この最初の選別から、いくつかのグループの 15mer ペプチドが IFN もしくは IL-2 分泌を刺激することが見出された。当該領域を図 20 上に印付けする。IFN 分泌を刺激するペプチドをさらに、細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリーによって検討し、その領域が CD4 もしくは CD8 エピトープを含むかどうかを判定した。ペプチド 223、224、225、238 および 239 が CD8 細胞から良好な IFN の分泌を

10

20

30

40

50

誘導することが見出された。さらにCD8エピトープのマップを作成するために、7または8個のいずれかの個数のアミノ酸だけオーバーラップした8および9merペプチドを入手した。IFN ELISPOTアッセイにおいてテストを行い、その後反応性を示すいくつかをフローサイトメトリーによってテストした。領域223-225はCD8エピトープのクラスターを含んでいた。力値測定によって、有力なペプチドはSAPDNRPALであって、すでに本発明者以外によってMUC-1特異的応答を測定するために使用されたペプチドであることが示された。しかしながら、この領域においていくつかの新規ペプチドが同定され、それらは10 μM以下でCD8によるIFN 分泌を誘導した。本発明者らは、これらのうちの1つ、TSAPDNRPAがin vitroで細胞傷害性T細胞を誘導する能力を有することを明らかにした（データは示さない）。領域238-239は1つの強力なCD8エピトープ、PTTLASHSを含み、本発明者らはこれをその後のMUC-1アッセイに使用したが、さらにいくつかのこれより弱いCD8エピトープも含むことが示された。

10

【0090】

4.9 PMID免疫化後のFL-MUC1、7x VNTR MUC-1および1x VNTR MUC-1に対する細胞性応答

pVAC（空のベクター）、JNW358（FL-MUC1）、JNW656（7x VNTR MUC-1）およびJNW332（1x VNTR MUC-1）を用いた免疫化後の細胞性応答を、第0日のPMIDによる初回免疫ならびに第21日および第42日の2回の追加免疫の後にELISPOTによって評価した。追加免疫の7日後にアッセイを行った。3つの異なるアッセイ条件を用いた：1) MUC-1発現腫瘍細胞、B16F0 MUC1およびEL4-MUC1、これらは広義の抗腫瘍細胞性免疫を示すために使用される、2) SAPDNRPALペプチド、MUC-1のVNTR領域外の高親和性ペプチド（使用されたすべての構築物において一度表現される）、3) VNTR領域に由来する完全な反復配列および隣接する反復配列からさらに5アミノ酸を包含する配列をコードする25merペプチド。このペプチドは、免疫化された脾細胞から主にIL-2産生を誘導する。FL-MUC1構築物、7x VNTR MUC-1および1x VNTR MUC-1構築物は、テストしたすべての刺激に対して強力で同等のMUC-1特異的細胞性応答を生じた。（図14）。SAPDNRPALペプチドの場合には、IFN がCD8細胞によって産生されるが、一方、腫瘍細胞に応答したIFN 産生および25merペプチドに応答したIL-2産生はCD4もしくはCD8細胞のいずれからであることを本発明者らは示した。このデータは、多数のVNTRユニットの欠失が、VNTR領域の内外いずれかのエピトープに対する強力なMUC-1特異的細胞性応答の誘導に不利益とならないことを確認する。

20

【0091】

30

4.10 腫瘍チャレンジ後の防御の比較（PMID対I.M）

PMIDもしくは筋肉注射のいずれかによるMUC-1発現プラスミドpcDNA3-FL-MUC-1または空のベクターpcDNA3.1の投与の後、マウスにMUC-1発現腫瘍細胞（B16F0MUC1）をチャレンジした。腫瘍のないマウスの割合を図15に示すが、これは明らかにPMIDが、同じプラスミドの筋肉注射による送達と比較して、より多数のマウスにおいてその後の腫瘍チャレンジからの防御を誘導することを実証する。このデータは上記に詳述した抗体応答および細胞性応答と関連して、PMIDが筋肉内送達より強力な細胞性および抗体応答を誘導することを示唆し、改善された腫瘍防御特性と対応する。

【0092】

40

4.11 腫瘍防御におけるMUC-1 cDNA構築物（F/L MUC-1および7 VNTR）の有効性

空のベクター（pVAC empty）もしくは全長MUC-1をコードするベクター（JNW358）のいずれかを用いて、材料および方法の項に記載のようにマウスを3回免疫した。最終追加免疫の2週間後、B16F0MUC1細胞を用いてマウスに腫瘍チャレンジし、腫瘍の増殖をモニターした。その時腫瘍は、空ベクター接種群では腫瘍チャレンジの約10-15日後に、FL-MUC1接種群では約22日後に出発した。図16aは空のベクターもしくは全長MUC-1をコードするベクターのいずれかによって免疫したマウスの生存を両群で比較している。空のベクターで免疫したマウス（腫瘍無し20%）に対してFL-MUC1で免疫したマウス（腫瘍無し60%）はかなり良好な生存を示す。図16bは、腫瘍の防御を、以前の実験の2倍量の腫瘍細胞（ 1.0×10^6 ）を用いて、FL-MUC1 および7x VNTRを対照群と比較して示す。2つのMUC-1構築物はいずれも、おおむね第25日までは対照接種群に関連して、腫瘍の増殖に顕著な、しかも同等の

50

遅れを生じる。後になってこの効果は減少するが、これはおそらく腫瘍抗原に対する免疫応答の消耗による。

【0093】

結論として、7x VNTR MUC-1構築物は、高度にストリンジエントな条件下であってもFL-MUC1と同等の防御的な抗腫瘍応答を与えた。

【0094】

4.12 組換えワクシニアウイルス系におけるFL-MUC1および7 VNTR MUC-1の安定性の対比

全長ヒトMUC-1をBamHI断片としてベクターpSClinkerに挿入した。この構築物を用いて、ワクシニアウイルスゲノムのTK(チミジンキナーゼ)遺伝子内への上記ベクターの相同的組換えによって組換えワクシニアウイルスを作製した。

10

【0095】

HTK細胞の細胞シート上に組換えウイルスを蒔き、プラークをbluo-galアッセイによって-ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。-gal遺伝子はベクター内に保有され、したがって青いプラークは組換えウイルスを示す。多数の青いプラークを選択し、bluo-galアッセイを行ったときにプラークの100%が青い染色を生じるまでクローン化した。

【0096】

これらのクローンのうち6個を用いて、感染多重度10でHTK細胞に感染させ、感染の6、24および32時間後に細胞を集めた。細胞を200μlの培地中に再懸濁し、40μlを採ってSDS-PAGEローディングバッファーと混合した。

20

【0097】

これらの細胞抽出物をSDS PAGEゲルで電気泳動し、モノクローナル抗体ATR1およびHMFG1を用いてウェスタンプロットによって解析した。これらのモノクローナル抗体はいずれも、MUC-1のVNTR領域にあるエピトープを認識する。組換えウイルス感染サンプルはいずれも、これらの抗体でまったく染色しなかった。pVAC-7VNTRMUC1でトランスクレクトされた細胞の対照細胞抽出物は染色され、明るいバンドはTRエピトープの存在を示す。抗-ガラクトシダーゼ抗体による染色は、組換えウイルスに感染した全サンプルで-galが発現しているが、野生型ウイルスもしくは細胞対照では発現していないことを示した。

