



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004134331/13, 23.05.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.05.2003(30) Конвенционный приоритет:  
24.05.2002 GB 0212046.7

(43) Дата публикации заявки: 27.08.2005

(45) Опубликовано: 20.07.2007 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: AKAGI et al., «Therapeutic antitumor response after immunization with an admixture of recombinant vaccinia viruses expressing a modified MUC1 gene and murine T-cell costimulatory molecule B7», J. Immunother., 1997; vol.20 no.1, стр.38-47. Muller et al, «Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
24.12.2004(86) Заявка РСТ:  
EP 03/05594 (23.05.2003)(87) Публикация РСТ:  
WO 03/100060 (04.12.2003)

Адрес для переписки:  
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ",  
пат.пов. А.В.Поликарпову, рег.№ 0009

(72) Автор(ы):

БЕРДЕН Нейл (GB),  
ЭЛЛИС Джонатан Генри (GB),  
ХАМБЛИН Пол А. (GB)

(73) Патентообладатель(и):

Глаксо Групп Лимитед (GB)

## (54) АНТИГЕН MUC1 СО СНИЖЕННЫМ ЧИСЛОМ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ VNTR-БЛОКОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии. В изобретении раскрыты варианты нуклеиновокислотного конструкта (НК конструкта), кодирующего антиген MUC1 на основе семи полных повторяющихся блоков VNTR. Варианты включают НК конструкты, выбранные из группы: полный MUC1 из семи полных повторяющихся блоков VNTR; MUC1 из семи полных VNTR без сигнальной последовательности; MUC1 из семи полных VNTR без сигнальной последовательности, трансмембранного и цитоплазматического доменов; полный MUC1 из семи полных VNTR без

трансмембранного и цитоплазматического доменов, а также мутанты указанных вариантов, где по меньшей мере один VNTR мутирован для снижения потенциала гликозилирования. Раскрыты НК конструкты, дополнительно включающие эпитопы, выбранные из группы: FLSFHISNL, NLTISDVSV или NSSLEDPSDYYQELQRDISE. Описаны варианты экспрессирующей плазмиды, несущей НК конструкт, представленный в виде ДНК, протеин с противоопухолевой активностью, кодируемый НК конструктом и фармацевтическая композиция с противоопухолевой активностью на основе указанного протеина, НК конструкта или

плазмиды. Описаны: применение НК конструкта, и протеина в изготовлении медикамента для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC1; способ лечения с использованием НК конструкта, протеина или плазмиды. НК конструкты обладают противоопухолевой активностью, эквивалентной активности при введении

полноразмерного MUC1 (с числом VNTR от 30 до 100), индуцируют устойчивые титры антител к MUC1. Плазмиды на основе НК конструктов обладают стабильными ростовыми характеристиками. Количество копий плазмиды при конечном - девятом пересеве увеличивается на 40%. 8 н. и 12 з.п. ф-лы, 16 ил.

(56) (продолжение):

endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation», J. Biol. Chem. 2002, v.277 no.29, с.26103-26112. WO 0146228 A, 28.06.2001. Xing et al., «Breast cancer in mice: effect of murine MUC-1 immunization on tumor incidence in C3H/HeOuj mice», J Immunother, 2001, v.24 no.1, с.10-18. HEUKAMP et al, «Identification of three non-VNTR MUC-1-derived HLA-A\*0201-restricted T-cell epitopes that induce protective anti-tumor immunity in HLA-A2/Kb-transgenic mice», Int.J. Cancer. 2001; v.91 no.3, с.385-392. WO 0157068 A, 09.08.2001. RU 2174409 C2, 10.10.2001.

RU 2 3 0 3 0 6 9 C 2

RU 2 3 0 3 0 6 9 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

**C12N 15/12** (2006.01)**C12N 15/63** (2006.01)**C07K 14/705** (2006.01)**A61K 39/00** (2006.01)**A61K 48/00** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004134331/13, 23.05.2003**(24) Effective date for property rights: **23.05.2003**(30) Priority:  
**24.05.2002 GB 0212046.7**(43) Application published: **27.08.2005**(45) Date of publication: **20.07.2007 Bull. 20**(85) Commencement of national phase: **24.12.2004**(86) PCT application:  
**EP 03/05594 (23.05.2003)**(87) PCT publication:  
**WO 03/100060 (04.12.2003)**Mail address:  
**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",  
pat.pov. A.V.Polikarpovu, reg.№ 0009**

(72) Inventor(s):

**BERDEN Nejl (GB),  
EhLLIS Dzhonatan Genri (GB),  
KhAMBLIN Pol A. (GB)**

(73) Proprietor(s):

**Glakso Grup Limited (GB)****(54) MUC1 ANTIGEN WITH REDUCED NUMBER OF REPEATED VNTR-UNITS**

(57) Abstract:

FIELD: immunology, biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to variants of nucleic acid construct (NK-construct) encoding of MUC1 antigen based on seven full repeated VNTR-units. Variants include NK-constructs selected from group containing MUC1 based on seven full repeated VNTR-units, MUC1 based on seven full repeated VNTR-units without signal sequence, MUC1 based on seven full repeated VNTR-units without signal sequence, transmembrane and cytoplasm domains, full MUC1 based on seven full repeated VNTR-units without transmembrane and cytoplasm domains, as well as mutants of abovementioned variants, wherein at least one VNTR is mutated to reduce of glycosylation potential. Disclosed are

NK-constructs additionally containing epitopes selected from group: FLSFHISNL, NLTISDVSV or NSSLEDPSTDYYQELQRDISE. Also described are variants of expressing plasmide carrying NK-construct represented as DNA, protein having anti-tumor activity, encoded with NK-construct and pharmaceutical composition with anti-tumor activity based on said protein, NK-construct or plasmide. Application of NK-construct and protein for producing of drug for treatment or prevention of MUC-1 expressing tumors; method for therapy by using NK-construct, protein, or plasmide also are disclosed.

EFFECT: NK-constructs with increased anti-tumor activity.

20 cl, 25 dwg, 5 ex

Настоящее изобретение относится к новым нуклеиновокислотным конструктам, полезным в протоколах вакцинации нуклеиновой кислотой для лечения и профилактики опухолей, экспрессирующих MUC1. В частности, нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, и ДНК-конструкты содержат ген, кодирующий производное MUC1, имеющее менее чем 10 полностью повторяющихся блоков. Это изобретение дополнительно предлагает фармацевтические композиции, содержащие вышеуказанные конструкты, в частности фармацевтические композиции, адаптированные для доставки посредством частиц, способы для их получения и их применение в медицине. Также предложены новые протеины, кодируемые этой нуклеиновой кислотой, и фармацевтические композиции, содержащие их.

Предшествующий уровень техники

Муцин эпителиальных клеток MUC1 (также известный как эписиалин или полиморфный эпителиальный муцин, PEM) представляет собой высокомолекулярный гликопротеин, экспрессирующийся на многих эпителиальных клетках. Этот протеин состоит из цитоплазматического хвоста, трансмембранного домена и варьирующего числа tandemных повторов мотива из 20 аминокислот (называемого здесь VNTR-мономер, он также может быть известным как VNTR-эпитоп или VNTR-повтор), содержащего большую долю остатков пролина, серина и треонина. Число повторов варьирует из-за генетического полиморфизма в локусе MUC1 и чаще всего находится в диапазоне 30-100 (Swallow et al., 1987, Nature 328:82-84). В нормальных эпителиях протоков протеин MUC1 найден только на апикальной поверхности клетки, обращенной к просвету протока (Graham et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 42:71-80; Barratt-Boyes et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43: 142-151). Одним из наиболее поразительных свойств молекулы MUC1 является ее обширное гликозилирование по атомам кислорода. Имеется пять предполагаемых мест гликозилирования по кислороду, доступных в пределах каждого VNTR-мономера MUC1. В соответствии с нижеприведенной системой нумерации, ими являются Thr-4, Ser-10, Thr-11, Thr-19 и Ser-20.

VNTR можно характеризовать как типичные или полные повторы, имеющие последовательность, показанную ниже, или минорные отклонения от этого полного повтора, содержащие два или три отличия на 20 аминокислот.

Нижеследующее представляет собой последовательность полного повтора:

|   |   |          |          |   |   |   |   |   |    |    |    |    |          |    |    |    |    |    |    |
|---|---|----------|----------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----------|----|----|----|----|----|----|
| 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        |    |    |    |    |    |    |

Подчеркнутые аминокислоты могут быть заменены показанными аминокислотными остатками.

Неполные повторы имеют разные аминокислотные замены в консенсусной последовательности при идентичности 55-90% на уровне аминокислот. Четыре неполных повтора показаны ниже, причем замены подчеркнуты:

**APDTRPAPGSTAPPANGVTS - полный повтор**

**APATEPASGSAATWGQDVTS - неполный повтор 1**

**VPVTRPALGSTTPPANDVTS - неполный повтор 2**

**APDNKPAPGSTAPPANGVTS - неполный повтор 3**

**APDNRPALGSTAPPVHNVTS - неполный повтор 4**

Неполные повторы в MUC1 дикого типа фланкируют область полных повторов. В злокачественных карциномах, возникающих при неопластической трансформации этих эпителиальных клеток, несколько изменений влияют на экспрессию MUC1. Поляризованная

экспрессия протеина теряется, и его находят распространенным по всей поверхности трансформированной клетки. Суммарное количество MUC1 также увеличено, часто в 10 раз или больше, чем в 10 раз (Strous&Dekker, 1992, Crit Rev Biochem Mol Biol 27:57-92). Самое важное, заметно меняется количество и качество присоединенных по кислороду углеводородных цепей. Гликозилировано меньше остатков серина и треонина. Те углеводородные цепи, которые находят, аномально укорочены, что создает опухолеассоциированный углеводный антиген STn (Lloyd et al., 1996, J Biol Chem, 271: 33325-33334). В результате этих изменений гликозилирования различные эпитопы на пептидной цепи MUC1, которые ранее экранировали углеводные цепи, становятся доступными. Один из эпитопов, который становится доступным таким путем, образован последовательностью APDTR (Ala 8 - Arg 12 на Фиг.2), присутствующей в каждом полностью повторяющемся мономере VNTR, состоящем из 20 аминокислот (Burchell et al., 1989, IntJ Cancer 44:691-696).

Очевидно, что эти изменения в MUC1 означают, что вакцина, которая может активировать иммунную систему против этой формы MUC1, экспрессирующейся на опухолях, может быть эффективной против опухолей из эпителиальных клеток и, на самом деле, клеток других типов, у которых найдены MUC1, таких как Т-клеточные лимфоциты. Одним из главных эффекторных механизмов, используемых иммунной системой для уничтожения клеток, экспрессирующих ненормальные белки, является иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов, и этот ответ желателен в вакцине для лечения опухолей так же, как и антительный ответ. Хорошая вакцина должна активировать все стороны иммунного ответа. Однако существующие углеводные и пептидные вакцины, такие как Theratope или BLP25 (Biomira Inc, Эдмонтон, Канада), предпочтительно активируют одну сторону иммунного ответа - гуморальный и клеточный ответ, соответственно, и для генерирования более сбалансированного ответа желателен более хороший дизайн вакцины.

Нуклеиновокислотные вакцины дают множество преимуществ над общепринятой вакцинацией белками в том отношении, что их просто получать в большом количестве. Сообщалось, что даже при малых дозах они индуцируют сильные иммунные ответы и могут индуцировать иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов, а также антительный ответ.

С полноразмерным MUC1, однако, очень трудно работать из-за сильно повторяющейся последовательности, поскольку она сильно подвержена рекомбинации, причем такие случаи рекомбинации причиняют значительные трудности в биофармацевтической разработке. Дополнительно, обогащенность VNTR-области ОС-парами затрудняет секвенирование. Далее по юридическим причинам необходимо полностью охарактеризовать ДНК-конструкт. Весьма проблематично секвенировать молекулу со структурой, имеющей такую высокую частоту повторности. В такой ситуации неизвестно в точности, как много повторяющихся блоков имеется в MUC1 дикого типа, причем эта неспособность точно охарактеризовать полноразмерный MUC1 делает его неприемлемым для юридического одобрения.

Считается, что VNTR-области MUC1 содержат иммунодоминантные эпитопы. К удивлению, данные изобретатели нашли, что можно снизить число VNTR с получением иммуногенного конструкта, который имеет эквивалентную противоопухолевую активность при сравнении с полноразмерным MUC1 дикого типа. Конструкт по настоящему изобретению стабилен. В частности, эти конструкты стабильны в смысле ростовых характеристик, удержания плазмиды и качества плазмиды при выращивании в виде культур E.Coli в течение 9 пересевов, каждый длительностью 10-14 часов.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предлагает нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую антиген MUC1, который способен вызывать иммунный ответ in vivo и является стабильным и имеет сниженную подверженность рекомбинации в сравнении с полноразмерным MUC1. Стабильность представляет собой меру количества плазмиды в определенной форме. Предпочтительным является то, что загрязнение рекомбинантной

формой после крупномасштабного выращивания составляет менее чем 2,0% при определении на агарозном или полиакриламидном геле с визуализацией на глаз. Крупномасштабное в типичных случаях означает выращивание в масштабе больше, чем один литр. Отдельной мерой стабильности является то, что копия плазмиды остается

5 стабильной в течение периода пересевов. Предпочтительно, число копий плазмиды увеличивается с числом пересевов, особенно от пересева 1 до пересева 9. Предпочтительно, число копий плазмиды увеличивается на около 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, наиболее предпочтительно на около 50%, в течение 9 пересевов. В конкретных воплощениях это изобретение предлагает конструкторы, имеющие от 1 до 15, 10 предпочтительно между 1 и 10, полных повторов VNTR-блоков. Предпочтительным является то, что имеется менее чем 8 полных повторов. Предпочтительные воплощения предлагают ДНК-конструкторы с одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью и семью повторами, соответственно. В определенных воплощениях этого изобретения, область неполного повтора сохранена. Предпочтительными являются конструкторы, содержащие 15 один или семь полных повторов. Белки, кодируемые такими конструкторами, являются новыми и образуют аспект этого изобретения.

В еще одном аспекте этого изобретения нуклеиновокислотная последовательность представляет собой последовательность ДНК в форме плазмиды. Предпочтительно, плазида является сверхскрученной.

20 В еще одном аспекте этого изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновокислотную последовательность, какая раскрыта здесь, и фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

Предпочтительно, носитель представляет собой гранулу золота, и фармацевтическая композиция поддается доставке путем доставки лекарственного средства посредством 25 частиц.

И в еще одном дополнительном воплощении это изобретение предлагает фармацевтическую композицию и нуклеиновокислотные конструкторы для применения в медицине. В частности, предложен нуклеиновокислотный конструктор по этому изобретению в изготовлении медикамента для применения в лечении или профилактике опухолей, 30 экспрессирующих MUC1.

Это изобретение дополнительно предлагает способы лечения пациента, страдающего от или подверженного опухоли, экспрессирующей MUC1, особенно от карциномы груди, легких, яичников, простаты (особенно немелкоклеточной карциномы легких), желудка и других желудочно-кишечных локализаций, введением безопасного и эффективного 35 количества композиции или нуклеиновой кислоты, какая описана здесь.

И в еще одном дополнительном воплощении это изобретение предлагает способ получения фармацевтической композиции, какая описана здесь, смешиванием нуклеиновокислотного конструктора или протеина по этому изобретению с фармацевтически приемлемым эксципиентом, разбавителем или носителем.

40 Подробное описание изобретения

Как описано здесь, нуклеиновокислотные конструкторы по этому изобретению в типичных случаях имеют меньше чем 15, в более типичных случаях менее чем 10, полных повторов. Молекула MUC1 дикого типа (см. Фиг.1) содержит сигнальную последовательность, лидерную последовательность, неполный или нетипичный VNTR, область полных VNTR, 45 дополнительный нетипичный VNTR, внеклеточный домен, не относящийся к VNTR, трансмембранный домен и цитоплазматический домен.

Предпочтительные воплощения этого изобретения имеют менее чем 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 повторов. Особенно предпочтительные конструкторы имеют 1, 2 или 7 полных повторов.

50 Внеклеточный домен, не относящийся к VNTR, состоит из приблизительно 80 аминокислот с 5'-конца VNTR и 190-200 аминокислот с 3'-конца VNTR. Все конструкторы по этому изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп из этой области. Эпитоп в типичных случаях образован последовательностью по меньшей мере семи аминокислот.

Соответственно, конструкторы по настоящему изобретению включают в себя по меньшей мере один эпитоп внеклеточного домена, не относящегося к VNTR. Предпочтительно, они включают в себя по существу все или, более предпочтительно, все из доменов, не относящихся к VNTR. Особенно предпочтительным является то, что этот конструктор

5 содержит по меньшей мере один эпитоп, содержащийся в последовательности FLSFHISNL, NSSLEDPSTDYYQELQRDISE или NLTISDVSV. Более предпочтительным является то, что в конструктор инкорпорированы две, предпочтительно три, эпитопных последовательности.

В предпочтительном воплощении конструкторы содержат N-концевую лидерную последовательность. Сигнальная последовательность, трансмембранный домен и

10 цитоплазматический домен каждый индивидуально являются необязательными в конструкторе. Все они могут присутствовать или один или более чем один из них могут быть исключены.

Предпочтительные конструкторы в соответствии с этим изобретением представляют собой:

- 15 1) 7 VNTR MUC1 (т.е. полный Muc1 только с 7 полными повторами);
- 2) 7 VNTR MUC1  $\Delta$ ss (такой же, как и 1, но к тому же лишен сигнальной последовательности);
- 3) 7 VNTR MUC1  $\Delta$ TM  $\Delta$ CYT (такой же, как и 1, но лишенный трансмембранного и цитоплазматического доменов);
- 20 4) 7 VNTR MUC1  $\Delta$ ss  $\Delta$ TM  $\Delta$ CYT (такой же, как и 3, но к тому же лишенный сигнальной последовательности).

Также предпочтительными являются конструкторы, эквивалентные вышеописанным от 1 до 4, но содержащие только 2 VNTR или 1 VNTR. VNTR в таких конструкторах имеют последовательность полного повтора, какая описана здесь ранее. В одном из воплощений

25 один или более чем один из VNTR-блоков мутированы для снижения потенциала гликозилирования изменением участка гликозилирования. Эта мутация представляет собой предпочтительно замену, но может быть вставкой или делецией. В типичных случаях по меньшей мере один треонин или серин заменен валином, изолейцином, аланином, аспарагином, фенилаланином или триптофаном. В мономере VNTR дикого типа имеется 5

30 предполагаемых участков гликозилирования по кислороду, доступных в пределах каждого VNTR-мономера MUC1. Ими являются (см. нумерацию) Thr-4, Ser-10, Thr-11, Thr-19 и Ser-20. Таким образом, предпочтительным является то, что по меньшей мере один, предпочтительно 2 или 3 или более чем три, предпочтительно по меньшей мере четыре, остаток заменен аминокислотой, как отмечено выше.

