

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-535723

(P2005-535723A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | | テーマコード (参考) |
|----------------------------|----------------|---|-----------------|
| A 6 1 K 39/395 | A 6 1 K 39/395 | E | 4 B 0 1 8 |
| A 2 3 L 1/305 | A 6 1 K 39/395 | C | 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 K 38/36 | A 6 1 K 39/395 | L | 4 B 0 6 4 |
| A 6 1 K 38/45 | A 6 1 K 39/395 | T | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 39/385 | A 2 3 L 1/305 | | 4 C 0 8 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | | | (全 88 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-530289 (P2004-530289) | (71) 出願人 | 502107469 バイオティ セラピューズ コーポ フィンランド国、エフアイエヌー2052 0 トゥルク、テキストカトゥ 6 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年8月20日 (2003. 8. 20) | (74) 代理人 | 100116838 弁理士 渡邊 潤三 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年4月7日 (2005. 4. 7) | (72) 発明者 | ナトゥネン, ヤリ フィンランド国、エフアイエヌー0152 0 ヴァンター、オーランニンティエ 1 0 エー 18 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/FI2003/000615 | (72) 発明者 | テネベリ, スサン スウェーデン国、エスー43063 ヒン ドス、ポストボックス 1639 |
| (87) 国際公開番号 | W02004/017810 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成16年3月4日 (2004. 3. 4) | | |
| (31) 優先権主張番号 | PCT/FI02/00681 | | |
| (32) 優先日 | 平成14年8月20日 (2002. 8. 20) | | |
| (33) 優先権主張国 | フィンランド (FI) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍特異的オリゴ糖エピトープおよびその用途

(57) 【要約】

本発明は、ヒト腫瘍によって特異的に発現されるオリゴ糖配列を開示する。本発明は、腫瘍特異的末端N - アセチルグルコサミン残基を有するオリゴ糖配列の存在を生物学的試料中に検出し、該配列の存在を指標として癌の検出を行う方法に関する。本発明は、多価の型で該オリゴ糖配列を含む抗原性物質を提供し、さらに該オリゴ糖配列または該オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含する診断剤、医薬組成物および癌ワクチンを提供する。また、本発明は癌の治療方法にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含するヒト癌治療用の医薬組成物であって、該オリゴ糖配列は、固有のタンパク質に結合した末端GlcNAc構造を含む配列であることを特徴とする医薬組成物。

【請求項 2】

該ヒト癌がヒト腫瘍であることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

該医薬組成物が、該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列を発現すると診断されたヒト腫瘍、または正常組織と比べて該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列を多量に発現しているヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

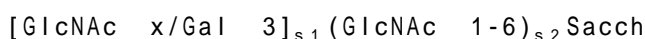
10

【請求項 4】

該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されたものであることを特徴とする、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が下記式で表されることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の医薬組成物。



(式中、

SacchがGal(NAc)である場合に x は 3 であり、SacchがManである場合に x は 2 であり；

20

s 1 と s 2 は各々独立に 0 または 1 であるが、少なくとも 1 つの末端GlcNAcが存在し；

s 1 と s 2 が共に 1 である場合には、オリゴ糖配列は分岐しており；

SacchがGalである場合には、該Galは他のGalNAcに 6 結合することはなく；

SacchがGlcNAc である場合には、s 1 および s 2 は共に 0 であり、該GlcNAc はタンパク質またはペプチドに結合しており；

[GlcNAc x/Gal 3]は、末端残基がGlcNAc xまたはGal 3であることを意味する。)

【請求項 6】

該結合性物質が、下記式 (I) で表される少なくとも 1 種の N - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

30



(式中、

r 1、r 2、r 3、r 4、r 5 および r 6 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、r 1 と r 2 の少なくとも一方は 1 であり、

GN はGlcNAcであるが、

但し、r 1 と r 2 が共に 1 である場合には、下記 (i) ~ (iv) からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の変更を式 (I) に加えることができる：

(i) 1 つのGN Manが、1 つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、

(ii) 1 つのGN 2ManがManに縮められている、

(iii) Man 6残基およびMan 3残基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種がGN 6またはGN 4で置換されている、

40

および (iv) Man 4がGN 4で置換されている。)

【請求項 7】

該結合性物質が、下記式 (II) で表される少なくとも 1 種の N - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の医薬組成物。



(式中、

r 1、r 2、r 5 および r 6 は各々独立に 0 または 1 の整数であるが、r 1 と r 2 の少なくとも一方は 1 であり、

GN はGlcNAcであるが、

50

但し、 r_1 と r_2 が共に1である場合には、下記(i)~(iv)からなる群より選ばれる少なくとも1種の変更を式(II)に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、(ii) 1つのGN 2ManがManに縮められている、(iii) Man 6残基およびMan 3残基からなる群より選ばれる少なくとも1種がGN 6またはGN 4で置換されている、および(iv) Man 4がGN 4で置換されている。)

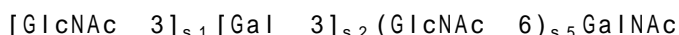
【請求項8】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項6に記載の医薬組成物。

GlcNAc 2Man、GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、10
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man、GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man、
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4GlcNAc、20
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man、
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4GlcNAc、そして
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc 。

【請求項9】

該結合性物質が、下記式で表される少なくとも1種のO-グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項1~5のいずれかに記載の医薬組成物。



(式中、 s_1 、 s_2 、 s_3 および s_5 は各々独立に0または1の整数であるが、上記式で表される末端オリゴ糖配列が少なくとも1種の非還元末端GlcNAc-残基を有するために、下記条件の少なくとも1種を満足する： s_1 は1である； s_5 および s_3 は共に1である；そして s_5 および s_3 は1である。)30

【請求項10】

該オリゴ糖配列が、タンパク質に結合したGlcNAcまたはその誘導体であることを特徴とする、請求項1~5のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項11】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項9に記載の医薬組成物。

GlcNAc 3Gal 3(Gal 4GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、
 GlcNAc 3Gal 3GalNAc、Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3(GlcNAc 6)GalNAc、
 GlcNAc 6GalNAc、そして GlcNAc 3GalNAc 。

【請求項12】

該結合性物質が、下記式からなる群より選ばれる少なくとも1種の末端オリゴ糖配列に特異的であり、該医薬組成物は、所望により、請求項6~11のいずれかで定義したオリゴ糖配列の少なくとも1種をさらに包含し、肺、咽頭、結腸、胃または卵巣の癌の治療用であることを特徴とする、請求項3に記載の医薬組成物。

GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、GlcNAc 6Gal 4GlcNAc、
 GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal、そして GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc 。

【請求項13】

該オリゴ糖配列が、天然グリコシド結合で他の単糖構造やオリゴ糖構造に結合していないことを特徴とする、請求項1~12のいずれかに記載の医薬組成物。50

【請求項 14】

該結合性物質が、アプタマー、ペプチドまたはタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 15】

該タンパク質が、抗体、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

該タンパク質が、末端 GlcNAc 構造を認識する酵素、好ましくはグリコシルトランスフェラーゼ酵素またはその異型であることを特徴とする、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

該抗体が、ヒト抗体または人体に適應させた抗体であることを特徴とする、請求項 15 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 18】

ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含する医薬組成物であって、該オリゴ糖配列はその末端に結合 N - アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) あるいはその類似体または誘導体を含むことを特徴とする、ヒトの肺、咽頭、結腸、胃または卵巣の癌の治療用の医薬組成物。

【請求項 19】

該ヒト癌がヒト腫瘍であることを特徴とする、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

該医薬組成物が、該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列を発現すると診断されたヒト腫瘍、または正常組織と比べて該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列を多量に発現しているヒト腫瘍の治療用であることを特徴とする、請求項 18 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 21】

該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されたものであることを特徴とする、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

抗原性を有することを特徴とする、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

該オリゴ糖配列が、請求項 1 および 5 ~ 12 のいずれかで定義されたオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 24】

下記式で表される、該オリゴ糖配列の多価結合体を包含することを特徴とする、請求項 23 に記載の医薬組成物。



(式中、

m は 1 を超える整数であり、

n は 0 または 1 であり、

OS はヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖であり、

L は酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、

40

X は単糖またはオリゴ糖残基、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、ポリ - N - アセチルラクトサミニル残基、あるいは O - グリカンまたは N - グリカンオリゴ糖配列の一部であり、

Y はスペーサー基または末端結合体、例えばセラミド脂質部または Z への結合部であり、

Z はオリゴ価または多価の担体であり、

オリゴ糖鎖 (OS) は、その還元末端の C 1 位からスペーサー基 (Y) を介して、所望により単糖またはオリゴ糖残基 (X) をさらに介して、オリゴ価または多価の担体 (Z) に原子 (L) によって結合している。)

【請求項 25】

50

医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドをさらに包含することを特徴とする、請求項 1 ~ 24 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 26】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法にして、固有のタンパク質に結合した末端結合 N - アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) を含むオリゴ糖配列の存在を該試料中に検出することを包含する診断方法。

【請求項 27】

以下の工程 (a) または工程 (b) を包含することを特徴とする、請求項 26 に記載の診断方法。

(a) 該生物学的試料を該オリゴ糖配列に結合する結合性物質と接触させ、そして該オリゴ糖配列を介した該結合性物質と該生物学的試料との結合を指標として、該生物学的試料中に存在する癌を検出する、または

(b) 酵素学的または化学的方法によって該生物学的試料中のオリゴ糖構造を遊離させて、該生物学的試料から遊離したオリゴ糖構造を含む画分を生成し、そして

該画分中の該オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中に存在する癌を検出する。

【請求項 28】

該オリゴ糖配列が、請求項 1 および 5 ~ 12 のいずれかで定義された末端オリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 26 または 27 に記載の診断方法。

【請求項 29】

該癌が腫瘍であることを特徴とする、請求項 26 ~ 28 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 30】

癌または腫瘍の型を決定することを特徴とする、請求項 26 ~ 28 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 31】

癌を含む組織の正常なグリコシル化を測定することを特徴とする、請求項 26 ~ 30 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 32】

グリコシル化を癌または正常組織の表面で測定することを特徴とする、請求項 26 ~ 31 のいずれかに記載の診断方法。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 17 のいずれかで定義されている結合性物質を包含する、ヒト癌または癌の型の決定に用いる診断剤。

【請求項 34】

請求項 1 および 5 ~ 12 のいずれかで定義されている末端オリゴ糖配列を、化学的または生化学的に合成した多価の型で含んでいることを特徴とする、抗原性物質。

【請求項 35】

請求項 34 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項 36】

請求項 34 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、血清、好ましくはヒトの血清から抗体を精製する方法。

【請求項 37】

請求項 34 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、抗体の検出および定量のいずれかまたは両方を行う方法。

【請求項 38】

請求項 1 および 5 ~ 12 のいずれかで定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌ワクチン。

【請求項 39】

医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドをさらに包含することを特徴と

10

20

30

40

50

する、請求項 38 に記載の癌ワクチン。

【請求項 40】

請求項 1 および 5 ~ 12 で定義されている末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖に結合する物質であって、アプタマー、ヒト天然抗体、人体に適応させた抗体またはペプチドであることを特徴とする、オリゴ糖鎖結合性物質。

【請求項 41】

請求項 1 および 5 ~ 12 のいずれかで定義されているオリゴ糖配列と化合物を接触させる工程、および

該化合物と該オリゴ糖配列との結合の有無を検出する工程

を包含する、癌または腫瘍に特異的な治療剤または診断剤を検出する方法。

10

【請求項 42】

以下の工程によって得られるヒト抗GlcNAc抗体。

固定した末端GlcNAc エピトープを含有するカラムに抗体を含有するヒト血清試料を流し、

上記カラムを洗浄し、

高濃度のGlcNAcを含有する緩衝液でカラムの溶出を行い、そして

溶出した抗体を回収する。

【請求項 43】

請求項 1 および 5 ~ 12 のいずれかで定義されている腫瘍特異的オリゴ糖配列を認識する抗体を含有する、ヒト癌または腫瘍を治療するための機能性食品または食品添加物。

20

【請求項 44】

該抗体が、乳または鶏卵の中で製造されたものであることを特徴とする、請求項 41 に記載の機能性食品。

【請求項 45】

該抗体が、以下のいずれかのオリゴ糖配列を認識することを特徴とする、請求項 42 に記載の抗体。

GlcNAc 6GalNAc -O-CH₂-R、GlcNAc 6(Gal 3)GalNAc -O-CH₂-R、

GlcNAc 2Man、GlcNAc -O-CH₂-R および GlcNAc 3GalNAc -O-CH₂。

【請求項 46】

修飾した単糖誘導体をグリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素によって癌細胞または腫瘍に送達することを特徴とする、癌または腫瘍の治療または診断を行うための方法。

30

【請求項 47】

該修飾した単糖誘導体が、請求項 1 ~ 46 のいずれかで定義した末端 -GlcNAc構造であることを特徴とする、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

該修飾した単糖誘導体が、下記式で表されることを特徴とする、請求項 46 に記載の方法。



(式中、

S は所望により結合しているスペーサー基であり、そして

D は誘導化するための基、例えば、ビオチンまたは蛍光性分子などの標識分子、毒性物質、プロドラッグまたはプロドラッグを遊離させる物質である。)

40

【請求項 49】

該修飾した単糖誘導体が、UDP - GalN - スペーサー - ビオチン または UDP - N-(6 - ビオチンアミドヘキサノイル) ガラクトサミンであることを特徴とする、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

該修飾した単糖誘導体を、2位を修飾した単糖を効果的に送達するように修飾したガラクトシルトランスフェラーゼ、または該修飾したガラクトシルトランスフェラーゼと同等

50

の特異性を示す動物由来の天然GalNAc/GlcNAc - トランスフェラーゼによって送達することを特徴とする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

該修飾した単糖誘導体が、非免疫原性の親水性構造であることを特徴とする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 2】

該修飾した単糖誘導体を細胞または組織に送達することを特徴とする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 3】

該修飾した単糖誘導体を、治療用タンパク質に結合した型で送達することを特徴とする、請求項 4 6 に記載の方法。 10

【請求項 5 4】

下記式 (P1) で表される物質。



(式中、

Hex、L および S は式 (C1) で定義した通りであり、

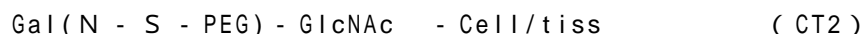
Core は N - グリカンおよび O - グリカンから選ばれる少なくとも 1 種のコア構造であり、GlcNAc がコア構造の一部である場合には、core は末端 GlcNAc 残基以外のグリカンコア構造であり、

PEG はポリエチレングリコールであり、そして 20

peptide はタンパク質またはペプチドである。))

【請求項 5 5】

下記式 (CT2) で表される物質。



(式中、S、PEG、Core および peptide は、式 (C1) で定義した通りである。)

【請求項 5 6】

該修飾した単糖誘導体を修飾したガラクトシルトランスフェラーゼで送達することを包含する、請求項 5 4 または 5 5 の物質を合成するための方法。

【請求項 5 7】

酵素基質を包含し、所望により免疫学的に活性な物質および毒性物質からなる群より選ばれる少なくとも 1 種に結合している医薬用の組成物であって、病因となるものあるいは悪性の細胞または組織の表面特異的に転移酵素によって送達され、該酵素基質と該表面のアクセプター構造との間に共有結合を形成する組成物。 30

【請求項 5 8】

該酵素基質が、病因となるものあるいは悪性の細胞または組織の表面特異的に転移酵素によって送達される炭水化物性物質であることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 5 9】

該転移酵素が、グリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素であることを特徴とする、請求項 5 8 に記載の組成物。 40

【請求項 6 0】

該炭水化物性物質が、糖ヌクレオチドであることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 6 1】

該糖ヌクレオチドが、天然型糖ヌクレオチドの活性化塩であることを特徴とする、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 2】

該糖ヌクレオチドが、下記糖ヌクレオチドからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 6 0 に記載の組成物。



CMP-NeuNAc。

【請求項 6 3】

請求項 5 7 で定義した免疫学的に活性な物質または毒性物質が、UDP-GalのGal残基、UDP-GalNAcのGalNAc残基、UDP-GlcのGlc残基 または UDP-GlcNAcのGlcNAc残基の 2 位または 6 位の炭素原子に結合していることを特徴とする、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

請求項 5 7 で定義した免疫学的に活性な物質または毒性物質が、GDP-FucのFuc残基の 6 位の炭素原子に結合していることを特徴とする、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

請求項 5 7 で定義した免疫学的に活性な物質または毒性物質が、CMP-NeuNAcの 5 位、7 位、8 位または 9 位の炭素原子に結合していることを特徴とする、請求項 6 2 に記載の組成物。 10

【請求項 6 6】

UDP-Galが、その 6 位の炭素原子からスパーサーおよびGal 3Gal - 糖エピトープによって修飾されていることを特徴とする、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 7】

該炭水化物性物質が、糖転移酵素の基質となる配糖体であることを特徴とする、請求項 5 8 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

該配糖体が、フェニルグリコシドまたはパラニトロフェニルグリコシドであることを特徴とする、請求項 6 7 に記載の組成物。 20

【請求項 6 9】

該免疫学的に活性な物質が、免疫系によって認識されうる炭水化物、炭水化物類似体または誘導體であることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 7 0】

該免疫学的に活性な物質が、抗体によって認識されることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

該炭水化物、炭水化物類似体または誘導體が、末端GlcNAc -、Gal - 抗原または血液型抗原を含むことを特徴とする、請求項 6 9 に記載の組成物。 30

【請求項 7 2】

該血液型抗原が、A血液型抗原またはB血液型抗原であることを特徴とする、請求項 7 1 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

該免疫学的に活性な物質が、防御細胞表面のレセプターによって認識されることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

該免疫学的に活性な物質が、患者の非抗体性の防御細胞レセプターによって認識される炭水化物であることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

該免疫学的に活性な物質が、患者の免疫系の防御レクチンによって認識される炭水化物または末端GlcNAc認識抗体の基質であることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。 40

【請求項 7 6】

該免疫学的に活性な物質が、タンパク質、ペプチド抗原、ペプチドグリカンの無害な部位、非天然エピトープおよび細菌の脂質 A からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 7 7】

該タンパク質が補体タンパク質であることを特徴とする、請求項 7 6 に記載の組成物。

【請求項 7 8】

グリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素をさらに包含することを特徴とする、 50

請求項 57 ~ 77 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 79】

該糖転移酵素がトランスシアリダーゼであることを特徴とする、請求項 78 に記載の組成物。

【請求項 80】

該グリコシルトランスフェラーゼが、下記グリコシルトランスフェラーゼからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 78 に記載の組成物。

ガラクトシルトランスフェラーゼ、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N - アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、グルクロニルトランスフェラーゼおよびグルコシルトランスフェラーゼ。

10

【請求項 81】

該グリコシルトランスフェラーゼが、下記グリコシルトランスフェラーゼからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 78 に記載の組成物。

4 ガラクトシルトランスフェラーゼ、4 グルコシルトランスフェラーゼ、4 - N - アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、4 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、3 ガラクトシルトランスフェラーゼ、3 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、6 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、3 シアリルトランスフェラーゼ、6 シアリルトランスフェラーゼ、3 フコシルトランスフェラーゼ、2 フコシルトランスフェラーゼおよび 6 フコシルトランスフェラーゼ。

20

【請求項 82】

該グリコシルトランスフェラーゼが、可溶性の非抗原型であることを特徴とする、請求項 78、80 および 81 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 83】

該病因となるものまたは悪性細胞が固有の炭水化物構造をその表面に保持し、該構造は該転移酵素によって特異的に認識されることを特徴とする、請求項 57 に記載の組成物。

【請求項 84】

該表面に保持されている該構造が、病原性または癌転移性を誘導する炭水化物レセプターであることを特徴とする、請求項 57 に記載の組成物。

30

【請求項 85】

Mn^{2+} イオン、 Ca^{2+} イオン、 Zn^{2+} イオンおよび Mg^{2+} イオンからなる群より選ばれる少なくとも 1 種をさらに包含することを特徴とする、請求項 57 ~ 84 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 86】

請求項 46 ~ 53 のいずれかで定義した修飾単糖誘導体および請求項 54 または 55 の物質からなる群より選ばれる少なくとも 1 種をさらに包含することを特徴とする、請求項 57 ~ 85 のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、ヒト腫瘍が特異的に発現するオリゴ糖配列に関する。本発明は、本願で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列と結合する試薬を製造するための方法のみならず、腫瘍特異的オリゴ糖配列を検出するための方法も開示する。また、本発明は、上記オリゴ糖配列およびそれに結合する試薬を用いた、癌および悪性腫瘍の診断方法にも関する。さらに本発明は、上記オリゴ糖配列およびそれに結合する試薬を用いた、腫瘍、癌および悪性腫瘍の治療方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

種々の腫瘍は、同種の細胞や組織の非悪性グリコシル化産物とは異なるオリゴ糖配列を

50

発現する。公知のまたは推測される癌関連オリゴ糖構造の例としては、次のオリゴ糖構造が挙げられる：糖脂質構造、例えばグロボ - H (Fuc 2Gal 3GalNAc 3Gal 4Lac Cer)、ガングリオシドである GM 1 (Gal 3GalNAc 4(NeuNAc 3)Lac Cer) や GD 2 (GalNAc 4(NeuNAc 8NeuNAc 3)Lac Cer)；ルイス型フコシル化構造、例えばルイス a および x (Gal 3/4(Fuc 4/3)GlcNAc)、ルイス y (Fuc 2Gal 4(Fuc 3)GlcNAc)、シアリルルイス x (NeuNAc 3Gal 4(Fuc 3)GlcNAc) およびポリラクトサミン鎖中でのこれらの組み合わせ；ならびに O - グリカンコア構造、例えば T - 抗原 (Gal 3GalNAc Ser/Thr-タンパク質)、T n - 抗原 (GalNAc Ser/Thr-タンパク質) やシアリル T n - 抗原 (NeuNAc 6GalNAc Ser/Thr-タンパク質)。非ヒト型の構造、例えば N - グリコリルノイラミン酸、が癌に存在することも示されている。癌においては、関連するオリゴ糖構造およびその特異性について十分に確立されている症例はわずかであり、これらの構造の中には、正常な細胞および組織に存在するものもあることから、癌には単に高濃度で存在しているだけだと考えられる。

【 0 0 0 3 】

末端 GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 配列を含む構造がヒト白血病細胞に存在することを示した報告 (Hu *et al.*, 1994) があるが、この構造は、正常な白血球にも同様に提示されている場合がある。従って、固形腫瘍に広く見られるグリコシル化パターンと上記知見との関連性は示されなかった。この種の糖構造は、ヒト組織の希少な正常グリコシル化産物の一部であると考えられ、O - グリカンに結合した GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 6配列は、おそらくヒト胃粘液に提示されている。ある研究によると、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 6配列を認識するモノクローナル抗体は、粘液性卵巣腫瘍、胆嚢およびすい臓上皮の偽幽門腺化生 (pseudopyloric metaplasia) や胃、胆嚢およびすい臓の分化型癌 (gastric differentiated carcinoma) などの悪性化組織、ならびにヒト羊水などの非悪性化組織に提示されている類似の構造をも認識する可能性を示しているものの、悪性化組織由来の構造は特徴付けられていない (Hanisch *et al.*, 1993)。この抗体は、ネオ糖脂質構造である GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4および肺、結腸、子宮内膜などの臓器の癌を認識しなかった。睾丸細胞に対して作製した別のモノクローナル抗体は、分岐 N - アセチルラクトサミン、例えば GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc-、を認識すると考えられる (Symington *et al.*, 1984)。また、末端 GlcNAc はヒト胎児粘液由来のムチン類に見出されている (Hounsell *et al.*, 1989)。正常な組織においては、末端 GlcNAc はポリ - N - アセチルラクトサミンの生合成における生合成中間体として少量存在する場合がある。

【 0 0 0 4 】

半合成糖脂質である GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Lac Cer に対する複数のモノクローナル抗体が作製されており、これらの抗体は培養結腸癌細胞系および腫瘍から得た糖脂質を認識することが示されている (Holmes *et al.*, 1991)。しかしながら、抗体は複数の構造を認識し、結合データは矛盾した。さらに、糖脂質は全ての抗体によって認識されることはなく、癌細胞または腫瘍から得た糖脂質構造を特徴付けるには至らなかった。従って、腫瘍上の末端 GlcNAc 構造の存在は確立されなかった。他の研究には、GlcNAc 3Lac Cer に対するモノクローナル抗体の製造に関する記載がある (Nakamura *et al.*, 1993)。この抗体による上記の五糖構造の認識も弱かった。さらにこの抗体は、ヒト由来の細胞系ではない COS - 1 細胞上のプロテアーゼ感受性エピトープを認識した。上記のいずれの研究に示された免疫化プロトコールにも、糖の多価結合体に対して誘導された抗体反応については記載されておらず、免疫化は糖脂質によるものである。

【 0 0 0 5 】

通常、ヒト血清中には末端 GlcNAc 構造を認識する多量の抗体が存在する。末端 Gal 3Gal 4GlcNAc - 構造を認識する天然の抗体のクラスもある。Gal 抗原はヒトに天然には存在しないが、天然の抗体が、例えば GalNAc 3Gal 4GlcNAc、GalNAc 3Gal 4GlcNAc および GlcNAc 3Gal 4GlcNAc といった構造に結合することも近年報告されている (Teneberg *et al.*, 1996)。X 2 - 構造である GalNAc 3Gal 4GlcNAc はヒト組織に提示されている正常な抗原であり、GalNAc 3Gal 4GlcNAc および Gal 3Gal 4GlcNAc といった構造

は、正常な組織や癌化組織からは報告されていない。このように、末端GlcNAc構造が腫瘍抗原であるという本願の知見は、天然の抗体の実際の機能が、末端GlcNAc構造を含む癌の予防である可能性を示している。

【0006】

以下の特許には、癌抗原、ならびにそれを用いた治療用および診断用の抗体の製造方法および癌ワクチンの製造方法に関する記載がある。しかし、抗原の構造は、本願で開示する糖類とは関係ない。

癌ワクチン： 米国特許第5,102,663号、第5,660,834号、第5,747,048号、第5,229,289号および第6,083,929号。

治療用抗体： 米国特許第4,851,511号、第4,904,596号、第5,874,060号、第6,025,481号、第5,795,961号。 10

診断方法： 米国特許第4,725,557号、第5,059,520号、第5,171,667号、第5,173,292号、第6,090,789号、第5,708,163号、第5,679,769号、第5,543,505号、第5,902,725号および第6,203,999号。

【0007】

従来技術としては、キトピオース-マンノース三糖を認識する、腫瘍の診断用抗体および治療用抗体がDE 38 07 594 A1に記載されている。この特許出願は、抗体以外にも、異なる末端構造を有する複数のN-グリカンも開示しており、その中には、非還元末端N-アセチルグルコサミンを有するものもある。望ましい構造のいくつかは、正常なグリカンであり、癌特異的構造ではないと特徴付けられた。この出願は、癌の分野に有用な構造を開示し、請求しているが、望ましいグリカンがどのような構造のものかはその発明からは明らかではない。式(1)を異例ながら右から左へ読んだ場合、式(1)は非還元末端GlcNAcの存在を示すとも言える。しかしながら、式(1)には末端GlcNAcの結合構造は示されていない。式(III)にはGlcNAc残基が 2、 4 および 6 - 結合することが示されているが、本発明はこのような通常は見られない構造に関するものではない。本発明は、非還元末端 - 結合GlcNAc残基を含むヒト腫瘍特異的グリカンに関する。 20

【0008】

特許出願であるWO 00/21552は、ウシ下顎腺ムチンから単離した複数の通常は見られないO-グリカン構造を請求している。上記の構造のうちの2種、例えば、GlcNAc 6GalNAc 6GalNAc および GalNAc 3(GlcNAc 6)GalNAcのように末端GlcNAc-残基を有するものもある。この特許出願は、これらの構造がウシまたはヒトの癌とも関連することを示さなかった。本発明は2個のGalNAc残基を有するこれらの構造に関するものではない。上記特許出願は、上記構造を癌に関連する抗原として用いる潜在的な治療用途の可能性に関する記載を含む。しかし、上記構造がウシ正常下顎腺分泌物に存在する場合にそれがウシ癌に関連することは示されていない。さらに、これらの構造がヒト組織に存在する可能性はほとんどない。それはグリコシル化反応は種特異的でヒトとウシとの間では異なっており、例えばウシとヒトのグリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシル化の反応方式が異なるためである。ヒトゲノムも公知であるため、上記特許出願で請求されているウシ構造の合成に関連する可能性のあるグリコシルトランスフェラーゼは、現在では製造され、ヒトから得たものについて特徴付けもされているであろう。現時点では、これらのグリコシルトランスフェラーゼのいずれもがヒトまたはヒト癌について報告されていない。 40

【0009】

Meichenin *et al.*, 2000 は、末端GlcNAc を含むいくつかのオリゴ糖およびヒト組織の癌から得た試料に結合し得るマウスモノクローナル抗体を開示している。この抗体はエンド - ガラクトシダーゼ処理赤血球を用いてマウスで製造したものである。しかしながらこの論文は、免疫原性炭水化物に結合する、特異的な抗体や他の炭水化物特異的な結合性物質を用いたいかなるヒト特異的免疫療法も確立していない。さらに、炭水化物に対する免疫反応は種特異的なので、特異性に限定のあるこのような抗体がマウスで産生されたという事実は、同様の抗体がヒトにおいて産生されるか許容されること、または特定の種類の個々のヒト腫瘍に対して有用であることを示してはいない。Endo *et al.*, 1996 は、 50

ラット肝癌 A H - 1 3 0 細胞系由来の可溶性のタンパク質アルカリホスファターゼから得た N - グリカン型オリゴ糖を開示している。ここでも、動物由来の材料の癌特異性について推論を述べているに過ぎず、ヒト癌の診断または治療に関する開示はない。

【 0 0 1 0 】

特許出願である FI20011671 には、腫瘍の治療における末端 GlcNAc - 構造の一般的な有用性について記載されている。この特許出願は、特に糖脂質から見出された Gal 結合末端 GlcNAc を含む特定のポリラクトサミン型オリゴ糖配列を開示している。この特許出願は、このような構造が N - 結合グリカンまたは O - 結合グリカンの一部でもよく、また、腫瘍特異的オリゴ糖配列が O - グリコシド結合 GalNAc にも結合し得ることを示している。この出願は O - 結合グリカンまたは N - 結合グリカンの正確な構造を開示していない。

10

【 0 0 1 1 】

本発明は、オリゴ糖配列が癌からは検出されるが正常な組織からは検出されない場合における、癌の好ましい治療について開示する。本発明は、癌の分析と治療の組み合わせに関する。さらに本願においては、上皮型および / または粘液分泌型癌のグループを形成する、肺癌、胃癌、結腸癌、喉頭癌および粘液性の癌、特に粘液性卵巣癌に対する、末端 - GlcNAc 配列を含むオリゴ糖配列の有用性を初めて明らかにした。そこで本発明は、特にヒト癌に固有のタンパク質に結合した GlcNAc - 構造に関する。さらに、本発明は、特定の N - グリカン、O - グリカンおよびタンパク質に結合した GlcNAc に関する。本発明において好ましい構造は、末端が特異的に「タンパク質結合 GlcNAc - 構造」となっている糖からなる特定のファミリーを形成し、これらはヒト癌に存在する、ヒトタンパク質結合欠陥グリコシル化産物である。特に、好ましい末端 - GlcNAc O - グリカン類および N - グリカン類は、癌または腫瘍化組織のグリコシル化の欠陥によって生じる、ヒト癌特異的な「タンパク質結合 GlcNAc - グリカンコア」の特定のファミリーを形成する。

20

【 0 0 1 2 】

さらに、本願はヒト天然抗体、特に本発明において好ましいヒト末端 - 結合 GlcNAc 構造を特異的に認識するヒト癌関連抗体を開示する。本発明はまた、修飾した単糖誘導体を癌細胞に送達することを特徴とする、酵素に基づく癌抗原のターゲティングについても記載する。ヒト天然癌関連抗体の存在から、この構造をヒト *in vivo* での癌治療の標的として用い得ることが明らかである。本発明は特に、本発明において好ましい、固有のタンパク質に結合した GlcNAc - 構造に関連した、抗体、他の癌標的療法、治療のための免疫反応（例えば癌に対する予防接種）およびこれらに有用な試薬に関する。特に本発明は、ヒト癌に固有のタンパク質結合 GlcNAc - グリカンコアに関連した、抗体、他の癌標的療法、治療のための免疫反応（例えば癌に対する予防接種）およびこれらに有用な試薬に関する。

30

【 0 0 1 3 】

癌および多くの感染症に対する現行の治療は、効果が十分ではない。癌は工業国において主要な死因であり、甚大な被害を及ぼす感染症は、特に発展途上国において子供や大人を死に至らしめている。また、感染症は、*Helicobacter pylori* による胃潰瘍などのように、工業化社会では多様なライフスタイルおよび他の疾病に潜んでいると考えられる。