【0098】

集められた感染細胞の分子的解析はPCRによって行った。組換えウイルスゲノム内部のpSC11linker-FLMUC1構築物のさまざまな部分の存在を示すと考えられるプライマー対を選択した。下記のプライマー対を選択した：

| | |
|---------------------|--------------------------|
| FMC101 + 2014MUC1 | - ベクターとMUC-1の5'末端との間の結合部 |
| 2008MUC1 + FMC102 | - ベクターとMUC-1の3'末端との間の結合部 |
| 2004MUC1 + 2014MUC1 | - MUC-1の一部分 VNTR領域の5'側 |
| 2007MUC1 + 2009MUC1 | - MUC-1の一部分 VNTR領域の3'側 |

【0099】

FMC101およびFMC102はベクター配列内のプライマーであって、それぞれリンクマー配列に対して5'および3'側にある。

【0100】

FMC101 : CATAAATAATAAACATAATAATTCTCG

40

FMC102 : GCCTCCTTAAAGCATTCATACACACAGC

【0101】

上記の4つのPCR反応は、1μlの回収された組換えウイルス感染細胞(感染後32時間)を用いて、80℃にて10分間加熱後に行われた。野生型ウイルス感染細胞および非感染細胞のサンプルについても反応を実施した。1ngのpSClinker-FLMUC1プラスミドDNAの陽性対照も含めた。

【0102】

陽性対照は、アガロースゲルで電気泳動した時に正確な大きさの増幅された断片を生成した。他のサンプルはいずれも特異的な産物を生成せず、これは構築物がもはやウイルスゲノム内で無損傷ではないことを示唆する。

50

【0103】

その後、7VNTR型のヒトMUC-1を含む組換えウイルスを同様に作製し、クローン集団を確実にした後これを用いて、前記のように回収されたHTK細胞に感染させた。これらの感染細胞の細胞抽出物は、感染2日後にART1を用いたウェスタンプロットによって、また感染細胞のFACS解析によつても、MUC-1の発現を明白に示した。7VNTR組換えウイルスに感染したマウスMC57細胞を用いて、ELISPOTアッセイにおいてMUC-1ワクチン接種したマウス由來の脾細胞を刺激した。一晩インキュベートした後、脾細胞は7VNTRワクシニア感染細胞に反応してIL-2の分泌を示したが、野生型ワクシニア感染細胞は示さなかつた。

【0104】

これらの結果は、7個の縦列反復配列を有するMUC-1構築物の使用は構築物の安定性を向上させることを示唆する。全長MUC-1組換えワクシニアウイルスが感染細胞においてMUC-1の発現を誘導できなかつた事実は、この大いに組換えを生じやすい環境では構築物が不安定であることを強く示唆する。6個のウイルスクローンのいずれもがMUC-1を発現せず、MUC-1遺伝子を含んでもいいと思われたが、すべてが⁻ガラクトシダーゼを発現し、これは同一ベクターに保持された。しかしながら、もっと少ない反復配列をもつ7VNTR型は、3通りの異なるアッセイにおいて発現を明白に示し、より大きな安定性を示し、抗体もしくは抗原特異的T細胞による認識はいずれも損なわれなかつた。

【0105】

5. 大腸菌DH1内で増幅する場合のFL MUC, 7 VNTRおよび1 VNTRの安定性

関連ベクターを用いて、大腸菌DH1を形質転換した。空のベクターも対照として形質転換した。

【0106】

VNTR領域内の反復配列数が安定性に影響を与えるかどうかを判断するために、FL-MUC1, 7xVNTR MUC1および1xVNTR MUC1プラスミドを用いて振盪フラスコ安定性アッセイを行つた。

【0107】

安定性試験は、それぞれ10-14時間持続する9回継代にわたる振盪フラスコ培養において各構築物の増殖、プラスミド生産およびプラスミド保持を調べた。安定性試験の使用は、振盪フラスコ中で細胞の継代培養を繰り返した結果としてプラスミドの生産および性質が変化するかどうかを判断するために採用される。振盪フラスコ中の条件は制御されていない（たとえば、pH, 通気）ので、試験の間のプラスミドの性質および生産の維持は、これらの性質が引き続き安定であると考えられる良好な徴候である。

【0108】

5. 結果5.2.1 培養物の増殖

接種量のわずかな変動に起因して、それぞれの継代からの細胞によって達成された最終的なOD600nm間には多少の変動があるが、全体としてはアッセイの間に、もしくは種々のMUC1構築物の間でいずれも増殖速度の有意な差はなかつた。

【0109】

5.2.2 プラスミドの生産

プラスミドコピー数の値は、1回目、5回目および9回目（最終）の継代から得られた。全長構築物に関しては、PCNはこの期間を通じて54%減少したが、他の3つの構築物については、PCNは40%程度増加した。量的な収量（mgプラスミド/1培養物）は7VNTRについては試験期間を通して安定なままであったが、全長構築物では64%減少した。量的収量のわずかな減少は、全長構築物で観察されたほどに著しくはないが、空のベクター（21%）および単一VNTR構築物（24%）において観察された。

【0110】

5.2.3 プラスミドの保持

プラスミド保持はレプリカプレーティングアッセイによって測定され、安定性試験の期間を通じてすべての構築物について80%から100%の間にとどまった。さらに、構築物の間

10

20

30

40

50

で有意な差はなかった。

【0111】

5.2.4 プラスミドの安定性

この研究の続行期間を通してプラスミドの安定性を調べるために、開始（第0日集菌）および終了時点（第5日集菌）のプラスミド抽出物を、Qiagen Mini-prep. Plasmid Extractionスピニカラムを用いて作製した。次にこれらの抽出物を、アガロースゲル電気泳動分離によって分析し、その後Sybr-Gold染色を行った。このSybr-Goldによる染色法は、プラスミドの安定性を解析するために特に適していると考えられるが、それは1000ngサンプル中の1ngの「スパイク（spike）」組換え体を検出する能力を有することを以前の研究が示しているためである。検討の結果を下記に示すが（図6を参照されたい）、この結果から、3つの結論が引き出される：

1. 7xVNTRおよび1xVNTR構築物は、実験の間を通じて想定される数のVNTR反復配列を含み、プラスミドバックボーンにもVNTR反復配列構造にもいずれの時点でも不安定さの検出される証拠はなかった。

【0112】

2. 安定性アッセイに使用したp7313空ベクターは期待されるプロファイルを示さず、p7313プラスミドスタンダードとは異なる。

【0113】

3. 最後の時点で採取された全長Muc1サンプル（第5日；9回目の継代）は、起源の不明な微量プラスミドを含有する。

【0114】

p7313プロファイルの矛盾、ならびに第5日目のFL-Muc1構築物での微量プラスミド種の同定の結果として、さらに調査検討を行った。

【0115】

安定性試験に用いられたp7313空ベクターとプラスミドスタンダードとの間の、観察された相違を検討するために制限酵素解析を行った。この解析の結果から、BamHI (1926bp) およびSapI (2422bp) 制限酵素切断部位を含むp7313構築物の～800bp領域が欠失していたことが判明した。そこで、この領域に隣接するプライマーをデザインして、続いてプラスミドの配列を決定した。その結果得られた配列データから、1866から2589の間の領域が欠失していたことが確認された。この領域のプラスミドは、Cer配列を含む。このCer配列はコンカテマーの分解を促進するために用いられるため、その欠失は、安定性試験で観察された多重結合したp7313プラスミド種を説明することができる。

【0116】

さらなる検討：FL-MUC1サンプルの微量プラスミドの解析

終点FL-MUC1サンプルにのみ認められる微量プラスミドをさらに解析した。この解析から、これらの微量物が第4日以前には検出されないことが判明した。これらの知見とともに、上記の微量プラスミドのゲル精製も行い、再形質転換、再精製して配列決定した。こうした分析によって、これらのプラスミドはその後、組換え体というよりはむしろ混入物として同定された；これらはすなわち安定性アッセイに用いられた7xVNTR (p7656) 、Cer領域に欠失のあるp7313（上記に概説）、およびやはりこのp7313 Cer欠失の推定コンカテマーである。