Предпочтительные замены включают в себя:

- Thr 4  $\rightarrow$  Val
- Ser 10  $\rightarrow$  Ala
- Thr 11  $\rightarrow$  Ile или Val
- Thr 19  $\rightarrow$  Val
- 40 Ser 20  $\rightarrow$  Ala

В еще одном воплощении конструкторы MUC1 снабжены нуклеиновокислотной последовательностью, кодирующей гетерологичный Т-клеточный эпитоп. Такие эпитопы включают в себя Т-клеточные эпитопы из бактериальных белков и токсинов, таких как

45 столбнячный и дифтерийный токсины, например эпитопы P2 и P30 из столбнячного токсина. Такие эпитопы могут быть частью более длинной последовательности. Эти эпитопы могут быть инкорпорированными в молекулу нуклеиновой кислоты на 3' - или 5'-конце последовательности в соответствии с этим изобретением.

Можно иметь в виду другие партнеры по слиянию, такие как те, что происходят из корового антигена гепатита В или из туберкулеза. В одном из воплощений партнер по слиянию происходит из *Mycobacterium tuberculosis*, RA12, подпоследовательности MTB32A (аминокислоты от 192 до 323) (Skeiky et al., *Infection and Immunity* (1999) 67:3998-4007).

50

Другие иммунологические партнеры по слиянию включают в себя, например, протеин D из *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926) или часть (в типичных случаях С-концевую

часть) LYTA из *Streptococcus pneumoniae* (Biotechnology 10:795-798, 1992).

В соответствии с еще одним аспектом этого изобретения предложен экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотидную последовательность в соответствии с этим изобретением и способен направлять ее экспрессию. Этот вектор может быть подходящим для управления экспрессией гетерологичной ДНК в клетках бактерии, насекомого или млекопитающего, конкретно в клетках человека.

В соответствии с еще одним аспектом этого изобретения предложена хозяйская клетка, содержащая полинуклеотидную последовательность в соответствии с этим изобретением или экспрессионный вектор в соответствии с этим изобретением. Эти хозяйские клетки могут быть бактериальными, например *E.coli*, клетками млекопитающего, например человека, или могут быть клетками насекомого. Клетки млекопитающего, содержащие вектор в соответствии с настоящим изобретением, могут быть клетками к культуре, трансфицированными *in vitro* или могут быть трансфицированными *in vivo* введением вектора млекопитающему.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает фармацевтическую композицию, содержащую полинуклеотидную последовательность в соответствии с этим изобретением. Предпочтительно, эта композиция содержит ДНК-вектор. В предпочтительном воплощении эта композиция содержит совокупность частиц, предпочтительно частиц золота, покрытых ДНК, содержащей вектор, кодирующий полинуклеотидную последовательность по этому изобретению, причем эта последовательность кодирует аминокислотную последовательность MUC1, такая как описана здесь. В альтернативных воплощениях композиция содержит фармацевтически приемлемый эксципиент и ДНК-вектор в соответствии с настоящим изобретением.

Композиция может также включать в себя адъювант или быть вводимой либо одновременно, либо последовательно с адъювантом или иммуностимулирующим агентом.

Таким образом, в этом воплощении этого изобретения векторы по этому изобретению должны быть использованы с иммуностимулирующим агентом. Предпочтительно, этот иммуностимулирующий агент вводят в то же время, что и нуклеиновокислотный вектор по этому изобретению, и в предпочтительных воплощениях их вводят в состав препарата вместе. Такие иммуностимулирующие агенты включают в себя (но этот список ни коим образом не является исчерпывающим и не исключает другие агенты): синтетические имидазохинолины, такие как имиквимод [S-26308, R-837], (Harrison, et al. Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with glycoprotein vaccine', Vaccine 19:1820-1826, (2001)); и резиквимод [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al.

«Adjuvant activities of immune response modifier» R-84 8: Comparison with CpG ODN<sup>5</sup>, Cellular Immunology 204:64-74 (2000)), шиффовы основания карбониллов и аминов, которые конститутивно экспрессированы на поверхностях антиген-представляющих клеток и Т-клеток, такие как тукапесол (Rhodes, J. et al. «Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs». Nature 377:71-75 (1995)),

цитокиновые, хемокиновые и костимулирующие молекулы как протеиновые, так и пептидные, что должно включать в себя провоспалительные цитокины, такие как интерфероны, в частности интерфероны и GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF $\alpha$  и TGF $\beta$ , ТМ-индукторы, такие как интерферон- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21, Th2-индукторы, такие как IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13, и другие гены хемокинов и костимуляторов,

таких как MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TCA-3, CD80, CD86 и CD40L, другие иммуностимулирующие нацеливающие лиганды, такие как CTLA-4 и L-селектин, белки и пептиды, стимулирующие апоптоз, такие как Fas, (49), адъюванты на основе синтетических липидов, такие как ваксфектин (Reyes et al., «Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization». Vaccine 19; 3778-3786), сквален,  $\alpha$ -токоферол, полисорбат 80, DOPC и холестерин, эндотоксин [LPS], Beutler, B., Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity'. Current Opinion in Microbiology 3:23-30 (2000)); олиго- и динуклеотиды CpG, Sato, Y. et al., «Immunostimulatory DNA sequences



necessary for effective intradermal gene immunization». Science 273 (5273):352-354

(1996). Hemmi, H. et al., «A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA», Nature 408:

740-745, (2000) и другие потенциальные лиганды, которые включают Toll-рецепторы для

5 липопротеины, микобактериальный протеин p19, пептидогликан, тейхоевая кислота и липид А. Другие бактериальные иммуностимулирующие белки включают в себя холерный токсин, токсин E.Coli и их мутантные токсины.

Конкретные предпочтительные адъюванты для того, чтобы вызывать преимущественно

10 монофосфорил липида А, или, предпочтительно, 3-дез-О-ацилированный монофосфорил липида А. Адъюванты MPL® доступны от Corixa Corporation (Seattle, WA; см., например, Патенты США №№ 4436727; 4877611; 4866034 и 4912094). CpG-содержащие олигонуклеотиды (в которых динуклеотид CpG не метилирован) также индуцируют преимущественно Th1-ответ. Такие олигонуклеотиды хорошо известны и раскрыты,

15 например, в WO 96/02555, WO 99/33488 и Патентах США №№ 6008200 и 5856462. Иммуностимулирующие последовательности ДНК также описаны, например, в Sato et al., Science 275:352, 1996. Другой предпочтительный адъювант содержит сапонин, такой как Quil A или его производные, в том числе QS21 и QS7 (Aquila BioPharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Эсцин, Дигитонин; или сапонины Gypsophila или Chenopodium quinoa.

20 Также предложено применение полинуклеотида или протеина в соответствии с этим изобретением или вектора в соответствии с этим изобретением в лечении или профилактике опухоли или метастазов, экспрессирующих MUC1.

Настоящее изобретение также предлагает способы лечения или предотвращения

25 опухолей, экспрессирующих MUC1, любых симптомов или заболеваний, ассоциированных с ними, в том числе метастазов, причем при этих способах вводят эффективное количество полинуклеотида, вектора или фармацевтической композиции в соответствии с этим изобретением. Введение фармацевтической композиции может приобретать форму одной или более чем одной из индивидуальных доз, например в режиме терапевтической

30 вакцинации «первичная вакцинация - поддерживающая вакцинация». В определенных случаях «первичная вакцинация» может быть осуществлена опосредованной частицами для доставки ДНК доставкой полинуклеотида в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно инкорпорированного в производимый из плазмиды вектор, а

35 «поддерживающая вакцинация» может быть осуществлена введением рекомбинантного вирусного вектора, содержащего ту же полинуклеотидную последовательность, или осуществлением поддерживающей вакцинации протеином в адъюванте. Или же первичная вакцинация может быть осуществлена вирусным вектором или протеиновым препаратом, в типичных случаях протеиновый препарат выполнен с адъювантом, а поддерживающая - ДНК-вакциной по настоящему изобретению.

Как обсуждено выше, настоящее изобретение включает в себя экспрессионные векторы,

40 которые содержат нуклеотидные последовательности по этому изобретению. В области молекулярной биологии такие экспрессионные векторы конструируют рутинным образом, и это может, например, включать в себя применение плазмидной ДНК и надлежащих инициаторов, промоторов, энхансеров и других элементов, таких как, например, сигналы полиаденилирования, которые могут быть необходимыми и которые позиционируют в

45 правильной ориентации, чтобы сделать возможной экспрессию протеина. Другие подходящие векторы должны быть очевидными специалистам. За дополнительными примерами в связи с этим мы отсылаем к Sambrook et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. CSH Laboratory Press, (1989).  
Предпочтительно, полинуклеотид по этому изобретению или для применения в этом

50 изобретении в векторе является работоспособным образом связанным с контрольной последовательностью, которая способна обеспечивать экспрессию кодирующей последовательности хозяйской клеткой, то есть вектор представляет собой экспрессионный вектор. Термин «работоспособным образом связанный» относится к

юкстапозиции, в которой описанные компоненты находятся во взаимоотношении, позволяющем им функционировать предназначенным образом. Регуляторная последовательность, такая как промотор, «работоспособным образом связанный» с кодирующей последовательностью, позиционирована таким образом, что этим достигают экспрессию кодирующей последовательности в условиях, совместимых с регуляторной последовательностью.

Векторами могут быть, например, плазмиды, искусственные хромосомы (например, ВАС, РАС, YAC), вирусные или фаговые векторы, снабженные нулевыми точками репликации, возможно промотором для экспрессии полинуклеотида и возможно регулятором промотора.

Векторы могут содержать один или более чем один из селективируемых маркерных генов, например ген устойчивости к ампициллину или канамицину в случае бактериальной плазмиды или ген устойчивости для грибкового вектора. Векторы можно применять *in vitro*, например для продукции ДНК или РНК или применять для трансфекции или трансформации хозяйской клетки, например, хозяйской клетки млекопитающего, например, для продукции протеина, кодируемого вектором. Векторы можно также адаптировать для применения *in vivo*, например, в способе ДНК-вакцинации или генной терапии.

Промоторы и другие сигналы регуляции экспрессии можно выбирать так, чтобы они были совместимы с хозяйской клеткой, для которой предназначена экспрессия. Например, промоторы млекопитающих включают в себя промотор металлотионеина, который можно индуцировать в ответ на тяжелые металлы, такие как кадмий, и промотор  $\beta$ -актина. Также можно использовать вирусные промоторы, такие как промотор большого Т-антигена SV40, немедленный ранний (immediate early, IE) промотор цитомегаловируса (CMV) человека, промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса саркомы Рауса, промотор аденовируса или промотор вируса папилломы человека (HPV), особенно вышележащую регуляторную область HPV (URR). Все эти промоторы хорошо описаны и легко доступны в данной области техники.

Предпочтительным промоторным элементом является немедленный ранний промотор CMV, лишенный интрона А, но включающий в себя экзон 1. Соответственно, предложен вектор, содержащий полинуклеотид по этому изобретению под контролем IE-промотора HCMV.

Примеры подходящих вирусных векторов включают в себя вирусные векторы, представляющие собой вирус простого герпеса, вирус осповакцины, альфа-вирусные векторы и ретровирусы, в том числе лентивирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы. Методики переноса генов при использовании этих вирусов известны специалистам. Ретровирусные векторы, например, можно использовать для стабильной интеграции полинуклеотида по этому изобретению в хозяйский геном, хотя такая гекомбинация не является предпочтительной. Дефективные по репликации аденовирусные векторы, напротив, остаются эписомальными и поэтому делают возможной преходящую экспрессию. Векторы, способные управлять экспрессией в клетках насекомого (например, бакуловирные векторы), в клетках человека или в бактериях, можно использовать для получения некоторых количеств протеина ВИЧ, кодируемого полинуклеотидами по настоящему изобретению, например, для применения в качестве субъединичных вакцин или в иммунных анализах. Полинуклеотиды по этому изобретению имеют особое применение в вирусных вакцинах, поскольку прежние попытки генерировать полноразмерные конструкторы вируса осповакцины были безуспешными.

Полинуклеотиды в соответствии с этим изобретением имеют применение в продукции кодируемых белков экспрессией, которая может иметь место *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Поэтому эти нуклеотиды можно вовлекать в синтез рекомбинантных протеинов, например, для увеличения выхода или они в сущности могут найти применение в качестве терапевтических агентов в своем роде, используемых в методиках ДНК-вакцинации. В случаях, когда полинуклеотиды по настоящему изобретению используют в получении кодируемых белков *in vitro* или *ex vivo*, клетки, например клетки в культуре, надо модифицировать включением в них полинуклеотида, подлежащего экспрессированию.

Такие клетки включают в себя нестабильные или предпочтительно стабильные линии клеток млекопитающего. Конкретные примеры клеток, которые можно модифицировать вставкой векторов, кодирующих полипептид в соответствии с этим изобретением, включают в себя клетки млекопитающего HEK293T, CHO, HeLa, 293 и COS. Предпочтительно,

выбранная клеточная линия должна быть такой, которая является не только стабильной, но также позволяющей полноценное гликозилирование полипептида и его экспрессию на клеточной поверхности. Экспрессию можно достигать в трансформированных ооцитах. Полипептид можно экспрессировать с полинуклеотида по настоящему изобретению в клетках трансгенного животного, которое не является человеком, предпочтительно мыши.

Трансгенное животное, которое не является человеком, экспрессирующее полипептид с полинуклеотида по этому изобретению, включено в объем этого изобретения.

Это изобретение предлагает еще и способ вакцинации млекопитающего субъекта, причем ему вводят эффективное количество такой вакцины или вакцинной композиции.

Наиболее предпочтительно то, что экспрессионные векторы для применения в ДНК-вакцинах, вакцинных композициях и иммунотерапевтических средствах должны быть плазмидными векторами.

ДНК-вакцины можно вводить в форме «голой ДНК», например, в жидком препарате, вводимом при использовании шприца или струи высокого давления, или в форме ДНК, введенной в состав липосом или раздражающего агента для улучшения трансфекции, или доставкой ДНК с помощью частиц (particle mediated DNA delivery, PMDD). Все эти системы доставки хорошо известны в данной области. Вектор можно внедрить млекопитающему, например, системой доставки, представляющей собой вирусный вектор.

Композиции по настоящему изобретению можно доставлять множеством путей, таких как внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный или внутривенный.

В предпочтительном воплощении композицию доставляют в кожу. В частности, композицию доставляют методиками введения генным пистолетом (особенно бомбардировкой частицами), при которых наносят вектор на гранулу (например, золотую), которую затем вводят под высоким давлением в эпидермис, например, так, как описано в Haynes et al., J Biotechnology 44:37-42 (1996).

В одном иллюстративном примере ускорение частиц под действием газа можно достигать устройствами, такими как те, что производит Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) и Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), некоторые примеры которых описаны в Патентах США №№ 5846796, 6010478, 5865796, 5584807 и в Европейском Патенте №0500799. Этот подход делает возможной доставку без использования игл, причем препарат микроскопических частиц, таких как полинуклеотидные, представляющий собой сухой порошок, ускоряют до высокой скорости в струе газа гелия, которую генерируют устройством, которое держат в руке, внедряющим эти частицы в целевую ткань, представляющую интерес, в типичных случаях в кожу. Эти частицы представляют собой предпочтительно гранулы золота с диаметром 0,4-4,0 мкм, более предпочтительно 0,6-2,0 мкм, с нанесенным на них конъюгатом ДНК, которые заключают в картридж или кассету для помещения в «генный пистолет».

В родственном воплощении другие устройства и способы, которые могут быть полезными для инъекции композиции по настоящему изобретению под действием газа и без иглы, включают в себя те, которыми снабжает Bioject, Inc. (Portland, OR),

некоторые примеры которых описаны в Патентах США №№ 4790824, 5064413, 5312335, 5383851, 5399163, 5520639 и 5993412.

Векторы, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные пептиды, вводят в таком количестве, которое должно быть профилактически или терапевтически эффективным. Количество нуклеотида на дозу для введения находится, в общем, в диапазоне от одного пикограмма до 1 миллиграмма, предпочтительно от 1 пикограмма до 10 микрограмм для доставки посредством частиц и от 10 микрограмм до 1 миллиграмма для других путей. Точное количество может значительно варьировать в зависимости от массы пациента, которого иммунизируют, и от пути введения.

Можно вводить иммуногенный компонент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный пептид, однократно или многократно, например от 1 до 7 раз, предпочтительно от 1 и 4 раз, при интервалах между около 1 дня и около 18 месяцев. Однако опять же этот режим лечения должен значительно

варьировать в зависимости от размера пациента, заболевания, от которого лечат/защищают, количества вводимой нуклеотидной последовательности пути введения и других факторов, которые должны быть очевидными опытному практикующему медику. Пациент может получать один или более чем один из других противораковых лекарственных средств в качестве части их общего режима лечения.

Подходящие методики для введения голого полинуклеотида или вектора в пациента также включают в себя местное нанесение с надлежащим носителем. Нуклеиновую кислоту можно вводить местным образом на кожу или на слизистые поверхности, например введением в нос, пероральным путем, в вагину или в прямую кишку. Голый полинуклеотид или вектор можно давать вместе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, таким как забуференный фосфатами физраствор (phosphate buffered saline, PBS). Поглощению ДНК можно дополнительно способствовать способствующими агентами, такими как бупивакаин, либо в отдельности, либо при включении в препарат ДНК. Другие способы введения нуклеиновой кислоты прямо реципиенту включают в себя ультразвук, электрическую стимуляцию, электропорацию и микропосев, который описан в Патенте США 5697901.

Поглощению конструктков нуклеиновой кислоты можно способствовать несколькими известными методиками трансфекции, например теми, которые включают в себя применение агентов трансфекции. Примеры этих агентов включает в себя катионные агенты, например фосфат кальция и ДЭАЭ-декстран, и липофектанты, например липофектам и трансфектам. Дозировку нуклеиновой кислоты для введения можно изменять.