【 0 0 1 4 】

先の *in vitro* の研究によって、培養細胞の表面へのシアリル - ルイス x オリゴ糖の転移が報告されている。この細胞は、シアリル - ルイス x オリゴ糖に対するヒト セレクチンの結合を調べるために用いたものである。同様に、B 血液型抗原がヒト赤血球に転移されており、これは抗 B 血液型抗体によって認識されることが示された。GDP - Fuc (- B - 抗原) の不自然な構造ゆえに、この報告の筆者らは、この構造が *in vivo* で用いるのに適さないと述べた。本発明においては、不自然な構造体も修飾した単糖として微生物病原体、ウイルス、腫瘍または癌のターゲティングに用いることができる。

40

【 0 0 1 5 】

ガラクトシルトランスフェラーゼは、*in vitro* 条件下において、エンド - ガラクトシダーゼ修飾ヒト赤血球の標識 (Viitala and Finne, 1984) およびマウス奇形癌細胞の標

50

識 (Spillmann and Finne, 1994) に用いられている。細胞表面のガラクトシルトランスフェラーゼは、種々の生物学的条件に関連しても研究されている。これら研究にはいかなる疾病に対する診断や治療についても示されていない。転移された炭水化物は、本願に開示するような単糖結合体ではない。過去の研究では放射性標識UDP-Galを用いており、このGal - 残基はその化学構造に変更はないが¹⁴C原子または³H原子に富んでいる。

【0016】

蛍光標識ムラミン酸を細菌に転移する方法が知られており、このような方法は、転移する化合物に対するワクチンの研究や、細菌間の相互作用を調べるために用いることが考えられていた。しかし、この転移反応は細菌の種特異的ではなかった。この方法は *in vitro* で用いることを目的としており、細胞はペプチドグリカン前駆体分子による非常に弱い反応を達成するために浸透性を高めなければならなかった (Sadamoto, R. *et al.*, 2001) 10。対照的に、本発明で細菌に関連して開示する転移反応は、細胞表面に直接炭水化物を転移することをねらうものである。好ましくは、本発明は患者 (ヒトでもよい) の *in vivo* での用途に関する。好ましくは、本発明は、患者血清中の転移酵素または病因となるものの文字通りの表面に存在する転移酵素の用途に関する。異なる態様としては、本発明は、炭水化物エピトープの転移によって細胞表面に直接行う、病因となるものに対する予防接種に関する。

【0017】

さらに、従来技術には、*in vitro*での 1 - 3 ガラクトシルトランスフェラーゼによる Gal の癌細胞上のアクセプターへの転移に関する記載がある。転移する単糖は修飾されて 20 もいないし、病原性を誘導する炭水化物レセプターを遮断することも目的としていない。本発明は、免疫学的に活性であるか毒性を有する単糖結合体の転移に関するものではないが、形成される末端構造は抗Gal 1-3Gal抗体に対して反応性を有するものである。このようなエピトープは、癌ワクチンとして接種される癌細胞の免疫反応性を高めることを目的としている。

【0018】

従来技術には、GlcNAc-BSAまたはトリ卵白オボアルブミンへの 6 - ビオチン化Galの転移、あるいはゴルジ装置の糖タンパク質へのフルオレセイン - NeuNAcの転移に関する報告もある。これらの研究には、本発明のような治療や診断に関する記載はない (Bulter T. *et al.*, 2001)。 30

【0019】

種々の細胞が、同種の細胞または組織の非悪性グリコシル化産物とは異なるオリゴ糖配列を発現している。癌においては、関連するオリゴ糖構造およびその特異性について十分に確立されている症例はわずかであり、これらの構造の中には、正常な細胞および組織に存在するものもあることから、癌には単に高濃度で存在しているだけだと考えられる。本願は、末端N - アセチルグルコサミン含有腫瘍特異的オリゴ糖配列についても開示する。グリコシルトランスフェラーゼによる腫瘍特異的オリゴ糖配列の認識に関する優先権は、本願により請求されている。

【0020】

通常、ヒト血清中には末端GlcNAc構造を認識する多量の抗体が存在する。従って、末端 40 GlcNAc構造が腫瘍抗原であるという先の知見は、天然の抗体の実際の機能が、末端GlcNAc構造を含む癌の予防である可能性を示している。

【0021】

発明の概要

本発明は、ヒト腫瘍によって特異的に発現されるオリゴ糖配列を開示する。本発明は、末端 - 結合N - アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) を有するヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含する、ヒト癌治療用の医薬組成物に関する。本発明は、ヒト腫瘍特異的末端 - 結合N - アセチルグルコサミン残基を有するオリゴ糖配列の存在を生物学的試料中に検出し、その配列の存在を指標として癌の検出を行う方法に関する。また、本発明は多価の型で該オリゴ糖配列を含む抗原性物質を提供し、さらに該オリゴ 50

糖配列または該オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含する診断剤、医薬組成物および癌ワクチンを提供する。また、本発明は癌の治療方法にも関する。

【0022】

発明の詳細の説明

本発明は、ヒト腫瘍によって提示される末端 - 結合 N - アセチルグルコサミンオリゴ糖鎖構造およびタンパク質結合単糖 N - アセチルグルコサミンに関する。本発明によってヒト腫瘍に特異的な欠陥が見出されたが、この欠陥は、末端 N - アセチルグルコサミンを含む、通常は見られない炭水化物の細胞表面および細胞外の提示を生じる。一般的に、末端 GlcNAc - 構造は、ヒトの正常な組織においては非常に希少である。このような構造の発現は二つの要素によって生じる。第一は、腫瘍細胞における生合成および分解機構が正しく機能していないためである。正常な組織においては、多くの末端構造は GlcNAc 残基に結合したガラクトースを含み、この構造は、シアル酸や血液型抗原などによってキャップされている。本願のデータは、癌または腫瘍の炭水化物が通常は見られないグリコシダーゼ活性および欠陥のあるグリコシル化反応、即ち、4 - ガラクトシルトランスフェラーゼの反応（さらに 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼも関与すると考えられる反応）、に曝されていることを示している。上記欠陥は、三種の - ガラクトシル化オリゴ糖配列の全てに見られた。第二に、糖タンパク質構造と糖脂質構造を含むグリコシル化産物の細胞内ターゲティングおよび品質管理機構に欠陥があると考えられる。正常な細胞においては、グリコシル化の不十分なタンパク質および糖脂質を再循環させて天然のグリコシル化反応を完了させる品質管理が行われているので、本願で開示するようなグリコシル化構造が細胞表面上に存在することは、正常な細胞では非常に稀である。正常な細胞または組織においては、本願で開示するオリゴ糖構造はヒトゴルジ装置に少量存在し、公知のタンパク質結合 GlcNAc は、細胞質に存在する核に見られるタンパク質修飾物であることに間違いはないと考えられている。ゴルジ装置の機構における欠陥は、本願で開示する腫瘍特異的構造の部分細胞表面発現を生じる。細胞内で過剰発現した本願で開示する構造でさえも、診断の分野に直接的に有用である。

10

20

【0023】

ガラクトシル化の欠陥、通常は見られないグリコシダーゼ活性の存在、および細胞内品質管理制御の喪失は、以下の三種の腫瘍関連グリコシル化産物を生じる：

1. ガラクトシル化の不十分な、不完全なタンパク質結合 N - グリカン；
2. ガラクトシル化の不十分な、不完全な O - グリカンコア構造；および
3. ガラクトシル化の不十分なポリラクトサミン（例えば、ヒト副腎腫由来のポリ - N - アセチルラクトサミン型糖脂質）。

30

これらの欠陥によって、糖タンパク質中に複数の通常は見られない末端エピトープが生じる。本発明は上記の三種のグループに属するオリゴ糖エピトープに関する。本発明は、正常な - ガラクトシル化オリゴ糖配列を有する三種類のグリカン鎖の全てに普遍的に存在する、類似した欠陥に初めて着目した。末端 - 結合 GlcNAc は末端構造として存在する。この構造は、末端 GlcNAc - 残基を直接修飾するための、1,4(3)-Gal - 転移酵素反応を含む酵素反応の欠陥を示し、その一方で、末端構造を分解することのできるゴルジ経路における増加したグリコシダーゼ活性を示す。しかしながら、三種の炭水化物における欠陥の普遍性は、ゴルジ装置の機構がかなり乱れていることを意味するので、ゴルジ経路の後期に位置する末端修飾酵素が腫瘍細胞の発現する全グリカンを効果的に修飾することはできない。

40

【0024】

さらに、本発明は以下について開示する：

4. 癌および腫瘍上のタンパク質結合 N - アセチルグルコサミン単糖の誤った発現。

タンパク質結合 N - アセチルグルコサミンは、一般的に、いわゆる O - GlcNAc - 構造の一部として細胞内に存在する。本発明では、タンパク質結合 N - アセチルグルコサミンの強い過剰発現に着目している。過剰発現によって、ヒト腫瘍は細胞表面に O - 結合 GlcNAc によるいくらかの標識さえも有することとなる。

50

【0025】

末端 - 結合GlcNAcは、上記グループ1～3の全てに共通だが、末端近傍の構造は、腫瘍や癌の診断または治療において認識されなければならない構造に影響を与えることが判明した。本発明は、特に末端GlcNAcと三種の欠陥オリゴ糖配列グループにおいて末端GlcNAcの近傍に位置する1つまたは複数の単糖残基を有する末端オリゴ糖配列を用いた、治療剤および診断剤に関する。また、本発明は、ポリラクトサミンの非還元末端 - GlcNAcオリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖、O-グリカンまたはN-グリカンに関する。本発明は、正常なグリコシル化、および潜在的かつ普遍的な、グリコシル化の欠陥を共に分析することで見出される、欠陥のあるグリコシル化反応産物の全ての種類に関する。本発明はさらに、上記四種の末端GlcNAc型構造のうち少なくとも二種を組み合わせて用いること、特に、ポリラクトサミン型末端GlcNAc配列を診断用の標的として他の末端GlcNAc構造と組み合わせて用いることに関する。

10

【0026】

普遍的なガラクトシル化反応欠陥および特異的なタンパク質ガラクトシル化反応欠陥

本発明においては、グリコシル化の欠陥は普遍的であり、本願で開示する4種の欠陥末端GlcNAc - グリコシル化産物(O-グリカン類、N-グリカン類、ポリラクトサミン類およびタンパク質結合GlcNAc)の少なくとも2種に影響を与えることを発見した。具体的な態様においては、普遍的なガラクトシル化反応欠陥は、固有のタンパク質に結合したグリコシル化産物および糖脂質に結合したグリコシル化産物の両方、特に糖脂質のポリラクトサミン型末端GlcNAc - 構造に影響を与える。本発明は特に、ヒトの癌および/またはヒトの正常組織の試料から普遍的なガラクトシル化反応欠陥の存在を検出することに関する。本発明は、複数種の末端GlcNAc構造を産生する、普遍的なグリコシル化反応欠陥に関する。このような欠陥の分析は、本発明で明示した炭水化物試料の分析によって行うことができる。ガラクトシル化の欠陥は、例えば遺伝学的、生化学的または細胞生物学的な手法によって、普遍的なグリコシル化反応欠陥を生じ得る酵素、他のタンパク質または生化学中間体の産生および/または活性および/または局在性を分析することによって調べることができる。本発明は、グリカンの生合成および/または分解に関与する細胞内構造に欠陥がある場合の、普遍的なグリコシル化反応欠陥の検出にも関する。本発明は特に、遺伝学的および/または生化学的および/または細胞生物学的な手段による普遍的なグリコシル化反応欠陥の分析を、炭水化物構造の分析による裏づけと共に行う方法に関し、炭水化物構造の分析は、質量分析法、公知の化学的および/または酵素学的方法や、本願で開示する末端GlcNAc - 構造に特異的に結合する物質および/または末端GlcNAc - 構造を特異的に修飾する物質によって行うことが好ましい。

20

30

【0027】

本願で開示する癌の治療を適用する患者を選択するために、患者の癌の試料および/または患者の正常組織における普遍的なグリコシル化反応欠陥を分析することが好ましい。本発明においては、正常な組織における普遍的なグリコシル化反応欠陥の分析は、ヒトの癌に対する罹病性や危険度の予測および/または癌の補足的スクリーニングを行うヒトの選択に用いることもできる。本願実施例に記載されるように、正常な組織のグリコシル化は癌患者によって異なる場合があることが分かっているので、正常な組織のグリコシル化および/または本願で開示する、普遍的なグリコシル化反応欠陥を個々に分析することが好ましい。好ましい態様においては、本発明は癌に対する危険度が高いことの予測、特に正常な組織に多量の「癌型」の末端GlcNAc構造を有するヒトについて行う予測に関する。

40

【0028】

本発明は特に、欠陥のあるグリコシル化産物、即ち、本願で開示する末端GlcNAc - グリコシル化産物(O-グリカン、N-グリカン、ポリラクトサミンおよびタンパク質結合GlcNAc)の少なくとも二種から選ばれる構造を標的とした治療に関する。好ましい態様においては、少なくとも三種または四種の全ての末端GlcNAc型構造を標的とする。具体的には、本発明はポリラクトサミン型構造を他の末端GlcNAc - 構造のいずれかと共に標的とすることに関する。好ましい態様においては、ポリラクトサミン型構造をタンパク質特異

50

的 N - グリカン構造と共に標的とする。

【 0 0 2 9 】

特異的なグリコシル化反応欠陥、特にタンパク質グリコシル化反応欠陥

さらに、本発明は、この欠陥はグリカンの生合成および/または分解に關与する細胞内構造の欠陥に起因する、グリコシル化の欠陥を開示する。末端GlcNAc - 構造の特定の種類に欠陥がある場合には、この特異的なグリコシル化反応欠陥は、グリカン構造を生合成または分解して末端GlcNAc - 構造を生じる特異的な酵素の活性および/または局在性の変化を調べることによって検出することができる。本発明は特に、遺伝学および/または生化学的および/または細胞生物学的手段による特異的なグリコシル化反応欠陥の分析を、炭水化物構造の分析による裏づけと共に行う方法に関し、炭水化物構造の分析は、質量分析法、公知の化学的および/または酵素学的方法や、本願で開示する末端GlcNAc - 構造に特異的に結合する物質および/または末端GlcNAc - 構造を特異的に修飾する物質によって分析することが好ましい。

10

【 0 0 3 0 】

腫瘍および癌に特異的な、欠陥を有するタンパク質結合末端GlcNAc - 構造

本発明は特に、ヒト癌に特異的な、タンパク質に結合したGlcNAc - 構造に関する。本願のデータは、ある種の腫瘍から単離したタンパク質画分にはN - グリカン類やO - グリカン類に結合した多くの末端GlcNAc - 構造、特に「固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造」が発現されていることを示した。ここで、「固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造」とは、GlcNAc - 構造がN - グリカン類またはO - グリカン類のコア構造に提示されていた、ラクトサミン構造のように伸長されていない構造であることを意味する。例えば、糖脂質に結合したGlcNAc Gal - 構造を含むことが既に報告されている副腎腫瘍と同じ腫瘍から単離したタンパク質画分に関する実験から、GlcNAc 2Man - 末端構造を末端に有するN - グリカンといった、固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造を多量に発現することが今回は明らかになった。このように本発明は、特に「固有のタンパク質に結合したGlcNAc構造」である特定のN - グリカン類、O - グリカン類およびタンパク質結合GlcNAc構造に関する。好ましい構造は、ヒトの癌に存在する、ヒトタンパク質に結合した欠陥グリコシル化産物である、タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造の特定のファミリーを形成する。さらに、本願は特定の好ましいN - グリカン構造およびO - グリカン構造を開示する。好ましい末端 -GlcNAcO - グリカン類および末端 -GlcNAcN - グリカン類は、癌または腫瘍化組織のガラクトシル化反応欠陥によって得られる、ヒトの癌に特異的な「タンパク質に結合したGlcNAc - グリカンコア」からなる特定のファミリーを形成する。

20

30

【 0 0 3 1 】

さらに、本願はヒト天然抗体、より具体的には好ましいヒト末端 - 結合GlcNAc構造を特異的に認識するヒト癌関連抗体について開示する。また、本願は、修飾した単糖誘導体を癌細胞に送達することによる、酵素に基づく癌抗原のターゲティングについても開示する。ヒト天然癌関連抗体の存在は、このような構造をヒト *in vivo*での癌治療の標的として用いることが可能であることを示す。具体的には、本発明は、本願において好ましい、固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造に対して有用な、抗体、他の癌標的治療、治療用の免疫反応（例えば癌に対する予防接種）および試薬に関する。さらに具体的には、本発明はヒト癌に特異的なタンパク質に結合したGlcNAc - グリカンコアに対して有用な、抗体、他の癌標的治療、治療用の免疫反応（例えば癌に対する予防接種）および試薬に関する。

40

【 0 0 3 2 】

1 . 不十分なガラクトシル化または分解によって生じた、不完全なN - 結合グリカン

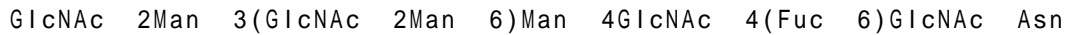
本明細書に記載したN - グリカン類は、本願で開示する、固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造およびタンパク質に結合したGlcNAc - グリカンコアに属する。このような構造の例としては、免疫化や、標的物質に対する結合エピトープとして有用な天然のN - グリカンおよびその末端構造を含む断片が挙げられる。全ての構造が特定のGlcNAc 2M

50

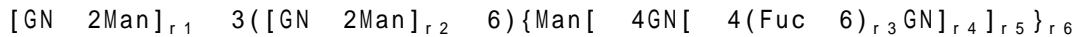
an - 構造を含んでいる。

【0033】

本発明者らは、喉頭、胃、結腸および肺などの腫瘍に由来する、末端GlcNAc残基を有する複数のN - グリカン構造を質量分析法によって特徴付けた。本明細書は、腫瘍においてはN - グリカン類の過剰発現が普遍的であることを示す。新規なN - グリカン型腫瘍抗原も新規なグリコシルトランスフェラーゼ酵素法によって腫瘍の組織片から特異的に検出されたが、対応する正常組織や非悪性化組織からは全く検出されないか少量しか検出されなかった。本発明は、下記式で表されるN - グリカン構造：



およびその部分オリゴ糖構造であって、非還元末端タンパク質またはペプチド結合末端GlcNAcを含むものに関する。式中のAsnは、天然の抗原においては、タンパク質に直接結合しているアミノ酸であるアスパラギンを示す。天然タンパク質結合オリゴ糖は、還元末端GlcNAc Asn - 構造と、末端GlcNAc 2Manを含む少なくとも一種の分岐鎖とを含んでいるはずである。抗原性エピトープの製造にN - グリカン構造を用いる場合には、本発明は、下記式で表される少なくとも1種の天然オリゴ糖配列、即ち、上記N - グリカン構造をその還元末端から縮めた構造および天然オリゴ糖配列に関する。



(式中、

r 1、r 2、r 3、r 4、r 5およびr 6は各々独立に0または1であるが、r 1とr 2の少なくとも一方は1であり、

GNはGlcNAcであるが、

但し、r 1とr 2が共に1である場合には、下記(i) ~ (iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を上記式に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、(ii) 1つのGN 2ManがManに縮められている、(iii) Man 6残基およびMan 3残基からなる群より選ばれる少なくとも一種がGN 6またはGN 4で置換されている、および(iv) Man 4がGN 4で置換されている。)

【0034】

上記式で表される構造は、ヒトN - グリカンに見られる公知のN - 結合グリカン構造をその末端から縮めた構造を表す。正常な組織においてはこれらの構造の存在は稀であるため、免疫学的診断に適している。

【0035】

より好ましいオリゴ糖配列は、下記式で表される構造である。



(式中、

r 1、r 2、r 5およびr 6は各々独立に0または1であるが、r 1とr 2の少なくとも一方は1であり、

GNはGlcNAcであるが、

但し、r 1とr 2が共に1である場合には、下記(i) ~ (iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を上記式に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、(ii) 1つのGN 2ManがManに縮められている、(iii) Man 6残基およびMan 3残基からなる群より選ばれる少なくとも一種がGN 6またはGN 4で置換されている、および(iv) Man 4がGN 4で置換されている。

【0036】

さらに好ましい態様においては、GNはGlcNAcであるが、但し、r 1とr 2が共に1である場合には、下記(i) および(ii) からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を上記式に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基、例えばガラクトース、で伸長されている、および(ii) 1つのGN 2ManがManまたはMan 6残基に縮められている。最も

好ましい態様においては、全てのGNがGlcNAcである。

【0037】

伸長されていない構造としては、以下のオリゴ糖配列が好ましい：

GlcNAc 2Man、GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man、GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man、
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man、
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4GlcNAc、そして
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc 。

10

【0038】

より好ましいN-グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

GlcNAc 2Man、GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc、Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man、
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man、そして
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 。

20

【0039】

最も好ましいN-グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

GlcNAc 2Man、GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、
 GlcNAc 2Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc、Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、そして
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 。

30

【0040】

2. 不十分なガラクトシル化または分解によって生じた、不完全なO-結合グリカン

本願に記載するO-グリカン類は、本願で開示する、固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造およびタンパク質に結合したGlcNAc - グリカンコアに属する。このような構造の例としては、免疫化または標的物質に対する結合エピトープとして有用な天然のO-グリカン類およびその末端構造含有断片が挙げられる。全ての構造が特定のGlcNAc GalNAc、好ましくはGlcNAc GalNAc - 構造を含む。

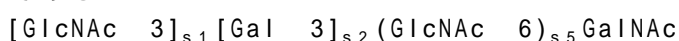
【0041】

本発明者らは、腫瘍の発現するO-グリカン類は末端 - 結合GlcNAcを含む構造を有することも見出した。腫瘍に対するO-グリカンの特異性は、後述する実施例において、卵巣癌から回復したヒトから得た特異的な癌関連天然抗体が存在することと、癌の病歴のないヒトから得た血清プールには抗体が存在しないことによって示されている。

40

【0042】

具体的には、本発明は末端 - 結合GlcNAc残基を有するヒト腫瘍特異的O-グリカンコア構造、好ましくは、GalNAc-GalNAc配列は含まないO-グリカン配列に関する。好ましいO-グリカンオリゴ糖配列は、下記式で表される少なくとも一種のオリゴ糖配列を含むものである：



(式中、s₁、s₂およびs₅は各々独立に0または1であるが、s₁とs₅の少なくとも

50

も一方は1である。)

上記式中に2個のGlcNAc構造が存在する場合には、1個のGlcNAc構造はGal、NeuNAc Galまたは他の天然オリゴ糖配列で置換されていてもよい。Gal - 残基はシアル酸または他の天然オリゴ糖配列でさらに置換されていてもよく、好ましい態様においてはGal - 残基はシアリル化されている。

【0043】

好ましいO - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

GlcNAc 3Gal 3(Gal 4GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、
GlcNAc 3Gal 3GalNAc、Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3(GlcNAc 6)GalNAc、
GlcNAc 6GalNAc、GlcNAc 3GalNAc、そして SA Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc (式中、S A 10
はシアル酸、好ましくはNeu5AcまたはNeu5Gcあるいはそれらの誘導体(例えば、Galに
3または6結合し得るO - アセチル化誘導体)である)。

【0044】

より好ましいO - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

GlcNAc 3Gal 3GalNAc、Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 6GalNAc、
GlcNAc 3GalNAc、そしてNeuNAc Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc 。

【0045】

最も好ましいO - グリカンオリゴ糖配列としては、以下の配列が挙げられる：

Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3GalNAc、GlcNAc 6GalNAc、そして
NeuNAc 3Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc 。

20

【0046】

本発明においてO - グリカンとは、その元となる抗原がタンパク質/ペプチドに結合している糖類、その結合体または類似体であって、抗原の還元末端からセリンまたはスレオニンに、好ましくは結合で結合しているものである。このようなオリゴ糖配列は他の担体であるアグリコンやアグリコン - スペース構造に結合していてもよい。アグリコンまたはアグリコン - スペースへの結合とは、エピトープが炭水化物に結合していないか、少なくとも直接は結合していないことを意味し、特にGalNAc に結合していないことを意味する。アグリコンは、セリンまたはスレオニンに存在するような CH_2 - 基を少なくとも1個有することが好ましく、この結果、好ましい構造であるOS - O - CH_2 - R (30
式中、OSは本願で開示するオリゴ糖であり、Rはアグリコンまたはスペースの残りの部分であり、追加のメチレン基または非環式アルキル構造を含むことが好ましい)が得られる。別の態様においては、O - グリカンは上述のように結合によって結合している。

【0047】

本発明は、特にO - グリカンオリゴ糖配列であるGal 3(GlcNAc 6)GalNAc および/またはGlcNAc 6GalNAcを認識するが、Gal 3(Gal 4GlcNAc 6)GalNAc および/またはGal 4GlcNAc 6GalNAcは認識しないヒト抗体に関し、さらに上記抗体を用いた本発明の治療剤および診断剤に関する。好ましい態様においては、本発明は、オリゴ糖配列であるGal 3(GlcNAc 6)GalNAcを効果的に認識するが、オリゴ糖配列であるGal 3(Gal 4GlcNAc 6)GalNAcを認識しないヒト抗体に関する。GlcNAc 3GalNAcもまたヒト抗体にとって好ましいO - グリカン型標的である。好ましい態様においては、ヒト抗体は天然の抗体である。他の一つの好ましい態様においては、上記抗体は癌ワクチンによって誘導されたものである。さらに好ましい態様においては、ヒト抗体はIgG抗体、IgA抗体またはIgM抗体であり、IgG抗体であることが最も好ましい。40

【0048】

別の一つの態様においては、本発明はO - グリカンコア構造の希少なシアリル化異型、例えばGlcNAc 3(NeuNAc 6)GalNAcまたはNeuNAc 3Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、の用途に関する。

【0049】

3 . 末端GlcNAc 3および/または末端GlcNAc 6を含むポリ - N - アセチルラクトサミン型配列

50

本願に記載するポリラクトサミン配列は、本願で開示する、固有のタンパク質に結合したGlcNAc - 構造およびタンパク質に結合したGlcNAc - グリカンコアに属するものではない。このような構造は、本願で開示する特定のタンパク質構造や他の特定の方法及び組み合わせるのに有用である。

【0050】

本発明は、ヒト腫瘍に提示されるポリ - N - アセチルラクトサミン型構造中の末端N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) の存在を開示する。上記構造は、検討した四つのヒト副腎腫瘍のうちの一つから多量に見出されたのが初めである。腫瘍の糖脂質画分は、特異的な放射性標識 *Escherichia coli* 株とパーメチル化した試料のFAB - 質量分析法によって、末端N - アセチルグルコサミンを含むと特徴付けられた。糖脂質画分は、特異的なレクチンを用いて検出することのできる末端N - アセチルラクトサミンも含んでいた。正常な腎臓由来糖脂質を細菌でスクリーニングしたところ、対応の正常組織には末端GlcNAcは存在しないことが判明した。これは複数の他の対照組織にも存在しないことから明らかである。

10

【0051】

本発明の一つの態様は、腫瘍由来の末端N - アセチルグルコサミン残基を有する少なくとも一種のオリゴ糖配列の検出または単離に関する。

【0052】

本発明において、単離または検出される腫瘍特異的構造としては、以下の糖配列が挙げられる：GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal、GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、そして GlcNAc 6Gal 4GlcNAc。上記糖配列は、ポリ - N - アセチルラクトサミン鎖の一部であるため、ポリ - N - アセチルラクトサミン鎖は少なくとも一種の末端 - 結合GlcNAcを含んでいる。

20

【0053】

さらに好ましい態様においては、本発明は、以下に挙げる 6 - 結合非含有直鎖状ポリラクトサミン配列に関する：GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、そして GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4GlcNAc。

【0054】

別の態様においては、本発明は、以下に挙げる 6 - 結合含有非分岐ポリラクトサミン配列に関する：GlcNAc 6Gal、GlcNAc 6Gal 4GlcNAc、そして GlcNAc 6Gal 4GlcNAc 3Gal 4GlcNAc。

30

【0055】

好ましいポリ - N - アセチルラクトサミン型配列としては、以下の 3 - 分岐構造および 6 - 分岐構造が挙げられる：GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal、GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc、そして Gal 4GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc。このような分岐構造は、分岐O - グリカン構造に類似している。

【0056】

1型N - アセチルラクトサミンであるGlcNAc 3Gal 3GlcNAc または GlcNAc 6Gal 3GlcNAcを含む構造も、本発明の化合物の範囲に含まれる。

【0057】

4. タンパク質結合N - アセチルグルコサミン

本願に記載するタンパク質結合GlcNAcは、本願で開示する、タンパク質に結合したGlcNAc - 構造に属する。本発明者らは、喉頭、胃、結腸および肺などの腫瘍に由来する、タンパク質結合GlcNAc残基を特徴付けた。本発明により、腫瘍においてはタンパク質結合GlcNAcの過剰発現が普遍的であることが明らかとなる。新規なN - グリカン型腫瘍抗原も新規なグリコシルトランスフェラーゼ酵素法によって腫瘍の組織片から特異的に検出されたが、対応する正常組織や非悪性化組織からは、全く検出されないか少量しか検出されなかった。タンパク質結合GlcNAcの分析により、種々の形態のタンパク質結合GlcNAcの存在が示された。

40

【0058】

50

具体的な態様においては、本発明は、本願で定義した治療剤や診断剤における β -結合 N - アセチルグルコサミン単糖残基 (GlcNAc) の用途、および GlcNAc を包含する医薬組成物に関する。大部分の腫瘍細胞は、 β -脱離法 (β -elimination) によって遊離させることができる O - グリカン様 GlcNAc を有する。

【0059】

本発明の好ましい態様は、次の O - グリコシド構造の、本願に記載した用途に関する。

GlcNAcSer および / または GlcNAcThr

(式中、セリン (Ser) 残基およびスレオニン (Thr) 残基の水酸基は GlcNAc 残基にグリコシド結合している。)

本発明のより好ましい態様においては、アミノ酸残基であるセリン (Ser) 残基およびスレオニン (Thr) 残基は、ペプチドまたはペプチド結合体の一部であるかアミノ基および / またはカルボン酸基から誘導されている。

10

【0060】

他の一つの好ましい態様においては、本発明は GlcNAcX (式中、X はアグリコンであり、好ましくは上記のアミノ酸残基であるセリンまたはスレオニンを模倣するもの) の用途に関する。

【0061】

より好ましい態様においては、GlcNAc Ser および / または GlcNAc Thr、即ち、GlcNAc X は、本願で説明する多価の担体に結合しており、本願で説明する用途に用いる。GlcNAc X は予防接種に有用な担体に結合していることが好ましく、本願で説明する炭水化物担体に結合していることが最も好ましい。

20

【0062】

他の一つの好ましい態様においては、GlcNAc Ser および / または GlcNAc Thr、即ち、GlcNAc X を、本願で説明する多価の担体に結合する。GlcNAc X は予防接種に有用な担体に結合していることが好ましく、本願で説明する炭水化物担体に結合していることが最も好ましい。

【0063】

本発明は、上記の O - グリカン型構造の β -結合 N - グリコシド類似体、例えば GlcNAc - Asn、およびペプチド誘導体ならびにそれらの類似体にも関する。生物学的試料においては、このような構造はエキソグリコシダーゼまたはエンド - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼによって形成される。

30

【0064】

好ましいヒト特異的免疫反応

本発明は、癌を患っているヒトまたは癌から回復したヒトから見出した新規な天然免疫反応について開示する。新規な炭水化物に対して起こりうるヒトの免疫反応は、グリコシル化が種特異的に生じるが故に動物のデータからは推測することができない。本発明は特に、新規なヒト癌関連免疫反応およびヒト癌関連抗体に関し、ヒト癌関連抗体としては、人体に適応させた、以下のオリゴ糖に対する抗体が挙げられる：O - グリカンオリゴ糖配列 (GlcNAc₃GalNAc および GlcNAc₆(Gal₃)GalNAc)、末端 GlcNAc₂Man を含む N - グリカンオリゴ糖配列 (特に GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man に結合するもの) およびタンパク質に結合した GlcNAc - 構造 (特に GlcNAc - O - CH₂ - R に結合する抗体が好ましく、この構造は、セリン、スレオニンまたはアグリコン (式中の R で表され、O - グリカンに関連して説明したもの) に O - グリコシド結合している)。抗体反応は O - グリカン構造に対して特に効果的であった。上記の構造の全てに対する IgM 抗体および IgG 抗体が認められた。本発明は、上記の好ましい構造を認識するヒト IgG 抗体およびヒト IgM 抗体を共に目的とする。

40

【0065】

オリゴ糖配列を表す一般構造

本願で開示するオリゴ糖配列は、糖脂質の一部、糖タンパク質の一部および / または N - アセチラクトサミン鎖の一部であってもよい。腫瘍特異的オリゴ糖配列も、糖脂質の