【0117】

これらの結果から、FL-MUC1サンプルにはp7313空ベクターおよび7xVNTR (p7656) 構築物の両方が混入しFL-MUC1の終点サンプルには組換え体は存在しないと結論された。これらの混入物は、プラスミドの最初の形質転換の間にFL-MUC1ストック大腸菌DH1に入ったと考えられる。微量プラスミドは第4日以前にはアガロースゲル上に現れないで、1つの可能性は、FL-MUC1プラスミドと比較してサイズが小さいため検討の過程で選択されたということである。

【0118】

3. 結論

10

20

30

40

50

安定性試験からのデータは、7xVNTRが増殖特性、プラスミド保持およびプラスミドの性質の点で安定であることを示した。増殖特性、プラスミド保持およびプラスミドの性質については、1xVNTR、7xVNTRおよびFL-MUC1ベクターの間で識別可能な差異はなかった。しかしながら、コピー数のデータはこれらの構築物の間で有意な差が存在することを強調した。プラスミドのコピー数および収量はいずれも安定性試験を通じて7xVNTR構築物と比較して全長構築物では有意に減少した。プラスミド保持は全長構築物については実験の間を通じて100%を維持すると思われたが、これは集団の中のすべての細胞がその時にまだ、細胞にカナマイシン耐性を与えるのに十分なプラスミドを含むことを意味するにすぎない。実験をもっと長く続けたならば、カナマイシンに対する耐性が選択プレート上での増殖を可能にするのに十分でないようなレベルにまでコピー数が減少する可能性があり、その結果、観察されるプラスミド保持の減少に至る。これらのデータは、7xVNTR構築物がその後の好ましい展開の側面から見て有意な利点を有することを示唆する。プラスミド含量は細胞ペーストの精製に影響を及ぼすと考えられる。7VNTRおよびFL-MUC1構築物の間の相違によって、7VNTRの方が容易に精製され、高収率で得られる可能性が高い。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0 1 1 9】

【図1】MUC1構築物の構成を示す。

【図2】プラスミドJNW283に由来するMUC1配列を示す。

【図3】プラスミドJNW358に由来するMUC1発現力セットを示す。

【図4】プラスミドJNW319由来の7xVNTR MUC1配列を示す。

【図5】プラスミドJNW321由来の2xVNTR MUC1配列を示す。

【図6】プラスミドJNW656由来の7xVNTR MUC1発現力セットを示す。

【図7】さまざまなプラスミド構築物の間の相互関係を示すフローチャート図を示す。

【図8】VNTRユニットの精製を示す。

【図9】pcDNA3-FL-MUC1の、PMID(マウスD-F)または筋肉内注射(マウスA-C)による投与後のC56BI/6マウスにおける全Ig抗体応答を示す。

【図10】pcDNA3-FL-MUC1(MUC1)またはpcDNA3(空ベクター)によるPMIDおよび筋肉内(IM)免疫化後の抗MUC1細胞性応答の比較を示す。

【図11】MUC1構築物による一過性トランスフェクション後のCHO細胞のウェスタンプロット分析を示す。

【図12】pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)およびJNW656(7xVNTR MUC1)およびJNW332(1xVNTR MUC1)によるPMID免疫化後の抗MUC1抗体応答のA) 力価測定、およびB) 速度論を示す。

【図13】空ベクター、FL-MUC1(JNW358)、7xVNTR MUC1(JNW656)および1xVNTR MUC1(JNW332)によって免疫したマウス由来の血清を用いた、染色されたB16親細胞およびB16F0MUC1腫瘍細胞のFACSプロファイルを示す。

【図14a】pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)、JNW656(7xVNTR MUC1)およびJNW332(1xVNTR MUC1)によるPMID免疫化後の抗MUC1細胞性応答を示す。グラフaはB16MUC1腫瘍細胞に対するIFN応答を示す。

【図14b-c】pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)、JNW656(7xVNTR MUC1)およびJNW332(1xVNTR MUC1)によるPMID免疫化後の抗MUC1細胞性応答を示す。グラフbはSAPDNRPALペプチドに対するIFN応答を示す。グラフcはTR配列を表す25merペプチドに対するIL-2応答を示す。

【図14d-e】pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)、JNW656(7xVNTR MUC1)およびJNW332(1xVNTR MUC1)によるPMID免疫化後の抗MUC1細胞性応答を示す。グラフdおよびeはブールされた脾細胞(グループ当たりマウス3匹)の様々なMUC1ペプチドに対するIFNおよびIL-2応答を示す。

【図15】pcDNA3-FL-MUC1またはpcDNA3.1(空ベクター)の3回投与、およびB16F0MUC1細胞による腫瘍チャレンジ後の腫瘍のないマウスの割合を示す。

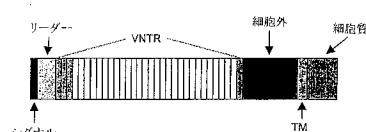
【図16】MUC1 PMID構築物による腫瘍の防御を示す。

【図17】MUC1構築物を用いた一過性トランスフェクション後のCHO細胞のウェスタンプロット分析を示す。

【図18】プライマー配列を示す。

【図1】

MUC1構築物・概説



記号表

| | |
|--|---------------|
| | シグナル配列 |
| | リーダー配列 |
| | 非典型VNTR反復ユニット |
| | 完全VNTR反復ユニット |
| | 非VNTR細胞外ドメイン |
| | 糖質側面ドメイン |
| | 細胞質ドメイン |

略号

| | |
|------|--------------|
| TM | 膜貫通ドメイン |
| CYT | 細胞質ドメイン |
| SS | シグナル配列 |
| VNTR | 数の変動する繰り返し配列 |

【図2-1】

プラスミドJNW283に由来するMUC1配列。BamHI部位に二重下線を付す。タンパク質配列は1文字書式で示す。開始および終止コドンは太字で示す。VNTR反復配列には下線を付し、EseI部位は太い下線で示す。プラスミドpcDNA3-FL-MUC1(ICRF)由来のFL-MUC1配列は、下線を付したVNTR配列を除いて下記の配列と同一であり、VNTR配列はpcDNA-FL-MUC1プラスミドでは約32回繰り返す。

```

GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCCTGAATCTGTTCTGCCCTCCCC
CCCCATTTCACCAACACCCATCACACCGGCACCCAGTCTCCCTTCTCCCTGCTGCTGCT
M T P G T Q S P F F L L L L - 15
TCACAGTGCTTACRATTGTTACAGGTTCTGGTCATCAGCTACCCAGGTGGAGAAA
T V L T V V T G S G H A S S T P G G E K - 35
AGGAGACTTCGGCTAACCCAGAGAAGATTCAGTGCCCAGCTACTGAGAAGAAATGCTGTGA
E T S A T Q R S S V P S S T E K N A V S - 55
GTATGACCAACAGCTTACCTCCAGGCCACAGCCCCGGTCAAGGCTCCACACACTCAGG
M T S S V L S S H S P G S S S T T Q G - 75
GACAGGATGTCACTCTGGCCCGGCCACGGAACCCAGCTCAGGTTCAAGCTGCCACCTGGG
Q D V T L A P A T E P A S G S S A A T W G - 95
GACAGGATGTCACCTCGGGCTCCACCCAGTCACCCAGGCCAGCTCCACCAACCCGGCAG
Q D V T S V P V T R P A L G S T T P P A - 115
CCCCAGATGTCACCTCGGCCGGACAACAGCCAGGCCGGCTCCACCCGGGGGGGGGGGGGG
H D V T S A P D N K P A P G S T A P P A - 135
CCCCAGGTGTCACTCGGCCGGACAACAGCCAGGCCGGCTCCACCCGGGGGGGGGGGGGG
H G V T S A P D T R F A P G S T A P P A - 155
CCCCATGGTGTCACTCGGCCGGACAACAGCCAGGCCGGCTCCACCCGGGGGGGGGGGG
H G V T S A P D N R F A L G S T A P P V - 175
TCCACATGTCACCTCGGCCCTCAGGCTCTGCACTCAGGCTACCTTCACTCTGGTGCACA
H N V T S A S G S A S G S A S T L V H N - 195
ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCAACACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC
G T S A R A T T T P A S K S T P F S I P - 215
CCAGGCCACCTCTGATACTCTACCCACCCCTGCCAGCCATAGCACCAAGAGCTGATGCCA
S H H S D T P T T L A S H S T K T D A S - 235
GTAGCACTACCATAGCACGGTACTCTCTCACCTCTCCAATCACAGCACTCTCCCC