Нуклеиновокислотную последовательность по настоящему изобретению можно также вводить трансформированными клетками. Такие клетки включают в себя клетки, полученные из субъекта. Голый полинуклеотид или вектор по настоящему изобретению можно интродуцировать в такие клетки *in vitro*, и эти трансформированные клетки можно позже возвращать субъекту. Полинуклеотид по этому изобретению можно интегрировать в нуклеиновую кислоту, уже присутствующую в клетке, в результате событий, представляющих собой гомологичную рекомбинацию. Трансформированные клетки можно, если это желательно, выращивать *in vitro*, и одну или более чем одну из получившихся клеток можно использовать в данном изобретении. Клетки можно доставлять в надлежащее место в пациенте известными хирургическими или микрохирургическими методиками (например, трансплантацией, микроинъекцией и т.д.).

#### Примеры

##### 1.1 Генерирование конструктков

Схему соотношений между всеми конструктками, детализированными ниже, можно найти на Фиг.1.

##### 1.2 Конструирование кассеты экспрессии полноразмерного MUC1

Начальной точкой для конструирования кассеты экспрессии MUC1 была плаزمида pcDNA3-FL-MUC1 (ICRF, Лондон). Эта плаزمида имеет скелет pcDNA3 (Invitrogen), содержащий кДНК-вую кассету полноразмерного MUC1 (FL-MUC1), клонированную в BamHI-сайте. На основании рестрикционного картирования, выполненного в ICRF, ген MUC1 имеет приблизительно 32 блока VNTR (варьирующее число tandemных повторов). Присутствие MUC1 подтвердили флуоресцентным секвенированием при использовании праймеров 2004MUC1-2014MUC1 (Приложение А). Последовательность MUC1, на которой основана последовательность FL-MUC1, показана на Фиг.2. На первой стадии этого способа клонирования BamHI-фрагмент, содержащий кДНК-вую последовательность полноразмерного MUC1, изолировали и клонировали в BamHI-сайт экспрессионного вектора pcDNA3.1(+)/Hygro (Invitrogen), генерируя плазмиду JNW278. Корректную ориентацию фрагмента относительно промотора CMV подтвердили методом ПЦР и

флуоресцентным секвенированием.

На следующей стадии клонирования удаляли 3'-нетранслируемую область (UTRs) и заменяли улучшенными сайтами для рестрикционных ферментов для облегчения будущих процедур клонирования. Фрагмент MUC1 амплифицировали в ПЦР с праймерами

5 2062MUC1 и 2063MUC1 (Приложение А) при использовании JNW278 в качестве матрицы и подвергали рестрикции при использовании BstXI и XhoI. Параллельно плазмиду JNW278 подвергали рестрикции при использовании BstXI и XhoI. Очищенный векторный скелет лигировали с ПЦР-фрагментом, генерируя плазмиду JNW314. Рестрикционный анализ и флуоресцентное секвенирование подтвердили присутствие корректного фрагмента.

10 Параллельно удаляли 5'-UTR и заменяли оптимальной Kozak-последовательностью и улучшенными сайтами для рестрикционных ферментов. JNW278 подвергали действию рестриктаз NheI и XhoI, удаляя целиком последовательность кДНК MUC1. Фрагмент MUC1 амплифицировали в ПЦР с ПЦР-праймерами 2060MUC1 и 2061 MUC1 (Приложение А), подвергали рестрикции рестриктазами NheI и XhoI и лигировали в скелет вектора,

15 генерируя плазмиду JNW294.

На следующей стадии клонирования подвергали JNW294 действию рестриктазы BsaMI, высвобождая два фрагмента (приблизительно 2,3 тысяч пар оснований и 3,2 тысяч пар оснований). Большой из этих двух фрагментов (Фрагмент А) изолировали и очищали.

20 Параллельно подвергали JNW314 действию рестриктазы BsaMI и большой из двух фрагментов (Фрагмент В, размером приблизительно 7 тысяч пар оснований), изолировали и очищали. Фрагменты А и В лигировали вместе, генерируя плазмиду JNW340. Корректную ориентацию подтвердили рестрикционным картированием при использовании Nhe-XhoI и, отдельно, XbaI.

На конечной стадии клонирования экспрессионную кассету изолировали из JNW340

25 расщеплением рестриктазами NheI и XhoI, высвобождая фрагмент приблизительно в 4 тысячи пар оснований. Экспрессионную плазмиду pVAC1 (Thomson Immunology 95: 510P106, 1998) подвергали действию рестриктаз NheI и XhoI и лигировали с кассетой MUC1, генерируя плазмиду JNW358 для экспрессии полноразмерного MUC1. Корректную ориентацию последовательности MUC1 относительно промотора CMV подтвердили

30 рестрикционным расщеплением и флуоресцентным секвенированием. Последовательность кассеты экспрессии MUC1 показана на Фиг.3.

### 1.3 Конструирование вектора MUC1, содержащего один VNTR-блок

Начальной точкой для конструирования кассеты для экспрессии MUC1, содержащего один VNTR-блок, является JNW278. Уникальным свойством последовательности ДНК с

35 высоким числом VNTR-повторов является присутствие сайта для рестриктазы FseI в каждом из повторяющихся блоков. JNW278 подвергали полному рестрикционному расщеплению при использовании FseI, скелет вектора изолировали и снова лигировали, генерируя плазмиду JNW283. Присутствие единственного VNTR-блока подтвердили рестрикционным анализом, ПЦР и флуоресцентным секвенированием.

40 Последовательность MUC1 в JNW283 показана на Фиг.2.

### 1.4 Конструирование вектора для экспрессии MUC1, содержащего один VNTR-блок

Для переноса кассеты MUC1, содержащего один VNTR-блок, из JNW283 в экспрессионную плазмиду pVAC осуществляли нижеследующие стадии клонирования. На первой стадии клонирования удаляли 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTRs) и заменяли

45 их улучшенными сайтами для рестрикционных ферментов для облегчения будущих процедур клонирования. Фрагмент MUC1 амплифицировали в ПЦР с праймерами 2060MUC1 и 2062MUC1 при использовании JNW283 в качестве матрицы и подвергали действию рестриктаз NheI и XhoI. Параллельно плазмиду pVAC подвергали рестрикции при использовании NheI и XhoI. Очищенный скелет вектора лигировали с ПЦР-фрагментом,

50 генерируя плазмиду JNW322. Рестрикционный анализ и флуоресцентное секвенирование подтвердили присутствие корректного фрагмента.

### 1.5 Конструирование кассеты MUC1, содержащего малое число VNTR-блоков

Начальной точкой для конструирования кассеты для экспрессии MUC1, содержащего

малое число VNTR-блоков, является JNW283, которую линеаризовали при использовании FseI. Генерировали VNTR-блоки частичным расщеплением плазмиды JNW278 рестриктазой FseI с высвобождением серии коротких фрагментов с размерами, варьирующими от 60 пар оснований (эквивалент одного VNTR-блока) до приблизительно 420 пар оснований, что соответствует семи VNTR-блокам. Серия фрагментов VNTR, генерированных частичным расщеплением JNW278, показана на Фиг.7. Фрагменты размером 60-500 пар оснований очищали экстракцией гелем и лигировали с FseI-линеаризованной JNW283. Сначала подвергали клоны скринингу в ПЦР при использовании праймеров 2005MUC1 и 2013MUC1, которые позиционированы с 5'- и 3'-стороны, соответственно, VNTR-области последовательности MUC1. ПЦР настраивали так, что клоны, которые содержали множественные VNTR-блоки, давали ПЦР-фрагменты, более крупные, чем ПЦР-фрагменты, соответствующие одному VNTR-блоку последовательности JNW283. ПЦР-позитивные клоны подвергали дополнительному анализу рестрикционным расщеплением и флуоресцентным секвенированием для подтверждения числа присутствующих VNTR-блоков. При использовании этого протокола получали множество разных плазмид, в том числе JNW319, которая имеет в сумме семь VNTR-блоков, и JNW321, которая имеет два VNTR-блока. Последовательности JNW319 и JNW321 показаны на Фиг.4 и 5. VNTR-блоки в JNW319 демонстрируют полиморфизмы, которые присутствуют в более обширной популяции (обозначены звездочками).

#### 1.6 Конструирование вектора для экспрессии MUC1, содержащего семь VNTR-блоков

Для переноса кассеты MUC1, содержащего семь VNTR-блоков, в экспрессионную плазмиду pVAC осуществляли нижеследующие стадии клонирования. На первой стадии клонирования удаляли 3'-нетранслируемую область (UTRs) и заменяли ее улучшенными сайтами для рестрикционных ферментов для облегчения будущих процедур клонирования. Фрагмент MUC1 амплифицировали в ПЦР с праймерами 2062MUC1 и 2063MUC1 при использовании JNW278 в качестве матрицы и подвергали действию рестриктаз BstXI и XhoI. Параллельно плазмиду JNW319 подвергали действию рестриктаз BstXI и XhoI. Очищенный скелет вектора лигировали с ПЦР-фрагментом, генерируя плазмиду JNW622. Рестрикционный анализ и флуоресцентное секвенирование подтвердили присутствие корректного фрагмента.

На следующей стадии клонирования подвергали JNW294 рестрикции при использовании BsaMI, высвобождая два фрагмента (приблизительно 2,3 тысяч пар оснований и 3,2 тысяч пар оснований). Большой из этих двух фрагментов (Фрагмент А) изолировали и очищали. Параллельно подвергали JNW622 действию рестриктазы BsaMI и больший из двух фрагментов (Фрагмент С, размером приблизительно 4 тысячи пар оснований), изолировали и очищали. Фрагменты А и С лигировали вместе, генерируя плазмиду JNW640. Корректную ориентацию подтвердили рестрикционным картированием при использовании XbaI и флуоресцентным секвенированием. На конечной стадии клонирования кассету MUC1 из JNW640 изолировали с последующей обработкой рестриктазами NheI и XhoI и лигировали с pVAC (также линеаризованной рестриктазами NheI и XhoI), генерируя плазмиду JNW656. Последовательность кассеты для экспрессии MUC1 подтвердили флуоресцентным секвенированием, и она показана на Фиг.6.

#### 1.7 Очистка VNTR-блоков

После расщепления JNW278 (FL-MUC1) рестриктазой FseI высвобождалась серия VNTR в диапазоне от 60 пар оснований (эквивалент одного VNTR-блока) до 420 пар оснований (эквивалент семи VNTR-блоков). После электрофореза изолировали эти фрагменты из агарозного геля и очищали их. Фиг.8 показывает две серии VNTR-блоков. Маркеры ДНК показаны на дорожках А и D. Дорожка В показывает серию, представляющую VNTR-блоки в диапазоне 60-240 пар оснований. Дорожка С показывает серию, представляющую VNTR-блоки в диапазоне 180-420 пар оснований. Эти фрагменты далее лигировали в FseI-линеаризованную JNW283 для построения гена MUC1, содержащего 2 и 7 VNTR-блоков. Аналогичным образом можно получать другие конструкторы, содержащие 3, 4, 5 или 6 VNTR-блоков (см. Фиг.7).

## 2. Получение конструкторов для кожной иммунизации генным пистолетом

Плазмидную ДНК преципитировали на гранулы золота диаметром 2 мкм при использовании хлорида кальция и спермидина. Нагруженные гранулы наносили на трубки Tefzel, как описано (Eisenbraun et al., 1993; Pertmer et al., 1996). Бомбардировку частицами выполняли при использовании системы доставки генов Accell (PCT WO 95/19799). В случае каждой плазмиды иммунизировали самок мышей C56B 1/6 3-кратным введением плазмиды в дни 0, 21 и 42. Каждое введение состояло из двух бомбардировок ДНК на золоте, что давало суммарную дозу приблизительно в 4-5 мкг плазмиды.

### 2.1 Внутримышечная (i.m.) ДНК-иммунизация

Самок мышей C57B1/6 иммунизировали внутримышечно в заднюю ногу дозой в 50 мкг ДНК в PBS в дни 0, 21 и 42.

### 2.2 Инъекция опухолевых клеток

Выполнили две серии экспериментов по регрессии опухоли, в которых, в первом эксперименте, инъектировали  $0,5 \times 10^6$  опухолевых клеток подкожно в правый бок анестезированной мыши через две недели после последней иммунизации. Во втором эксперименте использовали гораздо более агрессивную модель, в которой животное получало  $1,0 \times 10^6$  опухолевых клеток. Рост опухоли мониторировали дважды в неделю при использовании штангенциркуля в двух измерениях. Объемы опухоли вычисляли как  $(a \times b^2)/2$ , где  $a$  представляет больший диаметр, и  $b$  представляет меньший диаметр. Конечную точку эксперимента (смерть) определяли как момент времени, когда диаметр опухоли достигает 15 мм.

## 3. Тестирование конструкторов

### 3.1.1 Материалы и методы

#### Опухолевые клетки B16FO и B16FO-MUC1

B16FO (мышинная метастатическая меланома), трансфицированные экспрессионным вектором для кДНК MUC1 человека, получали от GlaxoWellcome U.S. Клетки культивировали в виде адгезивных монослоев в среде DMEM, обогащенной 10%-ой термически инактивированной фетальной телячьей сывороткой (FCS), 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина и 1 мг/мл антибиотика неомицина (G148). Для применения в анализе методом ELISPOT удаляли клетки из флаконов при использовании Версена и облучали (16000 рад).

### 3.1.2 Конструирование опухолевых клеток EL4, экспрессирующих MUC1

Культивировали клетки EL4 в полной среде RPMI, содержащей 10%-ую FCS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. JNW278 (полноразмерный MUC1) линеаризовали рестриктазой FspI, очищали экстракцией смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) с последующей преципитацией этанолом.  $2 \times 10^7$  клеток в 0,5 мл полной среды RPMI смешивали с 20 мкг линеаризованной ДНК в кювете BIORAD на 0,4 мм. Клетки трансфицировали электропорацией при 320 В, 960 мкФ. После электропорации суспензию клеток переносили в 30 мл предварительно нагретой полной среды RPMI и инкубировали 24 часа для восстановления состояния. Клетки помещали в условия селекции в полную среду RPMI, содержащую 500 мкг/мл гигромицина, и инкубировали 7-10 дней. Выжившие клетки разбавляли в планшетах на 96 лунок с U-образным дном до 0,5 клеток/лунка в 200 мкл полной среды RPMI, содержащей 500 мкг/мл гигромицина. 8-10 дней спустя переносили клоны в 24-луночные планшеты. На этой стадии проверяли проточной цитометрией профиль экспрессии MUC1 и сохраняли позитивные однородные клоны для дальнейшего анализа.

## 3.2 Анализ Т-клеточных ответов на продукт гена MUC1 методом Elispot

### 3.2.1 Получение спленоцитов

Получали селезенки из иммунизированных животных на 7-й день после поддерживающей иммунизации, что происходило либо в день 28, или день 49. Обработывали селезенки измельчением между стеклянными слайдами и получали клеточную суспензию. Лизировали красные клетки крови хлоридом аммония и удаляли

обломки с получением чистой суспензии спленоцитов. Клетки повторно суспендировали при концентрации  $8 \times 10^6$  /мл в полной среде RPMI для применения в анализах методом ELISPOT.

### 3.3 Скрининг пептидной библиотеки

5 Пептидную библиотеку, охватывающую полную последовательность MUC1, получали от Mimotopes. Библиотека содержала 116 15-мерных пептидов, перекрывающихся пептидами из 11 аминокислот, что охватывало всю последовательность MUC1 (что включает в себя 1 копию области tandemных повторов). Пептиды представлены числами от 184 до 299. Для скрининга этой пептидной библиотеки в ELISPOT с IFN $\gamma$  и IL-2 использовали пептиды в 10 конечной концентрации 10 мкМ, применяя протокол, описанный ниже. Для ELISPOTS на IFN $\gamma$  к анализу добавляли IL-2 при 10 нг/мл. Спленоциты, использованные в скрининге, брали в день 49 от мышей C57BL/6 или мышей CBA, иммунизированных при использовании FL MUC1 в дни 0, 21 и 42.

### 3.4 Картирование эпитопа

15 Для дополнительного исследования выбирали две области MUC1, демонстрирующих хорошую реактивность у мышей C57BL/6. Это были области, охватываемые пептидами 222-225 и 238-239. Проточной цитометрией (протокол описан ниже) показывали, что клетками, продуцирующими IFN $\gamma$  в ответ на эти пептиды, были CDS-клетки. Для дальнейшего картирования этих эпитопов заказывали у Mimotopes 8- и 9-мерные пептиды, перекрывающиеся на 7 или 8 аминокислот, соответственно. Их тестировали в ELISPOT с IFN $\gamma$  при использовании спленоцитов из животных, иммунизированных как детализировано выше. Идентифицировали два иммунодоминантных пептида:

SAPDNRPAL и PTTLASHS.

### 3.5 Анализ методом ELISPOT

25 Покрывали планшеты крысиными антителами против мышинного IFN $\gamma$  или мышинного IL-2 (Pharmingen, 15 мкг/мл в PBS) в течение ночи при +4°C. Перед использованием промывали планшеты три раза в PBS. Добавляют к планшетам спленоциты при  $4 \times 10^5$  клеток/лунка. Пептид SAPDNKPAL использовали в анализах в конечной концентрации 10 нг/мл. Пептид 30 RANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGV (25-мерный пептид) использовали в конечной концентрации 25 мкМ. Эти пептиды получали от Genemed Synthesis. Также в анализах методом ELISPOT использовали пептиды, идентифицированные в скрининге библиотеки и исследованиях по картированию эпитопов: 203 (DVTLPATEPATEPA) в концентрации 10 мкМ, 299 (LSYTNPAVAATSANL) в концентрации 10 мкМ, PTTLASHS в концентрации 1 мкМ 35 (Mimotopes). Облученные опухолевые клетки B16, B16-MUC1, EL4 и EL4-278 использовали при соотношении опухолевые клетки:эффектор, составляющем 1:4. Анализы методом ELISPOT проводили в присутствии IL-2 (10 нг/мл) или IL-7 (10 нг/мл) или без цитокина. Суммарный объем в каждой лунке был 200 мкл. Планшеты, содержащие клетки, стимулированные пептидом, инкубировали 16 часов в увлажненном инкубаторе при 37°C, 40 тогда как планшеты, которые содержали в качестве стимуляторов опухолевые клетки, инкубировали 40 часов.

#### 3.5.1 Проявление планшетов для анализа методом ELISPOT

Клетки удаляли из планшетов однократной промывкой в воде (погружение на 1 минуту для обеспечения лизиса клеток) и трехкратной промывкой в PBS. Конъюгированные с 45 биотином крысиные антитела против мышинного IFN $\gamma$  или IL-2 (Pharmingen) добавляли до 1 мкг/мл в PBS. Планшеты инкубировали при встряхивании 2 часа при комнатной температуре. Затем промывали планшеты три раза в PBS перед добавлением комплекса стрептавидина со щелочной фосфатазой (Caltag) при разведении 1/1000. После трех промывок в PBS выявляли пятна инкубацией с BCICP (Biorad) в качестве субстрата в 50 течение 15-45 минут. Субстрат отмывали при использовании воды и планшетам давали высохнуть. Пятна подсчитывали при использовании системы анализа изображений, которую разработал Brian Hayes из Asthma Cell Biology unit, GSK.