50

一部、糖タンパク質中のN-結合グリカンまたはO-結合グリカンの一部であってもよい。腫瘍関連オリゴ糖配列は、O-グリコシドGalNAcに直接結合していてもよい。腫瘍の生合成経路および/または生分解経路における欠陥または変更は、本願で開示するオリゴ糖配列を有した糖脂質および糖タンパク質の両方の合成をもたらす。末端N-アセチルグルコサミンの存在は、オリゴ糖鎖中の非還元末端GlcNAc残基が他のいかなる単糖にも置換されていないことを意味する。本発明における「オリゴ糖配列」は、オリゴ糖配列中の少なくとも1つの単糖残基が、他の単糖残基からなるオリゴ糖鎖を含むより大きな糖結合体の一部であり、上記オリゴ糖鎖は分岐していてもよいし、天然の置換修飾物であってもよい。上記のオリゴ糖鎖は、通常、脂質アンカーまたはタンパク質に結合している。好ましい態様においては、本願で開示するオリゴ糖配列は、非還元末端オリゴ糖配列である。本明細書において「非還元末端オリゴ糖配列」とは、所望によりオリゴ糖配列の還元末端から他の単糖構造またはオリゴ糖構造に結合している場合を除いては、他の単糖構造またはオリゴ糖構造に結合していない構造を意味する。オリゴ糖配列が結合体として存在している場合には、オリゴ糖配列の還元末端から結合することが好ましいが、抗体や結合性物質との結合が可能な他の結合位置も利用することができる。さらに好ましい具体的な態様においては、本願で開示するオリゴ糖配列には、糖結合体の一部に対応するオリゴ糖残基であって、天然のグリコシド結合によって他の単糖構造またはオリゴ糖構造に結合していないものも含まれる。上記のオリゴ糖残基は、遊離のオリゴ糖、ならびにオリゴ糖残基の還元末端から結合した結合体または誘導体であることが好ましい。

10

【0066】

20

希少な種類のガングリオシド型またはガラクトシル型のグロボシドも、腫瘍特異的末端GlcNAcとして用いることができる。いくつかの組織では末端Gal 4GlcNAc 3/6構造が糖脂質コアに結合されており、本願で説明する低ガラクトシル化条件においては、末端GlcNAcを形成することができる。

【0067】

本発明の他の一つの態様においては、癌または腫瘍を診断するために腫瘍特異的オリゴ糖配列を検出する。

【0068】

腫瘍特異的オリゴ糖配列は、特異的な結合性物質によって検出されることが好ましく、結合性物質としては、アプタマー、レクチン、ペプチドまたはタンパク質（例えば抗体）、それらの断片あるいは遺伝子工学的に作製したそれらの異型が挙げられる。特異的な結合性物質は二価、オリゴ価または多価であることがより好ましい。結合性物質はレクチンまたは抗体であることが最も好ましい。

30

【0069】

特異的な結合性物質のコンビナトリアルケミストリーライブラリーは、結合性分子を探索するために用いることができる。糖結合性のタンパク質、抗体またはレクチンは生物工学的に作製することができ、例えば、ファージディスプレイ法によって本願で開示する構造に対して特異的な結合性物質を製造することができる。標識した細菌または細胞、あるいは重合体の表面であって、本願で開示する構造を認識する分子を有するものを検出に用いることができる。オリゴ糖配列は、エンドグリコシダーゼ酵素によって癌または腫瘍細胞から遊離することもできる。また、オリゴ糖配列をプロテアーゼ酵素により、例えば糖ペプチド(glycopeptides)として遊離することもできる。オリゴ糖またはその誘導体を遊離させるための化学的方法の具体例には、糖脂質の音波分解法(otsonolysis)、および糖タンパク質からオリゴ糖を遊離させるためのβ-脱離法(beta-elimination)またはヒドラジン分解法(hydrazinolysis method)が含まれる。その他の方法としては、糖脂質画分の単離が挙げられる。腫瘍特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する結合性物質は、細胞表面上のオリゴ糖配列の分析に用いることもできる。このような配列は、例えば、糖結合体あるいは遊離のおよび/または単離したオリゴ糖画分として検出することができる。種々の形態の上記オリゴ糖配列の分析に用いることができる方法としては、NMR分光法、質量分析法およびグリコシダーゼ分解法が挙げられる。特に、特異性に限定のあ

40

50

る方法を用いる場合には、少なくとも二種の分析法を用いることが好ましい。

【0070】

質量分析プロファイルから複数の癌特異的構造を同時に解析する方法

本発明は特に、複数の分析シグナル、好ましくは、癌または腫瘍の試料から遊離したオリゴ糖の総画分を含むサンプルより得られた質量分析シグナルの解析および/または比較に関する。1種のオリゴ糖画分の単一の質量分析スペクトルには、グリコシル化反応のプロファイル、ならびにオリゴ糖配列および癌特異的オリゴ糖配列の潜在的な存在と、正常な組織試料と比べて変化したその存在レベルが示される。本願実施例に記載するように、このようなプロファイルはMALDI-TOFにより測定することが好ましい。総オリゴ糖画分は、タンパク質オリゴ糖の総画分に対応することが好ましく、総オリゴ糖画分が、癌または腫瘍に特異的な本願で開示するオリゴ糖配列を少なくとも1種含むことがより好ましい。他の1つの好ましい態様においては、総オリゴ糖画分は、癌または腫瘍に特異的な、本願で開示するO-グリコシド結合オリゴ糖およびN-グリコシド結合オリゴ糖を少なくとも1種含むことがより好ましい。さらに本発明は、酵素的または化学的な消化工程によって癌または腫瘍の試料から総オリゴ糖画分を遊離させた際に得られる複数の質量分析シグナルの解析に関する。酵素的消化はグリコシダーゼ酵素で行うことが好ましく、次の群から選ばれる酵素を用いることがより好ましい：ガラクトシダーゼ、シアリダーゼ、N-アセチルヘキソサミニダーゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼ、フコシダーゼおよびマンノシダーゼ。

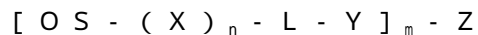
10

【0071】

本発明は、腫瘍特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を用いて、オリゴ糖構造を認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法に関し、以下の工程に従って上記抗体を製造する：

20

1) 本願で開示するオリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を多価の型で含んでいる結合体を、化学的または生化学的に合成する。多価の結合体は、例えば、本願で開示する腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖(OS)が、還元末端の1位の炭素原子からスペーサー基(Y)を介して、所望により単糖またはオリゴ糖残基(X)をさらに介して、オリゴ価または多価の担体(Z)に原子(L)によって結合している、下記式で表される構造を形成する：



30

(式中、

mは1より大きい整数であり、

nは各々独立に0または1であり、

OSは腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖であり、

Lは酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、

Xは単糖またはオリゴ糖残基、好ましくはラクトシル残基、ガラクトシル残基、ポリ-N-アセチルラクトサミニル残基、あるいはO-グリカンまたはN-グリカンオリゴ糖配列の一部であり、

Yはスペーサー基または末端結合体、例えばセラミド脂質部またはZへの結合部であり、

40

Zはオリゴ価または多価の担体である。)；そして

2) 免疫応答活性化物質と共に多価結合体で動物またはヒトを免疫する。

オリゴ糖配列は免疫応答活性化物質に多価の型で結合していることが好ましく、このような結合体は単独、またはさらなる免疫応答活性化物質と共に免疫に用いる。好ましい態様においては、オリゴ糖結合体を、1種または複数のアジュバンド分子と共に抗体産生生物に注射または粘膜投与する。抗体産生のためには、オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体をタンパク質、例えばBSA、スカシガイ(keyhole limpet)ヘモシアニン、リポペプチド、ペプチド、細菌の毒素、ペプチドグリカンまたは免疫活性多糖の一部、あるいは他の抗体産生活性化分子に多価の型で結合する。当業界で知られている慣習的な抗体産生法で抗体を誘導するために、多価結合体をアジュバンド分子と共に動物に注射するこ

50

とができる。

【0072】

抗体産生または予防接種は、腫瘍特異的オリゴ糖配列の類似体または誘導体によっても達成される。N - アセチル基含有オリゴ糖配列の単純な類似体としては、修飾されたN - アセチル基、例えばN - プロパノイル基などのN - アルキル基を含む化合物が挙げられる。

【0073】

GlcNAc₃Gal₁4GlcNAcに結合する抗体の産生に用いることができる類似体としては、Hex(NAc)₀₋₁3Gal₁4GlcNAcやHex(NAc)₀₋₁3Gal₁4GlcNAc(式中、Hexはヘキソースであり、好ましくはGalまたはGlcである)などの配列が挙げられる。類似体には、上記式中のGlcNAcが類似の異性体、例えばManNAcで置換された分子も含まれる。

【0074】

本発明によると、抗体を血清、好ましくはヒトの血清から精製するために腫瘍特異的オリゴ糖配列を用いることができる。通常、ヒト血清には末端GlcNAc構造を認識する抗体が大量に存在する。末端Gal₁3Gal₁4GlcNAc構造を認識する天然抗体のクラスも存在する。Gal₁抗原はヒトに天然には存在せず、天然抗体が*in vitro*の構造物であるGalNAc₃Gal₁4GlcNAc、GalNAc₃Gal₁4GlcNAcおよびGlcNAc₃Gal₁4GlcNAcにも結合することが近年示された(Teneberg *et al.*, 1996)。X₂-構造であるGalNAc₃Gal₁4GlcNAcは、ヒト組織に提示される正常な抗原であるが、GalNAc₃Gal₁4GlcNAc構造およびGal₁3Gal₁4GlcNAc構造はヒトの正常組織および癌組織からは見出されていない。このように、末端GlcNAc-構造が腫瘍抗原であるという本発明の知見は、天然抗体の実際の機能が、癌の予防および末端GlcNAc-構造を有する腫瘍の破壊の両方である可能性を示した。腫瘍特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体(例えば類似の異性体)は、血清、好ましくはヒトの血清、から抗体を精製するために固定することもできる。本発明は、本願で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列に強固に結合する天然のヒト抗体に関する。

【0075】

腫瘍特異的オリゴ糖配列は、腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合するヒト抗体の検出および/または定量、例えば酵素免疫測定法(ELISA)やアフィニティークロマトグラフィーによる分析にも用いることができる。腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合するヒト抗体の検出は、癌の診断、癌の治療剤の開発、特に本願で開示するオリゴ糖配列に対する癌ワクチンの開発、および大量の抗体またはある1種類の抗体を保持する血液提供者の探索を目的とすることが好ましい。

【0076】

さらに、腫瘍特異的オリゴ糖配列に対するヒト抗体または人体に適応させた抗体を、腫瘍や癌の破壊や、その増殖能を低下させるために用いることができる。ヒト抗体は、腫瘍特異的オリゴ糖配列に対する天然のヒト抗体の高耐性類似体でもよい。このような類似体は、組み換え遺伝子工学および/または生物工学によって製造することができ、ヒト抗体の断片または最適化した誘導体などであってもよい。精製した天然の抗腫瘍抗体は、標準的な輸血の際にも移植されていることから、予想されるいかなる副作用も生じることなくヒトに投与することができる。これは、腫瘍特異的構造が正常の組織または細胞に提示されておらず、且つ、血液型抗原とは異なり、個体差がないとした条件下では確実であり、しかも末端GlcNAcを含む構造には血液型のような多様性は知られていない。本願の他の一つの態様においては、種特異的動物抗体を特定の動物の腫瘍または癌に対して用いる。特異的な人体適応抗体を遺伝子工学および生物工学で製造することも可能であり、人体に適応させた抗体の製造方法は、例えば米国特許第5,874,060号および第6,025,481号に記載されている。人体に適応させた抗体はヒト抗体の配列を模倣するように設計されるので、ヒトの患者に投与した際に、動物抗体のように免疫系によって拒絶されることはない。癌の増殖能を低下させたり、癌を破壊したりするための方法は、固形腫瘍および広義の意味における癌細胞の両方に適用可能であることが知られている。いかなるヒト癌特異的抗原、好ましくはオリゴ糖からなる抗原を認識する精製した天然のヒト抗体は、腫瘍または癌の

増殖能の低下や、それを破壊するために用いることが可能であることも知られている。他の一つの好ましい態様においては、種特異的動物抗体を特定の動物の腫瘍または癌に対して用いる。

【0077】

本発明によると、腫瘍特異的オリゴ糖に対するヒト抗体または人体に適応させた抗体、あるいは腫瘍特異的オリゴ糖に結合する、生体に許容される他の物質は、腫瘍または癌細胞に毒性物質をターゲティングするために有用である。毒性物質としては、例えば細胞殺傷化学療法薬 (cell killing chemotherapeutics medicine) (例えばドキソルビシン (Arap et al., 1998))、毒性タンパク質または放射線化学薬剤などの腫瘍の破壊に有効な物質が挙げられる。このような療法は当業界で発表されており、特許にもなっている。毒性物質は、癌細胞または腫瘍にアポトーシスを起こさせたり、その分化を誘導したり、癌細胞または腫瘍に対する防御反応を増強したりすることもできる。本願の他の一つの態様においては、種特異的動物抗体を特定の動物の腫瘍または癌に対して用いる。本発明の癌結合性抗体または腫瘍結合性抗体は、例えば、いわゆる「ADEPT - アプローチ」において、腫瘍に対して活性を示すプロドラッグ、あるいはプロドラッグを腫瘍または癌を破壊したり抑制したりする活性化毒性物質に変換する酵素または他の物質の標的とするために用いることもできる。

10

【0078】

上記の治療用抗体は、癌または腫瘍の治療または予防を目的とした医薬組成物に用いることができる。本発明の治療方法は、患者が免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている時にも用いることができる。

20

【0079】

末端GlcNAc型 (または好ましくはGlcNAc 3/6Gal 4GlcNAc型) の、癌のまたは腫瘍のグリコシル化産物は、免疫不全状態、例えば、免疫不全を生じる疾病 (AIDSなど) や免疫抑制剤療法によって生じる免疫不全、に陥っている患者の腫瘍に広く見られる傾向がある。カポジ肉腫は、AIDSおよび免疫不全に関連して広く見られる癌である。免疫抑制剤療法は、例えば、腎臓、心臓、肝臓または肺の移植の際の拒絶反応を抑制するために、臓器移植と共に実施する。このような療法を実施している間に現れる腫瘍は通常は良性であるが、貴重な移植臓器の損失をしばしば引き起こす。潜在的な天然の抗癌抗体の中には、以下の類似したエピトープを認識すると考えられるものもある: GalNAc 3Gal 4GlcNAc、GalNAc 3Gal 4GlcNAc、そして Gal 3Gal 4GlcNAc。第一の構造であるX₂は、P血液型の希少な異型に属するヒトにより多く見られるものであり、このようなヒトは、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc構造を認識する抗体の量が少ない場合もある。腫瘍または癌に特異的な抗原に対する抗体の産生能は、免疫系に見られる個体差によって異なる場合がある。癌から回復したヒトは、特に多量の天然の抗癌抗体を保有している場合がある。

30

【0080】

抗体を介した、腫瘍化組織に対する免疫反応の考えられる例としては、腫瘍の大部分を切除した後に副腎腫から完全に回復した例が挙げられる。末端GlcNAcを含むオリゴ糖配列はこのような免疫応答の潜在的な標的である。

【0081】

腫瘍に対する治療的ターゲティングを行うための他の方法

診断用物質の場合と同様に、癌または腫瘍を標的とする治療剤に用いる物質としては、抗体、抗体断片や人体に適応させた抗体以外にも、多くの薬剤が利用可能であることが知られている。癌または腫瘍に対するターゲティングには、非免疫原性の許容される物質を用いることが特に好ましい。癌または腫瘍に結合するターゲティング物質の例には、癌または腫瘍を破壊または抑制する特異的な毒性、細胞溶解性または細胞調節性の薬剤も含まれる。癌または腫瘍に対する治療的ターゲティングに用いる非抗体分子は、本願で開示する癌特異的オリゴ糖配列または腫瘍特異的オリゴ糖配列に特異的に結合する分子を包含することが好ましく、このような結合性の分子 (即ち、オリゴ糖鎖結合性物質) としては、アプタマー、レクチン、遺伝子工学的に作製したレクチン、末端GlcNAc - 構造を認識する

40

50

酵素（例えば、グリコシダーゼやグリコシルトランスフェラーゼ）および遺伝子工学的に作製したそれらの異型が挙げられる。標識した細菌、ウイルスまたは細胞、あるいは重合体の表面であって、その構造を認識する分子を有するものも癌または腫瘍に対する治療的ターゲティングに用いることができる。本願で開示する癌結合性または腫瘍結合性の非抗体物質は、癌または腫瘍に対して活性を示すプロドラッグを、癌または腫瘍に対してターゲティングしたり、プロドラッグを癌または腫瘍を破壊したり抑制することが可能な活性化毒性物質に変換する酵素や他の物質をターゲティングするためにも用いることができる。

【0082】

グリコシルトランスフェラーゼによる末端GlcNAcを含む腫瘍抗原のターゲティング

本発明はまた、癌細胞または腫瘍に、修飾した単糖誘導体を送達する新規な治療方法または診断方法にも関する。本願は、毒性物質、標識物質、薬剤または免疫学的に活性のある炭水化物と、転移酵素によって認識されるアクセプター構造を有する、患者の病原性細胞表面との間に共有結合を生じるための、以下の工程を包含する方法を開示する：

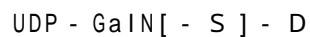
(i) 毒性物質、標識物質、薬剤または免疫学的に活性のある炭水化物を、転移酵素の供与分子と結合させて結合体を得、そして

(ii) (a) 得られた結合体および所望により転移酵素を腫瘍の治療のために患者に投与する、または

(b) 腫瘍の診断のために、得られた結合体を腫瘍試料に接触させて、結合体からなる標識を検出する。

【0083】

グリコシルトランスフェラーゼによって送達される単糖誘導体は、グリコシド結合したヌクレオチド残基も有する。単糖誘導体としては、2位の修飾物(2-modified)、例えばUDP-ガラクトサミンのアミド誘導体が好ましい。治療または診断のための単糖誘導体としては、下記式で表されるものが好ましい：



(式中、

Sは所望により結合しているスペーサー基であり、

Dは誘導体化した基、例えば、ビオチンまたは蛍光性分子などの標識分子、あるいは他の癌や腫瘍のターゲティング法に関連して開示されている、毒性物質、プロドラッグまたはプロドラッグを遊離させる物質である。)

【0084】

スペーサーは、修飾された単糖ヌクレオチドを転移酵素に結合させるのに十分な可とう性を有することが好ましい。

単糖誘導体は、UDP-N-(6-ビオチンアミドヘキサノイル)ガラクトサミンであることが好ましい。

使用する酵素は、2位修飾単糖を効果的に送達するように工学的に改変したガラクトシルトランスフェラーゼを用いることが好ましい。また、例えば、動物から得た類似の特異性を有する天然のGalNAc/GlcNAc-転移酵素を用いることもできる。

本発明は、特に、組織をUDP-GalN-スペーサー-ビオチンおよび修飾ガラクトシルトランスフェラーゼと共にインキュベートすることによって、ビオチンで腫瘍化組織を標識する方法に関する。

【0085】

別の態様においては、本発明は下記の工程からなる診断方法に関する：

1. ガラクトシルトランスフェラーゼ、好ましくは4-ガラクトシルトランスフェラーゼによって、放射性標識UDP-Galから放射性標識Galをヒト腫瘍化組織に転移し；そして
2. 組織に組み込まれた放射能を利用して、腫瘍上の末端GlcNAc残基を定量する。

【0086】

ガラクトシルトランスフェラーゼを用いた標識方法は、本発明の全ての末端-GlcNAc構造に有効である。

10

20

30

40

50

【0087】

末端GlcNAc - 構造を用いた治療または診断のための、修飾ガラクトース残基の癌への送達

さらに本発明は、in vivoまたはex vivoにおける、酵素に基づく治療または診断用のターゲティングおよび/またはGlcNAc - 残基の標識に関し、このようなターゲティングや標識は、標識単糖を目的材料のGlcNAc残基に共有結合を形成するように送達することで行う。目的材料は、癌特異的末端GlcNAc残基を含有する構造を発現しているタンパク質、組織試料または癌組織などであり、本願で開示するいかなる癌特異的または腫瘍特異的な構造も好ましく、このような構造としては末端GlcNAc - 構造に結合したポリラクトサミン、N - グリカン、O - グリカンおよびタンパク質が挙げられる。好ましい態様においては、ポリラクトサミン型、N - グリカン型、O - グリカン型の構造を標的とする。具体的には、本発明は、本発明において好ましい末端GlcNAc構造のグリコシル化反応に関する。単糖は、 β - グリコシルトランスフェラーゼによって転移されることが好ましく、 β - グリコシルトランスフェラーゼは、 β 3 - または β 4 - グリコシルトランスフェラーゼであることがより好ましく、 β 4 - グリコシルトランスフェラーゼが最も好ましい。好ましい態様においては、転移酵素は次の群から選ばれる1種または複数の単糖残基を転移することができるものである：Glc残基、GlcNAc残基、Gal残基およびGalNAc残基、ならびに少なくとも1種のそれらの修飾誘導体。転移酵素はHex(NAc)_r 4 - 転移酵素(式中、HexはGlcまたはGalであり、rは0または1である)である。好ましいグリコシルトランスフェラーゼとしては、動物およびヒトのグリコシルトランスフェラーゼが挙げられる。ヒトの転移酵素はin vivoの用途に特に好ましい。

10

20

【0088】

最も好ましい形態のグリコシルトランスフェラーゼは、2位を修飾したGal、GalN、GlcまたはGlcNを転移することが可能な形態の、動物の β 4 - GlcNAc - グリコシルトランスフェラーゼおよび/またはGalNAc - グリコシルトランスフェラーゼである。好ましい転移酵素については、Ramakrishnan and Qasba, 2002に報告がある。このウシ β 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼは、上述のような転移を可能にする変異がそのアミノ酸残基にある。本発明はまた、これと同じまたは類似のペプチド構造を触媒部位に有し、UDP-GalNAcまたはUDP-GlcNAcからGalNAcおよび/またはGlcNAcを転移することが特徴付けられている、同様の動物由来酵素にも関する。好ましい態様において動物の酵素は、ヒト β 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼの異型であり、好ましくは同様の変異を有するヒト β 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼの異型である。

30

【0089】

糖物質を転移する酵素は、2位に修飾がある単糖単位を転移することができるグリコシルトランスフェラーゼであることが好ましい。このような酵素の動物由来の変異型については、Ramakrishnan and Qasba, 2002に報告がある。本発明は特に、可溶性のヒトグリコシルトランスフェラーゼおよびその活性断片に関し、特に2位を修飾した単糖構造を転移することが可能な変異ガラクトシルトランスフェラーゼに関する。

【0090】

転移するための好ましい2位修飾炭水化物結合体

40

特異的な診断方法は、炭水化物の2位が修飾されていることを特徴とする炭水化物結合体を本願で開示する末端GlcNAcに転移する方法に関する。転移する炭水化物は、下記式(C1)で表される。



(式中、

Hexはヘキソース、好ましくはGalまたはGlcであり、

Lはヘキソースの2位の炭素原子と結合する原子であり、好ましくは酸素原子、窒素原子、炭素原子または硫黄原子であり、さらに好ましくは酸素原子または窒素原子であり、最も好ましくは窒素原子であり、

Sはスペーサー基または原子であるか、あるいは存在しないが、

50

スペーサー基が存在する場合には、その長さは少なくとも3原子であることが好ましく、少なくとも4原子であることがさらに好ましく、少なくとも6原子であることが最も好ましく、

Sに続くTが可とう性を有する脂肪鎖またはそれと同等の構造、例えばポリアルキルエーテル構造、好ましくはポリエチレングリコール(PEG)、を含んでいる場合、Sは存在しなくてもよい。))

【0091】

上記式中のTは、本発明によって転移されるかまたは標的とされる基である。驚くべきことに、このような転移可能な基は、GalNAcまたはGlcNAcに天然に提示されているアセチル基を含む構造が大きくても有用であることが明らかとなり、転移可能な基が4個、さらには6個、さらには10個を超える数の炭素原子を含む構造であっても有用である。従って、本発明は、好ましくは4個を超える数の炭素原子を含む物質、さらに好ましくは6個を超える数の炭素原子を含む物質、さらに好ましくは10個を超える数の炭素原子を含む物質の転移に関する。本発明によると、転移酵素は、約100Daを超える分子量を付加した修飾単糖の転移さえも可能であり、付加した分子量が500Da、さらには1000Da、さらには5000Daを超えてもなお、転移可能であった。本発明は、好ましいグリコシルトランスフェラーゼの能力を最大限に利用することに関する。大きな官能基を転移させる酵素の転移能は、機能構造(例えば標識物質、治療剤または非免疫原性の親水性構造)の転移を可能とする。分子量約5000kDaのPEGポリマーさえ転移させ得るということは、ビオチンまたは同等の大きさの標識物質を転移することよりもずっと驚くべき知見である。

【0092】

さらに本発明は、下記式(C2)で表される、本発明による特定の物質(T)を転移するための糖ヌクレオチド結合体に関する。



(式中、

Hex、L、SおよびTは、式(C1)で定義した通りであり、

Nuは、本発明による糖結合体を活性化するヌクレオチドである。)

ヌクレオチドは、用いるグリコシルトランスフェラーゼに応じて、UDP、GDP、TDPおよびADPが好ましく、UDPを用いるのが最も好ましい。グリコシルトランスフェラーゼは、動物およびヒトのグリコシルトランスフェラーゼであることが好ましい。

【0093】

好ましい糖ヌクレオチド結合体

最も好ましい糖ヌクレオチド結合体は、下記式(C3)および(C4)で表される。



(式中、ヌクレオチドはUDPであり、結合に関与する原子(L)が窒素原子(N)であり、そしてSおよびTは上記で定義した通りである。)

【0094】

プレターゲットイング(pretargeting)法

さらに、本発明は、本願で開示する修飾単糖を用いて結合基(linking group)を転移する方法に関する。結合基は、本発明において転移する基と結合した、対応する他の結合基で後から修飾することができる。特に、本発明は化学的な選択性を有し、且つタンパク質/組織に対して適合性を有する結合基の転移に関し、このような結合基は水溶液または水性緩衝液中で効果を発揮することが好ましい。「化学的な選択性」とは、結合基が他の一つの対応する結合基と選択的に反応することを意味する。「タンパク質/組織に対する適合性」とは、結合基またはそれに対応する他の結合基が、ターゲットイング反応条件下で標的となる材料に提示されているアミノ酸残基や他の構造と反応しないか、実質的に反応しないことを意味する。タンパク質/組織に対する適合性は、標的材料に提示されている化学基に依存する。例えば、標的となるタンパク質が未修飾(free)のシステイン側鎖を

10

20

30

40

50

有していない場合、チオールを用いた化学的手法 (thiol chemistry) を用いることができる。結合基と化学的に選択される基とのペアは、チオールとチオール反応性基 (例えばマレイミド) であることが好ましい。他の1つの所望の結合基とのペアとしては、アミノオキシ基とそれと反応するアルデヒドまたはケトンが好ましい。アミノオキシ基は選択的且つ効果的に水溶液中のカルボニル基含有物質と反応する。

【0095】

本発明は、式 (C1) ~ (C3) で表される物質であって、標的に送達するT基が化学的な選択性を有し、且つタンパク質/組織に対する適合性を有する結合基である物質に関する。本発明者らは、本発明において好ましい修飾ガラクトシルトランスフェラーゼは、スペーサーが2~4個の原子しか含まないような短いものである場合でさえ、炭素原子以外の原子の少なくとも一部を含む結合基を転移させることを見出した。好ましい態様においては、本発明は、少なくとも2個、より好ましくは少なくとも3個または4個の炭素原子からなる短いスペーサーと結合基を含む物質に関し、スペーサーが2個の炭素原子からなり、結合基がN-保護アミノオキシ基である物質がさらに好ましい。アミノオキシ基は保護された形態で転移されるのが好ましく、その後、大部分のタンパク質に適合可能な条件下で開裂して反応性のアミノオキシ基とする。具体的な態様においては、本発明による保護結合基を用いる。

10

【0096】

他の1つのプレターゲティング法においては、本発明は非共有結合プレターゲティング基としてピオチンを送達する。付加的な基をアビジンやストレプトアビジンによってピオチンにターゲティングすることができる。具体的には、本発明は、本願に記載するような組織や細胞にピオチンを送達することに関し、本願実施例は有用な方法や試薬および実際の標識方法を示す。例えば、ヒトの *in vivo* において、癌のプレターゲットであるピオチンまたは (ストレプト) アビジンに対して治療的ターゲティングを行う方法が示されている。この方法は、臨床試験でその効果が認められた。従って、本願に記載する癌組織へのピオチンの送達は特に好ましい。

20

【0097】

有害な相互作用を予防するための炭水化物結合体の治療用ターゲティング/治療関連試薬の *in vitro* における修飾

好ましい態様においては、本発明は転移可能な炭水化物に結合した非免疫原性の親水性構造を含む結合体に関する。非免疫原性の親水性構造は、ポリアルキルグリコールまたはその同等物あるいは炭水化物であることが好ましく、非免疫原性の多糖、あるいは多糖またはオリゴ糖の断片であることがさらに好ましい。非免疫原性の親水性構造はポリエチレングリコール (PEG) であることが最も好ましい。このような物質の目的は、治療用のタンパク質、細胞または組織などの治療用物質を、有害な相互作用の原因を避けてターゲティングを行うことである。修飾は通常 *in vitro* で起こり、治療用のタンパク質、細胞および組織などを含む治療用物質を本願ではまとめて「治療剤 (therapeutic agents)」と称する。細胞および組織の修飾は、例えば (同種) 移植、異種移植または創傷や組織の損傷の処置といった治療を目的としてもよい。有害な相互作用は、例えば、循環血液から治療用タンパク質を除去するレセプター、治療用のタンパク質、細胞または組織を分解するタンパク質分解酵素または加水分解酵素、治療用タンパク質を分解するかまたはそこに結合する白血球などの細胞、あるいは低分子量タンパク質などの低分子量物質を循環血液から除去する腎臓の構造体、によって仲介されることがある。

30

40

【0098】

治療用タンパク質の品質を向上させるためには、一般的にペグ化 (pegylation) を用いる。多くのタンパク質が生物工学的に製造され、PEGで修飾されており、このようにして得られるタンパク質の中には市販されているものもある。多くの場合、通常は腎臓で除去される低分子量タンパク質の分子量をペグ化は増加させることができる。本発明は、治療用タンパク質のペグ化に用いる物質およびペグ化を行う方法を目的とする。組織または細胞のペグ化は、異種移植などの手術で必要な場合がある。このような場合、ペグ化は、

50

例えば移植組織を免疫システムによる分解から保護することを目的とする。このような方法は、例えば、パーキンソン病の治療のための神経組織の移植、または糖尿病治療のためのすい臓膵島細胞の移植に用いることができる。

【0099】

治療剤に用いる、末端GlcNAc構造含有基質をin vitroで修飾する方法

本発明は、特定の細胞系、例えば昆虫の細胞、で産生されるガラクトシル化の不十分な糖タンパク質の修飾を目的とする。本発明は特に、ガラクトシル化の不十分な（且つシアリル化された）糖タンパク質が得られる条件下で産生された末端GlcNAc含有タンパク質の修飾に関する。末端グリコシル化の欠如は、細胞の培養条件（例えば、酸素量および単糖基質やタンパク質の有無など）によって誘導される。本発明はさらに、同一または異なる産生細胞系を用いて細胞培地中にガラクトシダーゼ酵素、シアリダーゼ（ノイラミニダーゼ）酵素、フコシダーゼ酵素またはN - アセチルヘキソサミニダーゼ酵素、好ましくは - ガラクトシダーゼと所望により - ノイラミニダーゼを発現させることで、末端グリコシル化産物を除去する方法に関する。 - ノイラミニダーゼは、一般的な幅広い特異性を有するものでも、 3 - 結合または 6 - 結合シアル酸、さらに所望により 8 - 結合または 9 - 結合シアル酸を用いて製造したシアル酸種に特異的なものでもよい。グリコシダーゼ（glycidase）酵素は、酵母や他の産生細胞種の細胞壁に固定化されるように製造することもできる。

10

【0100】

本発明は、O - またはN - グリカンおよび/またはタンパク質結合グリカンに結合した末端GlcNAcの修飾に関する。修飾の対象となる基質は、通常は標準的なN - グリコシド結合コア構造またはO - グリコシド結合コア構造の一部である。本発明は特に、下記式（P1）で表される物質に関する。

20



（式中、

Hex、LおよびSは、式（C1）で定義した通りであり、

CoreはN - グリカンおよび/またはO - グリカンのコア構造であり、GlcNAcがコア構造の一部である場合には、coreは末端GlcNAc残基を除いたグリカンコアであり、