```

【 图 2 - 2 】

S T H S T V P P L T S S N H S T S F Q - 255
 AGTTGTCCTACTGGGCTCTTCTTCCATTTCAACATTCAAACCTCCAGTTA
 L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 275

 ATTCCTCTCGGAAGATCCCAGCACCCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGRAACATTTCCTC
 S S L E D P S T D Y Y Y Q E L Q R D I S E - 295

 AATTTTTTTCGCAAGATTATAAAACAGGGGGTTCTGGGCTCTCCAAATATAAAGTTCA
 M F Q I Y K Q G F G L L G S N I K F R - 315

 GGCCAGGATCTGGGTACAATTGACTCTGGCCTCCAGAARGGTACCATCAATGTC
 P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 335

 ACGACGTTGGAGACACAGTCAATCAGTATAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA
 D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 355

 CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGTGATGTGCCATTCTCTCTGCCAGTCGGGGCTG
 I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 375

 GGGTCGCCAGGCCTGGGCATCGCGCTGGTGTCTGGTCAGTGTCTCTGGCTGGCCA
 V P G W G I A L L V L V C V L V A I L A I - 395

 TTGGCTATCTCATGGCTTGGCTGTCTGTCTGGCCGAAAGAAACTACGGGAGCTGG
 V Y L I L A B A V C Q C R R K N Y G Q L D - 415

 ACATCTTCCACCCGGATACCTACCATCTATGGCGAGTACCCCCACTACCCACCC
 I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 435

 ATGGGCGCTATGTGCCCTAGCAGTACCGATCTGAGCCCTATGAGAAAGGTTCTGCA
 G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 455

 GTAATGGTGGCACAGCCCTCTTACACAAACCCAGCTGGCAGCCACTCTGCCA
 N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 475

 TGTAGGGGCRGCTGCCCTGAGCTGAGTGGCCAGCTGGCATTCCACTCCACTCAG
 * - 476

 GTTCTTCAGGGGAGAGCCCCCTGACCCCTGTTGGCTGGTAGCTGGGAGCTGG
 GCTGCTCACACCGCTCTTCAAGGGCCCAACATTTCAGCTGGAGACTCTCAGTGTG
 AGCTTCACTGGAGACGCCCTAGAGCTGGAGCTGGAGCTGG

【図3-2】

S T H H S T V P P L T S S N H S T S P Q - 257
AGTTGTCCTACTGGGGCTCTTCTTCCATCTGTCTTCAACATTCAAACCTCCAGTTA
L S T G V S F F F L S P H I S N L Q F N - 277

ATTCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAAAGAGCTGCCAGAGACATTCTG
S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 297

AATGTTTTTGCAAGATTTATAACAGGGGGTTTCTGGGCCTCTCCAAATTAAAGTTCA
M F L Q I K Y Q G G F L G L S N I K F R - 317

GGCAGGATCTGGTGTCTACRATTGACTGGCTTCTCCAGAGCTTCAATGTCC
P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 337

ACGACGTGGAGACACAGTCAATCAGTATAAACGCGAACAGCCTCTCGATATAACCTGA
D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 357

CGATCTCAGACGTCAGCGTAGTGTGGCATTTCTCTGCCCCAGTCTGGGCTG
I S D V S V S D V P F F F S A Q S G A G - 377

GGGTGCCAGGCTGGGCCATCGCGCTGGTGTGGCTGTCTGGTGTCTGGCCGCTGGCCA
V P F G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 397

TTCGCTATCTCATGGCTTGGCTGTCTGTCTGGCTGGCTGGCTGTCTGGCTGGCTGG
V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 417

ACATTTTCCAGCCCCGGATACCTACCACTCTATGGGGAGTACCCCACTACCAACCC
I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 437

ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTCTGCA
G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 457

GTAATGGTGGCAGCACGGCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGGCACTTCCTG
N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 477

TGTCTAGATAGCTCGAG
S P * - 480

【図3-1】

プラスド⁺ JNW358 に由来する MUC1 発現カセット、タグ配列は1文字書式で示す。XbaI 部位に二重下線を付す。XbaI 部位には破綻の下線を付す。XbaI 部位はイクリプトとする。開始および終始ドンは太字で示す。VNTR 反復配列には下線を付し、FseI 部位は太い下線で示す。FL-MUC1 配列は下線を付した VNTR 配列を除いて下記の配列と同一であり、VNTR 配列は JNW358 では約 32 回繰り返す。

TCAGGGCCACCATGCTAGAACRCGGGCCACCGACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 M S R T P G Q T Q S P F F L L L L L - 17