### 3.6 Проточная цитометрия для детектирования продукции IFN $\gamma$ из Т-клеток в ответ на



стимуляцию пептидом

Повторно суспендировали спленоциты в концентрации  $4 \times 10^6$ /мл. Добавляли пептид до конечной концентрации 10 мкМ и IL-2 до конечной концентрации 10 нг/мл. Клетки инкубировали при 37°C 3 ч. Добавляли брефелдин А в концентрации 10 мкг/мл и продолжали инкубацию в течение ночи. Клетки промывали буфером FACS (PBS+2,5%-ая FCS+0,1%-ый азид) и окрашивали цихромом с антителами против CD4 и FITC с антителами против CDS (Pharmingen). Промывали клетки и фиксировали Средой А из набора Fix and Perm (Caltag) 15 минут с последующей промывкой и добавлением антител против IFN $\gamma$  PE (Pharmingen), разбавленных в Среде В из набора Fix and Perm. После 30 минут инкубации промывали клетки и анализировали при использовании FACSCAN. В сумме собирали 500000 клеток из пробы и затем разделяли CD4- и CDS-клетки для определения популяций клеток, секретирующих IFN $\gamma$  в ответ на каждый пептид.

### 3.7 Анализ на антитела к продукту гена MUC1 методом ELISA

Получали пробы сыворотки из животных пункцией вены в дни - 1, 21, 49 и 56 и анализировали на присутствие антител против MUC1. ELISA выполняли при использовании планшетов Nunc Maxisorp, которые покрывали в течение ночи при 4°C при использовании 3 мкг/мл последовательности пептида MUC-01 дикого типа (40-мерного, соответствующего последовательности 2 tandemных повторов, RANGVTSAPDTRPAPGSTAPPANGVTSAPDTRPAPGSTAP). После промывки при использовании TBS-Tween (забуференный Трисом физраствор, pH 7,4, содержащий Tween 20, 0,05%) планшеты блокировали 3%-ым бычьим сывороточным альбумином (BSA) в буфере TBS-Tween в течение 2 ч при комнатной температуре. Все сыворотки инкубировали при разведении 1:100 в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере TBS-Tween. Связывание антител детектировали при использовании конъюгированных с пероксидазой хрена противомышиных кроличьих иммуноглобулинов (№P0260, Dako) при разведении 1:2000 в буфере TBS-Tween. Планшеты промывали снова и связанный конъюгат детектировали при использовании цветных реагентов Fast OPD (Sigma, UK). Останавливали реакцию добавлением 3 М серной кислоты и определяли продукт OPD количественно измерением поглощения при 490 нм.

### 3.8 Анализ сывороток из иммунизированных мышей проточной цитометрией

Для того чтобы продемонстрировать, что антитела, вызванные этими вакцинами, способны распознавать опухолевые клетки, пробы антисывороток из PMID-иммунизированных мышей использовали, чтобы метить различные линии опухолевых клеток, и метки визуализировали проточной цитометрией. Клетки (T47-D, MCF-7, EL4, EL4-278, B16FO и B16FOMUC1;  $1 \times 10^6$ ) промывали в буфере PBS, обогащенном 5%-ой FCS, и инкубировали при 4°C в течение 15 мин с мышиными сыворотками при разведении 1:100. После промывки инкубировали клетки со вторым антителом (овечьи противомышиные IgG, Dako, Дания, при разведении 1:50) в тех же условиях. Контрольные клетки инкубировали с буфером для FACS вместо антител первой стадии перед тем, как окрашивать реагентом второй стадии. FACS-анализ выполняли при использовании FACScan (Becton Dickinson). 1000-10000 клеток в пробе одновременно промеряли на переднеугловое светорассеяние, интегральное светорассеяние, а также на зеленую (FL1) флуоресценцию (выражаемую как логарифм интегрального флуоресцентного света). Запись производили, исключая агрегаты, чье переднеугловое светорассеяние зашкаливало. Данные выражали в виде гистограмм числа клеток (Y-ось) против интенсивности флуоресценции (X-ось) для разных типов мышиных сывороток, связанных с поверхностью опухолевых клеток.

### 3.9 Анализы методом кратковременной трансфекции

Экспрессию MUC1 с различных ДНК-конструктов анализировали методом кратковременной трансфекции плазмид в клетки CHO (яичник китайского хомячка) с последующим вестерн-блоттингом с суммарным белком клеток или анализом MUC1, экспрессирующегося на клеточных мембранах, проточной цитофлуориметрией. Кратковременную трансфекцию осуществляли реагентом Transfectam (Promega) в соответствии с указаниями изготовителя. Вкратце, в 24-луночные планшеты для культуры

тканей высевали  $5 \times 10^4$  клеток CHO на лунку в 1 мл полной среды DMEM (DMEM, 10%-ая FCS, 2 mM L-глутамин, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) и инкубировали 16 часов при 37°C. Добавляли 0,5 мкг ДНК к 25 мкл 0,3 M NaCl (достаточно для одной лунки) и добавляли Transfectam (2 мкл) к 25 мкл Milli-Q. Растворы ДНК и Transfectam  
 5 осторожно смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Во время этой стадии инкубации клетки промывали один раз в PBS и покрывали бессывороточной средой (150 мкл, DMEM, 2 mM L-глутамин). Раствор с ДНК и Transfectam добавляли каплями к клеткам, планшеты мягко встряхивали и инкубировали 4-6 часов при 37°C. Добавляли 500 мкл полной среды DMEM и инкубировали клетки еще 48-72 часов при  
 10 37°C.

3.10 Анализ клеток CHO, кратковременно трансфицированных плазмидами MUC1, проточной цитометрией

После кратковременной трансфекции промывали клетки CHO один раз в PBS и обрабатывали смесью Версен (1:5000)/0,025%-ый раствор трипсина для перевода  
 15 клеток в суспензию. После трипсинизации осаждали клетки CHO и снова суспендировали в буфере FACS (PBS, 4%-ый PCS, 0,01%-ый азид натрия). Первичные антитела, ATR1, добавляли до конечной концентрации 15 мкг/мл и пробы инкубировали на льду в течение 15 минут. Контрольные клетки инкубировали с буфером FACS в отсутствие ATR1. Клетки промывали три раза в буфере FACS, снова суспендировали в 100 мкл буфера FACS,  
 20 содержащего 10 мкл вторичных антител, представляющих собой козы противомышьиные иммуноглобулины, конъюгированные с FITC, F(ab')<sub>2</sub> (Dako, F0479), и инкубировали на льду в течение 15 минут. После окрашивания вторичными антителами промывали клетки три раза в буфере для FACS. Анализ FACS выполняли при использовании FACScan (Becton Dickinson), 1000-10000 клеток в пробе одновременно промеряли на  
 25 переднеугловое светорассеяние, на интегральное светорассеяние, а также на зеленую (FL1) флуоресценцию (выражаемую как логарифм интегрального флуоресцентного света). Запись производили, исключая агрегаты, чье переднеугловое светорассеяние зашкаливало. Данные выражали в виде гистограмм числа клеток (Y-ось) против интенсивности флуоресценции (X-ось).

3.11 Анализ клеток CHO, кратковременно трансфицированных плазмидами MUC1, вестерн-блоттингом

Кратковременно трансфицированные клетки CHO промывали в PBS и обрабатывали смесью Версен (1:5000)/0,025%-ый раствор трипсина для перевода клеток в суспензию. После трипсинизации осаждали клетки CHO и снова суспендировали в 50 мкл PBS.  
 35 Добавляли равный объем буфера для пробы, представляющего собой 2-триглицерин с додецилсульфатом натрия (Invitrogen), содержащего 50 mM дитиотрейтола, и нагревали этот раствор до 95°C в течение 5 минут. 1-20 мкл пробы наносили на 4-20% триглицериновый гель толщиной 1,5 мм (Invitrogen) и подвергали электрофорузу при постоянном напряжении (125 В) в течение 90 мин в однократном триглицериновом буфере (Invitrogen). Для шкалирования проб использовали предварительно окрашенный маркер широкого диапазона (New England Biolabs, #P7708S). После электрофореза переносили пробы на PVDF-мембрану Immobilon-P (Millipore), предварительно смоченную метанолом, при использовании модуля Xcell III Blot (Invitrogen), однократного Transfer-буфера (Invitrogen), содержащего 20% метанола, постоянного напряжения 25 В в течение 90  
 45 минут. Мембрану блокировали в течение ночи при 4°C в TBS-Tween (забуференный Трисом физраствор, pH 7,4, содержащий 0,05%-ый Tween 20), содержащем 3% сухого обезжиренного молока (Marvel). Первичные антитела (ATR1) разбавляли до 1:100 и инкубировали с мембраной в течение 1 часа при комнатной температуре. После обильной промывки в TBS-Tween вторичные антитела разбавляли до 1:2000 в TBS-Tween,  
 50 содержащем 3% сухого обезжиренного молока, и инкубировали с мембраной в течение одного часа при комнатной температуре. После обильной промывки мембрану инкубировали с субстратом Supersignal West Pico Chemiluminescent (Pierce) в течение 5 минут. Избыток жидкости удаляли и мембрану запечатывали между двумя листками липкой

пленки и экспонировали пленке Hyperfilm ECL (AmershamPharmaciaBiotech) в течение 1-30 мин.

#### 4. Результаты

##### 4.1 Сравнение генного пистолета и внутримышечной инъекции

5 Кассету для экспрессии FL-MUC1 в плазмиде pcDNA3-FL-MUC1 вводили мышам при использовании PMID и внутримышечной инъекции.

##### 4.2 Сравнение антительных ответов

10 Ответы по антителам против MUC1 после иммунизации внутримышечной инъекцией (мышь А-С) и при использовании PMID (мышь D-F) показаны на Фиг.9. Результаты показывают, что введение с помощью PMID индуцирует более устойчивый антительный ответ с более быстрой кинетикой, причем 3 из 3 мышей дают ответ в день 41. Напротив, только одна мышь, иммунизированная внутримышечным путем, показала хорошие антительные ответы в день 41. Даже после дополнительной поддерживающей иммунизации в день 42 только 2 из 3 мышей показали уровни антител против MUC1, сравнимые с таковыми у PMID-иммунизированных мышей.

##### 4.3 Сравнение клеточных ответов

20 Клеточные ответы после PMID- или внутримышечной (IM) иммунизации плазмидой pcDNA3 (пустой вектор) или pcDNA3-FL-MUC1 анализировали методом ELISPOT после первичной иммунизации в день 0 и двух поддерживающих иммунизаций в день 21 и день 42. Анализ проводили в день 13 после 2-й поддерживающей иммунизации. Спленоциты стимулировали пептидом SAPDTRPAP (9.1), который был ранее описан в литературе как хороший эпитоп Н-2Кb. Относительно ответов по IFN $\gamma$ , Фиг.10 показывает, что у 100% PMID-иммунизированных мышей есть детектируемые ответы на пептид, тогда как у мышей, иммунизированных внутримышечно, ответов не выявили.

##### 4.4 Экспрессия конструктов MUC1 in vitro - вестерн-блоттинг

25 Фиг.11 показывает результаты вестерн-блоттинга на MUC1 с суммарным белком клеток после кратковременной трансфекции различных конструктов MUC1 в клетки CHO. Эти данные показывают, что конструкт FL-MUC1 (JNW358) генерирует размытое пятно при 83-175 кДа, что соответствует предсказанной молекулярной массе 108 кДа и гетерогенному, но обильному гликозилированию структуры VNTR. Конструкт 7 $\times$ VNTR-MUC1 (JNW656) продуцирует более фокусированное пятно, центрированное вокруг ~65 кДа, что соответствует предсказанной молекулярной массе (61 кДа) и гетерогенному гликозилированию структуры VNTR. Конструкт 1 $\times$ VNTR-MUC1 (JNW332) продуцирует единственную бледную полосу 40 кДа, что соответствует присутствию только одного VNTR-блока.

##### 4.5 Экспрессия конструктов MUC1 in vitro - проточная цитометрия

40 После кратковременной трансфекции конструктов MUC1 в клетки CHO экспрессию MUC1 на поверхности клеток проверяли проточной цитометрией при использовании специфичных антител ATR1 против VNTR в MUC1. Процент клеток, позитивных по MUC1, был 9,6% для проб, трансфицированных при использовании FL-MUC1 (JNW358), 8,8% для проб, трансфицированных при использовании 7 $\times$ VNTR-MUC1, и 9,8% для проб, трансфицированных при использовании 1 $\times$ VNTR-MUC1 (JNW332). Из этих данных следует, что число VNTR не влияет на способность MUC1 перемещаться к клеточной поверхности и на его выявляемость антителами ATR1

##### 4.6 Антительные ответы на FL-MUC1, 7 $\times$ VNTR-MUC1 и 1 $\times$ VNTR-MUC1 после PMID-иммунизации

50 Антительные ответы после иммунизации плазмидами pVAC (пустой вектор), JNW358 (FL-MUC1), JNW656 (7 $\times$ VNTR-MUC1) и JNW332 (1 $\times$ VNTR-MUC1) анализировали методом ELISA после первичной PMID-иммунизации в день 0 и двух поддерживающих иммунизаций в день 21 и день 42. Фиг.12 показывает антительные ответы в сыворотках, взятых в день 56. В то время как на пустой вектор MUC1 специфичных ответов не было, конструкт FL-MUC1 и конструкт 7 $\times$ VNTR-MUC1 продуцировали устойчивые и сравнимые титры MUC1 специфичных антител, и, напротив, конструкт 1 $\times$ VNTR-MUC1 индуцировал более низкий

титр антительного ответа. Фиг.12b показывает, что кинетики антительного ответа на FL-MUC1 и 7×VNTR-MUC1 также очень похожие, в то время как ответ на 1×VNTR-MUC1 развивается более медленно и для достижения плато требует второй поддерживающей иммунизации в день 42. Эти данные подтверждают, что делеция большинства VNTR-блоков не является губительной для индукции сильного антительного ответа, специфичного к MUC1. Однако антительный ответ на 1×VNTR-MUC1 является субоптимальным в смысле его силы и кинетики его начала.

4.7 Распознавание опухолевых клеток, экспрессирующих MUC1, сыворотками из мышей, иммунизированных при использовании MUC1

Для подтверждения того, что антитела, индуцируемые FL-MUC1, 7×VNTR-MUC1 и 1×VNTR-MUC1, способны к распознаванию той формы человеческого MUC1, которая экспрессируется на опухолевых клетках, сыворотки из иммунизированных мышей тестировали проточной цитометрией. Целевыми клетками были B16FOMUC1, линия опухолевых клеток, намеренно измененных так, что они экспрессируют MUC1 человека. Результаты, показанные на Фиг.13, подтверждают, что сыворотки из мышей, иммунизированных при использовании FL-MUC1 (JNW358), мышей, иммунизированных при использовании 7×VNTR-MUC1 (JNW656), и мышей, иммунизированных при использовании 1×VNTR-MUC1 (JNW332), эквивалентны по их способности распознавать MUC1, экспрессирующийся на B16FOMUC1, откуда следует предположение, что удаление большого числа VNTR-блоков не является губительным для индукции физиологически состоятельного антительного ответа.

4.8 Идентификация новых Т-клеточных эпитопов из MUC1 в мышах C57BL/6 скринингом библиотеки пептидов MUC1

После PMID-иммунизации с использованием JNW358 (FL-MUC1) в день 0 и двух поддерживающих иммунизации в день 21 и день 42 проводили анализы методом ELISPOT в день 49. Пептиды из библиотеки FL-MUC1 тестировали при конечной концентрации 10 мкМ. При этом исходном скрининге было найдено, что несколько групп 15-мерных пептидов стимулируют секрецию IFN $\gamma$  или IL-2. Области, представляющие интерес, отмечены на Фиг.14b, с. Пептиды, стимулирующие секрецию IFN $\gamma$ , были изучены далее внутриклеточным окрашиванием на цитокин и проточной цитометрией для определения, содержат ли эти области CD4- или CD8-эпитопы. Было найдено, что пептиды 223, 224, 225, 238 и 239 индуцируют хорошую секрецию IFN $\gamma$  из CD8-клеток. Для того чтобы картировать CD8-эпитопы далее, получали 8- и 9-мерные пептиды, перекрывающиеся на 7 или 8 аминокислот. Их тестировали в анализе на IFN $\gamma$  методом ELISPOT и затем несколько из них, демонстрирующих реактивность, тестировали проточной цитометрией. Область 223-225 содержала кластеры CD8-эпитопов. Титрованием показали, что доминантным пептидом был SAPDNRPAL, пептид, который уже использовали другие авторы для измерения ответов, специфичных к MUC1. Однако в этой области идентифицировали несколько новых пептидов, которые индуцировали секрецию IFN $\gamma$  CD8-клетками при 10 мкМ и более низкой концентрации. Мы показали, что один из них, TSAPDNRPA, способен индуцировать цитотоксические Т-клетки *in vitro* (данные не показаны). Показано, что область 238-239 содержит один сильный CD8-эпитоп, PTTLASHS, который мы использовали для последующих анализов MUC1, а также несколько более слабых CD8-эпитопов.

4.9 Клеточные ответы на FL-MUC1, 7×VNTR-MUC1 и 1×VNTR-MUC1 после PMID-иммунизации

Клеточные ответы после иммунизации плазмидами pVAC (пустой вектор), JNW358 (FL-MUC1), JNW656 (7×VNTR-MUC1) и JNW332 (1×VNTR-MUC1) анализировали методом ELISPOT после первичной PMID-иммунизации в день 0 и двух поддерживающих иммунизаций в день 21 и день 42. Анализы проводили через 7 дней после поддерживающей иммунизации. Применяли три варианта анализа: 1) опухолевые клетки B16-MUC1 и EL4-MUC1, экспрессирующие MUC1, которые использовали для демонстрации

широкого противоопухолевого клеточного ответа, 2) высокоаффинный пептид SAPDNRJPAL вне VNTR-области MUC1 (представлен один раз во всех использованных конструктах), 3) 25-мерный пептид, кодирующий последовательность, которая включает в себя целый повтор из VNTR-области и дополнительно 5 аминокислот из смежного повтора.