PEGはポリエチレングリコールであり、そして

peptideは免疫システムまたは他の有害な相互作用を避けてターゲティングを行うタンパク質またはペプチドである。）

30

式中のpeptideは、既にペグ化されることが分かっている治療用タンパク質であることが好ましい。治療用タンパク質は抗体または低分子量タンパク質、例えばヒト エリスロポエチン（EPO）、インターフェロンまたはインターロイキンであることが好ましい。好ましい態様においては、タンパク質はin vivoでの使用を目的としたアビジン化タンパク質である。

【0101】

さらに好ましくは、本発明は下記式（P2）で表される物質に関する。



（式中、S、PEG、Coreおよびpeptideは、上記で定義した通りである。）

40

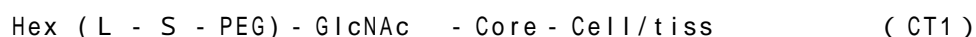
好ましい態様においては、本発明は下記式（P3）で表される物質に関する。



（式中、S、PEG、Coreおよびpeptideは、上記で定義した通りである。）

【0102】

本発明はさらに、本発明で開示する修飾炭水化物を細胞および/または組織の表面に送達させることで得られる、修飾した細胞または組織からなる材料に関する。好ましい材料は、下記式（CT1）で表される。



（式中、

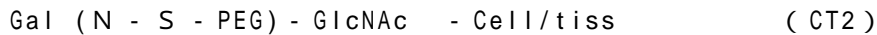
Hex、PEG、LおよびSは、式（D1）で定義した通りであり、

50

CoreはN - グリカンおよび / またはO - グリカンのコア構造を表すが、所望により末端GlcNAc残基を除くN - グリカンおよび / またはO - グリカンのコア構造を表し、そしてCell/tissは修飾可能な細胞または組織を表す。)

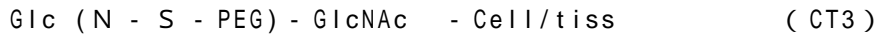
【0103】

さらに好ましくは、本発明は下記式(CT2)で表される組織に関する。



(式中、S、PEG、Coreおよびpeptideは、上記で定義した通りである。)

好ましい態様においては、本発明は下記式(CT3)で表される材料に関する。



(式中、S、PEG、Coreおよびpeptideは、上記で定義した通りである。)

10

【0104】

本発明はさらに、本発明で開示する修飾炭水化物を細胞および / または組織の表面に送達させることで得られる、修飾した細胞または組織からなる材料に関する。

【0105】

本発明は治療用または診断用の物質について開示し、このような物質は、*in vivo*において細胞表面、特に病因となるもの(例えば癌細胞、腫瘍化細胞、細菌、ウイルスまたは寄生生物)の表面、と共有結合を形成するように送達する。

【0106】

さらに本発明は、治療用または診断用の物質の、*in vivo*において細胞表面と共有結合を形成するように行う送達を開示し、細胞表面は、特に次の病因となるもの(1)~(3)の細胞表面である：(1)癌細胞または腫瘍化細胞、(2)細菌、菌類、ウイルスおよび寄生生物などの微生物病原体、そして(3)病原または転移を誘導するレセプター。本発明は特に、癌特異的オリゴ糖配列などの病原状態と関連のあるオリゴ糖、またはウイルス、細菌および寄生生物などの病原体に提示されているオリゴ糖に対するドナー炭水化物の送達に関する。本発明は特に、免疫学的な活性または毒性を有する治療用物質に結合した炭水化物を用いた、感染症、癌および悪性腫瘍などの疾病の治療方法に関する。

20

【0107】

本発明は、薬剤を細胞または組織の表面にターゲティングするのに用いることもでき、このような場合、薬剤は細胞内で第2の機能を発揮する(*recycled*)ことができる。具体的な態様においては、薬剤は送達する炭水化物に不安定な結合によって結合されており、この結合が細胞内で開裂し薬剤が放出される。

30

【0108】

他の1つの具体的な態様においては、治療用物質は天然型の単糖であり、*in vivo*の病原誘導性炭水化物レセプターに共有結合を形成するように送達されて、病原誘導性炭水化物レセプターを遮断する。病原誘導性炭水化物レセプターは、転移性癌や病原性微生物の炭水化物レセプターまたは自己免疫不全を生じる組織の欠陥グリコシル産物などである。

【0109】

さらに、本発明は、細胞または組織の表面へ*in vivo*で共有結合を形成するように物質を送達することによる、組織または病原に特異的なレセプターの探索について開示する。本発明は、病因となるものおよび病原に関連するレセプターを*in vivo*で検出するための方法について記載する。送達の標的が病原性と関連のない場合であっても、*in vivo*における組織への送達は、組織イメージング技術(*tissue imaging technologies*)に有用である。本発明はまた、炭水化物結合体を用いた、病因となるものおよびそれに関連する疾病の診断方法に関する。本発明は特に、少なくとも1種の上記炭水化物を用いた、感染症、癌および悪性腫瘍の診断方法に関する。

40

【0110】

細胞表面への*in vivo*における送達

本発明は、治療用または診断用の分子の、*in vivo*において細胞表面と共有結合を形成するように行う送達について開示する。このような送達は、ドナー基質分子を細胞表面、さらに具体的には、アクセプター基質分子に転移することのできる転移酵素により行う。

50

アクセプター基質分子は細胞表面分子であることが好ましいが、細胞表面関連分子であってもよい。細胞表面の病原性関連レセプターから求められる、許容される天然構造を *in vivo* で合成することによって、ドナー基質分子を用いて病原関連レセプターを遮断することができる。他の1つの態様においては、ドナー基質は、治療用または診断用の分子に結合した送達可能な分子である。ドナー基質の結合は、結合したドナー基質が転移酵素によって認識され且つ転移されるように行う。

【0111】

例えば、転移酵素はガラクトシルトランスフェラーゼであり、ドナー基質分子は糖ヌクレオチドまたはグリコシルトランスフェラーゼ酵素の脂質ドナーであり、アクセプター基質は細胞表面炭水化物または細胞表面関連炭水化物である。さらに、他の1つの例では、転移酵素は糖転移酵素であり、ドナー基質は糖転移酵素に対するオリゴ糖基質または糖結合体ドナー基質であり、アクセプター基質は糖転移酵素の細胞表面炭水化物アクセプターである。好ましくは、単糖残基またはその結合体はドナーからアクセプター基質に転移される。糖転移酵素およびオリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyltransferase) のようなグリコシルトランスフェラーゼでさえもが、オリゴ糖を転移することができる。いずれの場合においても、一次基質を治療用または診断用の分子に結合することができる。

10

【0112】

本発明は、薬剤を細胞または組織の表面にターゲティングするのに用いることもでき、このような場合、薬剤は細胞内で第2の機能を発揮することができる。具体的な態様においては、薬剤は修飾単糖に不安定な結合によって結合されており、この結合が細胞内または細胞表面で開裂し薬剤が放出される。

20

【0113】

In vivo の送達反応における特別な要件

本発明は、新規な *in vivo* 条件下で所望の標的に治療用または診断用の炭水化物を送達させるグリコシル基転移反応のための、反応条件および試薬の組み合わせに関する。

【0114】

A. *In vivo* のグリコシルトランスフェラーゼ反応

転移酵素反応： 本発明は、ヒトおよび哺乳類の体液ならびに細胞表面に存在する天然グリコシルトランスフェラーゼの用途に関する。細胞外グリコシルトランスフェラーゼの機能の大部分が未知であり、細胞表面型は細胞接着分子である可能性もある。本発明においては、血清に存在するグリコシルトランスフェラーゼの特異性によって、病因となるものに提示されている特別な前駆体オリゴ糖に対する特異的な送達反応が可能であることが判明した。

30

【0115】

さらに、この方法は、癌細胞および微生物病原体などの病因となるものの表面への、治療用または診断用の化合物の特異的ターゲティングにも利用可能であることが判明した。このようなターゲティング法は、炭水化物結合体を病因となるものの表面に共有結合を形成するように送達する点で従来の方法とは異なる。ある種の癌は、例えばヒト血清のガラクトシルトランスフェラーゼに対する末端GlcNAc - および末端GlcNAc - 含有アクセプターを有することが明らかとなった。

40

【0116】

さらにこの反応は、シアル酸をその表面に転移させることが知られている *Neisseria* などの微生物や、*Trypanosoma cruzii* などの寄生生物の表面に毒性物質または診断剤を送達するために利用可能であることが明らかになった。最新の組み換え酵素技術は、患者の体内に存在するさらなるグリコシルトランスフェラーゼの使用も可能にし、このような用途のためには、転移酵素は組み換え型の可溶性ヒト転移酵素のように十分許容されるものであることが好ましい。微生物病原体から得たグリコシルトランスフェラーゼでさえ微生物表面への特異的な送達には有用となり得るが、このような病原体型転移酵素に対する免疫反応によって、長期治療における有用性が制限されたり、長期的に見た場合にその治療効果がより予防接種的なものに変化したりする場合がある。

50

【0117】

別の態様においては、病原誘導レセプターは患者組織の糖構造体であり、この構造体は癌、微生物病原体または微生物病原体により分泌された毒素に対するレセプター、あるいはある種のグリコシル化不全によって生じたグリコシル化の不十分な構造体などの自己免疫レセプターである。末端GlcNAc₃LacNAc - 構造および末端GalNAc₃LacNAc - 構造は、Clostridium difficile由来の下痢発症性トキシゲンAに対する潜在的なレセプターであり、このようなレセプターは、NeuNAc₃ - のGal₄をレセプターに転移することで遮断することができる。アテローム性動脈硬化症で生じるシアリル化が不十分なLDL、HEMPLASの症状として生じるガラクトシル化の不十分な赤血球、あるいは糖尿病で生じるガラクトシル化の不十分なIgGはいずれも、本発明の方法で一般的な糖ヌクレオチドから正常な単糖を転移させることにより、in vivoで治療可能な病態の具体例である。癌は、肝臓のアシアロ糖タンパク質レセプターに結合する末端Gal - 残基によって肝臓へ転移することができるので、このレセプターをNeuNAc₃ - 残基で遮断すると、このような癌による肝転移を低減することができる。

10

【0118】

In vivoの転移酵素反応の特別な条件

In vitroでのグリコシルトランスフェラーゼ反応は、通常は比較的少量のMnCl₂の存在下で行われ、Mn²⁺イオンは公知のグリコシルトランスフェラーゼの大部分を活性化させる。このような試薬は、反応条件を向上させることを目的としてドナーヌクレオチドを安定化させるのに用いてもよい。しかしながら残念なことに、Mn²⁺イオンは神経毒性であることから、次のような条件下でごく短期間使用することが好ましい：Mn²⁺イオンと共に送達される炭水化物または結合体の量を少量とし、1) 胃腸器系に使用するか、2) 膀胱に使用するか、または3) 病因となるものの近傍に直接投与する。ここで「少量」とは、治療に用いるMn²⁺イオンのレベルが毒性レベルに達しないことを意味する。さらに、毒性の遊離Mn²⁺イオンレベルを調製するには、Mn²⁺イオンをキレート化する分子（例えばMn²⁺イオン錯体を用いたイメージングの際に血清中で使用する、生体に許容されるキレート化剤など）の増量、および/またはキレート化を行うタンパク質（トランスフェリン（transferring）など）の添加によってMn²⁺イオン量を抑制することができる。このようなキレート化剤を、所望の送達達成された後に余剰のMn²⁺イオンを除去したり、癌または病原部位に炭水化物をターゲティングした後に循環血液中に局所的に存在する余剰のMn²⁺イオンを除去したりするのに用いることができる。血液細胞、血液成分または組織を移植する際には、血液やその成分または組織を患者の体内に適用する前に有害な量のMn²⁺イオンを除去するのであれば、グリコシルトランスフェラーゼ反応を体外でMn²⁺イオンの存在下で行うことができる。しかしながら、後述するより許容性の高い2価のカチオンを用いることが好ましい。さらに、このような代替となる低毒性2価カチオンの使用またはMn²⁺イオンの除去は、グリコシル化を改変した治療用糖タンパク質の製造においても好ましいことが判明した。

20

30

【0119】

ガラクトシルトランスフェラーゼ / 修飾のための特別な条件

末端GlcNAc₄ - 構造と反応させるための、in vivoでの4 - ガラクトシルトランスフェラーゼの反応

40

ヒト血清のガラクトシルトランスフェラーゼ活性は、活性化にMn²⁺イオンを必要としたが、アッセイ条件において他のカチオンによって実質的に活性化されることはないことが観察された。そこで、ウシ乳由来の外來性ガラクトシルトランスフェラーゼを血清に添加したところ、Mn²⁺イオンの存在なしでも酵素が活性を示すことを見出した。亜鉛、カルシウムおよびマグネシウムの2価のカチオンによってさらに活性化することができた。本発明は特に、ヒト循環血液に添加した4 - ガラクトシルトランスフェラーゼを用いる方法に関する。酵素をさらに活性化するためにZn²⁺イオン、Ca²⁺イオンおよび/またはMg²⁺イオンを用いることが好ましい。さらに、ホスホリルコリンは、ドナー基質を安定化させる効果を有し、ドナー基質がガラクトースに分解されるのを部分的に防止するこ

50

とも見出した。本発明はさらに、許容可能なリン酸エステルを用いる方法に関し、ホスホリルコリンを用いてヒト血中のドナー基質の分解を低減することが好ましい。Mn²⁺イオンは、1 mM濃度、さらには0.2 mM濃度でも、内因性のヒトガラクトシルトランスフェラーゼを活性化することが分かった。本発明におけるマンガンの使用が許容される条件下においては、本発明は、約0.01~1 mM、好ましくは0.02~0.2 mMのMn²⁺イオンの使用に関する。

【0120】

本発明者らはまた、2価のカチオンを用いずに、Mn²⁺イオンで活性化される酵素を使用する有用で新規な反応条件も見出した。このような反応がin vivoで実施可能な理由は、高代謝性の活性癌細胞や多くのストレス細胞(stressed cells)は、例えば、2価のカチオンが複合体化したグリコシルトランスフェラーゼを分泌するので、このような細胞表面イオン濃度によって血清単独では実施不可能な反応が可能のためである。さらに、Mn²⁺イオンまたは他の2価のカチオンは、複合体として外来性グリコシルトランスフェラーゼおよびドナー炭水化物と共に用いることができるので、遊離イオン濃度を低く保つことができる。

10

【0121】

酵素活性が低くても、許容される代替となるイオンを用いることがさらに好ましい。本発明によると、4 mM MgCl₂をヒト全血中のフコシルトランスフェラーゼを活性化するのに用いることができる。短期間の治療では、約6~8 mMといったさらに高いMg²⁺イオン濃度でもヒトの患者は耐えることができる。さらに約1~2 mMといった高濃度のCa²⁺イオンを用いることで、より高い反応性が得られる場合もある。癌や非常に致死性の高い感染症などの重症の疾病においては、危険性が高まるものの、カチオン濃度の上昇を試みるのが望ましい場合がある。ヒト全血との反応に2価のカチオンを用いない場合には、より特異的なフコシルトランスフェラーゼ反応が見られる。In vivoでの送達反応の特異性を制御するためにカチオンを使用することもできる。具体的な態様においては、転移酵素の反応性を上昇させるために、スベルミン、レシチンやコリンなどのカチオン含有有機分子を用いることができる。場合によっては、Co²⁺イオンやBa²⁺イオン、さらにはCd²⁺イオンでさえも他の2価カチオンとして特定のグリコシルトランスフェラーゼの活性化に用いることができる。

20

【0122】

本発明はまた、反応を増加させるためにin vivoで許容されるホスファターゼ阻害剤を用いることにも関する。例えば、胃腸器系においては、ミリモル濃度のATPを使用することができる。胃腸器系で炭水化物および酵素を用いる場合には、これらを胃酸から保護することは有用であることに注目すべきである。

30

【0123】

免疫学的に活性な炭水化物および/または毒性炭水化物に結合した炭水化物の送達
好ましい態様においては、炭水化物を免疫学的に活性な物質および/または毒性物質に結合して結合体を得、得られた結合体を病因となるものの表面に送達することができる。修飾した炭水化物をアクセプター、特に、癌特異的オリゴ糖配列あるいはウイルス、細菌または寄生生物などの病原体に提示されているオリゴ糖といった、病原状態と関連するアクセプターに送達することができる。本発明は特に、修飾した単糖を用いた、感染症、癌および悪性腫瘍などの疾病の治療に関する。

40

【0124】

修飾した単糖は、1つまたは複数のグリコシル基転移反応によって病因となるものの表面に対して特異的なターゲティングを行う。グリコシル基転移反応は酵素によって触媒され、酵素は、病因となるものの表面に提示されているアクセプターオリゴ糖を認識する糖転移酵素またはグリコシルトランスフェラーゼ酵素が好ましい。糖転移酵素またはグリコシルトランスフェラーゼ酵素は患者に存在するものが好ましく、患者の血清(および/または他の体液)に存在するものがさらに好ましい。糖転移酵素またはグリコシルトランスフェラーゼ酵素は、膜タンパク質として病因となるものによって効果的に分泌されるか効

50

果的に産生される酵素のように、病因となるものの近傍に高濃度で存在するものであることが好ましい。具体的な態様においては、グリコシルトランスフェラーゼ酵素または糖転移酵素を修飾した単糖と共に用いる。酵素は、修飾した単糖の転移率を高めるために添加することができる。添加した酵素を *in vivo* で使用する場合には、酵素は可溶性であり且つ抗原性ではないことが好ましい。このような酵素としては天然の血清や尿に存在する酵素、患者の有する他の可溶型の酵素が挙げられる。

【0125】

好ましい態様においては、糖転移酵素はトランスシアリダーゼ酵素である。グリコシルトランスフェラーゼ酵素は、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、キシロシルトランスフェラーゼ、グルクロニルトランスフェラーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼであることが好ましい。さらに好ましくは、グリコシルトランスフェラーゼ酵素は、4ガラクトシルトランスフェラーゼ、3ガラクトシルトランスフェラーゼ、3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、3シアリルトランスフェラーゼ、6シアリルトランスフェラーゼ、3フコシルトランスフェラーゼ、2フコシルトランスフェラーゼまたは6フコシルトランスフェラーゼである。具体的な態様においては、糖転移酵素またはグリコシルトランスフェラーゼ酵素は、病因となるものに固有の単糖残基である、細菌に提示されているラムノース、KDO、ヘプトースやフラノースなどを転移する。多くの寄生生物も通常はヒトの体内に存在しない単糖を転移することができる。

【0126】

グリコシルトランスフェラーゼと共に用いる修飾した単糖は、糖ヌクレオチド誘導体またはその類似体であることが好ましく、修飾した他の配糖体もグリコシルトランスフェラーゼによって転移される場合がある。糖転移のためには、修飾した単糖はフェニルグリコシドまたはパラニトロフェニルグリコシドなどの配糖体であってもよい。グリコシルトランスフェラーゼは、ドナー基質に存在する多くの修飾を許容することが知られている。好ましい糖ヌクレオチド誘導体または類似体は、UDP-GalまたはUDP-GalNAcの誘導体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がGal残基またはGalNAc残基の2位または6位の炭素に結合しているもの）、UDP-GlcNAcまたはUDP-Glcの誘導体または類似体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がGlc残基またはGlcNAc残基の2位または6位の炭素に結合しているもの）、GDP-Fucの誘導体または類似体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がフコース残基の6位の炭素に結合しているもの）、あるいはCMP-NeuNAcまたはCMP-シアル酸の類似体または誘導体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がNeuNAc残基またはシアル酸残基の5位、7位、8位および/または9位の炭素に結合しているもの）である。NeuNAcの結合体および糖ヌクレオチド結合体の一般的な作製方法はW003031464 A2に記載されている。

【0127】

転移反応の特異性はグリコシルトランスフェラーゼ酵素の特異性に基づく。転移は、通常ドナー基質およびアクセプター基質の両方に特異的である。例えば、特定の種類のガラクトシルトランスフェラーゼや1-3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが知られており、これらはある種のO-グリカン構造、N-グリカン構造またはポリラクタミン構造に極めて特異的に転移することができる。病因となるものに提示されている炭水化物アクセプターに特異的または極めて特異的な可溶性の患者型グリコシルトランスフェラーゼを、修飾した糖ヌクレオチドと共に用いることが好ましい。このような「患者型の転移酵素」とは、患者に存在する天然の酵素のことである（例えば、ヒトに用いるヒトグリコシルトランスフェラーゼは生物工学的に製造することができ、あまり好ましくはないがヒトの血清または組織から精製することもできる）。このような転移酵素は、治療を行う組織の部分に天然に存在する形態、例えば血清中の酵素のような可溶性血清型の

10

20

30

40

50

ものを用いることがより好ましい。転移の特異性は、グリコシルトランスフェラーゼ酵素に対応する特定のアクセプター構造（病因となるものに提示されている炭水化物、糖結合体、ペプチド、タンパク質または脂質）の存在および/または転移酵素の局在性や、病因となるものの近傍に転移された炭水化物によって作製することもできる。病因となるものに対する特異性は、転移反応を行った後に毒性炭水化物または免疫学的に活性な炭水化物を局所的に活性化することによっても作製することができ、例えば放射性物質を特定の放射線で局所的に活性化することもできる。

【0128】

グリコシルトランスフェラーゼと共に用いる修飾した単糖は、糖ヌクレオチド誘導体またはその類似体であることが好ましく、修飾した他の配糖体もグリコシルトランスフェラーゼによって転移される場合がある。糖転移のためには修飾した単糖はフェニルグリコシドまたはパラニトロフェニルグリコシドなどの配糖体であってもよい。グリコシルトランスフェラーゼは、ドナー基質に存在する多くの修飾を許容することが知られている。好ましい糖ヌクレオチド誘導体または類似体は、UDP-GalまたはUDP-GalNAcの誘導体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がGal残基またはGalNAc残基の2位または6位の炭素に結合しているもの）、UDP-GlcNAcまたはUDP-Glcの誘導体または類似体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がGlc残基またはGlcNAc残基の2位または6位の炭素に結合しているもの）、GDP-Fucの誘導体または類似体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がフコース残基の6位の炭素に結合しているもの）、あるいはCMP-NeuNAcまたはCMP-シアル酸の類似体または誘導体（毒性物質または免疫学的に活性な炭水化物がNeuNAc残基またはシアル酸残基の5位、7位、8位および/または9位の炭素に結合しているもの）である。

【0129】

転移の特異性は、グリコシルトランスフェラーゼ酵素に対応する特定のアクセプター構造（病因となるものに提示されている炭水化物、糖結合体、ペプチド、タンパク質または脂質）の存在および/または転移酵素の局在性や病因となるものの近傍に転移された炭水化物によって作製することもできる。病因となるものに対する特異性は転移反応を行った後に毒性炭水化物または免疫学的に活性な炭水化物を局所的に活性化することによっても作製することができ、例えば放射性物質を特定の放射線で局所的に活性化することもできる。転移反応の特異性はグリコシルトランスフェラーゼ酵素の特異性に基づく。例えば、特定の種類のガラクトシルトランスフェラーゼや1-3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが知られており、これらはある種のO-グリカン構造、N-グリカン構造またはポリラクトサミン構造に極めて特異的に転移することができる。病因となるものに提示されている炭水化物アクセプターに特異的または極めて特異的な可溶性の患者型グリコシルトランスフェラーゼを、修飾した糖ヌクレオチドと共に用いることが好ましい。

【0130】

毒性物質の送達

修飾した単糖は、毒素のような毒性物質を含んでいてもよく、例えば細菌の毒素、細胞殺傷化学療法薬（cell killing chemotherapeutics medicine）（例えばドキソルピシン（Arap *et al.*, 1998））、または放射線化学薬剤などの腫瘍の破壊に有効な物質を含んでいてもよい。このような療法は、当業界では発表されており、特許にもなっている。毒性物質は、アポトーシスを起こさせたり、分化を誘導したりすることもできる。修飾した単糖は、本願に記載する免疫学的に活性な炭水化物にさらに結合することができ、このような炭水化物としては、患者に存在しないA血液型抗原またはB血液型抗原、Gal₃Gal₁-構造、他の抗炭水化物抗体（患者に存在する抗炭水化物抗体を含む）のリガンドあるいは免疫システムの防御レクチンのリガンドが挙げられる。

【0131】

免疫学的に活性な炭水化物の送達

免疫学的に活性な炭水化物は、天然のヒト抗体に認識されるオリゴ糖配列であってもよ

10

20

30

40

50

い。このような抗体が多数報告されている。天然のヒト抗体は、末端N - アセチルグルコサミン、N - アセチルマンノサミン、血液型抗原またはGal 3Gal - 構造などを認識する。抗体の機能は明らかになっておらず、上記オリゴ糖配列を保持している細菌による感染によって産生された可能性がある。A B O式血液型抗体は、輸血および臓器移植の実施を制限しており、これら抗体は移植片および輸血血液に存在する細胞を認識し、拒絶反応を生じる。同様に、抗Gal 3Gal - 抗体は、例えばブタからヒトへの異種移植も妨げる。

【0132】

先願は、末端N - アセチルグルコサミン配列がヒト腫瘍に存在し、これは天然抗体の潜在的な抗癌活性を意味することを示した。1価の化合物としては、オリゴ糖配列は有害ではない。天然の抗体によって認識されるオリゴ糖または炭水化物が多価の型で癌細胞/組織の表面に送達されると、オリゴ糖または炭水化物は天然抗体の標的となり、癌細胞または腫瘍の破壊をもたらされる。このような抗体は通常存在するため、末端GlcNAc - 構造およびGal 3Gal - 構造は一般的に使用可能である。特定の血液型抗原に対する抗体を保持する患者に存在する病原性物質 (pathogenenic agent) に血液型抗原を送達することができる。例えば、血液型がO型の患者はA血液型抗原およびB血液型抗原に対する抗体を通常保持し、血液型がA型の患者はB血液型抗原に対する抗体を通常保持し、そして血液型がB型の患者はA血液型抗原に対する抗体を通常保持している。P血液型のような他の血液型抗原システムが複数知られており、これらも本発明に従って用いることができる。癌細胞や微生物病原体 (細菌、ウイルスまたは寄生生物など) などの病因となるものに送達された抗原性の構造は抗体によって認識され、病原体の破壊をもたらす。

【0133】

天然の抗炭水化物抗体に加えて、炭水化物構造に対する特別な抗体をヒトに誘導することができる。種々の病原性の細菌や寄生生物の炭水化物エピトープに対する予防接種は、患者または将来的に患者となりうる対象生物に行うことが可能であり、また行われている。癌ワクチンによって癌に対する免疫を誘導する特定の方法も知られている。ワクチンが標的とする炭水化物構造は、自己免疫合併症を回避するために、患者自身が保持する非癌関連炭水化物構造と全く同一ではないことが好ましい。病因となるものに提示されているワクチン炭水化物エピトープを免疫学的活性および/または毒性を有する炭水化物として送達することにより、ワクチンエピトープに対する既存の免疫応答や、予防接種によって後に誘導される病原性物質に対する免疫応答を変化させることができる。このような方法は予防接種法として用いることもでき、免疫応答を予防接種によって別途誘導することは必ずしも必要ない。免疫学的活性および/または毒性を有する炭水化物が病因となるものの破壊をもたらす場合には、病因となるものに提示されている他の成分に対する免疫応答も誘導され、ワクチン効果が得られる。このような送達法も典型的な予防接種の効果を増加させるのに有用であり、免疫学的に活性な炭水化物は予防接種に用いたものと同じでも異なってもよい。本発明による方法はさらに、*ex vivo* / *in vitro*で、例えば赤血球などの細胞を特定の抗原構造で修飾するのに用いることができる。好ましい態様においては、修飾した赤血球を患者に再び導入し、抗原に対する免疫反応を誘導する。本発明の方法はさらに、*ex vivo* / *in vitro*でヒト癌から得た細胞や他の種類の試料を免疫応答誘導性のまたは抗原性の炭水化物結合体で修飾し、癌に対する免疫反応を増強するのに用いることができる。本発明はさらに、共有結合構造を有する修飾炭水化物の送達を用いて、ヒト癌細胞または赤血球から細胞をベースとした癌ワクチンを製造する方法に関する。本発明はさらに、炭水化物抗原および/または炭水化物構造を有する細胞の、*ex vivo* / *in vitro*での修飾に関する。これらは効果的な免疫結合体となる可能性が高い。

【0134】

本発明の最も一般的な形態においては、免疫システムに認識されるいかなる物質をも病因となるものの表面に送達することが可能である。炭水化物に加えて、このような物質としては、病因となるものの細胞表面に送達可能な、タンパク質ワクチン物質またはペプチドワクチン物質などのタンパク質抗原またはペプチド抗原、ペプチドグリカンの無害な部分あるいは細菌の脂質Aが挙げられる。さらに、補体タンパク質などの免疫システムの特

10

20

30

40

50

定の成分を送達することができる。タンパク質物質の結合体は自己免疫の問題を生じるので、結合化学 (conjugation chemistry) を計画する際にはこの点を考慮しなければならない。パラニトロフェニル基などの非天然エピトープの結合体に対して免疫反応を誘導することも知られており、本発明に従って用いることができる。非天然エピトープは単独でまたは非天然エピトープに対する予防接種型治療剤と組み合わせて、病因となるものに送達することができる。ターゲティングの技術が十分に優れている場合には、非天然エピトープを用いることは自己免疫反応の危険性を低減させることができる。免疫システムによって認識され得る非天然エピトープを以下に記載するような修飾した単糖の結合体として用いることができる。

【0135】

本発明によると、患者の有する防御レクチンに対する炭水化物レセプターも治療や診断に用いることができる。本発明で用いる免疫学的に活性な炭水化物には、マクロファージのマンノース結合タンパク質やコレクチンなどの患者の防御レクチン、またはナチュラルキラー細胞の防御レクチンによって認識され得る炭水化物が含まれる。マンノース結合タンパク質はさらにGlcNAcおよびフコースを含有する特定の分子、特に上記単糖残基が多価型で糖結合体の末端に存在する分子、も認識する場合がある。ナチュラルキラー細胞は、多価の末端GlcNAcにも結合するレクチンを有する。本発明によると、防御レクチンに対する炭水化物レセプターを病因となるものに送達することができる。防御レクチンの結合は、レクチンを付着させた組織、細胞またはウイルスに対する防御反応を導く。防御反応は、補体系、白血球 (マクロファージやナチュラルキラー細胞など)、または他の防御手段によって仲介されてもよい。

【0136】

免疫学的に活性な炭水化物はさらに、以下に記載するような毒性物質に結合し、病原物質に対する反応性を高めることができる。

【0137】

人体に適応させた抗体

癌の好ましい標的

本発明の治療法が癌および本発明で開示する末端GlcNAc - 癌抗原を標的とする場合、修飾したUDP-Galから癌細胞の細胞表面に修飾したGalを送達するために、ガラクトシルトランスフェラーゼ (4ガラクトシルトランスフェラーゼや3ガラクトシルトランスフェラーゼなど) を用いることができる。UDP-Galは、6位の炭素がスペーサーおよびGal-3Gal-糖エピトープによって修飾されていることが好ましい。他の一つの好ましい態様においては、UDP-Galは、本願に記載するようにGalの2位が修飾されている。修飾した単糖は、癌細胞に送達され、その後、癌細胞はGal-3Gal-糖に対する免疫反応によって破壊される。送達は、正常な血清に存在する4ガラクトシルトランスフェラーゼ、あるいは投与した、精製または組み換えヒト4ガラクトシルトランスフェラーゼを介して行うことができる。正常な血清は、O-グリコシド結合GalNAc (Tn-癌抗原) に対して転移反応を行う3ガラクトシルトランスフェラーゼも含んでおり、このような転移反応もまた、癌細胞に対して修飾単糖のターゲティングを行う。Helicobacter pylori、いくつかのNeisseria株やHaemophilus株などのように、複数のヒト病原体が哺乳類型オリゴ糖配列を保持することから、哺乳類のグリコシルトランスフェラーゼによってこれらの病原体に修飾した単糖を送達することができる。実際に、Neisseriaおよび寄生虫であるTrypanosoma bruceiは、病原状態においては、患者となりうる生体に由来するシアル酸を自らの表面に転移することが知られている。

【0138】

検出および診断

さらに、本発明は、本発明で定義した病因となるものまたは病因となる活性を検出する方法に関する。修飾した単糖を病因となるものに特異的に送達することにより、病因となるものの検出が可能となる。この目的のためには、単糖の修飾は毒性である必要はない。単糖は標識物質によって修飾され、このような標識物質には、例えば、抗体によって検出

10

20

30

40

50

可能な抗原、ビオチン、ジギトキシゲニン (digotoxigenin) やジギトキシシンなどのタグ物質 (tag substance)、またはローダミンやフルオレセインなどの蛍光性物質、化学発光活性を有する物質、燐光発生物質、および質量分析によって検出可能な特定の分子量マーカーなどの直接検出可能な物質が含まれる。