 TCAACAGTGGCTTCACTGTTCATACGGTTCTCGCTCATGCCAACGTCATCCCCAGGGAAAAA
 T V L T V V T G S G H A S S T P F G G E K - 37

 AGCAGATCTTGCGCTTACCCAGGAGRATTCTAGTGGCCCGCTCTCTAGTGAAGAAGAATCTGTA
 E T S A S T Q R S S V P P S S T E K N A V S - 57

 GTATWAGCAGCAGCGTACTCTCCACCCAGACGGCCGGTTCAAGCTCCTCCACCACTCAGG
 M T S S V S L D S H S P G S G S S T T Q G Q - 77

 GACAGGGATGTCACTCTGGCCCGCCGCCRCCGGAACCCAGCTTCAGGTTCACTGGCCACCTGGG
 Q D V T L A P A T E P A S G S A A T W G - 97

 GACAGGGATGTCACTCTGGCCCGCCAGTCAGCAGGCCAGCCCTGGCTTCACCCACCCCGCAG
 Q D V T S S V P V T R P A L G S T T P A P P A - 117

 CCCACGATGTCACTCTGGCCCGCCAGCACAAAGCAGCAGCCGGCTCCACCGCCCCCCCAG
 H D V T S S A P D N K P A P G S T A P P A - 137

 CCCACGGATGTCACTCTGGCCCGCCAGCACCAAGGCCGGCTCCACCGCCCCCCCAG
 H G V T S S A P D T R P A P G S T A P P A - 157

 CCCATGGGTGTCACCTCGGCCCGGACACCGAGGCCGGCCGGCTCCACCGCCCCCCCAG
 H G V T S S A P D N R P A L G S T A P P P V - 177

 TCCACAAATGTCACCTCGGCCCTAGGCTCTGCACTAGGCTCAGCTTACTCTGTTGCRCA
 H N V T S S A S G S A S G S A T L V H N - 197

 ACGEQACCTCTGGCAGGCTTACCAACACCCAGGCCAGCAAGAGACTCCATTCTCAATT
 G T S K A R A T T T P A S K S T P F S I P - 217

 CCAGGCCCCACTCTGATAACTCTACCCACCTTGAGCAGGCCATGACCAAGACTGTGACCA
 S H H S D T P T T L A S H S T K T D A S - 237

 GTAGCAGTCACTCAGCGGTACCTCTCTCTACCTCCATACAGCAGCTCTCTCTCTCTCTCT

【図4-1】

プラスミド JNW319 由来の 7xVNTR MUC1 配列。BamHI 部位に二重下線を付す。タンパク質配列は1文字書式で示す。開始および終止コドンは大字で示す。VNTR 反復配列には下線を付し、FseI 部位は太い下線で示す。VNTR 配列内の自然発生するアミノ酸多型を星印で示す。

```

GGATCCGCTCACCTCTCGACGCCGCCTGGCTGAGCTGGTCTGGCCCTCCCCCA
CCCATTTCACCAACCAATGRCAGCCGGCACCAGCTCTCTTCTCTCTGCTGCTCC
M T F G T Q S P F E L L L L - 15

TCACAGTGTCTACAGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCAGTTGGAAAA
T V L T V V T G S G H A S S T P P G G E K - 35

AGAGAGACTTCGGCTAACCCAGAGAAGTCTAGTGGCCAGCTCTACTGGAGAAATGCTGTGA
E T S A T Q R S S V P S S T E K N A V S - 55

GTATGACCCAGCGACTCTCCAGGCCACAGCCCCGGTTCAAGGCTCTCCACCACTCAGG
M T S S V L L S H S P G S G S S T T Q G - 75

GACAGGATGTCACTCTGGCCCGGCCAGGAACCCAGCTTCAAGGTTCACTGCCAACCTGGG
Q D V T L A F A T E P A S G S A A T W N G - 95

GACAGGATGTCACCTCGGTTCCAGTCACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCAACCCCGCAG
Q D V T S V F V T R P A L G S T T P P A - 115

CCCCAGGTGTCACCTCGGTTCCAGTCACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H D V T S A P D N K R P A P G S T A P P A - 135

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A F D T R P A P G S T A P P A - 155

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACCCAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 175

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 195

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 215

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 235

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 255

CCCCAGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAAGGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAG
H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 275

```

【 図 4 - 2 】

【図5-2】

ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTCTCTG
 S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 315

 AAATGTTTGTGAGATATAAACAAAGGGGTTTCTGGCCCTCTCCAATTAAGTCA
 M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 335

 GGCCAGGATCTGTTGCTACAATGACTCTGGCCCTCAGAGAAGCTTACCATCAATGTC
 P G S V W Q V Q L T L A F R E G T I N V H - 355

 ACAGACGTGGAGACACAGTCAATCTGATAAACCGGAAGCAGCCTCTGCATATAACCTGA
 D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 375

 CGAGTCTCAGACCTCAGCTGAGTGATGCCATTCTCTCTGCCAGTCTGGGGCTG
 I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 395

 GGGTGCAGGCTGGGCATCGCGCTGCTGGTGTGGCTGTGTTCTGGTGTGGCTGGCCA
 V P W G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 415

 TTGTCTATCTCTTGGCTTGGCTGTCAGTGCCTGGCGAARRGAACTRCGGCGCTGG
 V Y L I F A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 435

 ACATCTTCCAGCCGGGATACCTTACCATCCTATGAGCGAGTACCCCACTTACCCACACC
 I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T R - 455

 ATGGGCGCTATGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTRGCCCTATGAGAAGGTTCTGCAG
 G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 475

 GTAATGGTGCAGCAGCCCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGGCCACTCTGCCTACT
 N G G S S I S Y T N P A V A A T S A N L - 495

 TGTAGGGCAGCTCGCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCGTAGCTGCCATTCCACTCCACTCAG
 * - 496

 GTTCTTCAAGCCGAGACCCCTGACCTGTTGGCTGGCTGGGAGATTCAGCTGG
 GCTCTTCAACCCCTTCAAGGCCACCAATTGTCAGCTGGAGACTTCAGTGTGGA
 AGCTTCAGGCCCTTCAAGGCTGAGCTGCTGGAGACTTCAGTGTGGA
 GTCGGCCAGCTGGGAGGCTGAGCTGCTGGAGACTTCAGTGTGGA
 GCTGGCCAGCTGGGAGGCTGAGCTGCTGGAGACTTCAGTGTGGA

【 図 5 - 1 】

【 図 6 - 1 】

プラスミド JNW656 由来の 7xVNTR MUC1 発現カセット。NheI 部位に二重下線を付す。XbaI 部位には破線の下線を付す。XbaI 部位はイタリック体とする。タンパク質配列は 1 文字書式で開始および終止コドンは太字で示す。7xVNTR 反復配列には下線を付し、FseI 部位は太字で示す。VNTR 配列内の自然発生するアミノ酸多型を星印で示す。最適化された Kozak 配列はナンバーフォント(№)で示す。

```

  ######
 GCTGCTGCCACCATGTCAGAACACCGGGCACCAGCTCTCTTCTCTCTGCTG
   M S R T P G T Q S P F F L L - 14

CTGCTCCATCACAGTCTACAGTTCAAGGTCTGGTCAGCTCAGGGTCTACCCCAGGT
   L L L T V L V T V T G S G H A S T P G - 34

GGAGAGAAGAGRGAGCTTGGCTTACCCAGGAGAGTTCAGTGGCCAGCTTACTGAGAAGAAT
   G E K E T S A T Q R S S V P S S T E K N - 54

GCTGTTGAGTATGGCAGCACGCTACCTTCAGGCCACAGCAGCCGGGTTCAAGGGCTCCCTCACC
   A V S M T S V V S L S H S P G S G E S T - 74

ACTCAGGGCAGGGATGTCTACTTGCCCCGGCCACGGAACCACTCAGGGTCTCAGCTGCC
   T Q G Q D V T L A P A T E F P A S G S A A - 94

ACCTGGGGACAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCTCCAGTACCAAGGGCAGCCCTGGGCTCCACCC
   T W Q G D V T S V P V T R F A L G S T T - 114

CCGCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGAACAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H D V T S A P D N K P A P G S T A - 134

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A P F D T R P A P G S T A - 154

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A F D T R P A P G S T A - 174

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 194

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A P F D T R P A P G S T A - 214

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 234

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P F A * A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 254

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 274

CCCCCAGCCCCAGGGATGTCTACCTTCGGCTTCAAGGGCAGCCCCGGGACACCAAGGGCAGCCCCGGGCTCCACCC
   P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 294
  
```

【図6-2】

CCTCCAGTCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGGCTCTACTCTG
P P V H N V T S A S G S A S G S A S T L - 314

GTGACACAGGCCACCTCTGCCAGGGCTACCCACAACCCAGGCCAGCAAGAGCACTCCATT
V H N G T S A R A T T T F A S K S T P F - 334

TCAATTCCCAGGCCACCACTCTGATACTCTTACCCACCCCTGCCAGGCCATAGCAGCAAGACT
S I P S H N S D T P T T L A S H S T K T - 354

GATGCCAGTAGCAGTCAACCATAGCACGGTACCTCTCACCCTCTCCAATCAGCACT
D A S S T H S T V P P L T S S N H S T - 374

TCTCCCCAGTTGCTACTGGGTCTCTTCTTTCTGTCTTACATTTCAAACCTC
S P Q L S T G V S F F L S F H I S N L - 394

CAGTTAACTCTCTGGAAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGAGAGAGAC
Q F N S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D - 414