Этот пептид индуцирует преимущественно продукцию IL-2 из иммунизированных спленоцитов. Конструкты FL-MUC1, 7×VNTR-MUC1 и 1×VNTR-MUC1 продуцировали устойчивые и сравнимые клеточные ответы, специфичные к MUC1, на все тестированные стимулы (Фиг.14). В случае пептида SAPDNRJPAL мы показали, что IFN $\gamma$  продуцируют CD8-клетки, тогда как продукция IFN $\gamma$  в ответ на опухолевые клетки и продукция IL-2 в ответ на 25-мерные пептиды возможна из CD4- или CD8-клеток. Эти данные подтверждают, что делеция большинства VNTR-блоков не является губительной для индукции сильного клеточного ответа, специфичного к MUC1, на эпитопы как внутри, так и вне VNTR-области.

#### 4.10 Сравнение защиты (PMID в сравнении с IM) после опухолевого воздействия

После трех введений плазмиды pсDNA3-FL-MUC1, экспрессирующей MUC1, или пустого вектора pсDNA3.1 при использовании PMID или внутримышечной инъекции на мышей воздействовали опухолевыми клетками, экспрессирующими MUC1 (B16FOMUC1). Процент мышей без опухолей показывает Фиг.15, ясно демонстрирующая, что PMID индуцирует защиту от последующего опухолевого воздействия у большего числа мышей при сравнении с доставкой той же плазмиды внутримышечной инъекцией. Из этих данных в сочетании с антительным и клеточным ответами, детализированными выше, следует, что PMID при сравнении с внутримышечной доставкой индуцирует более устойчивый клеточный и антительный ответы, что коррелирует с улучшенным профилем защиты от опухоли.

#### 4.11 Эффективность конструктов кДНК MUC1 (F/L MUC1 и 7 VNTR) в противоопухолевой защите

Мышей иммунизировали три раза как описано в материалах и методах пустым вектором (pVAC, пустой) или вектором, кодирующим полноразмерный MUC1 (JNW358). Через две недели после последней поддерживающей иммунизации мышей подвергали опухолевому воздействию клетками B16FOMUC1 и мониторировали рост опухоли. При наличии опухолей они появлялись приблизительно через 10-15 дней после опухолевого воздействия в группе, подвергнутой пустой вакцинации, и приблизительно через 22 дня в группе, вакцинированной при использовании FL-MUC1. Фиг.16А сопоставляет выживание мышей, иммунизированных либо пустым вектором, либо вектором, кодирующим полноразмерный MUC1, в обеих группах. Имеет место значительно лучшее выживание у мышей, иммунизированных с использованием FL-MUC1 (60% без опухолей), в сравнении с таковым у мышей, иммунизированных пустым вектором (20% без опухолей). Фиг.16В показывает противоопухолевую защиту, сопоставляя группы с FL-MUC1 и 7×VNTR и контрольную группу при двухкратном количестве опухолевых клеток ( $1,0 \times 10^6$ ) в сравнении с предыдущими экспериментами. Оба конструкта MUC1 вызывают заметные и сравнимые задержки опухолевого роста относительно контрольной вакцинированной группы до приблизительно дня 25. Позже этот эффект уменьшался, возможно, из-за истощения иммунного ответа на опухолевый антиген.

В заключение, конструкт 7×VNTR-MUC1 давал такой же защитный противоопухолевый ответ, как и FL-MUC1, даже в весьма жестких условиях.

#### 4.12 FL-MUC1 в сравнении с 7×VNTR-MUC1: стабильность в системе, представляющей собой рекомбинантный вирус осповакцины

Полноразмерный MUC1 человека вставляли в вектор pSclinker в виде BamHI-фрагмента. Этот конструкт использовали для создания рекомбинантного вируса осповакцины гомологичной гекомбинацией вектора в ген ТК (тимидинкиназы) генома вируса осповакцины.

Наносили рекомбинантный вирус на клеточный слой НТК-клеток и анализировали бляшки на бета-галактозидазную активность способом blueo-gal. Ген бета-галактозидазы переносится вектором и, таким образом, синие бляшки указывают на наличие рекомбинантного вируса. Выбирали и клонировали множество синих бляшек до того, как

100% бляшек стали продуцировать синее окрашивание при выполнении анализа blue-gal.

6 из этих клонов использовали для инфицирования НТК-клеток при кратности инфицирования, равной 10, и собирали клетки через 6 ч, 24 ч и 32 ч после инфицирования. Повторно суспендировали эти клетки в 200 мкл среды и удаляли 40 мкл и  
 5 смешивали с буфером для нанесения пробы при электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфат натрия.

Эти клеточные экстракты подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфат натрия и анализировали вестерн-блоттингом при использовании моноклональных антител ATR1 и HMPG1, причем и те, и другие распознают эпитопы в  
 10 пределах VNTR-области MUC1. Ни одна из проб, инфицированных рекомбинантным вирусом, не давала какого-либо окрашивания с этими антителами. Контрольный клеточный экстракт клеток, трансфицированных плазмидой pVAC-7VNTRMUC1, окрашивался с получением яркой полосы, указывающей на присутствие TR-эпитопов.

Окрашивание антителами против бета-галактозидазы указывает на экспрессию бета-  
 15 галактозидазы во всех пробах, инфицированных рекомбинантным вирусом, но не вирусом дикого типа, или не в клеточном контроле.

Молекулярный анализ собранных инфицированных клеток выполняли методом ПЦР. Выбирали пары праймеров, которые должны указывать на присутствие различных частей конструктора pSCHnuHKer-FLMUC1 в геноме рекомбинантного вируса. Выбрали следующие  
 20 пары праймеров:

FMC101+2014MUC1 - место соединения вектора и 5'-конца MUC1

2008MUC1+FMC102 - место соединения вектора и 3'-конца MUC1

2004MUC1+2014MUC1 - часть MUC1 с 5'-стороны от VNTR-области

2007MUC1+2009MUC1 - часть MUC1 с 3'-стороны от VNTR-области

25 FMC101 и FMC102 представляют собой праймеры в векторной последовательности, которые находятся с 5'-стороны и 3'-стороны, соответственно, линкерной последовательности.

FMC101: - CATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCG

FMC102: - GCCTCCTTAAAGCATTTTCATACACACAGC

30 Осуществляли показанные выше 4 ПЦР при использовании 1 мкл собранных клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом (32 ч после инфицирования) после нагревания до 80°C в течение 10 мин. Реакцию проводили также на пробах клеток, инфицированных вирусом дикого типа, и неинфицированных клеток. Сюда включали и позитивный контроль, представляющий собой 1 нгДНК плазмиды pСлинкер-FLMUC1.

35 Позитивный контроль продуцировал амплифицированные фрагменты корректного размера при электрофорезе на агарозном геле. Ни одна из других проб не продуцировала специфические продукты, из чего следует, что в вирусном геноме конструктор уже не был интактным.

Затем аналогичным образом продуцировали рекомбинантный вирус, содержащий  
 40 7УМТК-вариант человеческого MUC1, и после обеспечения клональной популяции использовали его для инфицирования НТК-клеток, которые собирали как и ранее. Клеточные экстракты этих инфицированных клеток ясно демонстрировали экспрессию MUC1 при вестерн-блоттинге с ATR1 и также при FACS-анализе инфицированных клеток через два дня после инфицирования. Мышиные MC57-клетки, инфицированные вирусом,  
 45 рекомбинантным с 7VNTR, использовали для стимуляции клеток селезенки из мышей, которых вакцинировали при использовании MUC1, в ELISPOT-анализе. Было показано, что после инкубации в течение ночи клетки селезенки секретируют IL-2 в ответ на клетки, инфицированные 7VNTR-ВпрусоМ осповакцины, но не на клетки, инфицированные вирусом осповакцины дикого типа.

50 Из этих результатов следует, что использование конструктора MUC1 с 7-ю тандемными повторами улучшает стабильность конструктора. Из того факта, что вирус осповакцины, рекомбинантный с полноразмерным MUC1, был неспособным индуцировать экспрессию MUC1 в инфицированных клеток, явно следует, что этот конструктор нестабилен в этих

сильно рекомбиногенных условиях. Ни один из 6 вирусных клонов не экспрессировал MUC1, и они, по видимому, не содержали ген MUC1, однако все они экспрессировали бета-галактозидазу, которую переносил тот же вектор. Однако 7хMTP-вариант с меньшим числом повторов ясно демонстрировал экспрессию в 3 разных анализах, что указывает на

5 более высокую стабильность без потери распознавания как антителами, так и антиген-специфичными Т-клетками.

#### 5. Стабильность FL- MUC1, 7VNTR и 1VNTR при выращивании в E.Coli DH1

Для трансформирования E.Coli DH1 использовали соответствующий вектор. Для контроля трансформировали также пустым вектором.

10 Для того чтобы определить, влияет ли число повторов в VNTR-области на стабильность, выполняли анализ стабильности во встряхиваемом флаконе при использовании плазмид FL-MUC1, 7хVNTR-MUC1 и 1хVNTR-MUC1.

При исследовании стабильности наблюдали рост, продукцию плазмиды и удержание плазмиды для каждого из конструкторов в культуре во встряхиваемом флаконе на

15 протяжении 9 пересевов, каждый длительностью между 10 и 14 ч.

Исследование стабильности используют для определения того, меняется ли продукция и качество плазмиды в результате повторных пересевов клеток во встряхиваемых флаконах. Поскольку условия во встряхиваемых флаконах являются неконтролируемыми (например, pH, аэрация), поддержание качества и продукции плазмиды на протяжении исследования

20 является хорошим показателем того, что эти характеристики должны оставаться стабильными.

### 5. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 5.2.1. Рост культур

Хотя имело место некоторое варьирование между конечной оптической плотностью при

25 600 нм, достигнутой клетками из каждого посева, из-за легких вариаций в объеме инокулята, в целом не было значительных различий в скоростях роста как во время анализа, так и между разными конструкторами MUC1.

#### 5.2.2. Продукция плазмид

Величины числа копий плазмиды (ЧКП) получали на 1-м, 5-м и 9-м (конечном) посевах.

30 В случае полноразмерного конструктора ЧКП снижалось на 54% на протяжении этого периода, тогда как в случаях других трех конструкторов оно увеличивалось на ~40%. Объемный выход (мг плазмиды/л культуры) оставался стабильным на протяжении исследования в случае 7VNTR, тогда как в случае полноразмерного конструктора он снижался на 64%. Небольшое уменьшение объемного выхода наблюдали в случае пустого

35 вектора (21%) и конструктора с единственным VNTR (24%), хотя это ни коим образом не было столь же заметным, как в случае полноразмерного конструктора.

#### 5.2.3. Удержание плазмиды

Удержание плазмиды измеряли при использовании анализа высевания реплики, и оно на протяжении исследования стабильности оставалось у всех конструкторов между 80% и 100%.

40 Более того, не было значительных различий между конструкторами.

#### 5.2.4. Стабильность плазмиды

Для изучения стабильности плазмид на протяжении длительности этого исследования с помощью вращательных колонок Qiagen Mini-prep, Plasmide Extraction получали экстракты

плазмид как в начальной точке (сбор в день 0), так и в конечной точке (сбор в день

45 5). Эти экстракты затем анализировали электрофоретическим разделением на агарозном геле перед последующим окрашиванием при использовании Sybr-Gold. Этот метод окрашивания, основанный на Sybr-Gold, считают особенно подходящим для анализа стабильности плазмид по причине предыдущей работы, продемонстрировавшей, что он способен детектировать 1 нг «пика» рекомбинанта в 1000 нг пробы. Результаты этого

50 исследования показаны ниже (см. Фиг.6), и из этих результатов следует три вывода:

1. Конструкторы с 7хVNTR и 1хVNTR содержат ожидаемое количество повторов VNTR на протяжении эксперимента при отсутствии свидетельств нестабильности, выявленных либо в скелете плазмиды, либо в структуре VNTR-повтора в любой момент времени.

2. Пустой вектор p7313, который использовали в анализе стабильности, не имеет ожидаемого профиля и отличается от стандартной плазмиды p7313.

3. Пробы полноразмерного Mud, взятые в конечной точке времени (день 5; 9-й пересев) содержат следы плазмид неизвестного происхождения.

5 Вследствие неясности относительно профиля p7313, а также из-за идентификации следовых разновидностей плазмид в случае конструкта FL-MUC1 в день 5 была выполнена дополнительная исследовательская работа.

Для исследования наблюдаемых различий между пустым вектором p7313, использованным в исследовании стабильности, и стандартной плазмидой p7313 провели анализ рестрикционными ферментами. Результаты этого анализа показали, что область в ~800 пар оснований конструкта p7313, содержащая рестрикционные сайты для BamHI (1926 пар оснований) и SapI (2422 пар оснований), была утеряна. Затем разработали праймеры, фланкирующие эту область, и после этого секвенировали плазмиду. Получившиеся данные о последовательности подтвердили, что область между 1866 и 2589 15 была утеряна. Эта область плазмиды содержит Ser-последовательность. Из-за того, что эти Ser-последовательности помогают разделять конкатемеры, их отсутствием можно объяснить множественность полос у разновидностей плазмиды p7313, которую наблюдали в исследовании стабильности.

Дополнительная исследовательская работа: анализ следовых плазмид в пробах с FL-MUC1 20

Следовые плазмиды, которые наблюдали только в конечной точке в пробах с FL-Mud, анализировали дополнительно. Этот анализ обнаружил, что эти следы нельзя было выявить до дня 4. Наряду с этим открытием, с этими следовыми плазмидами еще и проводили очистку в геле, повторную трансформацию, повторную очистку и 25 секвенирование. Такой анализ затем идентифицировал эти плазмиды как примесные, а не рекомбинантные, причем они представляли собой именно тот 7xVNTR, который использовали в анализе стабильности (p7656), p7313 с делецией в Ser-области (обрисован выше), а также предположительный конкатемер этой Ser-делеции в p7313.

Из этих результатов сделали вывод, что пробы с FL-MUC1 имели примеси в виде 30 пустого вектора p7313 и конструктов 7xVNTR (p7656) и что рекомбинанты в конечной точке в пробах с FL-Mud отсутствуют. Считается, что эти примеси попали в часть E.coli DH1 с FL-Mud во время исходной трансформации плазмид. Из-за того, что эти следовые плазмиды не появляются на агарозных гелях до дня 4, одной из возможностей является то, что они прошли селекцию в течение исследования из-за их меньшего размера 35 относительно плазмиды FL-Mud.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные исследования стабильности показали, что плазида 7xVNTR-MUC1 стабильна в смысле ростовых характеристик, удержания плазмиды и качества плазмиды. В смысле ростовых характеристик, удержания плазмиды и качества плазмиды не было заметных 40 различий между векторами 1xVNTR, 7xVNTR и FL-MUC1. Однако данные о числе копий высветили значительные различия между этими конструктами. У полноразмерного конструкта при сравнении с 7xVNTR в течение исследования стабильности значительно снижались и число копий плазмиды, и объемный выход. Хотя удержание плазмиды, как видно, оставалось на уровне 100% на протяжении эксперимента с полноразмерным 45 конструктом, это только указывает на то, что все клетки в популяции все еще содержат достаточно плазмид для придания устойчивости к канамицину. Если бы этот эксперимент проводили дольше, возможно, что число копии могло уменьшиться до такого уровня, что устойчивость к канамицину стала бы недостаточной для того, чтобы дать возможность для роста на селективных планшетах, что привело бы к уменьшению наблюдаемого удержания 50 плазмиды. Из этих данных следует, что конструкт 7xVNTR может иметь значительные преимущества в смысле благоприятного профиля развития, поскольку содержание плазмиды может влиять на очистку клеточной массы. При наличии этих различий между конструктами 7VNTR и FL-MUC1 вероятно, что 7VNTR будет легче очищать и получать с



более высоким выходом.

#### Формула изобретения

1. Нуклеиновокислотный конструкт, кодирующий антиген MUC-1, выбранный из:

- (а) 7 VNTR MUC-1 (то есть полный MUC-1 только с 7 полными повторами);  
 (б) 7 VNTR MUC-1  $\Delta$ ss (такой же, как (а), но лишенный сигнальной последовательности);  
 (в) 7 VNTR MUC-1  $\Delta$ TM  $\Delta$ CYT (такой же, как (а), но лишенный трансмембранного и цитоплазматического доменов); или

(г) 7 VNTR MUC-1  $\Delta$ ss  $\Delta$ TM  $\Delta$ CYT (такой же, как (в), но лишенный сигнальной последовательности).

2. Нуклеиновокислотный конструкт по п.1, который включает в себя последовательность, кодирующую эпитоп, выбранный из группы: FLSFHISNL, NSSLEDPSTDYYQELQRDISE или NLTISDVSV.

3. Нуклеиновокислотный конструкт по п.1, где этот конструкт представляет собой молекулу ДНК.

4. Нуклеиновокислотный конструкт по п.1 для применения для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

5. Нуклеиновокислотный конструкт, кодирующий антиген MUC-1, выбранный из:

- (а) 7 VNTR MUC-1 (то есть полный MUC-1 только с 7 полными повторами);  
 (б) 7 VNTR MUC-1  $\Delta$ ss (такой же, как (а), но лишенный сигнальной последовательности);  
 (в) 7 VNTR MUC-1  $\Delta$ TM  $\Delta$ CYT (такой же, как (а), но лишенный трансмембранного и цитоплазматического доменов); или

(г) 7 VNTR MUC-1  $\Delta$ ss  $\Delta$ TM  $\Delta$ CYT (такой же, как (в), но лишенный сигнальной последовательности),

где по меньшей мере один VNTR мутирован для снижения потенциала гликозилирования.

6. Нуклеиновокислотный конструкт по п.5, который включает в себя последовательность, кодирующую эпитоп, выбранный из группы: FLSFHISNL, NSSLEDPSTDYYQELQRDISE или NLTISDVSV.

7. Нуклеиновокислотный конструкт по п.5, где этот конструкт представляет собой молекулу ДНК.

8. Нуклеиновокислотный конструкт по п.5 для применения для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

9. Экспрессирующая плазмида, содержащая молекулу ДНК по п.3 или 7.

10. Плазмида по п.9 для применения для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

11. Протеин, обладающий противоопухолевой активностью, кодируемый нуклеиновокислотным конструктом по любому из пп.1-3 и 5-7.

12. Протеин по п.11 для применения для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

13. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, содержащая эффективное количество нуклеиновокислотного конструкта по любому из пп.1-3 и 5-7, плазмиды по п.9 или протеина по п.11 и фармацевтический приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, где носитель представляет собой микрочастицу.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, где микрочастица является золотой.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15, содержащая адъювант.