【0139】

好ましい態様においては、修飾した単糖は2つの標識化合物、より好ましくは、タグ物質と直接検出可能な物質、最も好ましくはビオチンなどのタグ物質と質量分析用標識、で標識する。標識物質は、スパーサーを介して修飾した単糖に結合していることが好ましい。本発明は、上記炭水化物を用いた、病因となるものおよびそれに関連した疾病の診断方法にも関する。本発明は特に、1つまたは複数の上記炭水化物を用いた、感染症、癌および悪性腫瘍の診断方法に関する。本発明は特に、免疫学的活性または毒性を有する炭水化物を用いた、感染症、癌および悪性腫瘍などの疾病の治療方法に関する。好ましくは、細胞表面炭水化物は、修飾した単糖で標識する。検出を目的とした修飾単糖は、グリコシル化のある種の先天性障害およびシアリル化が不十分なLDLの検出に有用である。特に有用なのは標識した糖ヌクレオチドである。

10

【0140】

具体的な態様においては、修飾した単糖をビオチンおよび質量分析用標識で標識する。修飾した単糖を少なくとも1種のグリコシルトランスフェラーゼ酵素、好ましくは4ガラクトシルトランスフェラーゼによって細胞調製物に送達し、ビオチン化した画分を精製し、精製した画分を質量分析によって分析し、グリコシルトランスフェラーゼアクセプターの発現量の差異を明らかにする。試料のタンパク質分解によって調製した糖ペプチドを質量分析計によって分析し同定することが好ましい。好ましい態様においては、種々の条件下における細胞のO-結合GlcNAc発現レベルの差異をこの方法を用いて検出する。同種の細胞または組織における差異を種々の条件下で検出することが好ましい。O-結合N-アセチルグルコサミンを検出するためには、細胞調製物に細胞内タンパク質が含まれることが不可欠である。O-結合GlcNAcは糖尿病などの別の病原状態と関連することが知られている。

20

【0141】

本発明で開示するターゲットオリゴ糖配列は、糖脂質の一部、糖タンパク質の一部および/またはN-アセチラクトサミン鎖の一部であってもよい。糖タンパク質中のオリゴ糖配列も、N-結合グリカンまたはO-結合グリカンの一部であってもよい。腫瘍の生合成経路および/または生分解経路の欠陥または変更は、本発明で開示するオリゴ糖配列を含んだ糖脂質および糖タンパク質の両方の合成をもたらす。「末端N-アセチルグルコサミン」は、オリゴ糖鎖中の非還元末端GlcNAc残基が他のいかなる単糖にも置換されていないことを意味する。「オリゴ糖配列」は、オリゴ糖配列中の少なくとも1つの単糖残基が、他の単糖残基からなるオリゴ糖鎖を含むより大きな糖結合体の一部であり、上記オリゴ糖鎖は分岐していてもよいし、天然の置換修飾物であってもよい。上記のオリゴ糖鎖は、通常、脂質アンカーまたはタンパク質に結合している。

30

【0142】

上記の治療方法または医薬組成物は、本発明で開示する癌特異的オリゴ糖配列を発現していると診断された癌の治療に用いることが特に好ましい。治療方法または医薬組成物は、癌の治療のための他の治療方法または医薬組成物と共に用いることができる。好ましい他の治療方法や医薬組成物としては、細胞成長抑制剤、抗血管形成薬、抗癌タンパク質(例えばインターフェロンまたはインターロイキン)または放射線療法が挙げられる。

40

【0143】

治療のための非修飾炭水化物の送達

具体的な態様においては、病原性防止炭水化物は天然型の単糖であり、*in vivo*で病原性誘導炭水化物レセプターに共有結合するように送達され、病原性誘導炭水化物レセプターを遮断する。病原性誘導炭水化物レセプターは、グリコシル化の異常により生じた欠陥グリコシル化産物、自己免疫疾患で生じる特別なグリコシル化産物、病原体-宿主相互作用

50

用におけるレセプター炭水化物または癌 - 患者相互作用、例えば転移におけるレセプター炭水化物である。好ましい態様においては、送達は疾病の治療のために *in vivo* で行われる。好ましくは天然型の糖ヌクレオチドが用いられる。天然型の糖ヌクレオチドは、異常なグリコシル化反応、自己免疫疾患、感染症、癌および悪性腫瘍の治療につながる。好ましくは、送達は1つまたは複数の病因となるものの表面で生じる。

【0144】

本発明により、*in vivo* でグリコシル基転移反応を行うことが可能であること、そしてそれが治療に有用であることが明らかになった。本発明によると、糖ヌクレオチドまたは糖ヌクレオチドと天然型のグリコシルトランスフェラーゼをグリコシル化に関連する疾病に罹っている患者に投与し、少なくとも部分的にグリコシル化の異常を治癒することもできる。例えば、いくつかの先天性グリコシル化異常は、それを保持する患者に適切な糖ヌクレオチドを投与することで、循環血液中の糖ヌクレオチドによって少なくとも部分的に治療することができる。特にこのような治療にはUDP-Gal、GDP-FucおよびGDP-Manが有用だが、場合により、他の糖ヌクレオチド、例えばUDP-GlcNAc、UDP-Glc、UDP-Xyl、UDP-GlcAおよびCMP-NeuNAcなども有用である。グリコシルトランスフェラーゼ反応の一部は、血清中の転移酵素により患者の血清で行われてもよい。

10

【0145】

糖ヌクレオチドの特定の活性化塩について記載する。糖ヌクレオチドの実質的に純粋なマンガン塩、マグネシウム塩、カルシウム塩または修飾した糖ヌクレオチドは、有用な医薬組成物、治療用組成物または栄養補助的組成物であり、本発明に従って使用することのできる組成物の調製にも有用である。本発明によると、 Mn^{2+} イオン、 Ca^{2+} イオンおよび/または Mg^{2+} イオンと共に糖ヌクレオチドまたは修飾した糖ヌクレオチドを包含する医薬組成物または治療用組成物も好ましい。これらのイオンは、グリコシルトランスフェラーゼ反応の活性化および/または患者体内における糖ヌクレオチドや修飾糖ヌクレオチドの分解からの保護が可能である。ホスファターゼ耐性だがグリコシル基転移活性型の特別な糖ヌクレオチド（例えば、公知文献に記載されている硫黄置換リン酸エステル型のUDP-Galの1種）を用いることができる。マンガン塩は神経毒性があるため、循環血液中では非常に低濃度でしか許容されない。しかし、少量のマンガン型糖ヌクレオチドを胃腸器系に用いる、例えば膀胱や直接腫瘍に注入することができる。全身用途のためには、糖ヌクレオチドのカルシウムイオン複合体および/またはマグネシウムイオン複合体を用いるか、あるいは許容されるカルシウム塩またはマグネシウム塩を糖ヌクレオチドと共に用いることが好ましい。好ましい態様においては、許容可能な最も高いレベルでカルシウムイオンまたはマグネシウムイオンを使用し、最も好ましくは、糖ヌクレオチドと複合体を形成している Ca^{2+} イオンと Mg^{2+} イオンおよび/または許容可能な糖ヌクレオチド塩を、 Ca^{2+} イオンと Mg^{2+} イオンの比が血清における天然の比率と同じになるように用いる。

20

30

【0146】

具体的な態様においては、シアリル化が不十分な低比重リポタンパク質 (LDL) による疾病を予防するために、血清中でN-アセチルノイラミン酸を、例えばCMP-NeuNAcからシアリル化が不十分なLDLに送達する。

【0147】

好ましい態様においては、単糖を宿主 - 微生物相互作用に關与する炭水化物レセプターに送達するために、1種または複数の糖ヌクレオチドをグリコシルトランスフェラーゼと共に用いる。先の出願には、胃の病原体である *Helicobacter pylori* に対する末端GlcNAc含有レセプターについて記載されており、その次の出願ではグリコシダーゼを阻害することにより、レセプターの合成を防止することが記載されている。本発明によると、UDP-Galとガラクトシルトランスフェラーゼを包含する組成物によって、*Helicobacter pylori* のレセプターへの接着を防止することが可能である。

40

【0148】

1種または複数の糖ヌクレオチドをグリコシルトランスフェラーゼと共に経口投与した場合、これらは *in vivo* でグリコシル化反応を起こして、例えばラクトースから、プロバ

50

イオティックまたは抗菌性のオリゴ糖や糖結合体を産生し、さらに患者の糖結合体にプロバイオティック細菌に対するレセプターを形成するか、または病原性細菌に対するレセプターを遮蔽する。

【0149】

本発明によると、糖ヌクレオチドを含有する機能性食品組成物を製造することができる。好ましい態様においては、機能性食品組成物は糖ヌクレオチドとグリコシルトランスフェラーゼとの両方を含有する。好ましい機能性食品組成物は乳児用食品であり、より好ましくは乳児用ミルクである。ヒト乳および他の哺乳類の乳は、糖ヌクレオチドとグリコシルトランスフェラーゼを含有することが知られていることから、患者と同じ種の天然型の物質は有用であり高い許容性を示す。

10

【0150】

1種または複数の糖ヌクレオチド、またはグリコシルトランスフェラーゼと組み合わせる糖ヌクレオチドの好ましい使用量は、乳から摂取する一日平均量(dose/kg)の5~500%の範囲内で変動する。糖ヌクレオチドは、GDP-Fuc、CMP-NeuNAc、UDP-GlcNAcおよびUDP-Galが好ましく、他の使用可能な糖ヌクレオチドとしてはGDP-Man、UDP-Xyl、UDP-GlcAおよびUDP-Glcが考えられる。糖ヌクレオチドに結合した単糖残基も細菌接着の直接的な阻害剤として有用である。糖ヌクレオチドとその分解産物(例えば、単糖-1-リン酸)は、遊離単糖などのいわゆる糖化最終産物(AGES)という非酵素的な糖化最終生成物を形成しないことから、天然型糖結合体として特に望ましいものであることが本発明によって初めて明らかになった。例えば、哺乳類にとっては、ヌクレオチドモノリン酸および糖ヌクレオチドが糖脂質以外の主な単糖結合体である。

20

【0151】

抗体、好ましくは動物から得た抗体の胃腸器系疾患関連分野および食品関連分野での用途

本発明は特に、本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する物質および抗体を用いた、患者、好ましくはヒトの患者、の胃腸器系疾患の治療方法に関する。ヒトの胃腸器系で用いる治療用の抗体は、動物によって産生された抗体、例えば家畜(具体的には家畜用反芻動物であるウシ、ヒツジ、ヤギまたはバッファローなど)の乳に含まれる抗体や、鶏卵の中で製造した抗体でもよい。公知の方法に従って、動物を腫瘍特異的炭水化物結合体によって免疫することができる。本発明は、ヒトの胃腸器系の腫瘍の抑制または破壊に用いることができる、他の許容される物質、好ましくは食品として許容されるタンパク質にも関し、このような物質としては、腫瘍特異的オリゴ糖配列に特異的な植物レクチンが挙げられる。本発明は、胃腸器系に存在する本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列を認識する抗体を含む機能性食品および食品添加剤に関し、さらに本発明は、食品として許容される他の物質(特に胃腸器系に存在する腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合するレクチン)を用いた機能性食品または食品添加剤にも関する。

30

【0152】

腫瘍特異的末端GlcNAcに結合する結合性物質のスクリーニング

本発明は特に、腫瘍特異的末端GlcNAc-オリゴ糖配列を用いた、上記オリゴ糖配列からなる構造に特異的な結合性物質のスクリーニングに関する。スクリーニングは、本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列に対する最適な結合性物質の検索を可能にする。特異的な結合性物質は、本発明で開示する上記グリカンに結合する治療用や診断用の抗体または他の分子であってもよい。

40

【0153】

本発明で開示するオリゴ糖配列に結合する結合性物質のスクリーニングは、酵素免疫測定法(いわゆるELISA分析)によって行うことができる。直接的な結合は、例えば結合性物質が末端GlcNAc-グリカン構造のいずれかを固相マトリックスに結合することで定量することができる。

【0154】

本発明で開示する遊離オリゴ糖またはオリゴ糖結合体は、特異的な阻害剤としてアッセ

50

イ法に用いることもできる。蛍光偏向の変化量 (Fluorescence polararization difference) や NMR は、本発明で開示するオリゴ糖配列に結合する結合性物質を液相からスクリーニングするための手法の例である。

【0155】

癌ワクチン

さらに、本発明によると、腫瘍特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体は、癌細胞または腫瘍細胞を抑制するか排除するための免疫応答を刺激するために、ヒトの癌または腫瘍に対するワクチンとして使用することができる。このような治療は必ずしも癌または腫瘍を根治するわけではないが、腫瘍による負担を軽減させたり、癌患者の病態を安定化したり、癌の転移能も低下させたりすることができる。ワクチンとして用いるためには、オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を、例えばタンパク質 (具体的には BSA または スカシガイヘモシアニン)、脂質またはリポペプチド、細菌の毒素 (具体的にはコレラ毒素または熱不安定毒素)、ペプチドグリカン、免疫活性多糖、あるいはワクチン分子に対する免疫反応を活性化する他の分子に結合させることができる。癌または腫瘍ワクチンは、医薬的に許容される担体および所望によりアジュバンドをさらに包含してもよい。適切な担体またはアジュバンドは、例えば免疫応答を刺激することが知られている脂質である。糖類あるいはその誘導体または類似体、好ましくは該糖類の結合体は、少なくとも一種の許容されるアジュバンド分子と共に癌患者に注射あるいは粘膜的 (例えば経口的または経鼻的) に投与することができる。癌または腫瘍ワクチンは、癌または腫瘍に対する治療方法において薬剤として使用することができる。このような方法は、ヒトの患者の治療に用いることが好ましい。また、この治療方法は、免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の癌または腫瘍の治療に用いることが好ましい。

10

20

【0156】

さらに、腫瘍特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌や腫瘍を治療するための医薬組成物を製造することができる。医薬組成物は、ヒトの患者の治療に用いることが好ましい。免疫抑制剤療法を受けているか、免疫不全に陥っている患者の癌または腫瘍の治療に医薬組成物を用いることが好ましい。上記の治療方法または医薬組成物は、本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列を発現していると診断された癌または腫瘍の治療に用いることが特に好ましい。治療方法または医薬組成物は、癌または腫瘍の治療のための他の治療方法または医薬組成物と共に用いることができる。好ましい他の治療方法や医薬組成物には、細胞成長抑制剤、抗血管形成薬、抗癌タンパク質 (例えばインターフェロンまたはインターロイキン) または放射線療法が含まれる。

30

【0157】

癌または腫瘍の診断および薬剤を癌に対してターゲティングするために抗体を用いる方法は、他の抗原やオリゴ糖構造と関連して開示されている (米国特許第 4,851,511 号、第 4,904,596 号、第 5,874,060 号、第 6,025,481 号、第 5,795,961 号、第 4,725,557 号、第 5,059,520 号、第 5,171,667 号、第 5,173,292 号、第 6,090,789 号、第 5,708,163 号、第 5,902,725 号および第 6,203,999 号)。癌特異的オリゴ糖を癌ワクチンとして用いることも、他のオリゴ糖配列に関連して開示されている (米国特許第 5,102,663 号、第 5,660,834 号、第 5,747,048 号、第 5,229,289 号および第 6,083,929 号)。

40

【0158】

治療方法および診断方法の組み合わせ

本発明は特に、ヒトの腫瘍または癌に存在する異常なグリコシル化構造および正常なグリコシル化構造の分析、ならびにその分析結果を用いた、本発明の治療用抗体または癌ワクチンの製造方法に関する。本発明は特に、以下の工程を包含する癌の治療方法に関する：

1. 患者の腫瘍化組織または癌化組織のグリコシル化産物を分析し、
2. 一部が癌化した組織の正常なグリコシル化産物を分析し、そして
3. 患者の癌に本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列が存在するが、正常組織の細胞表面には該腫瘍特異的オリゴ糖配列が提示されていないか、微量しか提示されていない場

50

合に、本発明の治療方法を実施する。

【0159】

腫瘍化組織および正常な組織のグリコシル化には個体差があるので、本発明で開示する腫瘍特異的構造の分析は、異常なグリコシル化構造と正常なグリコシル化構造とを組み合わせる。腫瘍の近傍に位置する正常な組織は、腫瘍により分泌された物質で部分的に汚染されていることもあるので、正常な組織のデータを分析する際には考慮したほうがよい。

【0160】

本発明で開示する抗原性物質は、担体に結合することができる。オリゴ糖を一価または多価の担体に結合する方法は当業界では知られている。癌特異的オリゴ糖配列あるいはその類似体または誘導体をその還元末端から担体分子に結合することが好ましい。担体分子を用いると、一つの担体に本発明で開示する多数の抗原性物質分子を結合することができるので、免疫応答の刺激および抗体結合効率が増大する。最適な抗体産生を達成するためには、分子量が10kDaよりも大きい結合体で、一般的に10個を超えるオリゴ糖配列を担持したものをを用いることが好ましい。

10

【0161】

本発明で開示するオリゴ糖配列は、例えばグリコシルトランスフェラーゼによって酵素的に合成するか、あるいはグリコシダーゼまたはトランスグリコシダーゼによって触媒されるグリコシル基転移反応で合成することができる(文献としてErnst *et al.*, 2000を参照)。これらの酵素の特異性および補因子(例えば糖ヌクレオチドドナー)の必要性については改良することができる。修飾した特定の酵素を用いてより効率よく合成することもでき、例えば、グリコシル基転移反応を触媒するが、グリコシダーゼ反応は触媒しない酵素を得ることができる。本発明で開示する糖類および糖結合体またはそれらと類似した化合物の有機合成も知られている(Ernst *et al.*, 2000)。炭水化物材料を天然の原料から単離して、化学的または酵素学的に修飾して本願で開示する化合物とすることができる。種々の反芻動物や他の動物の乳から天然のオリゴ糖を単離することができる。グリコシル化酵素を発現するトランスジェニックな生物、例えばウシや微生物も糖の製造に用いることができる。

20

【0162】

本発明で開示するオリゴ糖配列は、所望により担体と共に、患者の癌または腫瘍の治療に適切な医薬組成物に加えることができる。本発明によって治療することのできる病態の例としては、本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列を少なくとも一種発現している腫瘍からなる癌が挙げられる。治療可能な癌の症例は、患者から得た生物学的試料中に腫瘍特異的オリゴ糖の存在を検出することによって発見することができる。このような試料としては、例えば、生検材料や血液試料が挙げられる。

30

【0163】

本発明の医薬組成物は、他の物質、例えば不活性なベヒクルや医薬的に許容される担体や保存剤などの公知の物質を包含してもよい。

【0164】

本発明による抗原性物質または医薬組成物は、適当な方法で投与すればよい。治療用抗体またはワクチンの投与方法は公知である。

40

【0165】

本願において「治療」とは、疾患または病態を治癒または改善するための治療と、疾患または病態の発症を予防するための治療の両方を意味する。治療は急性的または慢性的に行うことができる。

【0166】

本願において「患者」とは、本発明による治療を必要とするいかなる哺乳類も意味する。

腫瘍特異的オリゴ糖または本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖を特異的に認識する化合物を診断または型の同定に用いる場合、例えば、オリゴ糖または化合物はプローブやテ

50

ストスティックに含まれていてもよく、所望により、テストキットの一部を構成してもよい。このようなプローブやテストスティックが、癌患者から得た抗体を包含する試料あるいは患者の癌細胞または癌化組織と接触すると、癌陽性試料の成分はプローブまたはテストスティックに結合し、試料から取り出されてさらに分析される。

【0167】

本願において「腫瘍」は、固形が多細胞腫瘍化組織を意味する。さらに、本願において「腫瘍」は、前悪性状態の組織であって、固形腫瘍に分化し、腫瘍に特異的な特徴を有するものを意味する。本願において「腫瘍」という用語は、白血病のような単一細胞癌、培養した癌細胞、またはそのような細胞のクラスターを意味するものではない。本発明は初期のヒト癌試料を対象とすることが好ましい。培養した癌細胞のグリコシル化反応は変化し、それは癌との関連性を通常は示さないことが知られている。さらにトランスフェクション、細胞培養用培地および単一細胞への固形腫瘍の分離はグリコシル化反応に劇的な影響を与える場合があることも知られている。治療においては、腫瘍特異的オリゴ糖または腫瘍特異的オリゴ糖配列（時に「癌特異的オリゴ糖/オリゴ糖配列」ということもできる）は全ての種類の癌および腫瘍の治療を目的としている。「癌」という用語は腫瘍も意味する。

10

【0168】

本発明は特に、本発明で開示する腫瘍特異的オリゴ糖配列を発現している全ての癌および腫瘍の治療に関する。好ましい癌の種類としては、喉頭癌、結腸癌、胃癌および肺癌が挙げられる。特にN-グリカン型末端GlcNAcが関連する本発明の治療法および組成物は、このような種類の癌に対して好ましい。肺癌は、タンパク質結合GlcNAcに関連した本発明の治療法および組成物の好ましい標的である。O-グリカン型物質は、特に卵巣癌および粘液性癌（特に卵巣腺癌）に対する本発明の治療方法および組成物に用いることが好ましい。好ましい態様においては、ポリ-N-アセチルラクトサミン型末端GlcNAc-構造を副腎腫である癌の治療および診断に用いる。本発明は特に、本発明で開示する末端GlcNAc-構造をその表面に発現しているいかなる種類の癌および腫瘍に対する本発明の治療の実施に関する。

20

【0169】

糖脂質および炭水化物の命名は、IUPAC-IUB生化学命名委員会の推奨する命名法（*Carbohydr. Res.* 1998, 322:167; *Carbohydr. Res.* 1997, 297:1; *Eur. J. Biochem.* 1998, 257:29）に従った。

30

【0170】

Gal、Glc、GlcNAc および NeuNAcはD型であり、FucはL型であり、全ての単糖残基はピラノース環構造であるものとする。グルコサミンはGlcNと表し、ガラクトサミンはGalNと表す。グリコシド結合は略記で示す場合と正式名称で示す場合とあり、NeuNAc残基の3および6結合はそれぞれ2-3および2-6結合と同じである。1-3、1-4および1-6結合はそれぞれ3、4および6と略すことができる。ラクトサミン、N-アセチルラクトサミンまたはGal_{3/4}GlcNAcは、1型構造残基であるGal₃GlcNAcおよび2型構造残基であるGal₁₋₄GlcNAcのいずれかを表し、シアル酸はN-アセチルノイラミン酸またはNeuNAcであり、Lacはラクトースを表し、Cerはセラミドを表す。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0171】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0172】

細菌の培養および標識

GlcNAc認識GafDアドヘシンを発現している、組み換えG-繊毛保有（G-fimbriated）*Escherichia coli* IHE11088(pRR-5)株（Rhen, M. et al., 1986）を、テトラサイクリン（25 μg/ml）および10 μlの[³⁵S]-メチオニン（400 mCi；英国、リトル

50

チャルフォント、Amersham Pharmacia Biotech製)を含有するルリア培地中で37で一晚培養した。細菌を遠心分離で回収してリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.2)で二回洗浄し、 1×10^9 CFU/mlになるようにPBSに再懸濁した。比活性は約100 CFU/cpmだった。

【0173】

Erythrina cristagalli由来レクチンの標識

Erythrina cristagalli由来のGal 4GlcNAc - 結合レクチン(Teneberg et al., 1994)をVector Laboratories Inc.(カリフォルニア州、バーリングゲーム)から購入した。一つが100 µgの複数のタンパク質標本を 125 Iで標識した。具体的には、Na 125 I(100 mCi/ml; Amersham Pharmacia Biotech製)とIODO-GEN試薬(イリノイ州、ロックフォード、Pierce製)を用いて、製造者のプロトコールに従って標識した。約 5×10^3 cpm/µgタンパク質の標識レクチンが得られた。

10

【0174】

グリコフィンゴ脂質結合アッセイ

薄層クロマトグラムで分離したグリコフィンゴ脂質に対する、放射性標識した細菌およびレクチンの結合を、公知の方法(Teneberg et al., 1994; Hansson et al., 1985)に従って行った。グリコフィンゴ脂質の薄層クロマトグラフィーは、アルミニウムで裏打ちしたシリカゲル60 HPTLCプレート(ドイツ国、ダルムシュタット、Merck製)上で、クロロホルム/メタノール/水(容量比は60:35:8)を溶媒系として行った。乾燥したクロマトグラムを、0.5%(w/v)ポリイソブチルメタクリレート(ウィスコンシン州、ミルウォーキー、Aldrich Chem. Comp. Inc.製)を含有するジメチルエーテル/n-ヘキサン(容量比は1:5)に1分間浸した。乾燥後、クロマトグラムを2%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1%(w/v)NaN₃を含有するPBSに室温で2時間浸漬した。続いてクロマトグラムを、PBSで希釈した放射性標識細菌($2 \sim 5 \times 10^6$ cpm/ml)または放射性標識レクチンのBSA溶液(2×10^3 cpm/ml)で被覆した。室温で2時間インキュベートし、PBSで繰り返し洗浄した。その後クロマトグラムをXAR-5 X線フィルム(ニューヨーク州、ロチェスター、Eastman Kodak製)に12時間露光させた。

20

【実施例2】

【0175】

末端GlcNAc構造の腫瘍特異性の説明

放射性標識したG-繊毛保有Escherichia coliを用いて薄層オーバーレイアッセイを行い、種々の腫瘍および正常組織のスクリーニングを行った。E. coli IHE11088(pRR-5)株は、末端GlcNAc - 構造を特異的に認識する(Rhen, M. et al. 1986)。結合活性のある糖脂質は、検討した副腎腫である4つの腫瘍の1つに由来する非酸性画分から検出された(図1)。これに対応するヒトの正常な腎臓由来の非酸性グリコフィンゴ脂質からなる画分やここで検討した対照組織には、上記結合は見られなかった。

30

【実施例3】

【0176】

ヒトの副腎腫由来の末端GlcNAc - 構造の特徴づけ

ヒトの副腎腫である腫瘍に由来する非酸性グリコフィンゴ脂質を分画し、薄層オーバーレイアッセイによってGlcNAc - 特異的G-繊毛保有E. coli(図1A)および末端Gal 4GlcNAc - 構造を認識するErythrina cristagalliレクチン(図2B)のそれぞれによる結合を分析した。2種の結合試薬のそれぞれに結合するグリコフィンゴ脂質種の一部は重複している。このデータは、末端GlcNAc - 種の大部分がN-アセチルラクトサミン型非酸性グリコフィンゴ脂質に存在することを示す。レクチン結合活性種とは重複しない末端GlcNAc - 種においては、その末端構造は、N-アセチルラクトサミンをGlcNAcで誘導化したもの(例えば、GlcNAc 3Gal 3/4GlcNAc -)である可能性が最も高く、拡散したバンドも、異性体であるGlcNAc 6Gal 3/4GlcNAc -の存在を示すと考えられる。この試料には、1つの糖脂質に末端GlcNAcおよびN-アセチルラクトサミンの両方が存在する希

40

50

少な種も含まれていると考えられる。これは分岐構造、例えばGal 3/4GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 3/4GlcNAc -およびGlcNAc 3(Gal 3/4GlcNAc 6)Gal 3/4GlcNAc -の存在を示し、グリコスフィンゴ脂質のサイズ分布は、2つまたはそれ以上の末端GlcNAcを有する糖脂質種の存在も示すと考えられる。Erythrina cristagalliレクチンの結合は、ほとんどのラクトサミンがおそらく2型N - アセチルラクトサミン構造であるGal 4GlcNAcを有することを示す。

【0177】

パーメチル化後の糖脂質をF A B質量分析法およびE I質量分析法によって部分的に分析したところ、末端HexNAcの存在を示し、さらに末端GlcNAcを含む最も小さい糖脂質種が五糖グリコスフィンゴ脂質であり、おそらくはラクト系またはネオラクト系であることを示した。また、七量体およびより大きな十五量体までの構造も観察された(図1)。レクチンの結合は、ラクトサミンの大部分がおそらくは2型N - アセチルラクトサミン構造を有する可能性が高いことを示す。

10

【実施例4】

【0178】

タンパク質結合構造の調製およびガラクトシルトランスフェラーゼによる標識のための材料と方法

ホルマリン固定化組織試料またはホルマリン固定化・パラフィン包埋組織試料からのグリカン類の単離

ホルマリン固定化試料からグリカンを単離する前に、Manzi et al. (2000)の記載と実質的に同様にクロロホルム - メタノール抽出を行うことでタンパク質を濃縮した。糖タンパク質の定量的抽出は、放射性標識標準糖タンパク質によって確認した(データは示さない)。ホルマリン固定化・パラフィン包埋試料からグリカンを単離する前に、試料を脱パラフィン処理に付した。糖タンパク質試料から非還元的脱離法でグリカンを分離し、クロマトグラフィーにより精製した。

20

【0179】

MALDI - TOF質量分析

MALDI - TOF質量分析(MALDI - TOF MS)は、Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstationを用い、Saarinen et al. (1999)、Papac et al. (1996)およびHarvey(1993)の記載と実質的に同様に行った。

30

【0180】

エキソグリコシダーゼ消化

全てのエキソグリコシダーゼ反応をNyman et al. (1998)およびSaarinen et al. (1999)の記載と実質的に同様に行い、結果はMALDI - TOF質量分析法で分析した。使用した酵素とそれによって特徴付けられるオリゴ糖を用いた特異的な対照反応を以下に示す：
- N - アセチルグルコサミニダーゼ (Streptococcus pneumoniae由来、E. coli組み換え体；米国、Calbiochem製)は、GlcNAc 1-6Gal-Rを消化したが、GalNAc 1-4GlcNAc 1-3/6Gal-Rは消化しなかった；
1, 4 - ガラクトシダーゼ (Streptococcus pneumoniae由来、E. coli組み換え体；米国、Calbiochem製)は、Gal 1-4GlcNAc-Rを消化したが、Gal 1-3GlcNAc-Rは消化しなかった；
- マンノシダーゼ(ナタマメ由来；英国、Glyko製)は高マンノースN - グリカン類からなる混合物をMan₁GlcNAc₂N - グリカンコア三糖に転換した。対照の消化反応も分析用のエキソグリコシダーゼ反応と並行して行い、その結果も同様に分析した。

40

【0181】

UDP-GalN - ビオチンの合成

UDP - ガラクトサミン(UDP-GalN)を、UDP-Glcおよびガラクトサミン - 1 - リン酸からガラクトース - 1 - リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(E.C. 2.7.7.12；米国、Sigma製)の作用により合成する。典型的な合成プロトコールを以下に示す。反応混合物は、10 mMのガラクトサミン - 1 - リン酸、20 mMのUDP-Glc、5 U / mlのガラクトース - 1 - リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、100 mMのNa - HEPES (pH 8 .