ATTTCTGAAATGTTTCAGATTATAAACAGGGGTTTCTGGCCCTCTCCAAATT
I S E M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I - 434

AAGTTCAAGGCCAGGATCTGGTGTGAGTCTGGCCCTCCAGAGAAAGTACATC
K F R P G S V V V Q L T L A F R E G T I - 454

AATGTCACGGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAACAGGAAGCAGCCTCTGATAT
N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y - 474

AACTGAGCATCTCAGACGTCAGCTGAGTGATGTGCCATTCTCTGGCCAGCT
N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S - 494

GGGGCTGGGTGCCAGGCTGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGCTGTCTGGTTGCG
G A G V P G W G I A L L V L V C V L V A - 514

CTGGCCATTGCTATCTCATTGCCATTGGCTGTCAGTGCCGCCAAAGAAACTACGGG
L A I V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G - 534

CAGCTGGACATCTTCCAGCCCCGGATACCTACCATCTATGAGCGAGTACCCACCTAC
Q L D I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y - 554

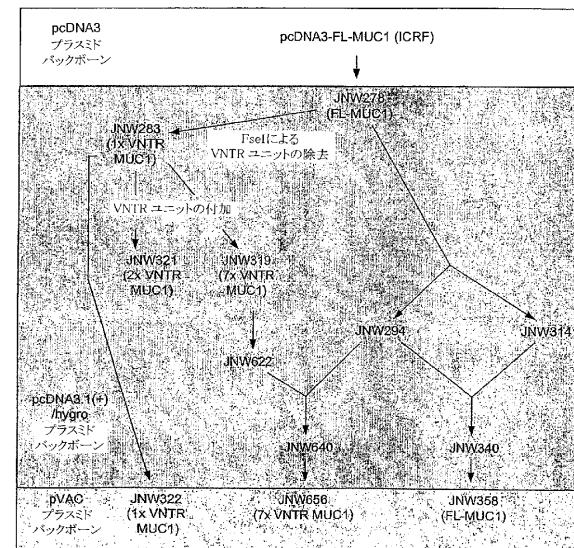
CACACCCATGGGCCTATGTGCCCTCTGCTGTCAGTGCCGCCATGAGAAGGTT
H T H G R Y V P P S S T D R S P Y E K V - 574

TCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCAGCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTCT
S A G N G G S S L S Y T N F A V A A T S - 594

GCCAACCTGTCTAGATAGCTCGAG
A N L S R * - 600

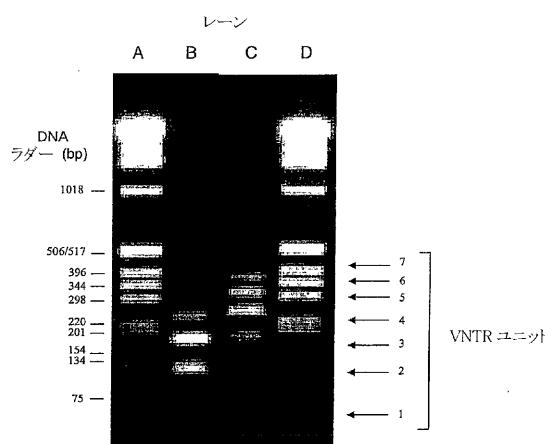
【図7】

さまざまなプラスマド構築物の間の相互関係を示すフローチャート図。空白の開みはpcDNA3バックボーンを有するプラスマドを示す。薄い灰色の開みはpVACを有するプラスマドを示し、濃い灰色の開みはpcDNA3.1(+)/hygro バックボーンを有するプラスマドを示す。



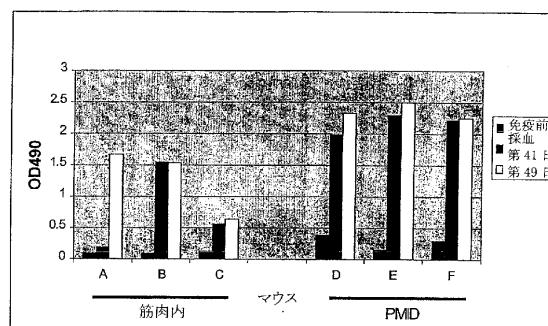
【図8】

VNTRユニットの精製



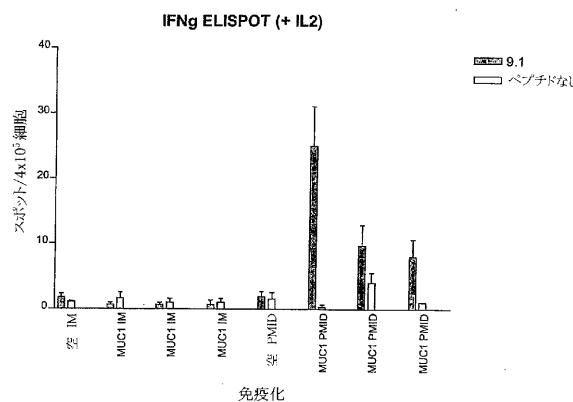
【図9】

pcDNA3-FL-MUC1 の、PMID(マウス D-F)または筋肉内注射(マウス A-C)による投与後の C56Bl/6 マウスにおける全 Ig 抗体応答



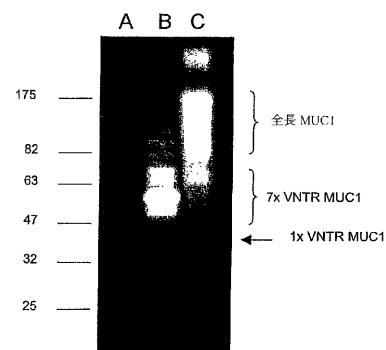
【図10】

pcDNA3-FL-MUC1(MUC1)またはpcDNA3(空ベクター)によるPMIDおよび筋肉内(IM)免疫化後の抗MUC1細胞性応答の比較。C57BL/6マウスを第0、21、および42日に免疫し、第55日にアッセイを行った。グラフはIL-2存在下でのペプチドSAPDTRPAP(9,1)に対するIFN γ 応答を示す。



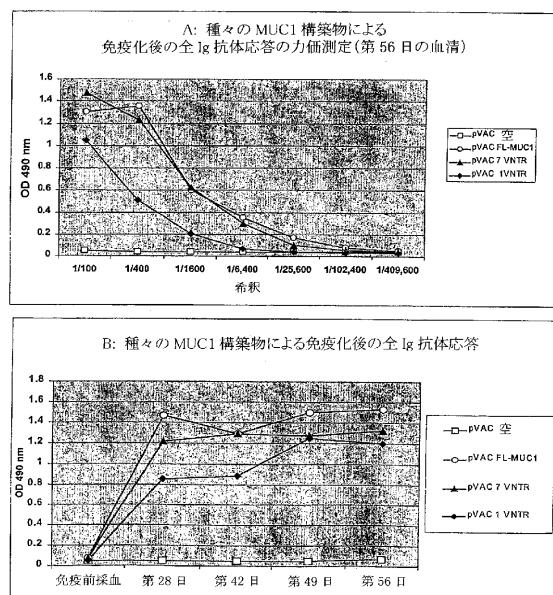
【図11】

MUC1構築物による一過性トランسفェクション後のCHO細胞のウェスタンプロット分析。CHO細胞はA) JNW332(1xVNTR MUC1)、B) JNW656(7xVNTR MUC1)およびC) JNW358(FL-MUC1)でトランسفェクトした。