17. Фармацевтическая композиция по п.13 для применения для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

18. Применение нуклеиновокислотного конструкта по любому из пп.1-3 и 5-7 в изготовлении медикамента для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

19. Применение протеина по п.11 в изготовлении медикамента для лечения или предотвращения опухолей, экспрессирующих MUC-1.

20. Способ лечения или предотвращения опухолей или метастазов, при котором вводят безопасное и эффективное количество нуклеиновокислотного конструкта по любому из

5 пп.1-3 и 5-7, плазмиды по п.9 или протеина по п.11.

10

15

20

25

30

35

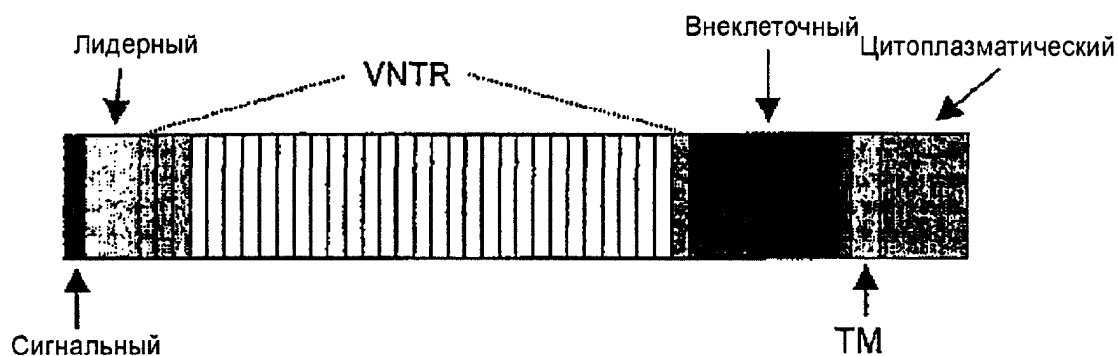
40

45

50

Фиг. 1

## Конструкты MUC1 - Введение

Обозначения

|                                                                                     |                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|    | Сигнальная последовательность             |
|    | Лидерная последовательность               |
|    | Нетипичные блоки VNTR-повторов            |
|   | Блоки полных VNTR-повторов                |
|  | Внеклеточный домен, не относящийся к VNTR |
|  | Трансмембранный домен                     |
|  | Цитоплазматический домен                  |

Сокращения

TM трансмембранный домен

CYT цитоплазматический домен

ss сигнальная последовательность

VNTR варьирующий по числу tandemных повторов

Фиг. 2

Последовательность MUC1 из плазмиды JNW283. Сайты для BamHI подчеркнуты дважды. Белковая последовательность показана в однобуквенном формате. Старт- и стоп-кодоны показаны жирным шрифтом. Последовательность VNTR-повторов подчеркнута, а сайт для FseI обозначен жирным подчеркиванием. Последовательность FL-MUC1 из плазмиды pcDNA3-FL-MUC1 (ICRF) идентична нижеприведенной последовательности, за исключением подчеркнутой VNTR-последовательности, которая в плазмиде pcDNA3-FL-MUC1 повторяется приблизительно 32 раза.

```

GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTCCCCA
CCCATTTCAACCACCACCATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC
      M T P G T Q S P F F L L L L L - 15

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

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

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

GACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGGG
      Q D V T L A P A T E P A S G S A A T W G - 95

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

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

CCCACGGTGTCACTCTGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAG
      H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 155

CCCATGGTGTCACTCTGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAG
      H G V T S A P D N R P A L G S T A P P V - 175

TCCACAATGTCACTCTGGCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA
      H N V T S A S G S A S G S A S T L V H N - 195

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC
      G T S A R A T T T P A S K S T P F S I P - 215

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA
      S H H S D T P T T L A S H S T K T D A S - 235

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC

```

S T H H S T V P P L T S S N H S T S P Q - 255  
 AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA  
 L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 275  
 ATTCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG  
 S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 295  
 AATGTTTTGTCAGATTTATAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA  
 M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 315  
 GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC  
 P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 335  
 ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA  
 D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 355  
 CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCCAGTCTGGGGCTG  
 I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 375  
 GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA  
 V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 395  
 TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCTAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG  
 V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 415  
 ACATCTTTCCAGCCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCC  
 I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 435  
 ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG  
 G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 455  
 GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT  
 N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 475  
 TGTAGGGGCACGTCGCCCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCCATTCCACTCCACTCAG  
 \* - 476  
 GTTCTTCAGGGCCAGAGCCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTTTCAGGTGG  
 GCTGCTCACACCGTCCTTCAGAGGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGA  
 AGCTCATGTGGGCCCCCTGAGGCTCATGCCTGGGAAGTGTTGTGGTGGGGGCTCCCAGGAG  
 GACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCC

Фиг. 3

Кассета для экспрессии MUC1 из плазмиды JNW358. Белковая последовательность показана в однобуквенном формате. Сайт для NheI подчеркнут дважды. Сайт для XhoI подчеркнут пунктиром. Сайты для XbaI выделены курсивом. Старт- и стоп-кодоны выделены жирным шрифтом. Последовательность VNTR-повторов подчеркнута и сайт для FseI обозначен жирным подчеркиванием. Последовательность FL-MUC1 идентична нижеприведенной последовательности за исключением подчеркнутой VNTR-последовательности, которая в JNW358 повторяется приблизительно 32 раза.

CTAGCGCCACCATGCTCTAGAACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC

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

TCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAA

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

AGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGA

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

GATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGG

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

GACAGGATGTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTACAGCTGCCACCTGGG

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

GACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAG

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

CCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG

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

CCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAG

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

CCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAG

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

TCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA

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

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC

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

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA

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

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC

S T H H S T V P P L T S S N H S T S F Q - 257  
 AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA  
 L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 277  
 ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG  
 S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 297  
 AATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA  
 M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 317  
 GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCGAGAAGGTACCATCAATGTCC  
 P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 337  
 ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA  
 D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 357  
 CGATCTCAGACGTGAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTG  
 I S D V S V S D V P F F F S A Q S G A G - 377  
 GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA  
 V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 397  
 TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG  
 V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 417  
 ACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCC  
 I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 437  
 ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG  
 G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 457  
 GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT  
 N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 477  
 TGTCTAGATAGCTCGAG  
 S R \* - 480

Фиг. 4

Последовательность 7×VNTR-MUC1 из плазмиды JNW319. Сайты для BamHI подчеркнуты дважды. Белковая последовательность показана в однобуквенном формате. Старт- и стоп- кодоны показаны жирным шрифтом. Последовательность VNTR-повторов подчеркнута и сайт для FseI обозначен жирным подчеркиванием. Природные аминокислотные полиморфизмы в VNTR-последовательности обозначены звездочкой.

```

GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTCCCCA
CCCATTTTACCACCACCATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC
      M T P G T Q S P F F L L L L L - 15

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

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

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

GACAGGATGTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTGAGCTGCCACCTGGG
  Q D V T L A P A T E P A S G S A A T W G - 95

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

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

CCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAG
  H G V T S A P D T R P A P G S T A P P A - 155

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

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

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

CCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCGCCCGCAG
  H G V T S A P D T R P A P G S T A P A* A - 235

CCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCAAG
  H G V T S A P D T R P A P G S T A P Q* A - 255

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

```



CCCATGGTGTACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCCGCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAG  
 H G V T S A P D N R P A L G S T A P P V - 295

TCCACAATGTACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA  
 H N V T S A S G S A S G S A S T L V H N - 315

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC  
 G T S A R A T T T P A S K S T P F S I P - 335

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA  
 S H H S D T P T T L A S H S T K T D A S - 355

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC  
 S T H H S T V P P L T S S N H S T S P Q - 375

AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGTCTTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA  
 L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 395

ATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG  
 S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 415

AAATGTTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA  
 M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 435

GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC  
 P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 455

ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA  
 D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 475

CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTG  
 I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 495

GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA  
 V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 515

TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTGTCAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG  
 V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 535

ACATCTTTCCAGCCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCC  
 I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 555

ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG  
 G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 575

GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT  
 N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 595

TGTAGGGGCACGTCGCCCCGTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCCATTCCACTCCACTCAG  
 \* - 596

GTTCTTCAGGGCCAGAGCCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTTTCAGGTGG  
 GCTGCTCACACCGTCTTTCAGAGGGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGGA  
 AGCTCATGTGGGCCCCCTGAGGCTCATGCCTGGGAAGTGTGTGGTGGGGGCTCCCAGGAG  
 GACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCC

## Фиг. 5

Последовательность 2×VNTR-MUC1 из плазмиды JNW321. Сайты для BamHI подчеркнуты дважды. Белковая последовательность показана в однобуквенном формате. Старт- и стоп- кодоны показаны жирным шрифтом. Последовательность повторов VNTR подчеркнута и сайт для FseI обозначен жирным подчеркиванием.

GGATCCGCTCCACCTCTCAAGCAGCCAGCGCCTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTCCCCA  
CCCATTTACACCACCACCATGACACCGGGCAGCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCC  
 M T P G T Q S P F F L L L L L - 15

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

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

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

GACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTCAAGCTGCCACCTGGG  
 Q D V T L A P A T E P A S G S A A T W G - 95

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

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

CCCACGGTGTCACTCTGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCAAG  
 H G V T S A P D T R P A P G S T A P Q A - 155

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

CCCATGGTGTCACTCTGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCCCCCTCCAG  
 H G V T S A P D N R P A L G S T A P P V - 195

TCCACAATGTCACTCTGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACA  
 H N V T S A S G S A S G S A S T L V H N - 215

ACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTC  
 G T S A R A T T T P A S K S T P F S I P - 235

CCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCA  
 S H H S D T P T T L A S H S T K T D A S - 255

GTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCC  
 S T H H S T V P P L T S S N H S T S P Q - 275

AGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTTA  
 L S T G V S F F F L S F H I S N L Q F N - 295

ATTCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTG  
 S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D I S E - 315  
 AAATGTTTTGCAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCA  
 M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I K F R - 335  
 GGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCC  
 P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H - 355  
 ACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGA  
 D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T - 375  
 CGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCAGTCTGGGGCTG  
 I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G - 395  
 GGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCA  
 V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I - 415  
 TTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCTGAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGG  
 V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D - 435  
 ACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCC  
 I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H - 455  
 ATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAG  
 G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G - 475  
 GTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACT  
 N G G S S L S Y T N P A V A A T S A N L - 495  
 TGTAGGGGCACGTCGCCCCGCTGAGCTGAGTGGCCAGCCAGTGCCATTCCACTCCACTCAG  
 \* - 496  
 GTTCTTCAGGGCCAGAGCCCCCTGCACCCTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTTCAGGTGG  
 GCTGCTCACACCGTCCTTCAGAGGCCCCACCAATTTCTCGGACACTTCTCAGTGTGTGGA  
 AGCTCATGTGGGCCCCCTGAGGCTCATGCCTGGGAAGTGTTGTGGTGGGGGCTCCCAGGAG  
 GACTGGCCCAGAGAGCCCTGAGATAGCGGGGATCC

Фиг. 6

Кассета для экспрессии 7×VNTR-MUC1 из плазмиды JNW656. Сайт для NheI подчеркнут дважды. Сайт для XhoI подчеркнут пунктиром. Сайты для XbaI выделены курсивом. Белковая последовательность показана в однобуквенном формате. Старт- и стоп-кодоны показаны жирным шрифтом. Последовательность повторов 7×VNTR подчеркнута и сайт для FseI обозначен жирным подчеркиванием. Встречающиеся в природе аминокислотные полиморфизмы в VNTR-последовательности обозначены звездочкой. Оптимизированная Kozak-последовательность обозначена решетчатыми символами.

```

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

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

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

GCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACC
A V S M T S S V L S S H S P G S G S S T - 74

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

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

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

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 154

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 174

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

CCCCCAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 214

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

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

CCCCAAGCCCACGGTGTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGGCTCCACCGCC
P Q* A H G V T S A P D T R P A P G S T A - 274

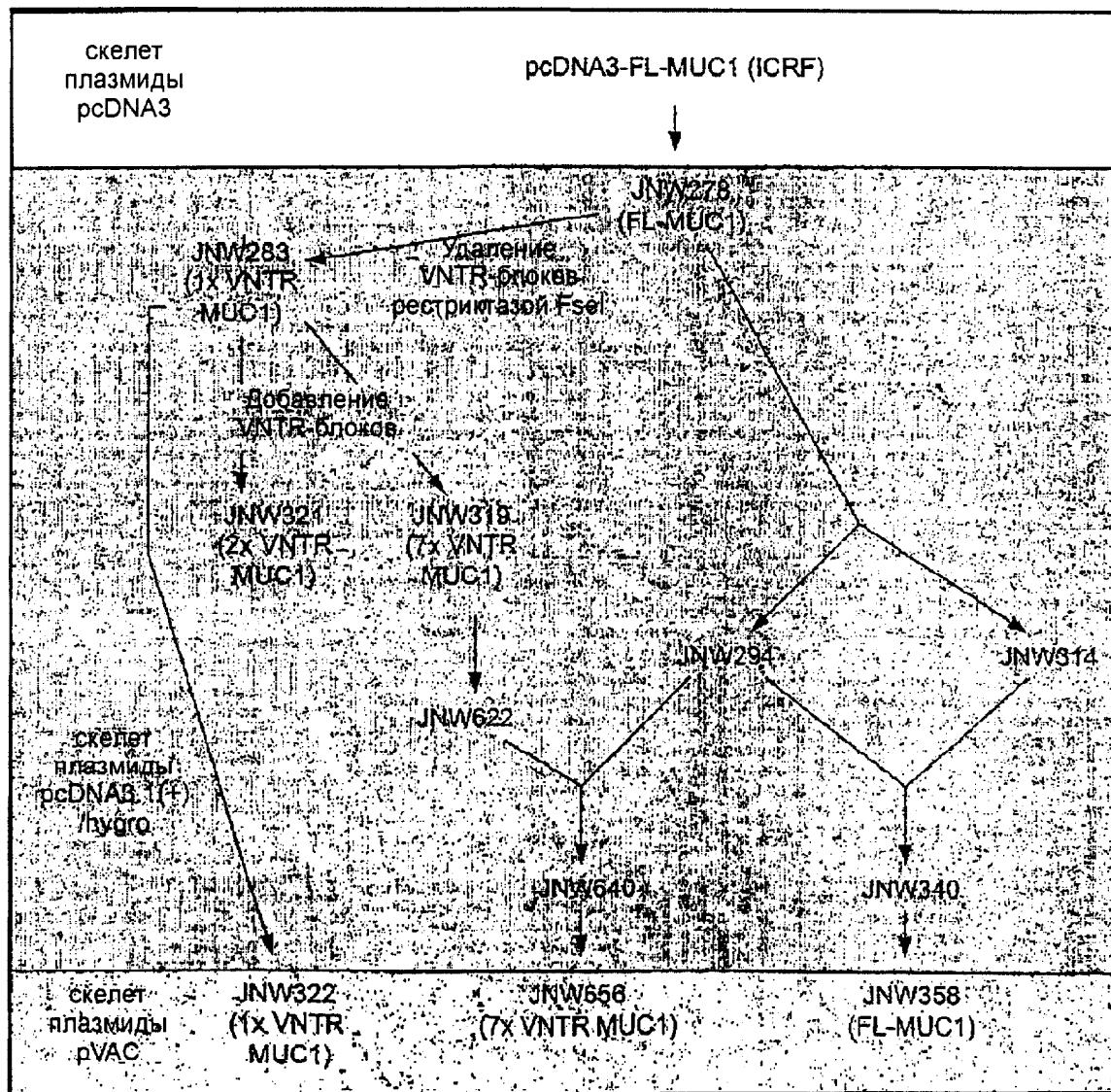
CCCCCAGCCCATGGTGTCACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGGCTCCACCGCC
P P A H G V T S A P D N R P A L G S T A - 294

```

CCTCCAGTCCACAATGTACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTG  
 P P V H N V T S A S G S A S G S A S T L - 314  
 GTGCACAACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCAACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTC  
 V H N G T S A R A T T T P A S K S T P F - 334  
 TCAATTCCCAGCCACCCTCTGATACTCCTACCACCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACT  
 S I P S H H S D T P T T L A S H S T K T - 354  
 GATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACT  
 D A S S T H H S T V P P L T S S N H S T - 374  
 TCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTC  
 S P Q L S T G V S F F F L S F H I S N L - 394  
 CAGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGAC  
 Q F N S S L E D P S T D Y Y Q E L Q R D - 414  
 ATTTCTGAAATGTTTTTGAGATTTATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATT  
 I S E M F L Q I Y K Q G G F L G L S N I - 434  
 AAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCGAGAAGGTACCATC  
 K F R P G S V V V Q L T L A F R E G T I - 454  
 AATGTCCACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAACGGAAGCAGCCTCTCGATAT  
 N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y - 474  
 AACCTGACGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCCAGTCT  
 N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S - 494  
 GGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCG  
 G A G V P G W G I A L L V L V C V L V A - 514  
 CTGGCCATTGTCTATCTCATTGCCTTGCGTGTCTGTCTAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGG  
 L A I V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G - 534  
 CAGCTGGACATCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTAC  
 Q L D I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y - 554  
 CACACCCATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAGAAGGTT  
 H T H G R Y V P P S S T D R S P Y E K V - 574  
 TCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCT  
 S A G N G G S S L S Y T N P A V A A T S - 594  
 GCCAACTTGTCAGATAGCTCGAG - 600  
 A N L S R \*