50

0)、5 mMのMgCl₂および5 mMのβ-メルカプトエタノールを含有する。反応容器を窒素雰囲気下、室温で3日間インキュベートし、その後、Maki et al. (2002)の記載と実質的に同様に、黒鉛化炭素のカラム(graphitised carbon column)を用いて糖ヌクレオチドを反応混合物から単離する。UDP-GlcおよびUDP-GalNを含有する糖ヌクレオチド混合物を、過剰モル量のヘキサノ酸スルホスクシニミジル-6-(ピオチンアミド)(sulfo-NHS-LC-ピオチン; 米国、Pierce製)を含む50 mMのNH₄HCO₃中で、室温で2.5時間インキュベートする。生成物であるUDP-GalN-ピオチン(即ち、ウリジン5'-ニリン酸-N-(6-ピオチンアミドヘキサノイル)ガラクトサミン)をゲルろ過および逆層HPLCによって精製する。

【0182】

UDP-GalN-ピオチンによる、オリゴ糖中および組織切片中の末端GlcNAc残基の標識

Ramakrishnan and Qasba (2002)に記載の酵素に類似する組み換え1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて、N-(6-ピオチンアミドヘキサノイル)ガラクトサミンをUDP-GalN-ピオチンから末端GlcNAc含有アクセプターへ転移することができる。典型的な方法においては、オリゴ糖アクセプター(例えばGlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc)または脱パラフィンした、ホルマリン固定化・パラフィン包埋組織切片を、10 mMのUDP-GalN-ピオチン、160 U/lの酵素、100 mMのTris-HClおよび20 mMのMnCl₂を含有する反応混合物と共に+37°Cでインキュベートする。洗浄後、ストレプトアビジン結合試薬またはアビジン結合試薬、例えばストレプトアビジン-FITC、を用いて、当業界では標準的な方法によってピオチン基を視覚化する。

【0183】

UDP-[¹⁴C]Galによる組織片中の末端GlcNAc残基の標識

ホルマリン固定化・パラフィン包埋組織切片を脱パラフィンし、UDP-[¹⁴C]Gal、200 U/lのウシ乳1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(米国、Calbiochem製)、50 mMのNa-MOPS(pH 7.4)および20 mMのMnCl₂を含有する反応混合物中、+37°Cでインキュベートした。洗浄後、標識した組織切片をオートラジオグラフィに付した。Nyman et al. (1998)の記載と実質的に同様の方法に従って、*Chryseobacterium meningosepticum* N-グリコシダーゼF(米国、Calbiochem製)を用いて組織切片からN-グリカンを分離した。クロマトグラフィは、図7Aおよび図7Bに関する「図面の簡単な説明」の欄に記載したように行った。

【実施例5】

【0184】

肺腺癌試料由来の癌関連末端GlcNAc含有N-グリカン

腫瘍およびその周囲の健康な組織のホルマリン固定化試料を、肺腺癌の患者から調製した。腫瘍試料(図3A)と健康組織の試料(図3B)のそれぞれから単離した中性N-グリカン、具体的には、m/z 1485.48に観測される、[Hex₃HexNAc₄Fuc₁+Na]⁺イオン(計算値:m/z 1485.53)に相当するピークにおいて、有意な差が見られた。このグリカンのピークの相対強度は、健康な組織と比較して、腫瘍試料では6.1倍以上も増加した。さらに、m/z 1647.53に観測される、[Hex₄HexNAc₄Fuc₁+Na]⁺イオン(計算値:m/z 1647.59)に相当するピークは、腫瘍試料においてはより高いシグナル強度を示していた。β-N-アセチルグルコサミニダーゼ消化の際には(図3C)、2種のピークはそれぞれ、m/z 1079.18に観測される[Hex₃HexNAc₂Fuc₁+Na]⁺イオン(計算値:m/z 1079.38)に相当するピーク、およびm/z 1444.24に観測される[Hex₄HexNAc₃Fuc₁+Na]⁺イオン(計算値:m/z 1444.51)に相当するピーク、に完全に变化し、これは末端β-GlcNAc残基の存在を示す。ナタマメ由来β-マンノシダーゼ消化の際には(図3D)、これらのピークはそれぞれ、m/z 755.19に観測される[Hex₁HexNAc₂Fuc₁+Na]⁺イオン(計算値:m/z 755.27)に相当するピーク、およびm/z 1282.29に観測される[Hex₃HexNAc₃Fuc₁+Na]⁺イオン(計算値:m/z 1282.45)に相当するピーク、にさらに变化した。しかしながらβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ消化の前にβ-マンノシダーゼ消化を実施しても、2種のピークに影響を与えることはなく、これは、β-Man残基は末端β-GlcNAc残基に隣接して存在することを示して

10

20

30

40

50

いる。さらに、もとの中性グリカン試料の 1, 4 - ガラクトシダーゼ消化によって、 m/z 1647.5に観測されるピークが m/z 1485.5に観測されるピークに変化したことは、末端Gal 1-4GlcNAc単位の存在を示す。これらの結果を全て考慮すると、肺腺癌腫瘍試料には、周囲の健康な組織と比較して、非常に増加した量の複合N - 結合グリカンコア構造であるGlcNAc -Man 1-6(GlcNAc -Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAcを含有し、該構造のモノ - 1, 4 - ガラクトシル化誘導体 (GalがGlcNAcに結合している) の量も若干増えていることが示唆された。

【実施例 6】

【0185】

癌試料における末端GlcNAc含有N - グリカンの出現

10

種々の腫瘍試料および健康な対照試料における上記構造の出現を、中性グリカン画分の単離と分析をMALDI - TOF MSとエキソグリコシダーゼ消化を行うことで検討した。検討した腫瘍 - 対照のペアは次の通りである：7種の肺癌試料ペアおよび各一種の結腸癌、胃癌および喉頭癌のペア。分析の結果、全てのペアにおいて、 m/z 1485.5に観測される2つの末端GlcNAcを含有するN - グリカンの相対的な存在量が、癌試料では上昇することが判明した。しかしながら、健康な組織と癌化組織の両方に、このグリカンエピトープの発現レベルに有意な個体差が存在した。表1に、 m/z 1485.5に観測されるN - グリカンの特徴的な発現を、単離した中性グリカン類からなる画分と関連してまとめた。

【実施例 7】

【0186】

20

UDP-GalN - ビオチンの合成

UDP - ガラクトサミンを、上記の「タンパク質結合構造の調製およびガラクトシルトランスフェラーゼによる標識のための材料と方法」の欄に記載したように合成した。生成物をMALDI - TOF MSで特徴付けたところ ($[C_{15}H_{25}N_3O_{16}P_2-H]^-$ イオンの実測値は m/z 564.42であり、計算値は m/z 564.31) (図4A)、予想されたピークは、マススペクトルにおいて、UDP-Glcのピーク ($[C_{15}H_{24}N_2O_{17}P_2-H]^-$ イオンの実測値は m/z 565.37であり、計算値は m/z 565.29) よりも1質量単位小さい位置に現れた (図4A)。粗糖ヌクレオチド調製物をビオチン化試薬、即ち、ヘキサノールスクシニミジル - 6 - (ビオチンアミド) と反応させた。反応後、予想された生成物を反応混合物の質量分析スペクトルに観察することができた ($[C_{31}H_{50}N_6O_{19}P_2S-H]^-$ イオンの実測値は m/z 902.93であり、計算値は m/z 903.76) (図4B)。UDP-Glcはビオチン化試薬とまったく反応しなかった。合成したUDP-GalN - ビオチン (即ち、ウリジン5' - ニリン酸 - N - (6 - ビオチンアミドヘキサノイル) ガラクトサミン) を、GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc および Ramakrishnan and Qasba (2002) に記載の酵素と類似の組み換え 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼと反応させた。生成物である [N - (6 - ビオチンアミドヘキサノイル) ガラクトサミン] 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc を MALDI - TOF MS を用いて特徴付けた ($[M+Na]^+$ イオンの実測値は m/z 1433.38であり、計算値は m/z 1433.55)。これらの結果を全て考慮すると、合成した生成物は予想通りの構造を有することが判明した (図5)。生成物は、均質になるまでクロマトグラフィーで精製した。

30

40

【実施例 8】

【0187】

UDP- $[^{14}C]$ Gal および UDP-GalN - ビオチンによる、組織切片中の末端GlcNAc残基の標識

脱パラフィンしたホルマリン固定化・パラフィン包埋組織切片を、UDP- $[^{14}C]$ Gal およびウシ乳 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて、「タンパク質結合構造の調製およびガラクトシルトランスフェラーゼによる標識のための材料と方法」の欄に記載したように放射性標識した。オートラジオグラフィーによって、腫瘍試料と健康組織試料の間にはっきりとした差異が示され (図6)、肺腺癌試料においては、末端GlcNAc残基の量が非常に上昇していることが判明した。同様の結果は、「タンパク質結合構造の調製およびガラクトシルトランスフェラーゼによる標識のための材料と方法」の欄に記載したよう

50

に、UDP-GalN - ビオチン試薬としてストレプトアビジン - FITCを用い、蛍光顕微鏡観察を行うことでも得られた。重要なことは、癌細胞はこのビオチン化試薬で標識できることである。

【実施例 9】

【0188】

肺腺癌試料からの $[^{14}\text{C}]$ Gal標識オリゴ糖の単離

肺腺癌試料およびその周囲の健康な組織の組織切片を上記のように $[^{14}\text{C}]$ Galで標識した後に、標識したオリゴ糖をN - グリコシダーゼF消化および非還元的 - 脱離反応のそれぞれで単離した。N - グリコシダーゼFで遊離した肺腺癌由来グリカンのゲルろ過クロマトグラム(図7A)においては、1つのピークだけが見られ、それは標準N - グリカンであるGal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6(Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc および Gal 1-4[GlcNAc 1-2Man 1-6(GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc]と共に溶出した。このピークをプールし、多孔性黒鉛化炭素のカラムを用いたHPLCに付したところ、1つの大きなピークと二つの小さなピークに分割された(図7B)。総放射能のほぼ全てを含む大きなピークは、標準N - グリカンであるGal 1-4[GlcNAc 1-2Man 1-6(GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc]と共に溶出した。

【0189】

肺腺癌から非還元的 - 脱離法により遊離した材料のゲルろ過HPLCクロマトグラム(図7C)においては、総放射能の45%を含む幅広いピークが、移動相の容量(void volume)(8ml)と標準N - グリカンであるGal 1-4[GlcNAc 1-2Man 1-6(GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc]の溶出時間との間で溶出した。この幅広いピークをプールし、全ての糖ペプチド材料を保持するが、遊離のオリゴ糖の定量的な溶出が可能な強カチオン交換材料のカラムと C_{18} シリカのカラムに通した。その結果、プールした画分中のほぼ80%の放射能がカラムに保持され、これは、幅広いピークは $[^{14}\text{C}]$ Gal標識グリカン部分が分離されていないアルカリ - 遊離糖ペプチドと実際に対応することを示した。残りの放射能の大部分は、上記のN - グリカン構造に対応することが判明したが、他の標識オリゴ糖の存在を否定することはできなかった。総放射能の55%を含むゲルろ過HPLCクロマトグラムの大きなピークは、標準N - アセチルラクトサミン(LacNAc)と共に溶出した。

【実施例 10】

【0190】

癌試料由来のタンパク質結合GlcNAc

さらに、15 ~ 18分に溶出した画分をプールしたものを、黒鉛化炭素のカラムを用いたHPLCに付したところ、主要なピークがLacNAcと共に溶出した。これは、試料が塩基不安定GlcNAc単糖 - タンパク質結合体(最も可能性が高いのはGlcNAc -O-Ser/Thr単位)を含有することを示唆している。重要なことには、肺腺癌試料における $[^{14}\text{C}]$ - 標識LacNAcの存在量は、その周囲の健康組織の試料と比較した場合に、有意に(1.99倍にも)増加していた。

【0191】

これらの結果をまとめると、UDP- $[^{14}\text{C}]$ Gal標識肺腺癌試料組織切片から遊離することのできる総放射能の約半分は、 $[^{14}\text{C}]$ Gal標識型の癌関連N - グリカン(即ち、GlcNAc -Man 1-6(GlcNAc -Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4(Fuc 1-6)GlcNAc)であることが判明した。さらに、UDP-GalN - ビオチン反応においても、標識は上記の記載で特徴付けられたオリゴ糖構造に転移されることは明らかである。

【実施例 11】

【0192】

ヒト血清からの抗GlcNAc抗体の単離

粘液性卵巣腺癌から回復したヒトから得たヒト血清を、エピトープであるGlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc またはGal 1-4GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc を共有結合でカップリ

10

20

30

40

50

ングさせたセファロースカラムに通した。カラムを洗浄した後、初めに 0.5 M の GlcNAc を含有する緩衝液で特異的に溶出させ、次に酸性緩衝液で非特異的に溶出させた。対照として、健康な提供者、即ち悪性疾患の病歴のないヒト、からプールしたヒト血清から調製した IgG 調製物も上記のカラムクロマトグラフィー工程に付した。回収した画分を還元条件下の SDS-PAGE 分析に付した (図 8)。その結果、標準 IgG の H 鎖および L 鎖の分子量に類似した相対分子量を有するタンパク質に対応する 2 つのバンドが、GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc セファロースカラムからの 0.5 M の GlcNAc による特異的溶出で溶出したが、これは癌から回復したヒトから得た血清試料のみで見られた。対照的に、このような特異的な溶出は、二種の試料を Gal 1-4GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc セファロースカラムクロマトグラフィーにかけても検出できなかった。それらの相対分子量から、特異的に溶出したタンパク質は IgG ヒト抗体または IgA ヒト抗体の H 鎖および L 鎖のサブユニットを示すが、IgM ヒト抗体の H 鎖および L 鎖のサブユニットではないと考えられる。上述の結果は、癌から回復したヒトの血清中には、上昇したレベルの末端 GlcNAc 特異的抗体、より具体的にはグリカンエピトープである GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc を認識する IgG 抗体および / または IgA 抗体、が存在することを示す。

10

【実施例 12】

【0193】

ヒトの癌腫において減少した、中性 N - および O - グリカンのガラクトシル化の定量と統計的評価

ガラクトシル化度の算出

20

ガラクトシル化度 (galactosylation degree) の定量のために、非小細胞肺癌腫およびそれに対応する健康肺組織より得た対照試料から、上述の方法で非シアリル化グリカン画分を単離し、MALDI-TOF 質量分析法で解析した。ガラクトシル化度は次のように計算した。マススペクトル中の 3 つのピーク、即ち、 m/z 1485.5 (2 つの非還元末端 N - アセチルグルコサミン残基を有する $[\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1\text{Na}]^+$ イオンに相当)、 m/z 1647.6 (1 つの非還元末端 N - アセチラクトサミン基および 1 つの非還元末端 N - アセチルグルコサミン残基を有する $[\text{Hex}_4\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1\text{Na}]^+$ イオンに相当) および m/z 1809.6 (2 つの非還元末端 N - アセチラクトサミン基を有する $[\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{dHex}_1\text{Na}]^+$ イオンに相当)、の相対強度 (I) をそれぞれ測定した。これらのグリカン成分の非還元末端残基は、ナタマメ由来グルコサミニダーゼによる消化に対する感受性から N - アセチルグルコサミン、または - ガラクトシダーゼ消化に対する感受性から N - アセチラクトサミンであると既に同定されている。ガラクトシル化度 (DG) は、側鎖 N - アセチルグルコサミン残基の総量に対する、ガラクトシル化された側鎖 N - アセチルグルコサミン残基の量の関数として、以下の式に基づいて計算した。

30

$$DG = (I_{1647.6} + 2 \times I_{1809.6}) : (2 \times I_{1485.5} + 2 \times I_{1647.6} + 2 \times I_{1809.6}) \times 100 \%$$

【0194】

統計的計算

統計解析は SAS ソフトウェア (SAS システム、バージョン 8.2) (米国、ノースカロライナ州、ケアリー、SAS Institute Inc. 製) で、SAS/STAT モジュールおよび SAS/BASE モジュールを用いて行った。実施した全ての検定を両側検定とした。実験データの分布が 1) 正規・対称分布、2) 対称分布のみ、または 3) 非対称・非正規分布であるとして評価し、各分布に適した検定法として 1) Student の t - 検定、2) Wilcoxon の符号順位検定および 3) 符号検定を用いた。p 値が 0.05 未満の場合には、統計学的に有意であると判断した。

40

【0195】

中性モノフコシル化 2 本鎖 N - グリカン類のガラクトシル化度は、非小細胞肺腺癌腫において有意に減少している

乱数的に選択した 7 人の非小細胞肺腺癌腫患者からなる一群より得た腫瘍試料の全てにおいて、同じ患者から得た対照試料に比べて、中性モノフコシル化 2 本鎖 N - グリカン類

50

のガラクトシル化度が減少していた。この差異は統計的に有意である (Wilcoxonの符号順位検定において $p = 0.0156$)。また、上述した、マススペクトルに見られる腫瘍試料と健康組織試料との差異は、同じ試料から調製した組織切片の放射線化学的染色結果と相関した。この放射線化学的染色結果は、 ^{14}C で標識したウリジンニリン酸ガラクトースとウシ乳 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼとを用いる、試料糖タンパク質中の非還元末端 N - アセチルグルコサミン残基を定量するために設計したガラクトシルトランスフェラーゼ反応によって得られたものである。さらに、放射線化学的染色結果に見られる腫瘍試料と健康対照試料との差異は、対応するガラクトシル化度の差異が最も大きい時に最大となった。この結果は、腫瘍のガラクトシルトランスフェラーゼ感受性非還元末端 - N - アセチルグルコサミン残基の総量と、組織から単離したグリカン類について得られたマススペクトル分析結果とを相関させることを可能とした。

10

【0196】

個体肺癌腫 (individual lung carcinoma)、胃腸癌腫および副腎腫の患者において、糖タンパク質の非還元末端ガラクトシル化が重度に減少している

肺癌腫試料における一般的なガラクトシル化度の減少に加え、他の患者群より得た試料の分析結果には、この減少が非常に著しいものも存在した。このような試料においては、 m/z 1485.5に観測される N - グリカンのピークは、マススペクトル中で1番または2番目に多く観測される中性グリカンシグナルであり、これはシグナルに相当するグリカン構造が腫瘍細胞の糖タンパク質中に特異的に蓄積されていたことを示す。同様の現象が、腎癌腫および胃腸癌腫の個々の患者より得た腫瘍試料でも検出され、肺癌腫に限られた現象ではないことを示した。既にその糖脂質構造が分析され、減少したガラクトシル化によって特徴付けられる糖脂質を含有することが知られている副腎腫に関しては、非還元末端 - N - アセチルグルコサミン含有 N - グリカンの蓄積は、副腎腫の患者から単離した腫瘍タンパク質結合グリカンも特徴付けた。後者の糖タンパク質と糖脂質構造との相関関係は、我々の観察した非還元末端 - N - アセチルグルコサミン含有糖結合体の蓄積が、種々の型の癌に見られるガラクトシル化反応の一般的欠陥によって生じるものであることをさらに示唆した。

20

【0197】

O - および N - 結合糖タンパク質グリカン類の非還元末端ガラクトシル化が重度に減少した、個体肺癌腫患者の腫瘍試料

30

非小細胞肺腺癌腫患者の腫瘍試料について、試料中に検出される種々の N - アセチルグルコサミニダーゼ感受性構造体の構造を明かにするために詳細に検討した。健康な肺試料に比べて、パラフィン包埋・ホルマリン固定化腫瘍試料より調製した非シアリル化グリカン画分のマススペクトルは、 m/z 609.23 (Hex₁HexNAc₂ に相当し、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ イオンに基づく計算値は m/z 609.21) に観測されるシグナル量の有意な上昇を示した。このシグナルは、以下に説明する特異的エキソグリコシダーゼ消化反応および反応生成物の MALDI - TOF 質量分析 (マススペクトルは示さない) によって、特定のムチン型 O - グリカンに帰属されるものである。上記のグリカンシグナルはナタマメ由来の - マンノシダーゼ消化には感受性を示さないが、一方、同じ試料中に存在する、それぞれ分子式: Man₃₋₈GlcNAc₂ および Man₂₋₃GlcNAc₂Fuc₁ で表される2種の高マンノース型 N - グリカンに相当するシグナルは、Hex₁HexNAc₂ に相当する m/z 609.16のピークと Hex₁HexNAc₂Fuc₁ (計算値: m/z 755.27) に相当する m/z 755.22のピークにそれぞれ変換された。同様に、- マンノシダーゼ消化も特定のピークに影響を与えることはなかった。しかし、*S. pneumoniae* 由来の - N - アセチルグルコサミニダーゼは、 m/z 609.23に観測されるピークを分割し、Hex₁HexNAc₁ (計算値: m/z 406.13) に相当する m/z 405.77のピークに変換した。この結果は、グリカン構造中に非還元末端 - N - アセチルグルコサミン残基が存在することを意味する。さらに、組み換え 1, 3 - ガラクトシダーゼは上述のピークの一部を、HexNAc₂ (計算値: m/z 447.16) に相当する m/z 447.16のピークに変換した。本発明のデータは、 m/z 609.23に観測されるピークを構成する主要な成分であるグリカンは、非還元末端 - N - アセチルグルコサミン残基と非還元末端 1, 3 - 結合ガラクトース残基の両

40

50

方を含むことを示し、さらにO-グリカンコア2三糖構造であるGlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAcを含むことも示す。健康な肺組織試料と比べて、対応する腫瘍のシアリル化グリカン画分のマススペクトルには、上述の中性三糖のシアリル化産物に帰属されるシグナル、即ち、m/z 876.27に観測される、NeuAc₁Hex₁HexNAc₂に相当するピーク([M-H]⁻イオンに基づく計算値はm/z 876.31)の有意な上昇を示した。このデータは、上記のグリカンシグナルが、同じ試料から他の中性グリカン類と共に検出されるコア2 O-グリカンエピソードのシアリル化型、即ち、GlcNAc 1-6(Neu5Ac 2-3Gal 1-3)GalNAc、に相当することを示した。

【0198】

*S. pneumoniae*由来の -N-アセチルグルコサミニダーゼの作用によって、同じ試料の非シアリル化グリカン画分に見られるピークは変化した。具体的には、Hex₃HexNAc₄Fuc₁ (計算値：m/z 1485.53)に相当するm/z 1485.61のピークが、Hex₃HexNAc₂Fuc₁ (計算値：m/z 1079.38)に相当するm/z 1079.16のピークに変換され、Hex₄HexNAc₄Fuc₁ (計算値：m/z 1647.59)に相当するm/z 1647.67のピークが、Hex₄HexNAc₃Fuc₁ (計算値：m/z 1444.51)に相当するm/z 1444.24のピークに変換された。この結果は、対応するグリカンはそれぞれ2つおよび1つの非還元末端 -N-アセチルグルコサミン残基を含んでいることを意味する。*S. pneumoniae*由来の 1,4-ガラクトシダーゼと組み換え 1,3-ガラクトシダーゼを組み合わせた作用により、m/z 1647.67に観測されるピークと、Hex₅HexNAc₄Fuc₁ (計算値：m/z 1809.64)に相当するm/z 1809.72のピークの両方がm/z 1485.48に観測されるピークに変換され、これは対応グリカン類がN-アセチラクトサミン末端構造中に非還元末端 -ガラクトース残基を含んでいることを示す。これらの結果を総合的に判断すると、m/z 1485.61、1647.67と1809.72に観測されるグリカンシグナルは、ガラクトシル化の異なる一連のグリカン種を表している。ここで用いた腫瘍試料中の上述の3つのシグナルから計算したガラクトシル化度は24%であり、この値は、上述した7人の肺癌患者からなる群より得た腫瘍試料の平均値である33%よりも有意に低かった。さらに、Hex₁HexNAc₂とNeuAc₁Hex₁HexNAc₂といった末端 -N-アセチルグルコサミン残基含有グリカン類が同時にこの腫瘍試料に存在することは、特定の腫瘍試料においては、タンパク質結合グリカン中の非還元末端 -N-アセチルグルコサミン残基のガラクトシル化が一般的に減少することを意味する。

【実施例13】

【0199】

タンパク質と水溶液に適合した結合試薬

UDP-GalN-PEG-フルオレセインの調製

総反応容量が100 μlの系で、5 nmolのウリジン二リン酸ガラクトサミン(UDP-GalN)、500 nmolのフルオレセイン-ポリ(エチレングリコール)-NH₂(分子量(MW):5000、米国、Nektar Therapeutics製)及び500 nmolの六フッ化リン酸O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-ビス(テトラメチレン)ウロニウム(米国、Aldrich製)の混合物を、55 mMのN-エチルジイソプロピルアミンを含むエチレングリコール-ジメチルフォルムアミド混合溶媒(容量比は1:1)中で、室温で60時間インキュベートした。得られた反応混合物を、Superdex Peptide HR 10/30カラム(Amersham Pharmacia Biotech製)を用い、250 mMのNH₄HCO₃中で流速1 ml/分の条件下でゲルろ過に付し、UV検出器を用いて、溶出液の214 nm、261 nmおよび460 nmの紫外線吸収をモニターした。8~10分の間で、フルオレセイン-PEG出発材料と共に目的物が溶出し、これを回収して乾燥した。次にResource Q 1 mlカラム(Amersham Pharmacia Biotech製)による陰イオン交換クロマトグラフィーをH₂O-NaClの濃度勾配を用いて行った。214 nm、261 nmおよび460 nmの紫外線吸収をモニターした。フルオレセイン-PEG出発材料を含む未結合物を廃棄し、10 mM~40 mMのNaCl濃度で溶出した画分を回収した。ゲルろ過画分およびイオン交換画分のMALDI-TOF質量分析を、Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstationを用い、リニア型の陽イオン遅延引き出しモード(positive ion delayed extract

ion linear mode) において、2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) をマトリックスとして行った。質量分析によって、ポリエチレングリコール誘導体が両方の画分に存在することが判明した。また、460 nmの紫外線吸収は、両方の画分にフルオレセインが存在することを示した。これらを総合すると、合成UDP-GaIN-PEG-フルオレセイン (図9) は2つのクロマトグラフィー工程によって効果的に精製された。

【0200】

酵素反応

ヒト非小細胞肺腺癌腫の腫瘍組織より調製したホルマリン固定化・パラフィン包埋組織切片を脱パラフィンし、糖のドナーとしてUDP-GaIN-PEG-フルオレセイン、20 mMのMnCl₂、10 mMのTris-HCl (pH 8.0) および Ramakrishnan and Qasba (2002) に記載されている酵素に類似した変異ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素を含有するインキュベーション混合物で切片を覆った。負の対照反応には、酵素を含まないインキュベーション混合物を用いた。37 °Cで20時間インキュベートすることで反応を行い、その後、組織切片を水で洗浄した。蛍光性の試料をOlympus AX70 Provis 蛍光顕微鏡で分析した。反応終了後の試料は、腫瘍組織中に460 ~ 490 nmの波長 (FITC使用) ではっきりとした陽性細胞を示した (図10のE)。蛍光性は陽性細胞の膜のみならず、細胞質にも存在した (図10のC)。しかし、対照試料は陰性のままであり (図10のA)、わずかな自己蛍光を示しただけである (図10のB)。さらに、530 ~ 550 nmの波長の分析では、分析した全ての試料が陰性であり、陽性の結果が自己蛍光によるものではないことを示した (図10のDとF)。結論として、この実施例は、UDP-GaIN-PEG-フルオレセインからGaIN-PEG-フルオレセイン基を、ヒト腫瘍細胞および腫瘍組織切片の糖タンパク質グリカンに存在する非還元末端N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基に *ex vivo* で転移する反応を酵素がどのようにして触媒するかを示している。

【0201】

種々の結合試薬の調製と使用

種々の反応系において、アミド化によってウリジン二リン酸ガラクトサミンの2位のアミノ基に効果的に導入されるカルボン酸試薬としては、S - アセチル - 3 - メルカプトプロピオン酸、4 - メルカプトブチル酸、Boc - 2 - アミノオキシ酢酸およびN - マレイミド - 6 - アミノヘキサン酸が挙げられ、それぞれN - マレイミド、アルデヒド、チオール基含有試薬および生物活性物質の、タンパク質適合性水溶液カップリング (protein-compatible water-solution coupling) に適している。3 - メルカプトプロピオン酸結合体は、初めに酢酸保護型に調製し、2 - アミノオキシ酢酸結合体は、t - Boc保護型を調製する。次に、それぞれ穏やかなアルカリ水溶液またはトリフルオロ酢酸でインキュベートすることで保護基を完全に除去することができる。精製した後、得られた結合試薬の構造をMALDI - TOF質量分析で確認したところ、目的の官能基がガラクトサミン残基に結合していることが判明した。試験反応においては、各試薬を水溶液中で、非還元末端N - アセチルグルコサミン含有糖結合体と、Ramakrishnan and Qasba (2002) に記載の酵素に類似した修飾ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素と共にインキュベートした。その結果、結合試薬修飾ガラクトサミン残基が糖結合体に効果的に転移され、これは、ガラクトサミン - 試薬結合体に相当する、アクセプター糖結合体の質量の増加としてMALDI - TOF質量分析で証明された (マススペクトルは示さない)。

【実施例14】

【0202】

癌患者の血清における、非還元末端N - アセチルグルコサミン含有糖結合体に対する特異的抗体レベルの上昇

血清試料に含まれる、特定の炭水化物エピトープに対するIgG抗体およびIgM抗体の濃度を分析することで、種々のステージの、胃腸器系または卵巣の癌と診断された4人の患者からなる一群について研究した。抗体濃度の分析は、血清中の特定の抗体を合成糖結合体に結合させる工程、洗浄工程、酵素標識した抗ヒトIgG二次抗体または抗ヒトIgM二次抗体を用いたELISA法による特異的結合抗体レベルを検出する工程、そして

特異的抗原生成物の定量工程からなる。得られた結果を表2に示した。非還元末端N-アセチルグルコサミン含有N-グリカンに対するIgGとIgMのレベルは、一人の患者において両方とも上昇していた。コア2三糖であるGlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAcに対する抗体レベルは患者群全体で上昇していたが、特異的抗体応答に違いがあった。即ち、一人の患者ではIgGレベルとIgMレベルが共に上昇していたが、他の一人の患者では主としてIgGレベルが上昇しており、残りの二人の患者では主としてIgMレベルが上昇していた。これと同様の抗体応答パターンが二糖であるGlcNAc 1-3GalNAcに対しても患者群で見られた。O-グリコシド-GlcNAcエピトープに対しては、二人の患者において主としてIgMの血清レベルが上昇しており、一人の患者においては、主としてIgGの血清レベルが上昇していた。

【0203】

【表 1】

抗体シグナル強度からバックグラウンド値を引いた値として表した、炭水化物エピトープに対する特異的抗体応答

糖 1 : GlcNAc β 1-2Man α 1-6 (GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4
(Fuc α 1-6)GlcNAc β -N-Asn-R、 糖 2 : 陽性癌関連糖、 糖 3 : GlcNAc β 1-6
(Gal β 1-3)GalNAc α -0-CH₂-R、 糖 4 : GlcNAc β -0-CH₂-R、 糖 5 : GlcNAc β 1
-3GalNAc α -0-CH₂-R (R は可変リンカー)。

| 糖 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 患者 1 IgG | 0 | 0 | 0.039 | 0 | 0.017 |
| 患者 1 IgM | 0 | 0.259 | 0.091 | 0.159 | 0.125 |
| 患者 2 IgG | 0 | 0.022 | 0.078 | 0.082 | 0.094 |
| 患者 2 IgM | 0 | 0.079 | 0.008 | 0.029 | 0.041 |
| 患者 3 IgG | 0.006 | 0 | 0 | 0.013 | 0 |
| 患者 3 IgM | 0.01 | 0.1 | 0.068 | 0.122 | 0.011 |
| 患者 4 IgG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 患者 4 IgM | 0 | 0.463 | 0.042 | 0 | 0.056 |

【実施例 15】

【0204】

ヒト血清中の 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼの活性および種々の反応条件下における添加 1, 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼの活性化

新鮮なヒト血液試料 (5 ml) を血液型 B の個人から回収した。30 分間凝固させた後、+4、2000 rpm の条件下で 25 分間遠心分離し、実験のために血清を回収した

(2 ml、氷上で保存)。

【0205】

反応は、50 nmolのアクセプター糖 (GlcNAc 1-3Gal 1-4GlcNAc、酵素学的に合成し、イオン交換とゲルろ過で精製し、NMRとマススペクトル解析で特徴付けたもの)、5 nmolのUDP-[¹⁴C]Gal (非標識物と放射性標識物の混合物、放射能は100,000 cpm) および20 μlの新鮮ヒト血清 (合計量は20 μl) を用いて行った。反応条件は、陽イオンおよびウシ乳 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (1,4GalT) を添加することで変化させた。

【0206】

結果

2 mUの 1,4GalTを単独で添加すると、明瞭なガラクトシルトランスフェラーゼ活性を示し、精製ガラクトシル化四糖試料は、534 cpmの放射能を有していた (表3)。バックグラウンドの放射能は、ドナー基質から遊離された放射性Galによるものと考えられる。0.1 mMのZn²⁺を反応混合物に添加すると、生成物の形成量が倍になった。また、4 mMのMgCl₂と2 mMのCaCl₂の添加によって、生成物の形成量がさらに増加した。

10

【0207】

同様の生成物形成量の増加が、Mn²⁺の添加によっても生じたが、外因性の 1,4GalTの存在なしでは、実験で使用した他の塩類はヒト血清中の内因性ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を上昇させることはできなかった。また、5 mM未満のMnCl₂は、生物学的溶液中の内因性の酵素を活性化することができた (データは示さない)。注目すべきことは、Mn²⁺の添加およびZn²⁺とホスホリルコリンの添加では、バックグラウンドの放射能が低下したことである。ホスホリルコリンは、ドナーであるヌクレオチドを分解する血清中の酵素活性を阻害する可能性がある。

20

【0208】

【表 2】

| 反応混合物に加えた変更 | 生成物 (cpm) | バックグラウンド (cpm) |
|--|--------------|-------------------|
| 塩類なし、2 mU β 1,4GalT | 534 | 5104 |
| 0.1 mM $ZnCl_2$ 、2 mU β 1,4GalT | 1022 | 4446 |
| 0.1 mM $ZnCl_2$ 、2 mU β 1,4GalT、 4 mM $MgCl_2$ 、2 mM $CaCl_2$ | 1292 | 4546 |
| 0.1 mM $ZnCl_2$ 、1 mM ホスホリルコリン、 2 mU β 1,4GalT | 872 | 2552 |
| 5 mM $MnCl_2$ | 566 | 1079 |
| 1 mM $MnCl_2$ | 1073 | 2068 |
| 0.2 mM $MnCl_2$ | 457 | 4578 |

10

20

【実施例 16】

30

【0209】

a) オリゴ糖構造 GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4Glc は、胃の病原体である *Helicobacter pylori* に対するレセプターである。この構造を、UDP-Gal とウシ乳由来の 4-ガラクトシルトランスフェラーゼと共にインキュベートすることで、活性が 10 分の 1 であるレセプター構造 Gal 4GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4Glc に変換する。

【0210】

b) オリゴ糖レセプター GlcNAc 3Gal 4GlcNAc 3Gal 4Glc を、GDP-Fuc と、ヒト乳の主なフコシルトランスフェラーゼである可溶性ヒトフコシルトランスフェラーゼ VI と共にインキュベートする。MALDI-TOF 質量分析は、GlcNAc 3Gal 4(Fuc 3)GlcNAc 3Gal 4Glc に相当する主要なピークを示し、この構造は NMR 解析でも確認した。

40

【0211】

c) グリコシル化反応が欠損していることによって GlcNAc 3Gal 4Glc Cer などの末端 GlcNAc-構造が増加している患者の赤血球を、放射性標識 UDP-Gal とガラクトシルトランスフェラーゼと共にインキュベートした。細胞表面への標識ガラクトースの転移が観察された。細胞のガラクトシル化は、細胞の抗 GlcNAc 抗体との反応性を低下させる。

【0212】

参考文献

Angstrom, J., and Karl-Anders Karlsson (1996) *Glycobiology* 6, 599-609.