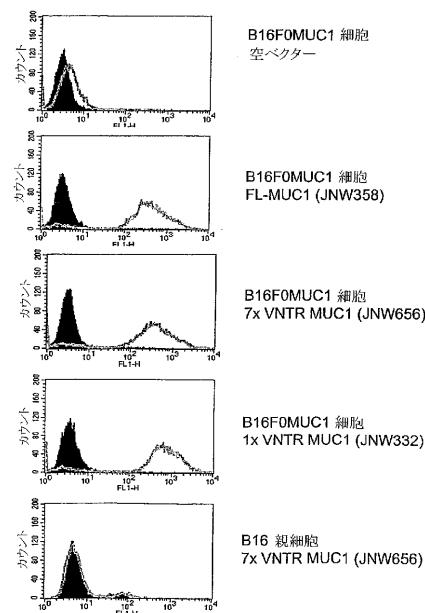
【図12】

pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)およびJNW656(7xVNTR MUC1)およびJNW332(1xVNTR MUC1)によるPMID免疫化後の抗MUC1抗体応答のA) 力価測定、およびB) 速度論。



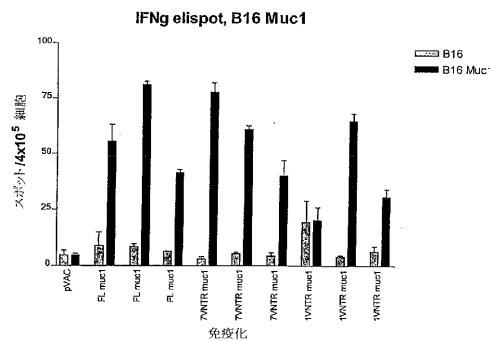
【図13】

空ベクター、FL-MUC1(JNW358)、7xVNTR MUC1(JNW656)および1xVNTR MUC1(JNW332)によって免疫したマウス由来の血清を用いた、染色されたB16親細胞およびB16F0MUC1腫瘍細胞のFACSプロファイル。黒塗りのプロファイルは免疫前に採血した血清由来の染色を示し、白抜きのプロファイルは3回の免疫後に心臓から採取した血液サンプル由来の染色を示す。



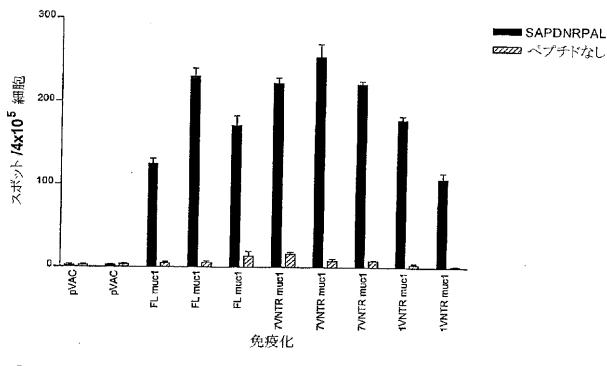
【図14a】

pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)、JNW656(7xVNTR MUC1)およびJNW332(1xVNTR MUC1)によるPMID免疫化後の抗MUC1細胞応答。C57BL/6マウスを第0, 21, および42日に免疫し、第49日にアンセイを行った。グラフaはB16MUC1腫瘍細胞に対するIFN γ 応答を示す。グラフbはSAPDNRPALペプチドに対するIFN γ 応答を示す。グラフcはTR配列を表す25merペプチドに対するIL-2応答を示す。

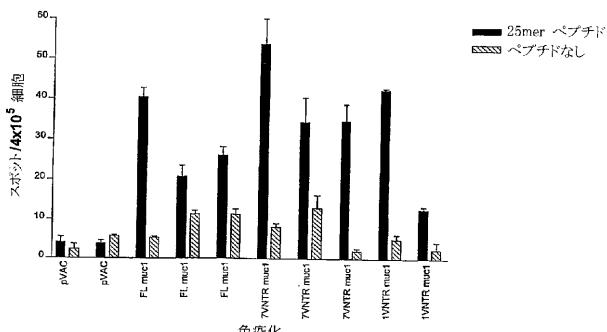


【図14b-c】

個々のマウスで免疫優性CD8ペプチドを用いたIFN γ elispot

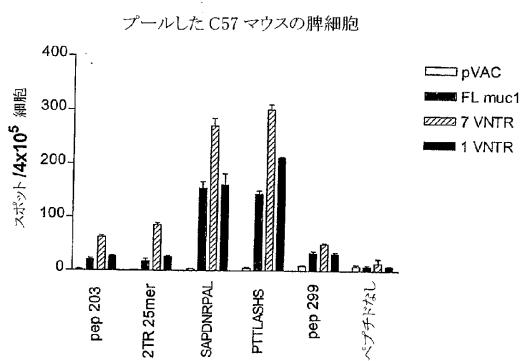


個々のマウスでTR配列を含む25merペプチドを用いたIL-2 clispot



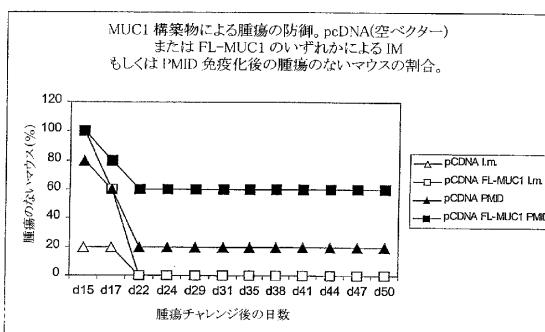
【図14d-e】

d

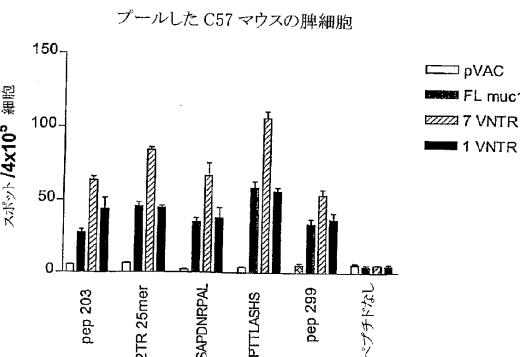


【図15】

pcDNA3-FL-MUC1またはpcDNA3.1(空ベクター)の3回投与、およびB16F0MUC1細胞による腫瘍チャレンジ後の腫瘍のないマウスの割合。

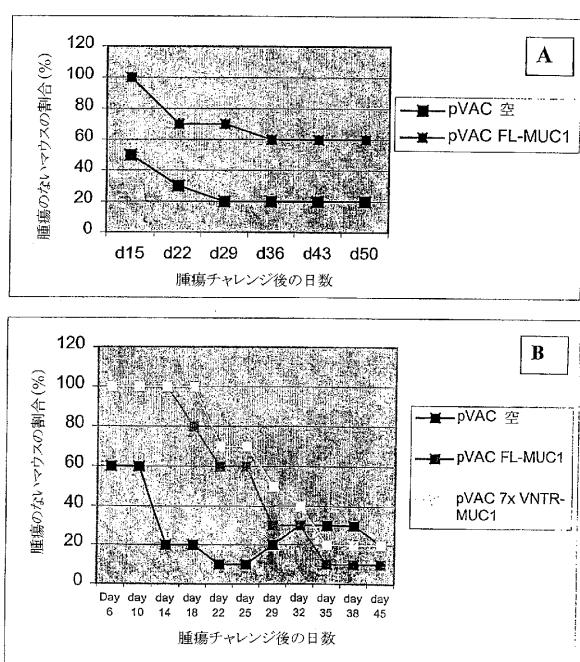


e



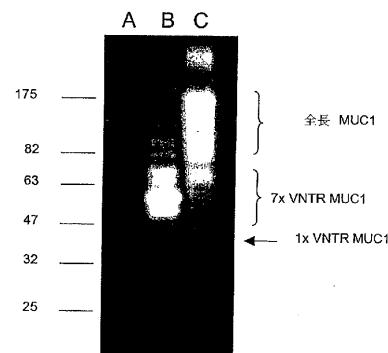
【図16】

MUC1 PMID 構築物による腫瘍の防御。pVAC(空ベクター)、JNW358(FL-MUC1)、または JNW656(7xVNTR MUC1)のいずれかによる遺伝子錠免疫化後の腫瘍のないマウスの割合



