

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/705	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49045 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00440		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)		
(30) Prioritätsdaten: 199 06 615.9 17. Februar 1999 (17.02.99) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder: HANISCH, Franz-Georg [DE/DE]; Graf-Gessler-Strasse 6, D-50679 Köln (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Stefan [DE/DE]; Reuter Strasse 38, D-51465 Bergisch-Gladbach (DE).		
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		

(54) Title: PEPTIDE VARIANTS OF THE TUMOUR MARKER MUC1 AND THE USE THEREOF**(54) Bezeichnung:** PEPTID-VARIANTEN DES TUMORMARKERS MUC1 UND IHRE VERWENDUNG**(57) Abstract**

The invention relates to peptide variants of the tumour marker MUC1 and the use thereof in antigenic and immunogenic means. The invention particularly relates to peptide variants of the MUC1 repetitive unit within the VNTR (variable number of tandem repeats) domain.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Peptid-Varianten des Tumormarkers MUC1 und ihre Verwendung in antigenen und immunogenen Mitteln. Sie betrifft konkret Peptid-Varianten der MUC1-Wiederholungseinheit innerhalb der VNTR (variable number of tandem repeats)-Domäne.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Peptid-Varianten des Tumormarkers MUC1 und ihre Verwendung**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft Peptid-Varianten des Tumormarkers MUC1 und ihre Verwendung in antigenen und immunogenen Mitteln. Sie betrifft konkret Peptide der MUC1-Wiederholungseinheit innerhalb der VNTR (variable number of tandem repeats)-Domäne.

Epitheliale Mucine sind Glykoproteine mit repetitiven Aminosäuresequenzen und einem hohen Kohlenhydratanteil, die teils membrangebunden sind, teils sezerniert werden und auf vielen Drüsenepithelien vorkommen. Das am besten bekannte epitheliale Mucin ist das membrangebundene MUC1, auch als PEM, PUM, EMA, MAM-6, PAS-O oder Episialin beschrieben (Finn, O., et al., Immunol.Reviews 145:61, 1995).

Das MUC1 ist an sich kein tumorspezifisches Molekül; seine Eignung als Tumorantigen beruht darauf, daß sein Kohlenhydratanteil bei Tumoren qualitativ und quantitativ verändert ist (Burchell,J., und Taylor-Papadimitriou,J., Epith.Cell Biol. 2:155, 1993). Dabei treten neue Epitope auf, die vom Immunsystem (humorale und zelluläre Abwehr) wahrgenommen werden.

Der extrazelluläre Teil von MUC1 besteht aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Einheiten aus 20 Aminosäuren, den sogenannten "Tandem-Repeats". Diese MUC1-Wiederholungseinheit der VNRT (variable number of tandem repeats)-Domäne wurde von Gendler, S. et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 15286-15293 auf der DNA-Basis als Icosapeptid mit der Sequenz PAPGSTAPPAHGVTSAAPDTR (PAP20) beschrieben und unter den AC-Nummern J03651, J05288 und J05581 bei der GenBank™/EMBL registriert (siehe auch die unter den Genbank-Eintragungen angegebenen Literaturstellen). Diese Sequenz wird beim Menschen als streng konserviert angesehen, da bisher keine Strukturvarianten gefunden wurden.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, Peptid-Varianten zu suchen, die zur Generierung spezifischer Immundiagnostika geeignet sind.

Überraschend ergaben sich neue Strukturerkenntnisse aus Sequenzierungsanalysen auf Protein- und DNA-Ebene, die für sezerniertes MUC1 normaler Brustdrüsenzellen (Milch) und verschiedener Karzinomzellen gewonnen wurden.

Die Erfindung beruht auf dem Befund, daß das aus Milch isolierte MUC1 keine Varianten der bekannten PAP20-Sequenz aufweist, während menschliche Karzinomzellen einen hohen Anteil alternativer Sequenzen der VNTR-Peptide zeigen.

Erfindungsgemäß wurden in den Sequenzen des PAP20-Peptids 3 Aminosäureaustausche festgestellt:

Pro9 → Ala, Asp18 → Glu, Thr19 → Ser,
die durch Massenspektrometrie und quantitativen Edman-Abbau identifiziert wurden (siehe Ausführungsbeispiel).

Gegenstand der Erfindung sind somit Peptid-Varianten des MUC1 innerhalb der VNTR (variable number of tandem repeats)-Domäne umfassend 20 Aminosäuren, die an der Position 9 und/oder 18 und/oder 19 von der bekannten VNTR-Peptidsequenz abweichen.