50

- Arap, W., Pasqualini, R. and Ruoslahti, E. (1998) Science 279, 323-4.
- Endo et al. (1996) Eur. J. Biochem. 236:579-590.
- Ernst, B., Hart, G.W., and Sinay, P. (eds.) (2000) Carbohydrates in chemistry and biology, ISBN 3-527-29511-9, Wiley-VHC, Weinheim.
- Hanisch, F.-G., Koldovsky, U., and Borchard F. (1993) Cancer Res. 53, 4791-4796.
- Hansson, G.C., Karlsson, K.-A., Larson G., Stromberg, N., and Thurin, J. (1985) 10
Anal. Biochem. 146, 158-63.
- Harvey, D.J., et al. (1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7(7):614-9.
- Hounsell, E.F., Lawson, A.M., Stoll, M., Kane, D.P., Cashmore, G.C., Carruthers, R.A., Feeney, J., and Feizi, T. (1989) Eur. J. Biochem. 186, 597-610.
- Holmes, E.H., and Greene, T.G. (1991) Arch. Biochem. Biophys. 288, 87-96.
- Hu, J., Stults, C.L.M., Holmes, E.H., and Macher, B.A. (1994) Glycobiology 4, 25 20
1-257.
- Nakamura, M., Tsunoda, A., Sakoe, K., and Saito, M. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 197 1025-1033.
- Manzi, A.E., et al. (2000) Glycobiology 10(7):669-89.
- Meichenin M. et al. (2000) Cancer Research 60:5499-5507.
- Maki, M., et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269(2):593-601. 30
- Nyman, T.A., et al. (1998) Eur. J. Biochem. 253(2):485-93.
- Packer, N.H., et al. (1998) Glycoconj. J. 15(8):737-747.
- Ramakrishnan, B., and Qasba, P.K. (2002) J. Biol. Chem. 277(23):20833-9.
- Papac, D.I., et al. (1996) Anal. Chem. 68(18):3215-23.
- Rhen M., Klemm P., and Korhonen T.K. (1986) J. Bacteriol 168, 1234-42. 40
- Saarinen, J., et al. (1999) Eur. J. Biochem. 259(3):829-40.
- Sadamoto, R., Nikura, K., Nishimura, S.-I. (2001) Chemical engineering of bacterial cell wall. Poster C13.8, XVI International Symposium on Glycoconjugates August 19.-24. 2001 Haag Netherlands, Glycoconjugate J. no. 1 /2001.
- Spillmann, A., and Finne, J. (1994) Eur. J. Biochem. 220, 385-394.
- Symington, F.W, Hendersson, B.A., and Hakomori, S.-I. (1984) Mol. Immunol. 21, 8 50

77-882.

Teneberg, S., Lonroth, I., Torres Lopez, J.T., Galili, U., Olwegard Halvarsson, M., Verostek, M.F., et al. (2000) Anal. Biochem. 278:111-122.

Teneberg S, Angstrom J, Jovall P-A, and Karlsson K-A. (1994) J. Biol. Chem. 269, 8554-63.

Viitala, J., and Finne, J. (1984) Eur. J. Biochem. 138, 393-397.

【図面の簡単な説明】

10

【0213】

【図1】GlcNAc - 特異的 E. coli の菌体をオーバーレイして結合させた、薄層オーバーレイアッセイ後のオートラジオグラムであり、末端GlcNAc残基を有するオリゴ糖配列の腫瘍特異性を表すものである：副腎腫である腫瘍に由来する非酸性グリコフィンゴ脂質類（第1レーン）およびそれに対応する、正常な腎臓由来のグリコフィンゴ脂質画分（第2レーン）。

【図2】Aは [³⁵S] で標識したGlcNAc - 特異的 E. coli を用いて薄層オーバーレイアッセイを行った結果であり、Bは [¹²⁵I] で標識したGal 4GlcNAc - 特異的 Erythrina cristagalli 由来レクチンを用いて薄層オーバーレイアッセイを行った結果である。レーン1~8：ヒト副腎腫由来の非酸性グリコフィンゴ脂質の副画分、レーン9：参照用のグリコフィンゴ脂質であるGlcNAc 3Gal 4Glc 1Cer、レーン10：参照用のグリコフィンゴ脂質グロボシドであるGalNAc 3Gal 4Gal 4Glc 1Cer。

20

【図3A】肺腺癌試料由来の中性グリカンの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマスペクトル。

【図3B】健康な肺の試料由来の中性グリカンの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマスペクトル。

【図3C】S. pneumoniae - N - アセチルグルコサミニダーゼ消化後の、肺腺癌試料由来の中性グリカンの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマスペクトル。

【図3D】S. pneumoniae - N - アセチルグルコサミニダーゼ消化およびナタマメ - マンノシダーゼ消化後の、肺腺癌試料由来の中性グリカンの、リフレクター型の陽イオンモードMALDI-TOFマスペクトル。

30

【図4A】UDP - ガラクトサミン合成反応後に精製した糖ヌクレオチドの、リニア型の陰イオンモードMALDI-TOFマスペクトル。

【図4B】UDP-GalN - ビオチン合成反応後に精製した糖ヌクレオチドの、リニア型の陰イオンモードMALDI-TOFマスペクトル。

【図5】UDP-GalN - ビオチン（即ち、ウリジン5' - ニリン酸 - N - (6 - ビオチンアミドヘキサノイル)ガラクトサミン）の構造。

【図6】aは [¹⁴C]Galで標識した肺腺癌切片のオートラジオグラムであり、bは健康な肺組織切片のオートラジオグラムである。

40

【図7A】N - グリコシダーゼFで消化した肺腺癌試料に由来する、 [¹⁴C]Galで標識したオリゴ糖。グリカン類は、50 mMのNH₄HCO₃（pH約8.3）で膨潤させたSuperdex Peptide HR 10/30 カラム（スウェーデン国、Pharmacia製）を用い、流速1 ml / 分の条件下でゲルろ過HPLCに付した。各1 mlの画分を回収し、その放射能を測定した。12 ~ 15分に得た画分をプールした。

【図7B】N - グリコシダーゼFで消化した肺腺癌試料に由来する、 [¹⁴C]Galで標識したオリゴ糖。Superdex Peptideカラムを用いたゲルろ過HPLCで回収した12 ~ 15分に得た画分（図10A）を、10 mMのNH₃溶液で膨潤させたHypercarb 5uカラム（4.6 x 250 mm）（米国、Thermo Hypersil製）を用い、流速0.7 ml / 分、移動相のアセトニトリル濃度勾配が100分間で0 ~ 40%まで直線的に増加する条件下でHPLCに付し

50

た。各 0.7 ml の画分を回収し、その放射能を測定した。

【図 7 C】肺腺癌試料から非還元的 - 脱離法によって遊離した、 $[^{14}\text{C}]\text{Gal}$ で標識した標品。これを、50 mM の NH_4HCO_3 で膨潤させた Superdex Peptide HR 10/30 カラム (スウェーデン国、Pharmacia 製) を使い、流速 1 ml / 分の条件下でゲルろ過 HPLC に付した。各 1 ml の画分を回収し、その放射能を測定した。8 ~ 15 分に溶出した画分 (プール 1) のみならず、15 ~ 18 分に溶出した画分 (プール 2) もプールした。

【図 8】クーマシーブルー染色した還元条件下の SDS-PAGE ゲル。矢じりはそれぞれ IgG の H 鎖および L 鎖の位置を示す。A : 粘液性卵巣腺癌から回復したヒトから得た血清を、GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc セファロースカラムにかけたもの。左のレーンは 0.5 M の GlcNAc で溶出したものであり、右のレーンは酸性緩衝液で溶出したものである。B : プールしたヒト血清から得た IgG を、GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc セファロースカラムにかけたもの。左のレーンは 0.5 M の GlcNAc で溶出したものであり、右のレーンは酸性緩衝液で溶出したものである。C : 銀染色したゲル。粘液性卵巣腺癌から回復したヒトから得た血清を、Gal 1-4GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc セファロースカラムにかけたもの。左のレーンは 0.5 M の GlcNAc で溶出したものであり、右のレーンは酸性緩衝液で溶出したものである。

10

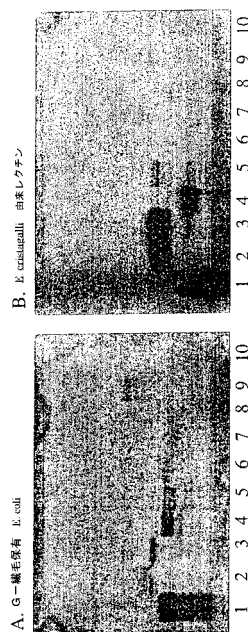
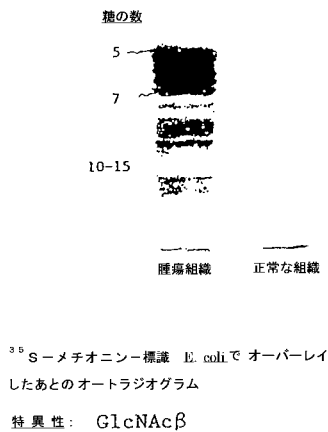
【図 9】UDP-GalN-PEG-フルオレセインの化学構造。

【図 10】GalN-PEG-フルオレセイン標識腫瘍組織切片の蛍光顕微鏡観察結果。A : 酵素を使用しない対照反応を 460 ~ 490 nm で観察。B : 酵素を使用しない対照反応を 530 ~ 550 nm で観察。C : 酵素を使用した反応を 460 ~ 490 nm で観察。D : 酵素を使用した反応を 530 ~ 550 nm で観察。E : 酵素を使用した反応を 460 ~ 490 nm で観察。F : 酵素を使用した反応を 530 ~ 550 nm で観察。

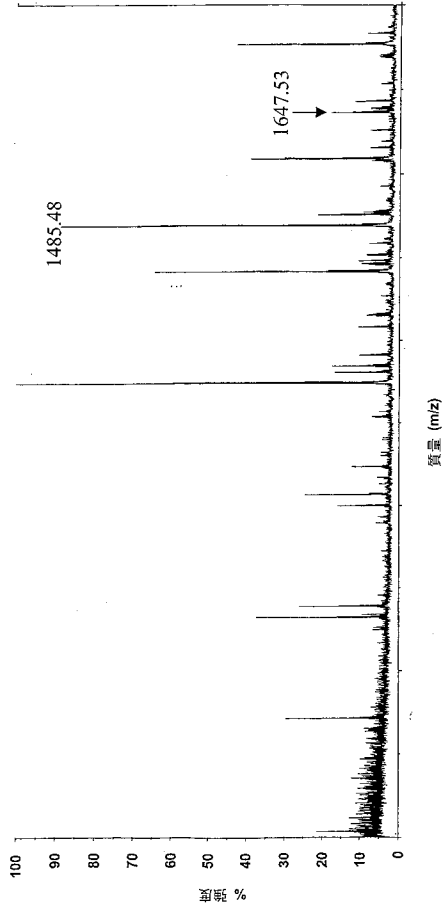
20

【図 1】

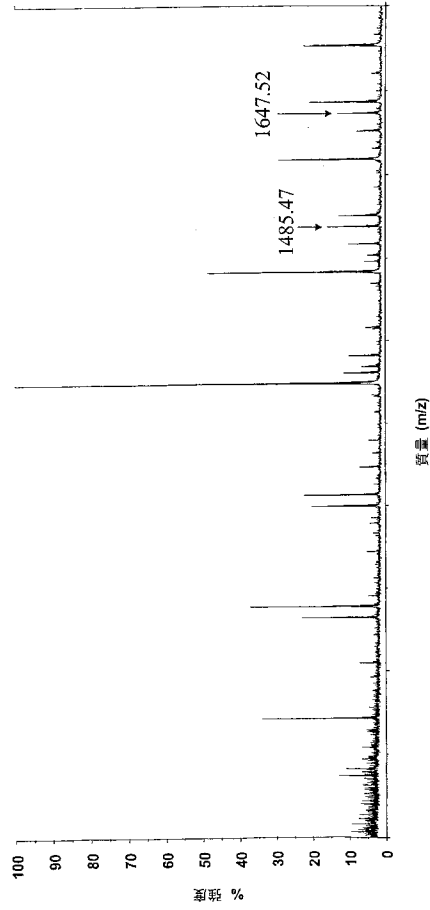
【図 2】



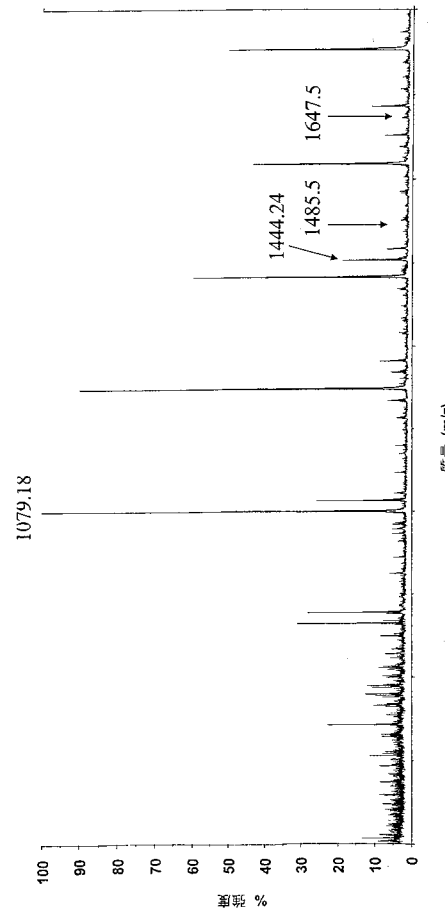
【 3 A 】



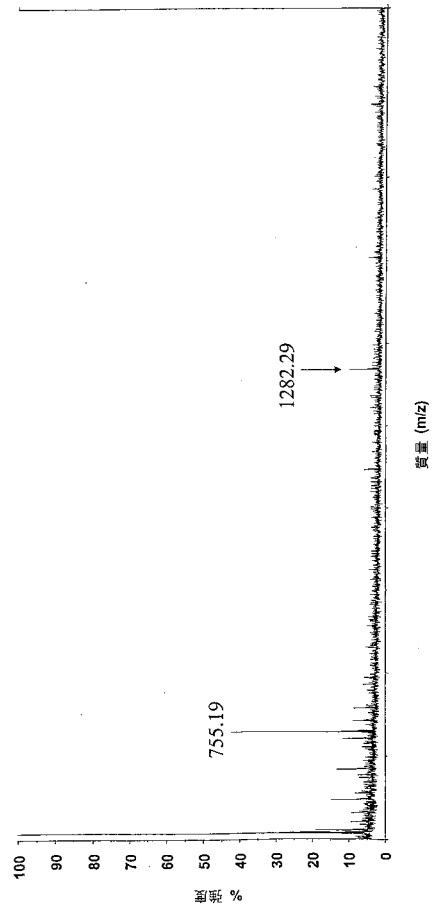
【 3 B 】



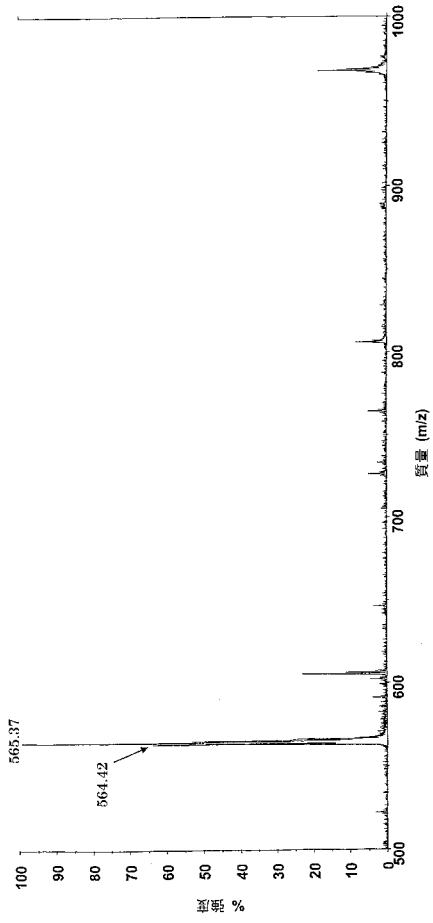
【 3 C 】



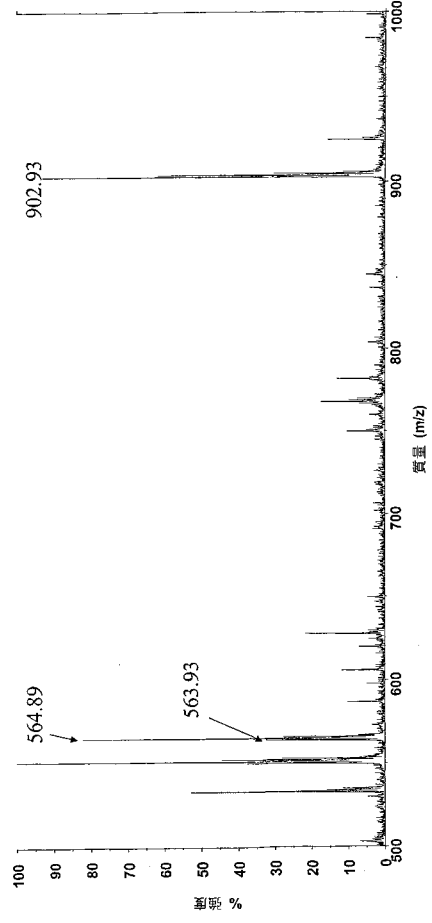
【 3 D 】



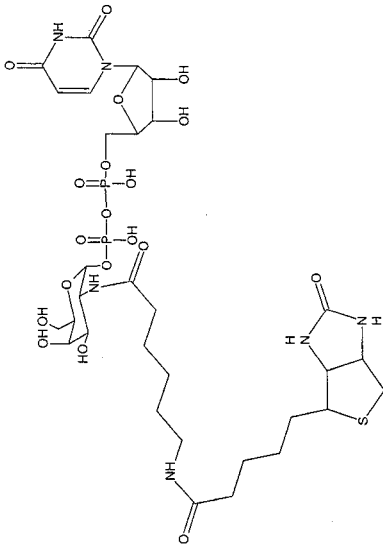
【 図 4 A 】



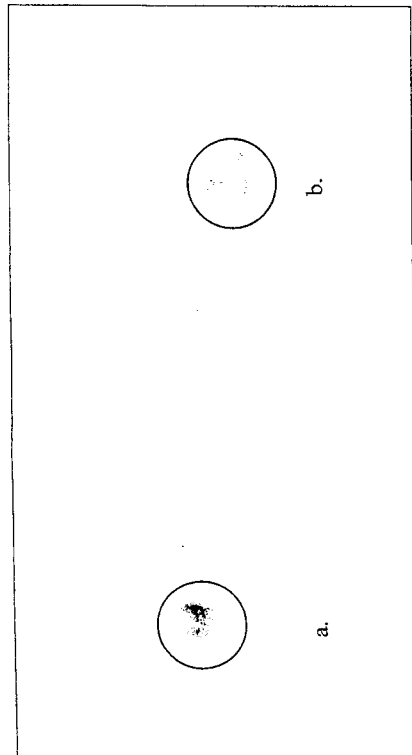
【 図 4 B 】



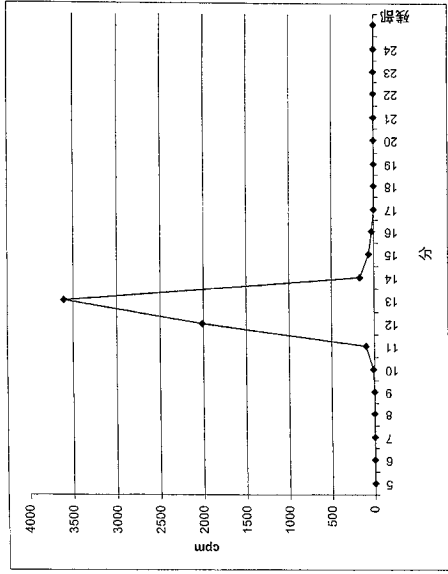
【 図 5 】



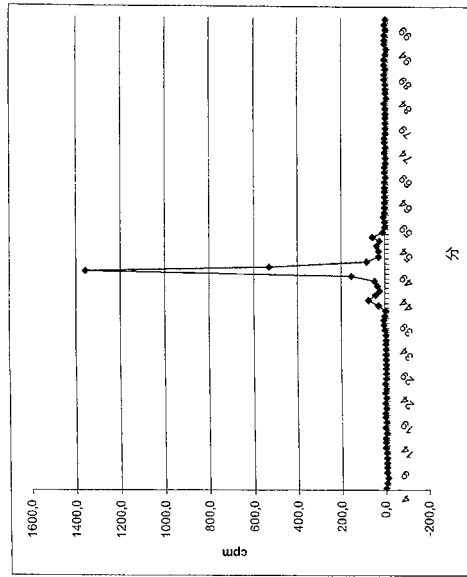
【 図 6 】



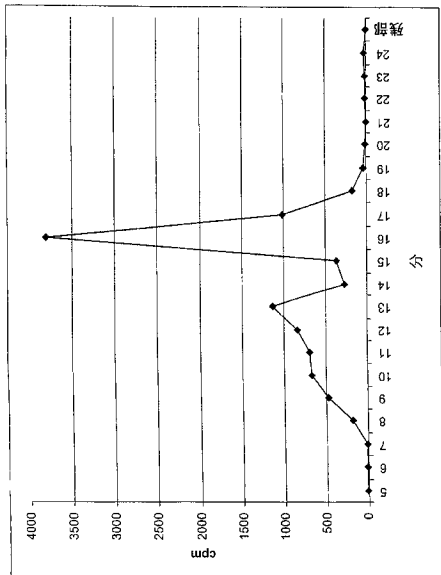
【 図 7 A 】



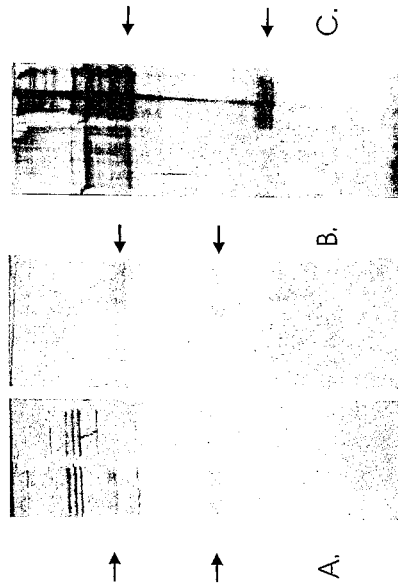
【 図 7 B 】



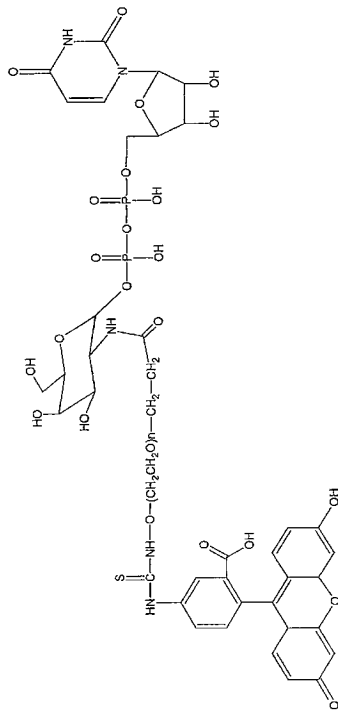
【 図 7 C 】



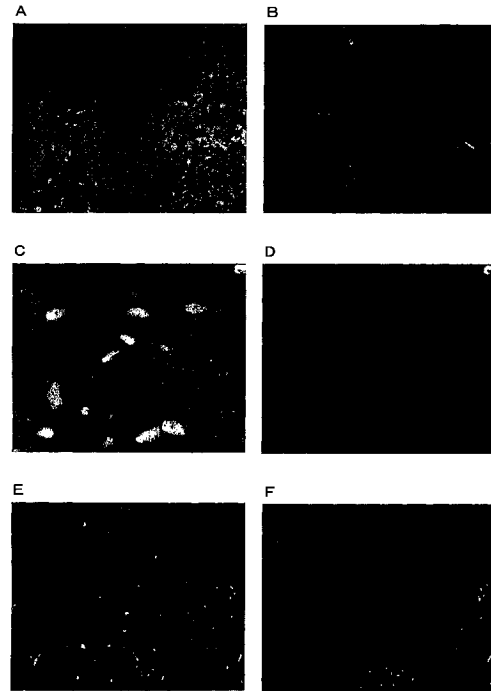
【 図 8 】



【図 9】



【図 10】



【手続補正書】

【提出日】平成17年4月7日(2005.4.7)

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含するヒト癌治療用の医薬組成物であって、該オリゴ糖配列は、タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 2】

該ヒト癌がヒト腫瘍であり、該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されたものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

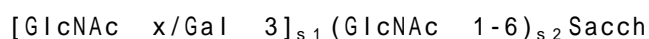
該結合性物質が、ヒト抗体、人体に適応させた抗体またはグリコシルトランスフェラーゼであることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

該ヒト腫瘍が、患者の正常組織と比べて該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列を多量に発現していると診断されたものであることを特徴とする、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が下記式で表されることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。



(式中、

SacchがGalNAcである場合にxは3であり、SacchがManである場合にxは2であり；
s1とs2は各々独立に0又は1であるが、少なくとも1つの末端GlcNAcが存在し；
s1とs2が共に1である場合には、オリゴ糖配列は分岐しており；

SacchがGalNAcである場合には、該GalNAcは他のGalNAcに6結合することではなく；
SacchがGlcNAcである場合には、s1およびs2は共に0であり、該GlcNAcはタンパク質またはペプチドに結合しており；

[GlcNAc_x/Gal₃]は、末端残基がGlcNAc_xまたはGal₃であることを意味する。))

【請求項6】

該結合性物質が、下記式(1)で表される少なくとも一種のN-グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項5に記載の医薬組成物。



(式中、

r1、r2、r3、r4、r5およびr6は各々独立に0または1の整数であるが、r1とr2の少なくとも一方は1であり、

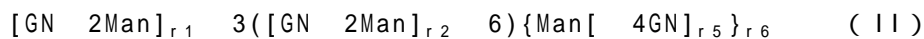
GNはGlcNAcであるが、

但し、r1とr2が共に1である場合には、下記(i)~(iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式(1)に加えることができる：

(i) 1つのGN₂Manが、1つまたは複数の他の単糖残基で伸長されている、(ii) 1つのGN₂ManがManに縮められている、(iii) Man₆残基およびMan₃残基からなる群より選ばれる少なくとも一種がGN₆またはGN₄で置換されている、および(iv) Man₄がGN₄で置換されている。)

【請求項7】

該結合性物質が、下記式(II)で表される少なくとも一種のN-グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項6に記載の医薬組成物。



(式中、

r1、r2、r5およびr6は各々独立に0または1の整数であるが、r1とr2の少なくとも一方は1であり、

GNはGlcNAcであるが、

但し、r1とr2が共に1である場合には、下記(i)~(iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式(II)に加えることができる：

(i) 1つのGN₂Manが、1つまたは複数の他の単糖残基で伸長されている、(ii) 1つのGN₂ManがManに縮められている、(iii) Man₆残基およびMan₃残基からなる群より選ばれる少なくとも一種がGN₆またはGN₄で置換されている、および(iv) Man₄がGN₄で置換されている。)

【請求項8】

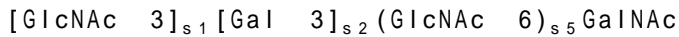
該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項6に記載の医薬組成物。

GlcNAc₂Man、GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man、
GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc₄(Fuc₆)GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man、GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAc、
GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc₄(Fuc₆)GlcNAc、
Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man、Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc、
Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAc、
Man₃(GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc₄(Fuc₆)GlcNAc、GlcNAc₂Man₃Man、
GlcNAc₂Man₃Man₄GlcNAc、GlcNAc₂Man₃Man₄GlcNAc₄GlcNAc、

GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man、
GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4GlcNAc、そして
GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc 。

【請求項 9】

該結合性物質が、下記式で表される少なくとも一種の O - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 5に記載の医薬組成物。



(式中、s 1、s 2 および s 5 は各々独立に 0 または 1 の整数であり、上記式で表される末端オリゴ糖配列は少なくとも一種の非還元末端 GlcNAc - 残基を有する。)

【請求項 10】

該オリゴ糖配列が、タンパク質結合 GlcNAc またはその誘導体であることを特徴とする、請求項 9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 9に記載の医薬組成物。

GlcNAc 3Gal 3(Gal 4GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、
GlcNAc 3Gal 3GalNAc、Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3(GlcNAc 6)GalNAc、
GlcNAc 6GalNAc、そして GlcNAc 3GalNAc 。

【請求項 12】

下記式からなる群より選ばれる少なくとも一種の末端オリゴ糖配列に特異的な結合性物質をさらに包含し、肺、咽頭、結腸、胃または卵巣の癌の治療用であることを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。

GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、GlcNAc 6Gal 4GlcNAc、
GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal、そして GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc 。

【請求項 13】

該オリゴ糖配列が、非天然のグリコシド結合で他の単糖構造やオリゴ糖構造に結合していることを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

該結合性物質が、アプタマー、ペプチドまたはタンパク質であることを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

該タンパク質が、抗体、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 14に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

該タンパク質が、末端 GlcNAc - 構造を認識する酵素であることを特徴とする、請求項 14に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

下記式で表される、該オリゴ糖配列の多価結合体を包含することを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。



(式中、

m は 1 を超える整数であり、

n は 0 または 1 であり、

OS はヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖であり、

L は酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、

X はラクトシル残基、ガラクトシル残基、ポリ - N - アセチルラクトサミニル残基、あるいは O - グリカンまたは N - グリカンオリゴ糖配列の一部であり、

Y はスペーサー基、末端結合体または Z への結合部であり、

Z はオリゴ価または多価の担体であり、

オリゴ糖鎖 (OS) は、その還元末端の C 1 位からスペーサー基 (Y) を介してオリゴ

価または多価の担体（Z）に原子（L）によって結合している。）

【請求項18】

医薬的に許容される担体およびアジュバンドからなる群より選ばれる少なくとも1種をさらに包含することを特徴とする、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項19】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を用いて、ヒト治療用の薬剤を製造する方法。

【請求項20】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法にして、タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むオリゴ糖配列の存在を該試料中に検出することを包含する診断方法。

【請求項21】

以下の工程（a）または工程（b）を包含することを特徴とする、請求項20に記載の診断方法。

（a）該生物学的試料を該オリゴ糖配列に結合する結合性物質と接触させ、そして該オリゴ糖配列を介した該結合性物質と該生物学的試料との結合を指標として、該生物学的試料中に存在する癌を検出する、または

（b）酵素学的または化学的方法によって該生物学的試料中のオリゴ糖構造を遊離させて、該生物学的試料から遊離したオリゴ糖構造を含む画分を生成し、そして該画分中の該オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中に存在する癌を検出する。

【請求項22】

該オリゴ糖配列が、請求項5で定義されたオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項20に記載の診断方法。

【請求項23】

該癌が腫瘍であることを特徴とする、請求項20に記載の診断方法。

【請求項24】

癌または腫瘍の型を決定することを特徴とする、請求項20に記載の診断方法。

【請求項25】

癌を含む組織の正常なグリコシル化を測定することを特徴とする、請求項20に記載の診断方法。

【請求項26】

グリコシル化を癌または正常組織の表面で測定することを特徴とする、請求項20に記載の診断方法。

【請求項27】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含する、ヒト癌または癌の型の診断に用いる診断剤。

【請求項28】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を、化学的または生化学的に合成した多価の型で含んでいることを特徴とする、抗原性物質。

【請求項29】

請求項28の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項30】

請求項28の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、血清、好ましくはヒトの血清から抗体を精製する方法。

【請求項31】

請求項 2 8 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、抗体の検出および定量のいずれかまたは両方を行う方法。

【請求項 3 2】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むオリゴ糖配列、あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌ワクチン。

【請求項 3 3】

医薬的に許容される担体およびアジュバンドからなる群より選ばれる少なくとも 1 種をさらに包含することを特徴とする、請求項 3 2 に記載の癌ワクチン。

【請求項 3 4】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造に結合するヒト癌治療用物質であって、アプタマー、ヒト天然抗体、人体に適應させた抗体またはペプチドであることを特徴とする物質。