【図17】

MUC1 構築物を用いた一過性トランスフェクション後の CHO 細胞のウェスタンプロット分析。CHO 細胞は A) JNW332(1xVNTR MUC1)、B) JNW656(7xVNTR MUC1) および C) JNW358(FL-MUC1)でトランスフェクトした。



【図18】

付表 A - プライマー

```

2004MUC1 ATGACACCGGGCACCCAGTC
2005MUC1 GACCAGCAGCGTACTCTC
2006MUC1 CCAGCCAGCAAGAGCACTCC
2007MUC1 CCTCTCTGGAAGATCCCAGC
2008MUC1 GGTTGCGCTGGCATGTGTC
2009MUC1 GCAGAAGTGGCTGCCACTGC
2010MUC1 GCACTGACAGACAGCCAAGGC
2011MUC1 CCTTCTCGGAAGGCCAGAGTC
2012MUC1 GTACCGTGCTATGGTGAGTGC
2013MUC1 CACCAGAGTAGAACAGCTGAGCC
2014MUC1 GGAGAGTACGCTGCTGGTC
2060MUC1 GCAGGGCTAGGCCACCATGTCAGAACACCGGGCACCCAGTCTCC
2061MUC1 GACGCTCGAGAGCATCTTCTCAGTAGAGC
2062MUC1 GACGCTCGAGCTATCTAGACAAAGTTGGCAGAACAGTGGC
2063MUC1 CGAGTACCCACCTACCACACCCATGGC

```

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No PCT/EP 03/05594 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/00 C07K14/705 A61K39/00 A61K48/00 C12N15/11 | | |
| 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 C12N 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) BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | AKAGI JUNJI ET AL: "Therapeutic antitumor response after immunization with an admixture of recombinant vaccinia viruses expressing a modified MUC1 gene and the murine T-cell costimulatory molecule B7" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 20, no. 1, 1997, pages 38-47, XP009022733 page 38-47 | 1-3,5-8, 13-16 |
| X | XING PEI XIANG ET AL: "Breast cancer in mice: Effect of murine muc-1 immunization on tumor incidence in C3H/HeOuj mice" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 24, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 10-18, XP009022734 page 10-18 | 1-3,5-8, 13-16 |
| | | -/- |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of box C. | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| Special categories of cited documents: | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| *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 9 December 2003 | Date of mailing of the International search report 30/12/2003 | |
| 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 Fotaki, M | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|------------------------------|
| International Application No |
| PCT/EP 03/05594 |

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 01 46228 A (CROWE JAMES SCOTT ;GLAXO GROUP LTD (GB); ELLIS JONATHAN HENRY (GB)) 28 June 2001 (2001-06-28) page 21-23 | 1-4,6-16 |
| X | MUELLER STEFAN ET AL: "Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 29, 8 May 2002 (2002-05-08), pages 26103-26112, XP002264326 On-line publication ISSN: 0021-9258 page 26103 -page 26112 | 1-3,6-8 |
| X | CARMON L ET AL: "NOVEL BREAST-TUMOR-ASSOCIATED MUC1-DERIVED PEPTIDES: CHARACTERIZATION IN DB/- X BETA2 MICROGLOBULIN (BETA2M) NULL MICE TRANSGENIC FOR A CHIMERIC HLA-A2.1/DB-BETA2 MICROGLOBULIN SINGLE CHAIN" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 85, no. 3, 2000, pages 391-397, XP001009767 ISSN: 0020-7136 page 391-397 | 8,9,12, 15,16 |
| Y | | 1,5-7, 13,14 |
| X | HEUKAMP, LUKAS C. ET AL: "Identification of three non-VNTR MUC1-derived HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes that induce protective anti-tumor immunity in HLA-A2/Kb-transgenic mice" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER (2001), 91(3), 385-392 , XP002264327 page 385-392 | 8,9,12, 15,16 |
| Y | | 1,5-7, 13,14 |
| X | WO 2001 018035 A (TRANSGENE S.A., FR.; IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY, LTD.) 15 March 2001 (2001-03-15) page 6-20 page 41-46 | 1-3,5-9, 12-16 |
| X | WO 01 57068 A (APOSTOLOPOULOUS VASSO ;AUSTIN RES INST (AU); MCKENZIE IAN F C (AU)) 9 August 2001 (2001-08-09) page 5-10; claims 46,47; figure 1; table 1 | 1,5-9, 12-16 |
| | -/- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | |
|-----------------|-------------|
| Internal Ref. | Location No |
| PCT/EP 03/05594 | |

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|------------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | WO 02 062319 A (CORIXA CORP) 15 August 2002 (2002-08-15) page 2-11 ----- | 1-3, 6-10, 12-16 |
| E | WO 2003 089574 A (BIOMIRA, INC., CAN.) 30 October 2003 (2003-10-30) page 61-65 ----- | 8, 9, 12, 15, 16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| International application No |
|------------------------------|
| PCT/EP 03/05594 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|--|--|
| WO 0146228 A | 28-06-2001 | AU 2204901 A BR 0016672 A CA 2395208 A1 CN 1434862 T CZ 20022192 A3 EP 1240317 A2 WO 0146228 A2 HU 0203848 A2 JP 2003517845 T NO 20023010 A US 2003133909 A1 | 03-07-2001 08-10-2002 28-06-2001 06-08-2003 13-11-2002 18-09-2002 28-06-2001 28-03-2003 03-06-2003 06-08-2002 17-07-2003 |
| WO 2001018035 A | 15-03-2001 | AU 7651500 A CA 2383737 A1 WO 0118035 A2 EP 1210430 A2 JP 2003510094 T | 10-04-2001 15-03-2001 15-03-2001 05-06-2002 18-03-2003 |
| WO 0157068 A | 09-08-2001 | US 6548643 B1 WO 0157068 A1 AU 2987701 A CA 2399026 A1 EP 1257565 A1 JP 2003533181 T | 15-04-2003 09-08-2001 14-08-2001 09-08-2001 20-11-2002 11-11-2003 |
| WO 02062319 A | 15-08-2002 | WO 02062319 A2 US 2002142047 A1 | 15-08-2002 03-10-2002 |
| WO 2003089574 A | 30-10-2003 | WO 03089574 A2 | 30-10-2003 |

フロントページの続き

| | | |
|---------------------------|----------------|------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
| A 6 1 P 35/04 | A 6 1 P 35/04 | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K 14/705 | C 0 7 K 14/705 | |
| // C 1 2 N 5/10 | C 1 2 N 5/00 | B |

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,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,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,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

(74) 代理人 100112346

弁理士 内藤 由美

(72) 発明者 バーデン,ネイル

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 エリス,ジョナサン,ヘンリー

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 ハンプリン,ポール,エー.

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

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA36 CA02 CA06 CA07 EA04 FA11 GA11 HA17

4B065 AA90X AA93Y AB01 BA05 CA24 CA46

4C084 AA13 MA05 NA14 ZB262

4C085 AA03 BB11 EE06

4C087 BC84 MA05 NA14 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA10 BA53 CA41 DA50 DA86 EA31