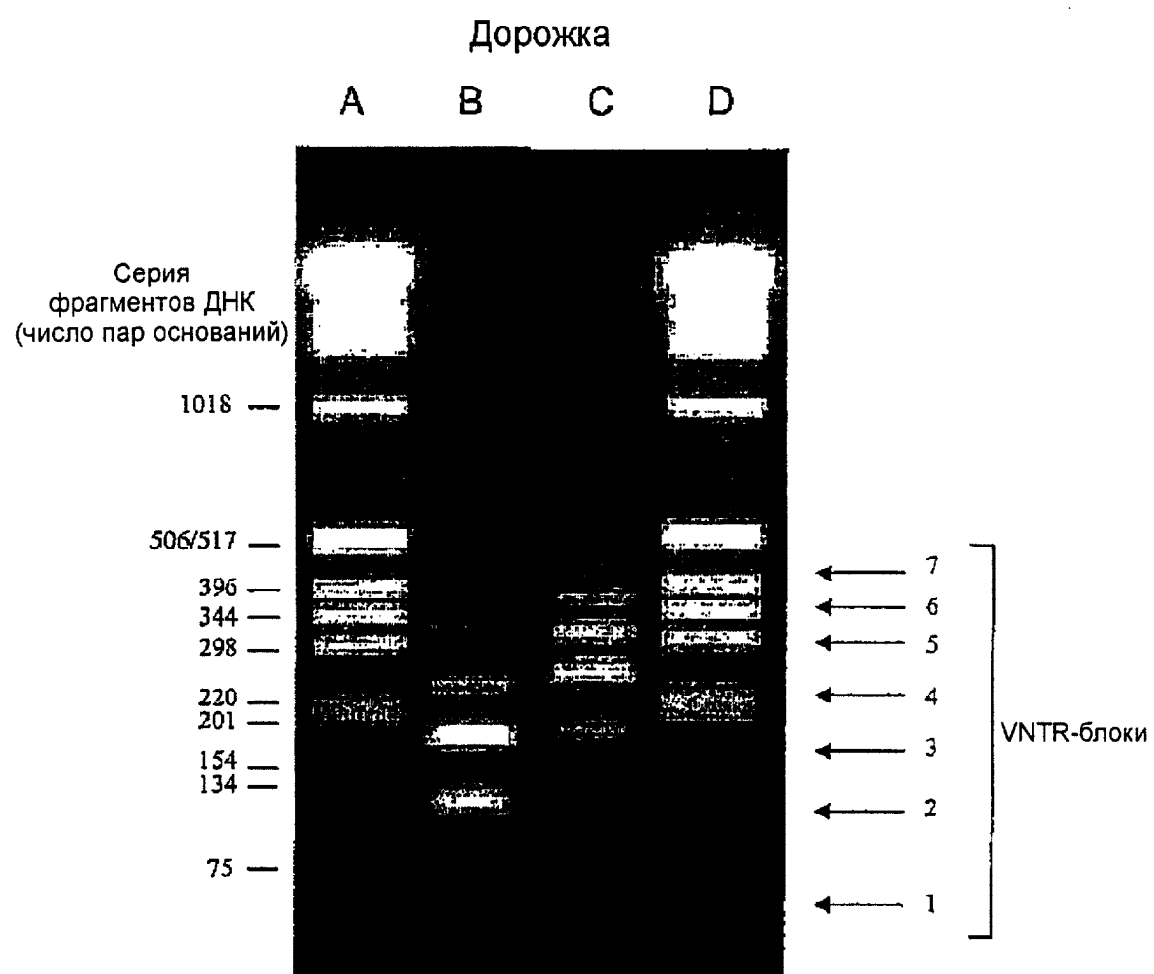
Фиг. 7

Схема взаимоотношений между разными плазмидными конструктами. Белая панель показывает плазмиды со скелетом pcDNA3. Светло-серая панель показывает плазмиды со скелетом pVAC, и темно-серая панель показывает плазмиды со скелетом pcDNA3.1(+)/hygro.



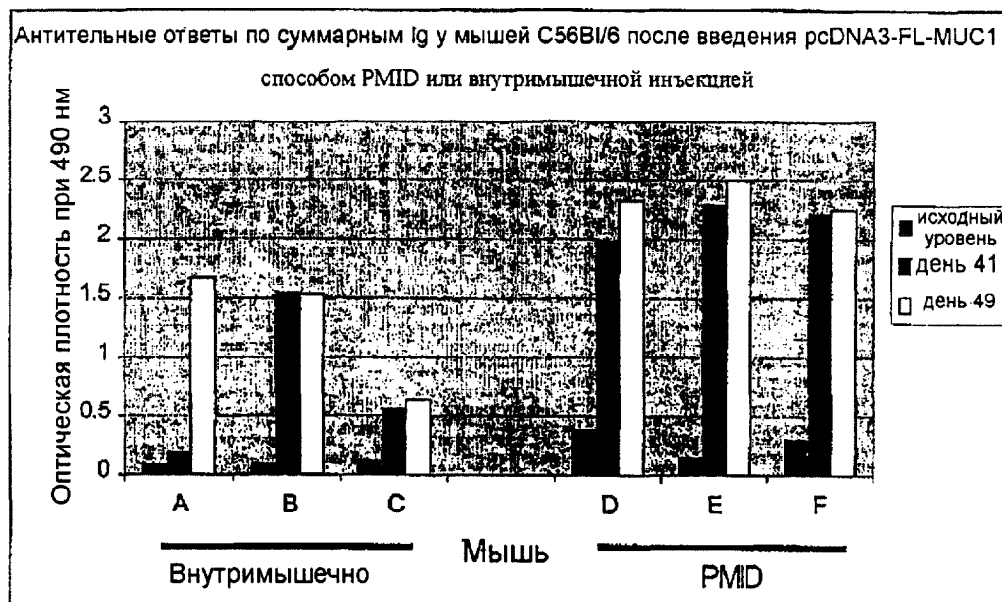
Фиг. 8

Очистка блоков VNTR



Фиг. 9

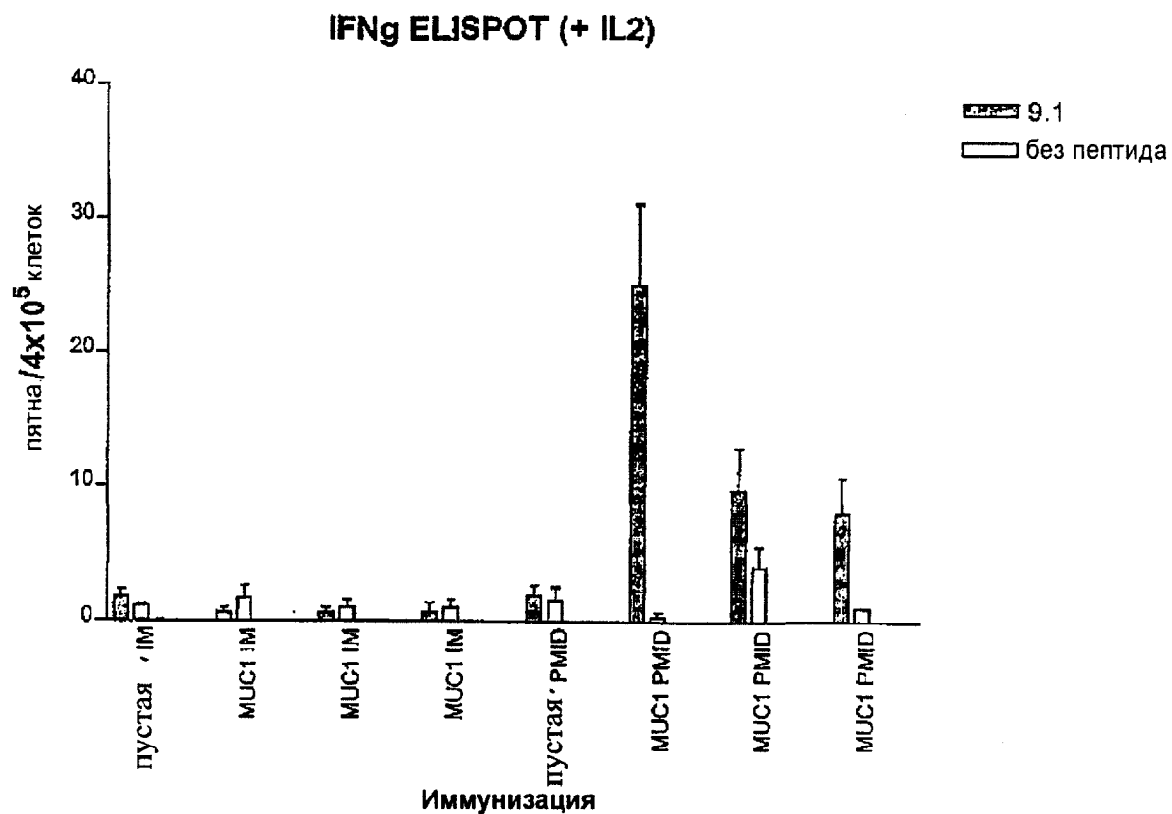
Антительные ответы по суммарным Ig у мышей C56Bl/6 после введения pcDNA3-FL-MUC1 способом PMID (мыши D-F) или внутримышечной инъекцией (мыши A-C)





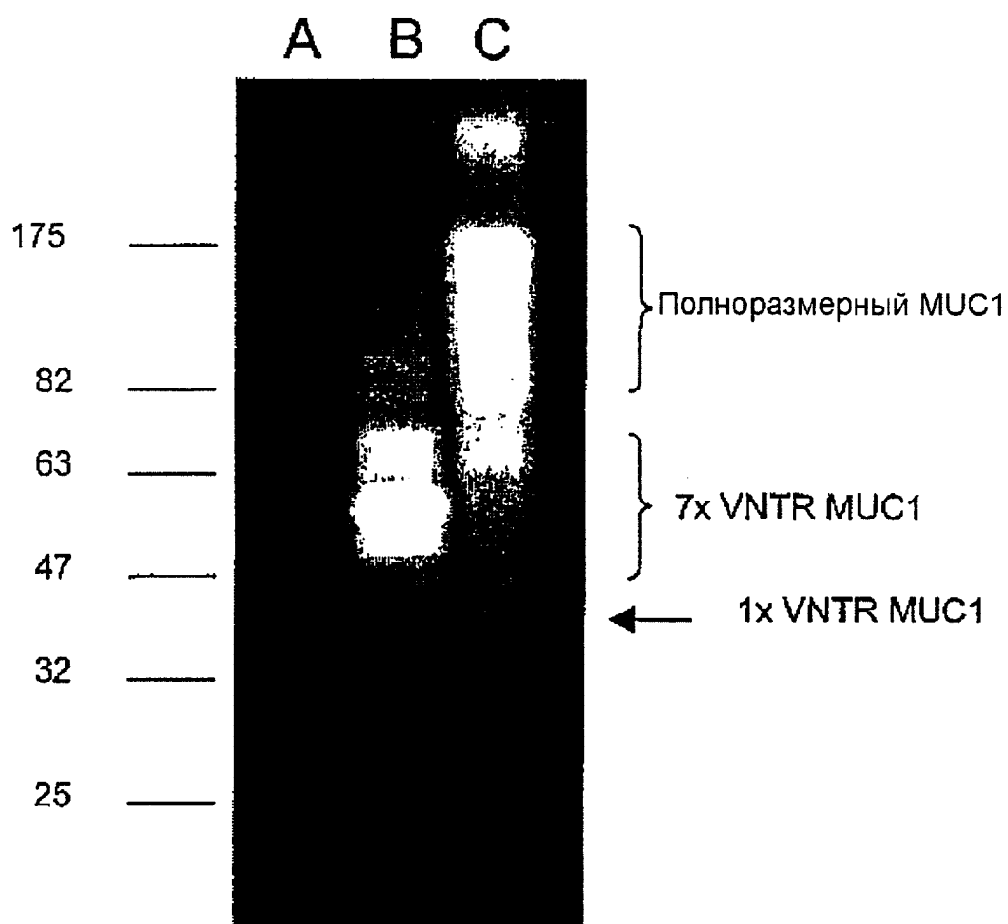
**Фиг. 10**

Сравнение клеточных ответов против MUC1 после PMID-иммунизации и внутримышечной (IM) иммунизации плазмидами pcDNA3-FL-MUC1 (MUC1) или pcDNA3 (пустая). Мышей C57BL/6 иммунизировали в день 0, 21 и 42 и анализ проводили в день 55. График показывает ответы по IFN $\gamma$  на пептид SAPDTRPAP (9.1) в присутствии IL-2.



**Фиг. 11**

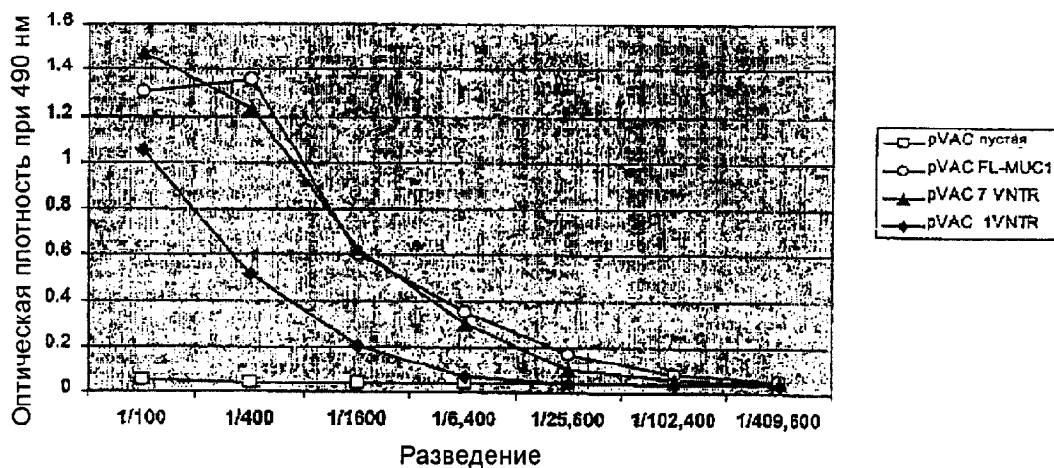
Анализ клеток CHO вестерн-блоттингом после кратковременной трансфекции конструктами MUC1. Клетки CHO трансфицированы плазмидами А) JNW332 (1×VNTR-MUC1), В) JNW656 (7×VNTR-MUC1) и С) JNW358 (FL-MUC1).



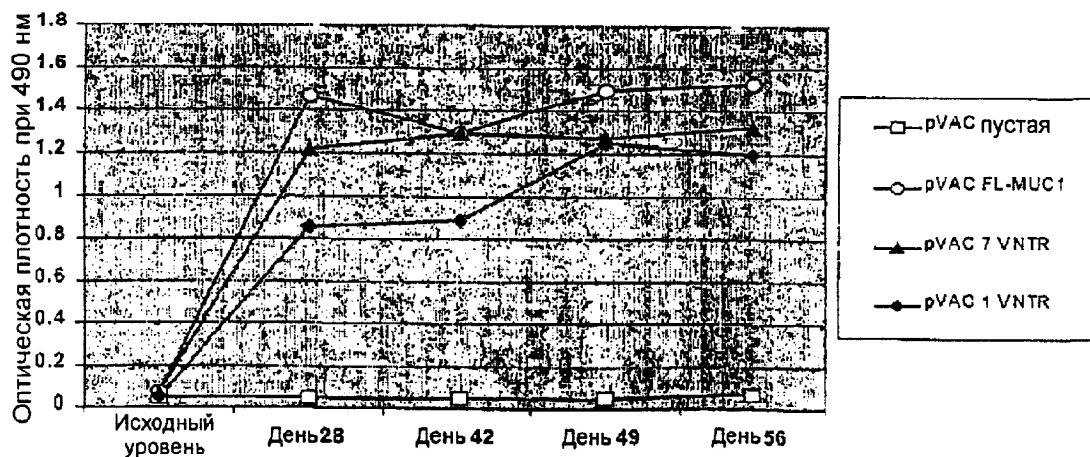
Фиг. 12

А) Титрование и В) Кинетика антительных ответов против MUC1 после PMID-иммунизации плазмидами pVAC (пустой вектор), JNW358 (FL-MUC1) и JNW656 (7×VNTR-MUC1) и JNW332 (1×VNTR-MUC1).

**А. Титрование антительных ответов по суммарным Ig после иммунизации разными конструктами MUC1 (сыворотки дня 56)**

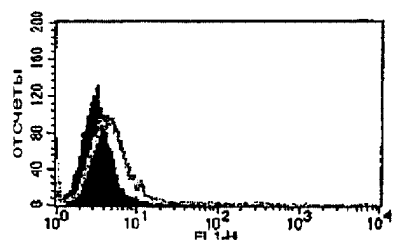


**В. Антительные ответы по суммарным Ig после иммунизации разными конструктами MUC1**

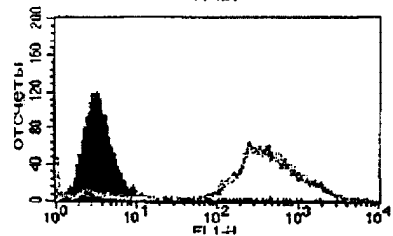


Фиг. 13

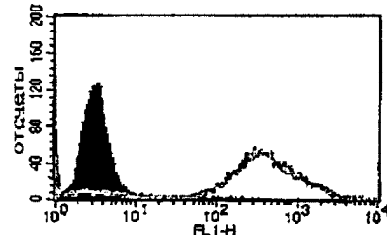
Профили FACS у исходных опухолевых клеток B16 и у опухолевых клеток B16F0MUC1, окрашенных сыворотками из мышей, иммунизированных пустым вектором FL-MUC1 (JNW358), вектором 7×VNTR-MUC1 (JNW656) и вектором 1×VNTR-MUC1 (JNW332). Темный профиль представляет окрашивание сыворотками до кровопускания, в то время как светлый профиль показывает окрашивание с пробами взятых при кровопускании из сердца после трех иммунизаций.