Bevorzugt sind es die Peptide mit der SEQ ID No. 1:

PAPGSTAPAAHGVTSAAPDTR (PAP20-A),

mit der SEQ ID No. 2:

PAPGSTAPPAHGVTSAPESR (PAP20-ES),

und mit der SEQ ID No. 3:

PAPGSTAPAAHGVTSAPESR (PAP20-AES)

Die Pro → Ala Substitution hat starken Einfluß auf die Sekundärstruktur des Peptids, da Prolinreste wesentlich an der Ausbildung einer linksgewundenen Poly-L-Prolin II-Helix beteiligt sind. Durch die mit Pro → Ala Substitution in

Position 9 gegebenen strukturellen Änderungen ergeben sich Einflüsse auf die Antigenität des VNTR-Peptids. Dies gilt in verstärktem Maße für das PDTR-Motiv innerhalb der Wiederholungseinheit, das als intern stabilisiertes Strukturelement mit den Charakteristika einer 'Ausstülpung' den immundominanten Target des VNTR-Peptids darstellt. Der (konservative) Austausch zweier Aminosäuren des Motivs (Asp18-Thr19 gegen Glu18-Ser19) beeinflußt aufgrund der veränderten Kettenlängen der Aminosäurereste sowohl die Antigenität als auch die Immunogenetät des Peptids. Da die spezifischen Aminosäureaustausche innerhalb der VNTR-Domäne bislang nur auf Tumor-MUC1 gefunden wurden, besitzen die veränderten Peptidepitope ein hohes immundiagnostisches und tumortherapeutisches Potential.

Die Peptide können nach bekannten Verfahren durch Festphasensynthese oder gentechnisch hergestellt werden.

Eine Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide besteht in immunogenen Mitteln, im Sinne von spezifischen Immundiagnostika oder in entsprechenden Tumorvakzinen. Diese enthalten mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide.

Die effektivste adjuvante Immuntherapie ist die Vakzinierung. Zwei Voraussetzungen sind hierfür erforderlich: erstens, daß ein geeignetes Zielantigen (Epitop) auf den Tumorzellen vorhanden ist, und zweitens, daß es gelingt, eine möglichst stark immunogene, vorzugsweise synthetische Form einer Vakzine herzustellen.

Es werden erfindungsgemäß Tumorvakzine auf der Grundlage der Molekülstruktur des menschlichen epithelialen Mucins MUC1 bereitgestellt, die vorzugsweise zur Bekämpfung der nach chirurgischer Behandlung oder nach einer anderen primären Therapie noch im Körper verbliebenen Tumorzellen ('minimal residual disease') dienen und die vom MUC1 abgeleiteten Peptid-Varianten der MUC1-VNTR-Domäne, vorzugsweise Peptid SEQ ID No. 1, 2 und/oder 3 enthalten.

Eine solche Tumorvakzine kann zur Bekämpfung von Tumorzellen vorzugsweise aus Mamma-, colorectalen oder Pankreaskarzinomen im Sinne einer aktiven spezifischen Immunisierung eingesetzt werden.

Weiterhin betrifft die Erfindung analytische Verfahren zur Bestimmung der Identität und Inzidenz von DNA-Mutationen, die den oben spezifizierten Peptidvarianten zugrundeliegen.

Durch Entwicklung eines Testkits auf der Basis dieser DNA-Mutationen lassen sich prognostische Parameter für die Tumordiagnostik erstellen. Das Testprinzip stellt ein PCR-ELISA (= polymerase chain reaction - enzyme immunoassay) auf der Grundlage amplifizierter VNTR-Domänen aus genomischer DNA dar.

Dieser Nachweis dient erfindungsgemäß als Grundlage für Therapieverfahren.

Ausführungsbeispiel

Am Beispiel der menschlichen Brustkarzinomzelllinie T47D soll erläutert werden, welche Evidenz für das Vorliegen alternativer Sequenzen des VNTR-Peptids erbracht werden konnte.

Die sezernierte Glykoform des MUC1 wurde aus Kulturüberständen der Zelllinie durch Affinitäts-Chromatographie auf immobilisiertem Anti-MUC1-Antikörper (BC-3) gereinigt. Nach partieller enzymatischer Deglykosylierung (α -Sialidase, β -Galactosidase) wurde die VNTR-Domäne des Mucins durch die Arg-C spezifische Endoproteinase Clostripain in Icosapeptide (PAP20) fragmentiert. Die durch rpHPLC gereinigten Glykopeptide wurden massenspektrometrisch (QTOF-ESI-Massenspektrometrie) und durch quantitativen Edman-Abbau sequenziert. Die kombinierten Meßdaten lassen sich

zweifelsfrei in der Weise interpretieren, daß

(1) alle fünf Positionen des VNTR-Peptids glykolyisiert vorliegen, und

(2) neben der bekannten PAP20-Sequenz drei alternative Icosapeptide mit einer Gesamtinzidenz von >50% existieren.

Während der nicht-konservative Pro9 → Ala Austausch auch unabhängig auftritt und insgesamt in etwa 30% der VNTR-Peptide vorliegt, erfolgen der Asp18 → Glu und der Thr19 → Ser Austausch konzertiert in etwa 50% der VNTR-Peptide. Eine vergleichbar hohe Inzidenz dieser Aminosäure-Austausche wurde auf DNA-Ebene für eine Reihe anderer menschlicher Karzinomzellen gefunden. Neben dem bekannten Polymorphismus des MUC1 hinsichtlich der Zahl der Wiederholungseinheiten deutet sich damit ein weiterer genetischer Polymorphismus auf der Ebene der Peptidsequenzen an.

Patentansprüche

1. Peptid-Varianten des MUC1 innerhalb der VNTR (variable number of tandem repeats)-Domäne umfassend 20 Aminosäuren, die an der Position 9 und/oder 18 und/oder 19 der PAP20-Sequenz von der bekannten VNTR (variable number of tandem repeats)-Domäne abweichen.
2. Peptid-Varianten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die SEQ ID Nr. 1 PAPGSTAPAAHGVTSAPDTR (PAP20-A) aufweist.
3. Peptid-Varianten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die SEQ ID Nr. 2 PAPGSTAPPAHGVTSAPESR (PAP20-ES) aufweist.
4. Peptid-Varianten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die SEQ ID Nr. 3 PAPGSTAPAAHGVTSAPESR (PAP20-AES) aufweist.
5. Immunogenes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
6. Antigenes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
7. Testkit zum Nachweis der Identität und Inzidenz von DNA-Mutationen innerhalb der VNTR-Domäne des MUC1 enthaltend mindestens einen DNA-Primer, dessen Sequenz einem der Peptide gemäß Anspruch 1 bis 4 entspricht.
8. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 bis 4 zur Herstellung cancerostatischer Mittel, insbesondere zur Generierung einer effektiven Vakzine im tumortherapeutischen Kontext.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

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

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

PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 05, 30 June 1995 (1995-06-30) & JP 07 051065 A (NIPPON KOUTAI KENKYUSHO:KK; OTHERS: 01), 28 February 1995 (1995-02-28) abstract page 8, line 4 - line 7 — WO 98 37095 A (DANA FARBER CANCER INST INC ; THERION BIOLOG CORP (US); GRITZ LINDA) 27 August 1998 (1998-08-27) page 20; table C page 20; table C — WO 94 22464 A (GEN HOSPITAL CORP ; SHISEIDO CO LTD (JP)) 13 October 1994 (1994-10-13) page 22 —	1,2
X		1
Y		1-8
Y		1-8

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2000

Date of mailing of the international search report

21/07/2000

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Deffner, C-A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00440

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
JP 07051065	A	28-02-1995	JP	3023469 B		21-03-2000
WO 9837095	A	27-08-1998	AU	6186098 A		09-09-1998
			EP	1012276 A		28-06-2000
WO 9422464	A	13-10-1994	AU	6418794 A		24-10-1994
			CA	2159637 A		13-10-1994
			EP	0692968 A		24-01-1996
			EP	0857174 A		12-08-1998
			JP	8510207 T		29-10-1996
			WO	9712905 A		10-04-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00440

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/705

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassefikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 05, 30. Juni 1995 (1995-06-30) & JP 07 051065 A (NIPPON KOUTAI KENKYUSHO:KK; OTHERS: 01), 28. Februar 1995 (1995-02-28) Zusammenfassung Seite 8, Zeile 4 - Zeile 7 ---	1,2
X	WO 98 37095 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;THERION BIOLOG CORP (US); GRITZ LINDA) 27. August 1998 (1998-08-27) Seite 20; Tabelle C	1
Y	Seite 20; Tabelle C ---	1-8
Y	WO 94 22464 A (GEN HOSPITAL CORP ;SHISEIDO CO LTD (JP)) 13. Oktober 1994 (1994-10-13) Seite 22 -----	1-8

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

17. Juli 2000

21/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00440

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
JP 07051065 A	28-02-1995	JP	3023469 B	21-03-2000
WO 9837095 A	27-08-1998	AU EP	6186098 A 1012276 A	09-09-1998 28-06-2000
WO 9422464 A	13-10-1994	AU CA EP EP JP WO	6418794 A 2159637 A 0692968 A 0857174 A 8510207 T 9712905 A	24-10-1994 13-10-1994 24-01-1996 12-08-1998 29-10-1996 10-04-1997