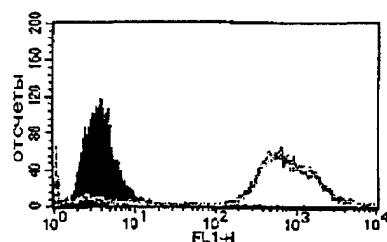
клетки B16F0MUC1  
пустой вектор



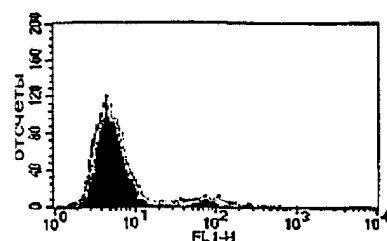
клетки B16F0MUC1  
FL-MUC1 (JNW358)



клетки B16F0MUC1  
7x VNTR MUC1 (JNW656)



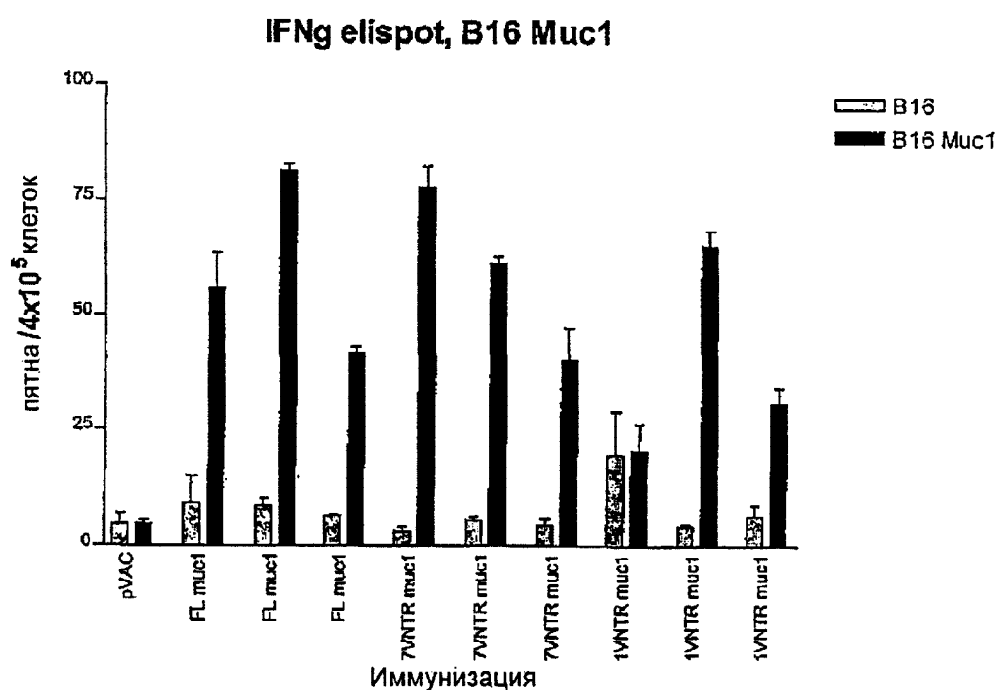
клетки B16F0MUC1  
1x VNTR MUC1 (JNW332)



исходные клетки B16  
7x VNTR MUC1 (JNW656)

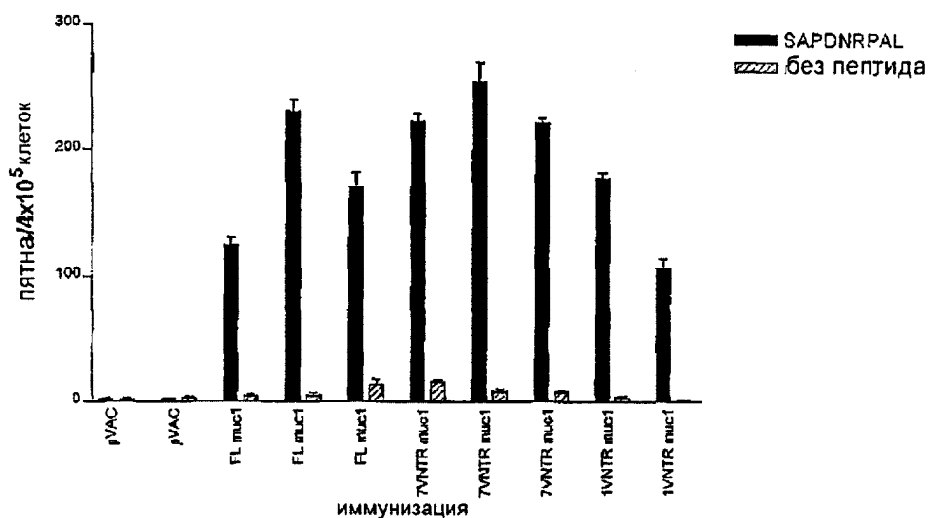
Фиг. 14

Клеточные ответы против MUC1 после PMID-иммунизации плазмидой pVAC (пустой вектор), JNW358 (FL-MUC1), JNW656 (7×VNTR-MUC1) и JNW332 (1×VNTR-MUC1). Мышей C57BL/6 иммунизировали в день 0, день 21 и день 42 и анализы проводили в день 49. График **a** показывает ответы по IFN $\gamma$  на опухолевые клетки B16-MUC1. График **b** показывает ответы по IFN $\gamma$  на пептид SAPDNRPAL. График **c** показывает ответы по IL-2 на 25-мерный пептид, представляющий TR-последовательность. Графики **d** и **e** показывают ответы по IFN $\gamma$  и IL-2 у объединенных в пул спленоцитов (3 мыши в группе) на серию пептидов MUC1

**a**

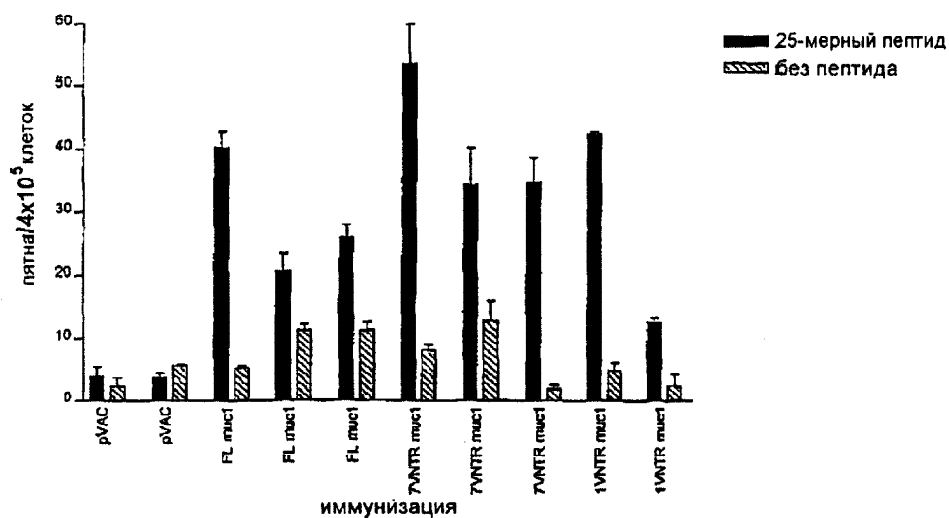
b

**ELISPOT на  $\text{IFN}\gamma$  при использовании иммунодоминантного CD8-пептида  
индивидуальные мыши**

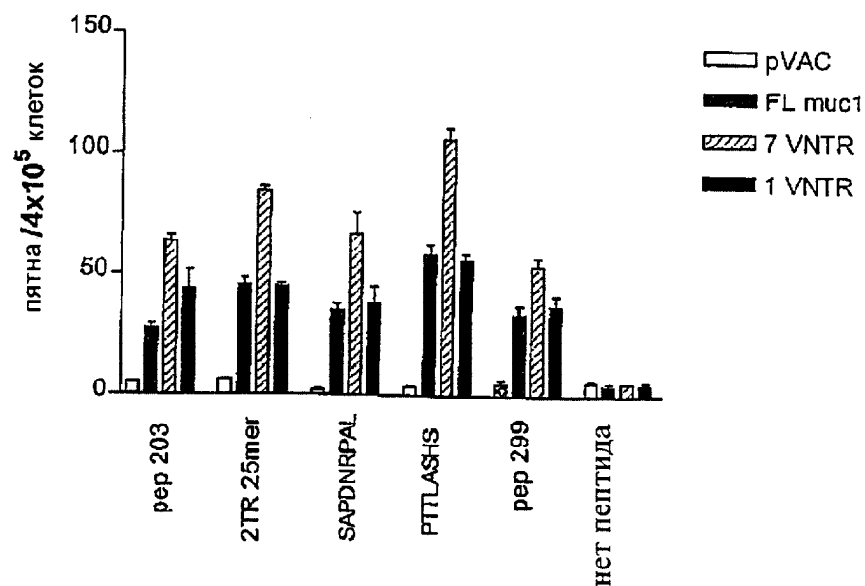


c

**ELISPOT на IL-2 при использовании 25-мерного пептида, содержащего TR-  
последовательность  
индивидуальные мыши**

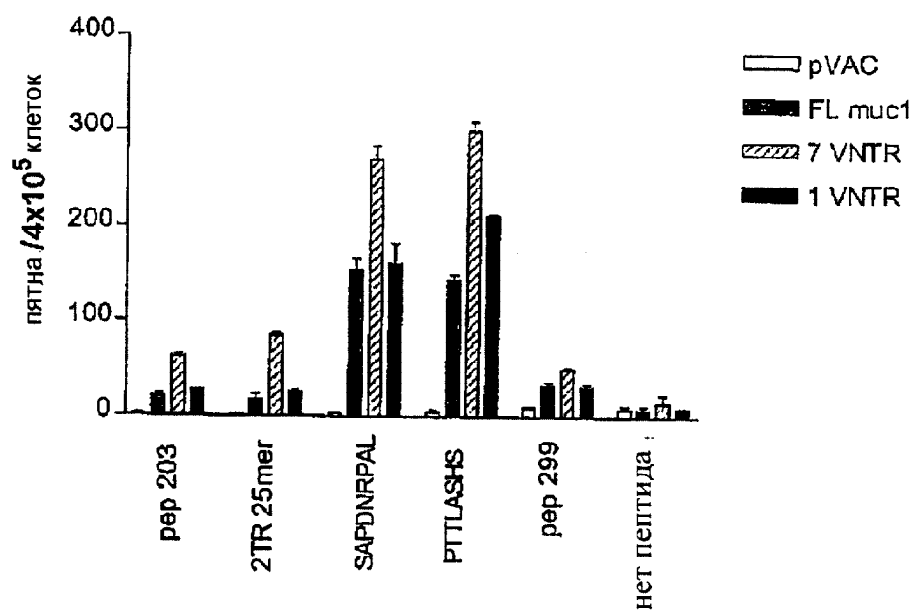


d

ELISPOT на  $\text{IFN}\gamma$ , объединенные в пул спленоциты C57

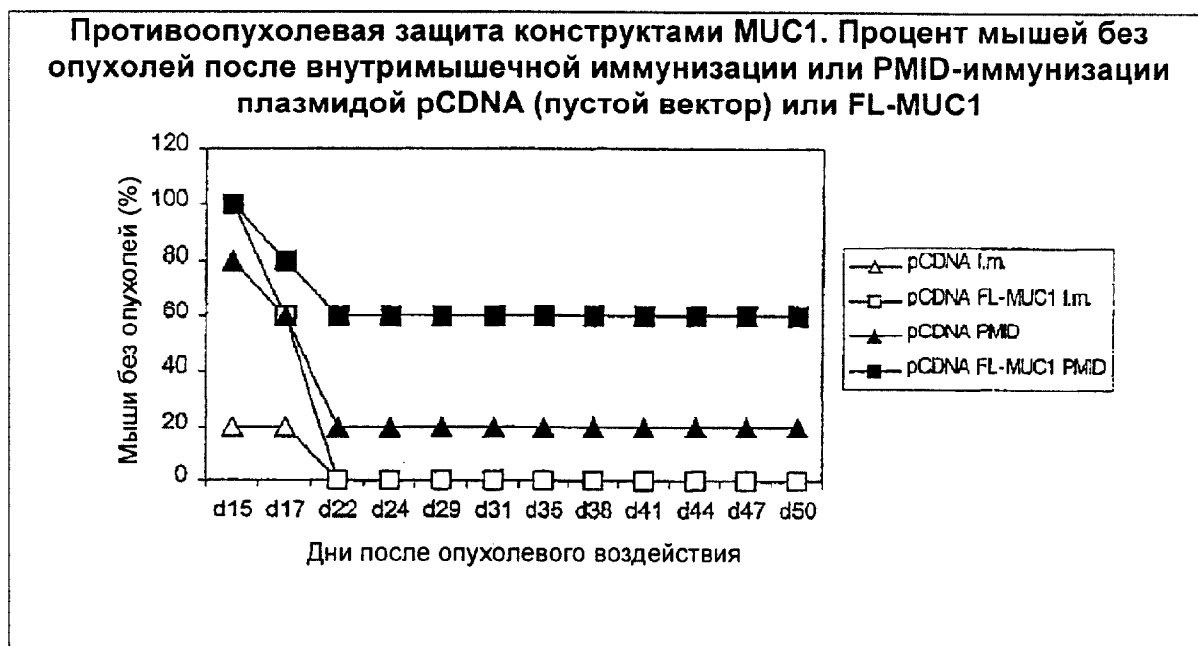
e

## ELISPOT на IL-2, объединенные в пул спленоциты C57



Фиг. 15

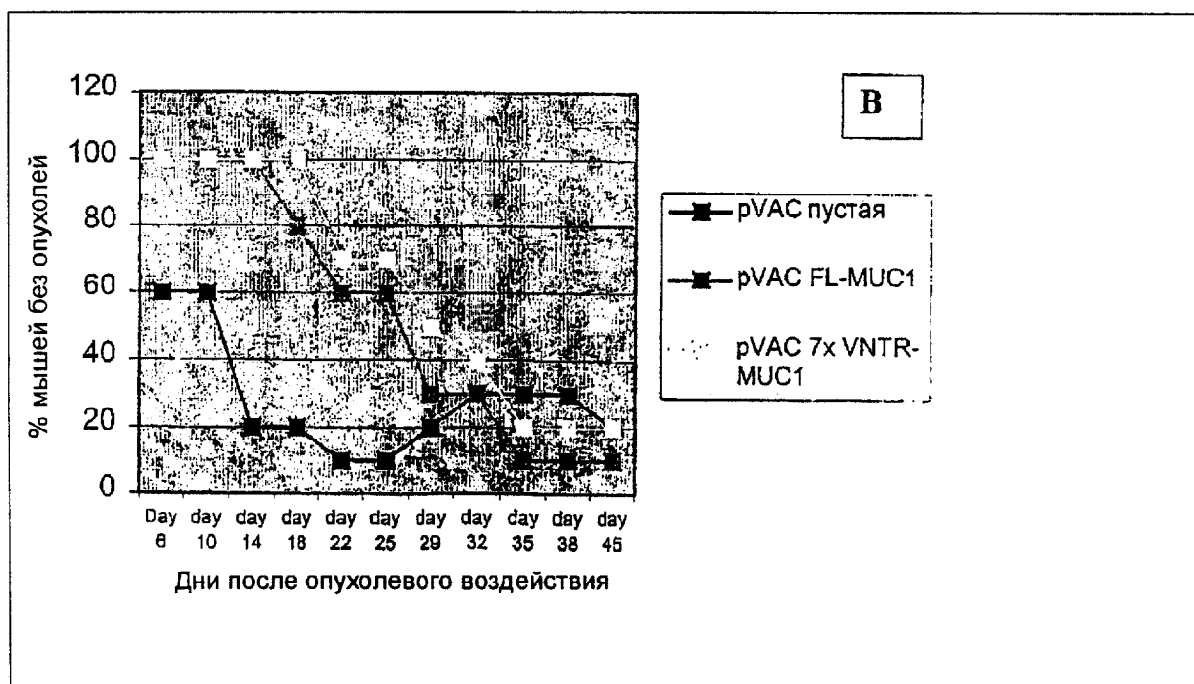
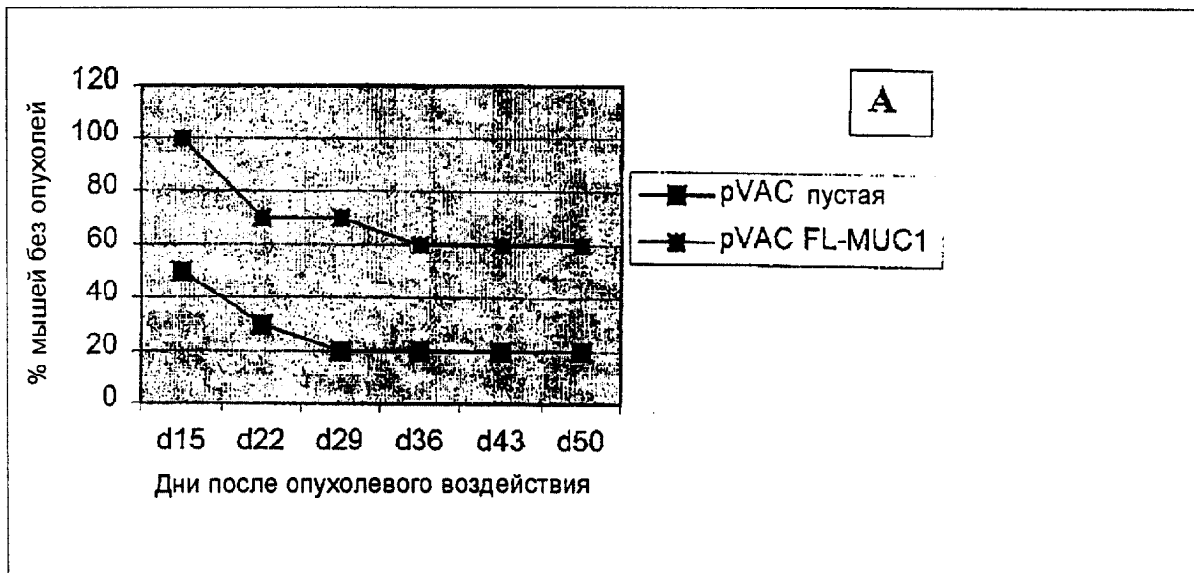
Процент мышей без опухолей после трех введений рсDNA3-FL-MUC1 или рсDNA3.1 (пустой вектор) и опухолевого воздействия клетками B16FOMUC1.





Фиг. 16

Противоопухолевая защита конструктами MUC1 при PMID. Процент мышей без опухолей после иммунизацией при использовании генного пистолета плазмидами pVAC (пустая), JNW 358 (FL-MUC1) или 7xVNTR-MUC1 (JNW656)



**Приложение А – Праймеры**

|          |                                               |
|----------|-----------------------------------------------|
| 2004MUC1 | ATGACACCGGGCACCCAGTC                          |
| 2005MUC1 | GACCAGCAGCGTACTCTC                            |
| 2006MUC1 | CCAGCCAGCAAGAGCACTCC                          |
| 2007MUC1 | CCTCTCTGGAAGATCCCAGC                          |
| 2008MUC1 | GGTTGCGCTGGCCATTGTC                           |
| 2009MUC1 | GCAGAAAGTGGCTGCCACTGC                         |
| 2010MUC1 | GCACTGACAGACAGCCAAGGC                         |
| 2011MUC1 | CCTTCTCGGAAGGCCAGAGTC                         |
| 2012MUC1 | GTACCGTGCTATGGTGAGTGC                         |
| 2013MUC1 | CACCAGAGTAGAAGCTGAGCC                         |
| 2014MUC1 | GGAGAGTACGCTGCTGGTC                           |
| 2060MUC1 | GCAGGCTAGCGCCACCATGTCTAGAACACCGGGCACCCAGTCTCC |
| 2061MUC1 | GACGCTCGAGAGCATTCTTCTCAGTAGAGC                |
| 2062MUC1 | GACGCTCGAGCTATCTAGACAAGTTGGCAGAAGTGGC         |
| 2063MUC1 | CGAGTACCCACCTACCACACCCATGGGC                  |