【請求項 3 5】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むオリゴ糖配列と化合物を接触させる工程、および

該化合物と該オリゴ糖配列との結合の有無を検出する工程を包含する、癌または腫瘍に特異的な治療剤または診断剤を検出する方法。

【請求項 3 6】

以下の工程によって得られるヒト抗GlcNAc抗体。

固定した末端GlcNAc エピトープを含有するカラムに抗体を含有するヒト血漿試料を流し、

上記カラムを洗浄し、

高濃度のGlcNAcを含有する緩衝液でカラムの溶出を行い、そして

溶出した抗体を回収する。

【請求項 3 7】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を認識する抗体を含有する、ヒト癌または腫瘍を治療するための機能性食品または食品添加物。

【請求項 3 8】

該抗体が、乳または鶏卵の中で製造されたものであることを特徴とする、請求項 3 7 に記載の機能性食品または食品添加物。

【請求項 3 9】

以下のいずれかのオリゴ糖配列を認識することを特徴とする、請求項 3 6 に記載の抗体。

GlcNAc 6GalNAc -O-CH₂-R、GlcNAc 6(Gal 3)GalNAc -O-CH₂-R、

GlcNAc 2Man、GlcNAc -O-CH₂-R および GlcNAc 3GalNAc -O-CH₂。

【請求項 4 0】

修飾した単糖誘導体をグリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素によって癌細胞または腫瘍に送達することを特徴とする、癌または腫瘍の治療または診断を行うための方法。

【請求項 4 1】

該修飾した単糖誘導体が、タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造であることを特徴とする、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

該修飾した単糖誘導体が下記式で表されることを特徴とする、請求項 4 0 に記載の方法。



(式中、

S は、所望により用いるスペーサー基であり、そして
D は、分子ラベル、毒性物質、プロドラッグおよびプロドラッグ放出物質からなる群より選ばれる誘導化するための基である。)

【請求項 4 3】

該分子ラベルがビオチンまたは蛍光分子であることを特徴とする、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

該修飾した単糖誘導体が、UDP - GalN - スペーサー - ビオチン または UDP - N - (6 - ビオチンアミドヘキサノイル) ガラクトサミンであることを特徴とする、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

該修飾した単糖誘導体を、2 - 修飾単糖を効果的に送達するように修飾したガラクトシルトランスフェラーゼ、または該修飾したガラクトシルトランスフェラーゼと同等の特異性を示す動物由来の天然 GalNAc/GlcNAc - トランスフェラーゼによって送達することを特徴とする、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 6】

該修飾した単糖誘導体を細胞または組織に送達することを特徴とする、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 7】

酵素基質を包含する医薬用の組成物であって、病因となるものあるいは悪性の細胞または組織の表面特異的に転移酵素によって送達され、該酵素基質と該表面のアクセプター構造との間に共有結合を形成する組成物。

【請求項 4 8】

酵素基質が、免疫学的に活性な物質および毒性物質からなる群より選ばれる少なくとも 1 種に結合していることを特徴とする、請求項 4 7 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

該酵素基質が、病因となるものあるいは悪性の細胞または組織の表面特異的に転移酵素によって送達される炭水化物性物質であることを特徴とする、請求項 4 7 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

該転移酵素が、グリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素であることを特徴とする、請求項 4 7 に記載の組成物。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 8 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 8 5】

癌試料における末端 GlcNAc 含有 N - グリカンの出現

種々の腫瘍試料および健康な対照試料における上記構造の出現を、中性グリカン画分の単離と分析を MALDI - TOF MS とエキソグリコシダーゼ消化を行うことで検討した。検討した腫瘍 - 対照のペアは次の通りである：7 種の肺癌試料ペアおよび各一種の結腸癌、胃癌および喉頭癌のペア。分析の結果、全てのペアにおいて、m/z 1485.5 に観測される 2 つの末端 GlcNAc を含有する N - グリカンの相対的な存在量が、癌試料では上昇することが判明した。しかしながら、健康な組織と癌化組織の両方に、このグリカンエピトープの発現レベルに有意な個体差が存在した。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 0 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0202】

癌患者の血清における、非還元末端 N - アセチルグルコサミン含有糖結合体に対する特異的抗体レベルの上昇

血清試料に含まれる、特定の炭水化物エピトープに対する I g G 抗体および I g M 抗体の濃度を分析することで、種々のステージの、胃腸器系または卵巣の癌と診断された 4 人の患者からなる一群について研究した。抗体濃度の分析は、血清中の特定の抗体を合成糖結合体に結合させる工程、洗浄工程、酵素標識した抗ヒト I g G 二次抗体または抗ヒト I g M 二次抗体を用いた E L I S A 法による特異的結合抗体レベルを検出する工程、そして特異的反応生成物の定量工程からなる。得られた結果を表 1 に示した。非還元末端 N - アセチルグルコサミン含有 N - グリカンに対する I g G と I g M のレベルは、一人の患者において両方とも上昇していた。コア 2 三糖である GlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAc に対する抗体レベルは患者群全体で上昇していたが、特異的抗体応答に違いがあった。即ち、一人の患者では I g G レベルと I g M レベルが共に上昇していたが、他の一人の患者では主として I g G レベルが上昇しており、残りの二人の患者では主として I g M レベルが上昇していた。これと同様の抗体応答パターンが二糖である GlcNAc 1-3GalNAc に対しても患者群で見られた。O - グリコシド -GlcNAc エピトープに対しては、二人の患者において主として I g M の血清レベルが上昇しており、一人の患者においては、主として I g G の血清レベルが上昇していた。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0206

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0206】

結果

2 m U の 1,4GalT を単独で添加すると、明瞭なガラクトシルトランスフェラーゼ活性を示し、精製ガラクトシル化四糖試料は、534 c p m の放射能を有していた (表 2)。バックグラウンドの放射能は、ドナー基質から遊離された放射性 Gal によるものと考えられる。0.1 m M の Zn^{2+} を反応混合物に添加すると、生成物の形成量が倍になった。また、4 m M の $MgCl_2$ と 2 m M の $CaCl_2$ の添加によって、生成物の形成量がさらに増加した。

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 6 月 27 日 (2005.6.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含するヒト癌治療用の医薬組成物であって、該オリゴ糖配列は、タンパク質に結合した末端 GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端 GlcNAc - グリカン構造を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 2】

該ヒト癌がヒト腫瘍であり、該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が、ヒト腫瘍の細胞表面または組織表面に発現されたものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

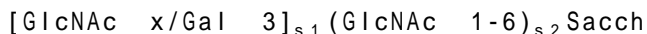
該結合性物質が、ヒト抗体、人体に適應させた抗体またはグリコシルトランスフェラーゼであることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項4】

該ヒト腫瘍が、患者の正常組織と比べて該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列を多量に発現していると診断されたものであることを特徴とする、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項5】

該ヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列が下記式で表されることを特徴とする、請求項1に記載の医薬組成物。



(式中、

SacchがGalNAcである場合にxは3であり、SacchがManである場合にxは2であり；

s₁とs₂は各々独立に0又は1であるが、少なくとも1つの末端GlcNAcが存在し；

s₁とs₂が共に1である場合には、オリゴ糖配列は分岐しており；

SacchがGalNAcである場合には、該GalNAcは他のGalNAcに6結合することはなく；

SacchがGlcNAcである場合には、s₁およびs₂は共に0であり、該GlcNAcはタンパク質またはペプチドに結合しており；

[GlcNAc x/Gal 3]は、末端残基がGlcNAc xまたはGal 3であることを意味する。)

【請求項6】

該結合性物質が、下記式(1)で表される少なくとも一種のN-グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項5に記載の医薬組成物。



(式中、

r₁、r₂、r₃、r₄、r₅およびr₆は各々独立に0または1の整数であるが、r₁とr₂の少なくとも一方は1であり、

GNはGlcNAcであるが、

但し、r₁とr₂が共に1である場合には、下記(i)~(iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式(1)に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基で伸長されている、(ii) 1つのGN 2ManがManに縮められている、(iii) Man 6残基およびMan 3残基からなる群より選ばれる少なくとも一種がGN 6またはGN 4で置換されている、および(iv) Man 4がGN 4で置換されている。)

【請求項7】

該結合性物質が、下記式(II)で表される少なくとも一種のN-グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項6に記載の医薬組成物。



(式中、

r₁、r₂、r₅およびr₆は各々独立に0または1の整数であるが、r₁とr₂の少なくとも一方は1であり、

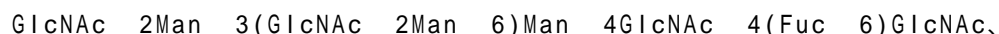
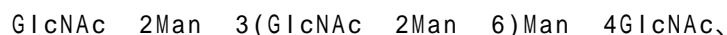
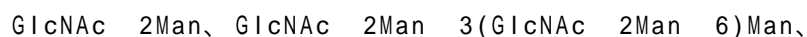
GNはGlcNAcであるが、

但し、r₁とr₂が共に1である場合には、下記(i)~(iv)からなる群より選ばれる少なくとも一種の変更を式(II)に加えることができる：

(i) 1つのGN Manが、1つまたは複数の他の単糖残基で伸長されている、(ii) 1つのGN 2ManがManに縮められている、(iii) Man 6残基およびMan 3残基からなる群より選ばれる少なくとも一種がGN 6またはGN 4で置換されている、および(iv) Man 4がGN 4で置換されている。)

【請求項8】

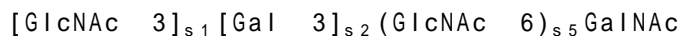
該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項6に記載の医薬組成物。



GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man、GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3(Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man、Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 Man 3(GlcNAc 2Man 6)Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man、
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4GlcNAc、
 GlcNAc 2Man 3Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man、
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc、GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4GlcNAc、そして
 GlcNAc 2Man 6Man 4GlcNAc 4(Fuc 6)GlcNAc 。

【請求項 9】

該結合性物質が、下記式で表される少なくとも一種の O - グリカン型構造の末端オリゴ糖配列に特異的であることを特徴とする、請求項 5に記載の医薬組成物。



(式中、 s_1 、 s_2 および s_5 は各々独立に 0 または 1 の整数であり、上記式で表される末端オリゴ糖配列は少なくとも一種の非還元末端 GlcNAc - 残基を有する。)

【請求項 10】

該オリゴ糖配列が、タンパク質結合 GlcNAc またはその誘導体であることを特徴とする、請求項 9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

該オリゴ糖配列が、下記式からなる群より選ばれるオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 9に記載の医薬組成物。

GlcNAc 3Gal 3(Gal 4GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、
 GlcNAc 3Gal 3GalNAc、Gal 3(GlcNAc 6)GalNAc、GlcNAc 3(GlcNAc 6)GalNAc、
 GlcNAc 6GalNAc、そして GlcNAc 3GalNAc 。

【請求項 12】

下記式からなる群より選ばれる少なくとも一種の末端オリゴ糖配列に特異的な結合性物質をさらに包含し、肺、咽頭、結腸、胃または卵巣の癌の治療用であることを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。

GlcNAc 3Gal、GlcNAc 3Gal 4GlcNAc、GlcNAc 6Gal、GlcNAc 6Gal 4GlcNAc、
 GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal、そして GlcNAc 3(GlcNAc 6)Gal 4GlcNAc 。

【請求項 13】

該オリゴ糖配列が、非天然のグリコシド結合で他の単糖構造やオリゴ糖構造に結合していることを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

該結合性物質が、アダマー、ペプチドまたはタンパク質であることを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

該タンパク質が、抗体、レクチンまたはそれらの断片であることを特徴とする、請求項 14に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

該タンパク質が、末端 GlcNAc - 構造を認識する酵素であることを特徴とする、請求項 14に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

下記式で表される、該オリゴ糖配列の多価結合体を包含することを特徴とする、請求項 1に記載の医薬組成物。



(式中、

m は 1 を超える整数であり、

n は 0 または 1 であり、

O S はヒト腫瘍特異的末端オリゴ糖配列を含むオリゴ糖鎖であり、
L は酸素原子、窒素原子、硫黄原子または炭素原子であり、
X はラクトシル残基、ガラクトシル残基、ポリ - N - アセチルラクトサミニル残基、あるいは O - グリカンまたは N - グリカンオリゴ糖配列の一部であり、
Y はスパーサー基、末端結合体または Z への結合部であり、
Z はオリゴ価または多価の担体であり、
オリゴ糖鎖 (O S) は、その還元末端の C 1 位からスパーサー基 (Y) を介してオリゴ価または多価の担体 (Z) に原子 (L) によって結合している。

【請求項 18】

医薬的に許容される担体およびアジュバンドからなる群より選ばれる少なくとも 1 種をさらに包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

タンパク質に結合した末端 GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端 GlcNAc - グリカン構造を含むヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を用いて、ヒト治療用の薬剤を製造する方法。

【請求項 20】

ヒトの患者から得た生物学的試料を用いて癌または腫瘍を診断する方法にして、タンパク質に結合した末端 GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端 GlcNAc - グリカン構造を含むオリゴ糖配列の存在を該試料中に検出することを包含する診断方法。

【請求項 21】

以下の工程 (a) または工程 (b) を包含することを特徴とする、請求項 20 に記載の診断方法。

(a) 該生物学的試料を該オリゴ糖配列に結合する結合性物質と接触させ、そして該オリゴ糖配列を介した該結合性物質と該生物学的試料との結合を指標として、該生物学的試料中に存在する癌を検出する、または

(b) 酵素学的または化学的方法によって該生物学的試料中のオリゴ糖構造を遊離させて、該生物学的試料から遊離したオリゴ糖構造を含む画分を生成し、そして

該画分中の該オリゴ糖配列の存在を指標として、該生物学的試料中に存在する癌を検出する。

【請求項 22】

該オリゴ糖配列が、請求項 5 で定義されたオリゴ糖配列であることを特徴とする、請求項 20 に記載の診断方法。

【請求項 23】

該癌が腫瘍であることを特徴とする、請求項 20 に記載の診断方法。

【請求項 24】

癌または腫瘍の型を決定することを特徴とする、請求項 20 に記載の診断方法。

【請求項 25】

癌を含む組織の正常なグリコシル化を測定することを特徴とする、請求項 20 に記載の診断方法。

【請求項 26】

グリコシル化を癌または正常組織の表面で測定することを特徴とする、請求項 20 に記載の診断方法。

【請求項 27】

タンパク質に結合した末端 GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端 GlcNAc - グリカン構造を含むヒト腫瘍特異的オリゴ糖配列に結合する結合性物質を包含する、ヒト癌または癌の型の診断に用いる診断剤。

【請求項 28】

タンパク質に結合した末端 GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端 GlcNAc - グリカン構造を、化学的または生化学的に合成した多価の型で含んでいることを特徴とする、抗原性物質。

【請求項 29】

請求項 28 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を製造する方法。

【請求項 30】

請求項 28 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、血清、好ましくはヒトの血清から抗体を精製する方法。

【請求項 31】

請求項 28 の抗原性物質あるいはその類似体または誘導体を用いて、抗体の検出および定量のいずれかまたは両方を行う方法。

【請求項 32】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むオリゴ糖配列、あるいはその類似体または誘導体を包含する、癌ワクチン。

【請求項 33】

医薬的に許容される担体およびアジュバンドからなる群より選ばれる少なくとも 1 種をさらに包含することを特徴とする、請求項 32 に記載の癌ワクチン。

【請求項 34】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造に結合するヒト癌治療用物質であって、アプタマー、ヒト天然抗体、人体に適應させた抗体またはペプチドであることを特徴とする物質。

【請求項 35】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を含むオリゴ糖配列と化合物を接触させる工程、および

該化合物と該オリゴ糖配列との結合の有無を検出する工程を包含する、癌または腫瘍に特異的な治療剤または診断剤を検出する方法。

【請求項 36】

以下の工程によって得られるヒト抗GlcNAc抗体。

固定した末端GlcNAc エピトープを含有するカラムに抗体を含有するヒト血漿試料を流し、

上記カラムを洗浄し、

高濃度のGlcNAcを含有する緩衝液でカラムの溶出を行い、そして

溶出した抗体を回収する。

【請求項 37】

タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質に結合した末端GlcNAc - グリカン構造を認識する抗体を含有する、ヒト癌または腫瘍を治療するための機能性食品または食品添加物。

【請求項 38】

該抗体が、乳または鶏卵の中で製造されたものであることを特徴とする、請求項 37 に記載の機能性食品または食品添加物。

【請求項 39】

以下のいずれかのオリゴ糖配列を認識することを特徴とする、請求項 36 に記載の抗体。

GlcNAc 6GalNAc -O-CH₂-R、GlcNAc 6(Gal 3)GalNAc -O-CH₂-R、

GlcNAc 2Man、GlcNAc -O-CH₂-R および GlcNAc 3GalNAc -O-CH₂。

【請求項 40】

修飾した単糖誘導体をグリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素によって癌細胞または腫瘍に送達することを特徴とする、癌または腫瘍の治療または診断を行うための方法。

【請求項 41】

該修飾した単糖誘導体が、タンパク質に結合した末端GlcNAc - 構造またはタンパク質

に結合した末端GlcNAc - グリカン構造であることを特徴とする、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

該修飾した単糖誘導体が下記式で表されることを特徴とする、請求項40に記載の方法。



(式中、

Sは、所望により用いるスペーサー基であり、そして

Dは、分子ラベル、毒性物質、プロドラッグおよびプロドラッグ放出物質からなる群より選ばれる誘導化するための基である。)

【請求項43】

該分子ラベルがビオチンまたは蛍光分子であることを特徴とする、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

該修飾した単糖誘導体が、UDP - GalN - スペーサー - ビオチン または UDP - N-(6 - ビオチンアミドヘキサノイル) ガラクトサミンであることを特徴とする、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

該修飾した単糖誘導体を、2 - 修飾単糖を効果的に送達するように修飾したガラクトシルトランスフェラーゼ、または該修飾したガラクトシルトランスフェラーゼと同等の特異性を示す動物由来の天然GalNAc/GlcNAc - トランスフェラーゼによって送達することを特徴とする、請求項40に記載の方法。

【請求項46】

該修飾した単糖誘導体を細胞または組織に送達することを特徴とする、請求項40に記載の方法。

【請求項47】

酵素基質を包含する医薬用の組成物であって、病因となるものあるいは悪性の細胞または組織の表面特異的に転移酵素によって送達され、該酵素基質と該表面のアクセプター構造との間に共有結合を形成する組成物。

【請求項48】

酵素基質が、免疫学的に活性な物質および毒性物質からなる群より選ばれる少なくとも1種に結合していることを特徴とする、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】

該酵素基質が、病因となるものあるいは悪性の細胞または組織の表面特異的に転移酵素によって送達される炭水化物性物質であることを特徴とする、請求項47に記載の組成物。

【請求項50】

該転移酵素が、グリコシルトランスフェラーゼまたは糖転移酵素であることを特徴とする、請求項47に記載の組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0185

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0185】

癌試料における末端GlcNAc含有N - グリカンの出現

種々の腫瘍試料および健康な対照試料における上記構造の出現を、中性グリカン画分の単離と分析をMALDI - TOF MSとエキソグリコシダーゼ消化を行うことで検討した。検討した腫瘍 - 対照のペアは次の通りである：7種の肺癌試料ペアおよび各一種の結腸癌、胃癌および喉頭癌のペア。分析の結果、全てのペアにおいて、m/z 1485.5に観測さ

れる2つの末端GlcNAcを含有するN-グリカンの相対的な存在量が、癌試料では上昇することが判明した。しかしながら、健康な組織と癌化組織の両方に、このグリカンエpiteープの発現レベルに有意な個体差が存在した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0202

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0202】

癌患者の血清における、非還元末端N-アセチルグルコサミン含有糖結合体に対する特異的抗体レベルの上昇

血清試料に含まれる、特定の炭水化物エpiteープに対するIgG抗体およびIgM抗体の濃度を分析することで、種々のステージの、胃腸器系または卵巣の癌と診断された4人の患者からなる一群について研究した。抗体濃度の分析は、血清中の特定の抗体を合成糖結合体に結合させる工程、洗浄工程、酵素標識した抗ヒトIgG二次抗体または抗ヒトIgM二次抗体を用いたELISA法による特異的結合抗体レベルを検出する工程、そして特異的反応生成物の定量工程からなる。得られた結果を表1に示した。非還元末端N-アセチルグルコサミン含有N-グリカンに対するIgGとIgMのレベルは、一人の患者において両方とも上昇していた。コア2三糖であるGlcNAc 1-6(Gal 1-3)GalNAcに対する抗体レベルは患者群全体で上昇していたが、特異的抗体応答に違いがあった。即ち、一人の患者ではIgGレベルとIgMレベルが共に上昇していたが、他の一人の患者では主としてIgGレベルが上昇しており、残りの二人の患者では主としてIgMレベルが上昇していた。これと同様の抗体応答パターンが二糖であるGlcNAc 1-3GalNAcに対しても患者群で見られた。O-グリコシド-GlcNAcエpiteープに対しては、二人の患者において主としてIgMの血清レベルが上昇しており、一人の患者においては、主としてIgGの血清レベルが上昇していた。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0206

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0206】

結果

2 mUの1,4GalTを単独で添加すると、明瞭なガラクトシルトランスフェラーゼ活性を示し、精製ガラクトシル化四糖試料は、534 cpmの放射能を有していた(表2)。バックグラウンドの放射能は、ドナー基質から遊離された放射性Galによるものと考えられる。0.1 mMのZn²⁺を反応混合物に添加すると、生成物の形成量が倍になった。また、4 mMのMgCl₂と2 mMのCaCl₂の添加によって、生成物の形成量がさらに増加した。

【手続補正書】

【提出日】平成17年6月27日(2005.6.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】手続補正書

【補正対象項目名】手続補正2

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正2】

【補正対象書類名】手続補正書

【補正対象項目名】手続補正3

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正3】

【補正対象書類名】手続補正書

【補正対象項目名】手続補正4

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正4】

【補正対象書類名】手続補正書

【補正対象項目名】手続補正5

【補正方法】削除

【補正の内容】

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/FI 2003/000615 |
|---|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC7: A61K 39/00, A61K 31/70, A61P 35/00, A61P 31/00, G01N 33/574, C07H 5/06 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) | | |
| IPC7: A61K, G01N, C07H, A61P | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| SE,DK,FI,NO classes as above | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM.ABS.DATA | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| E,X | WO 03016915 A1 (CARBION OY), 27 February 2003 (27.02.2003) | 1-45, 46-86 (PARTI- ALLY) |
| | -- | |
| X | British Journal of Cancer, Volume 83, No. 10, 2000, PJ Johnson et al, "Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms", pages 1330-1337, see specially figure 1, G10 and G11 | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |
| | -- | |
| X | British Journal of Cancer, Volume 81, No. 7, 1999, PJ Johnson et al, "Glycan composition of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma and non-seminomatous germ cell tumour", pages 1188-1195, se specially figure 3, G11 and G10 | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |
| | -- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 | |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 | |
| "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) | "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 | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 31 March 2004 | Date of mailing of the international search report 2004-04-06 | |
| Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86 | Authorized officer Micael Qwald/BS Telephone No. +46 8 782 25 00 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 2003/000615

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|---|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 0255342 A1 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON), 3 February 1988 (03.02.1988), see specially page 1, column 2, lines 32-61 -- | 1-45, 46-86 (PARTI- ALLY) |
| X | Eur. J. Biochem., Volume 161, 1986, James W. Dennis et al, "Asn-linked oligosaccharides in lectin-resistant tumor-cell mutants with varying metastatic potential", pages 359-373, the whole document -- | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |
| X | DE 3807594 A1 (REUTTER, WERNER), 21 Sept 1989 (21.09.1989) -- | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |
| X | Cancer Research, Volume 43, November 1983, Katsuko Yamashita et al, "Comparative Study of the Sugar Chains of gamma-Glutamyltranspeptidases Purified from Rat Liver and Rat AH-66 Hepatoma Cells", pages 5059-5063, see specially charts. 4-5 -- | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |
| X | J. Biochem., Volume 90, 1981, Katsuko Yamashita et al, "Structural Study of the Sugar Chains of alpha-Amylases Produced Ectopically in Tumors", pages 1281-1289, see specially figures 4-5 -- | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |
| X | Histochemical Journal, Volume 24, 1992, Boris E. Chechik et al, "Increased expression of highly branched N-linked oligosaccharides terminating in N-acetylglucosamine residues in neoplastic and sclerodermal chicken fibroblasts", pages 15-20, the whole document -- | 1-5 (PARTIAL- LY),6-8, 13-86 (PARTI- ALLY) |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI 2003/000615

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|--|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Molecular Immunology, Volume 24, No. 8, 1989, Gail Nixon Volman et al, "Analysis of Asparagine-linked oligosaccharide structures of chronic lymphocytic leukemia cells", pages 871-888 see specially table 5 -- | 1-5 (PARTIAL-LY),6-8, 13-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Eur. J. Biochem., Volume 236, 1996, Tamao Endo et al, "Comparative study of the sugar chains of alkaline phosphatases purified from rat liver and rat AH-130 hepatoma cells Occurrence of fucosylated high-mannose-type and hybrid-type sugar chains", pages 579-590, see specially table 2 -- | 1-5 (PARTIAL-LY),6-8, 13-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Clinical Cancer Research, Volume 5, 1999, Abdelhadi Rebbaa et al, "Expression of Bisecting GlcNac in Pediatric Brain Tumors and Its Association with Tumor Cell Response to Vinblastine", pages 3661-3668 -- | 1-5 (PARTIAL-LY),6-8, 13-86 (PARTI-ALLY) |
| P,X | Jpn J. Electroph, Volume 46: 163, 2002, Nobuhisa Ohtani et al, "Abnormality of the oligosaccharide moiety of human immunoglobulin G in sera of patients with either rheumatoid arthritis or cancer", pages 2-6, the whole document -- | 1-5 (PARTIAL-LY),6-8, 13-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Cancer Research, Volume 60, 1 October 2000, Marc Meichenin et al: "Tk, a New Colon Tumor-associated Antigen Resulting from Altered O-Glycosylation 1", page 5499 - page 5507 -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL-LY) |
| X | Cancer Research, Volume 53, 15 October 1993, F-G. Hanisch et al: "Monoclonal Antibody 2B5 Defines a Truncated O-Glycan, GlcNAcBeta 1-3GalBeta 1 4GlcNAcBeta 1-6 (GalNAc), on Mucins from Deep Gastric and Duodenal Glands as Well as Metaplasia and Neoplasia of Gastric Differentiation", page 4791 - page 4796 -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL-LY) |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/FI 2003/000615

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|--|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Jpn. J. Cancer Res., Volume 81, April 1990, Jun Nakayama et al: "Griffonia simplicifolia Agglutinin-2-binding Glycoprotein as a Novel Carbohydrate Antigen of Human Colonic Carcinoma", page 388 - page 395 -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL- LY) |
| X | DATABASE WPI Week 199049 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1990-365935 & JP 2264864 A (SHINETSU CHEM IND CO LTD), 29 October 1990 (1990-10-29) -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL- LY) |
| X | Glycobiology, Volume 4, no. 3, 1994, Jie Hu et al: "Structural characterization of intermediates in the biosynthetic pathway of neolacto glycosphingolipids: differential expression in human leukaemia cells", page 251 - page 257 -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL- LY) |
| X | Archives of biochemistry and biophysics, Volume 288, no. 1, July 1991, Eric H. Holmes et al: "Isolation and Fine-Structure Characterization of Four Monoclonal Antibodies Reactive with Glycoconjugates Containing Terminal GlcNAc Residues: Application to Aspects of Lacto-Series Tumor Antigen Biosynthesis 1", page 87 - page 96 -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL- LY) |
| X | WO 0021552 A1 (UNIVERSITY TECHNOLOGY CORPORATION), 20 April 2000 (20.04.2000), -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL- LY) |
| X | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 10, 17 November 2000, (2000-11-17) & JP 20 00191685 A (NIPPON KOUTAI KENKYUSHO:KK), 11 July 2000 (2000-07-11) abstract -- | 1-5,9,11-12, 13-45 AND 46 -86 (PARTIAL- LY) |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 2003/000615

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Chembiochem, Volume 2, 2001, Thomas Bülter et al: "Chemoenzymatic Synthesis of Biotinylated Nucleotide Sugars as Substrates for Glycosyltransferases", page 884 - page 894 -- | 46-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Glycobiology, Volume 11, no. 7, 2001, Zhao Chun Chen et al: "Synthesis of alpha-gal epitopes (Galalpha 1-3GalBeta 1-4GlcNAc-R) on human tumor cells by recombinant alpha 1,3galactosyltransferase produced in Pichia pastoris", page 577 - page 586 -- | 46-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Vaccine, Volume 15, no. 11, 1997, Timothy R. Henion et al: "Synthesis of a-gal epitopes on influenza virus vaccines, by recombinant alpha 1,3galactosyltransferase, enables the formation of immune complexes with the natural anti-Gal antibody", page 1174 - page 1182 -- | 46-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Methods in enzymology, Volume 362, 2003, Reiko Sadamoto et al: "Cell Wall Engineering of Living Bacteria through Biosynthesis", page 273 - page 286 -- | 46-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Chemistry & Biology, Volume 8, 2001, George A. Lemieux et al: "Modulating cell surface immunoreactivity by metabolic induction of unnatural carbohydrate antigens", page 265 - page 275 -- | 46-86 (PARTI-ALLY) |
| X | Annu. Rev. Cell Dev. Biol., Volume 17, 2001, Eliana Saxon et al: "Chemical and Biological Strategies for Engineering Cell Surface Glycosylation", page 1 - page 23 -- | 46-86 (PARTI-ALLY) |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 2003/000615

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 6075134 A (CAROLYN BERTOZZI ET AL), 13 June 2000 (13.06.2000) -- | 46-86 (PARTI - ALLY) |
| X | WO 9114697 A1 (BROSSMER, REINHARD), 3 October 1991 (03.10.1991) -- | 46-86 (PARTI - ALLY) |
| X | WO 0187321 A2 (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY), 22 November 2001 (22.11.2001) -- | 46-86 (PARTI - ALLY) |
| X | EP 0334962 A1 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.), 4 October 1989 (04.10.1989) -- ----- | 46-86 (PARTI - ALLY) |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No. PCT/FI2003/000615 |
|---|

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

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

1. Claims Nos.: **46-53**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see extra sheet

2. Claims Nos.: **57-59, 69-70, 73-76, 83-84**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see extra sheet

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: **1-45, 46-86 (partially)**

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2003/000615Box II.1

Claims 46-53 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy or diagnostic methods practiced on the human or animal body (Rule 39.1(iv)). Nevertheless, a search has been executed for these claims.

Box II.2

Present claims 57-59, 69-70, 73-76 and 83-84 relate to compositions defined by reference to desirable characteristics or properties, namely *inter alia* the capability of the enzyme substrate of claim 57 of being transferred to a surface of a pathogenic entity. The claims cover all enzyme substrates having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and / or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of compounds. Additionally, previously known compounds may be included in the scope of the present claims. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the composition by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Box III

This International Searching Authority found multiple inventions.

The separate inventions are:

Invention 1.1, (claims 1-5 (partially), 6-8, 13-45 (partially) and 46-86 (partially)) concerns a pharmaceutical composition comprising a substance binding to a terminal N-glycan oligosaccharide sequence according to Formula I or Formula II and a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of the above described terminal oligosaccharide. It also concerns: other pharmaceutical compositions, a diagnostic agent, an antigenic substance and use thereof, a cancer vaccine, a binding substance, a method for identifying therapeutics or diagnostic agents, a functional food, a method of transferring a modified monosaccharide derivative to a terminal β -N-acetylglucosamine (GlcNAc) structure and an enzyme substrate composition.

.../...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2003/000615

Invention 1.2, (claims 1-5 (partially), 9, 11-12, 13-45 (partially) and 46-86 (partially)) concerns a pharmaceutical composition comprising a substance binding to a terminal O-glycan oligosaccharide sequence according to Formula III or according to claim 12 and a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of the above described terminal oligosaccharide. It also concerns: other pharmaceutical compositions, a diagnostic agent, an antigenic substance and use thereof, a cancer vaccine, a binding substance, a method for identifying therapeutics or diagnostic agents, a functional food, a method of transferring a modified monosaccharide derivative to a terminal β -GlcNAc structure and an enzyme substrate composition.

Invention 1.3, (claims 1-5 (partially), 10, 13-45 (partially) and 46-86 (partially)) concerns a pharmaceutical composition comprising a substance binding to a terminal GlcNAc linked to a protein and a method for diagnosing cancer in a biological sample comprising determining the presence of the above described terminal oligosaccharide. It also concerns: other pharmaceutical compositions, a diagnostic agent, an antigenic substance and use thereof, a cancer vaccine, a binding substance, a method for identifying therapeutics or diagnostic agents, a functional food, a method of transferring a modified monosaccharide derivative to a terminal β -GlcNAc structure and an enzyme substrate composition.

Invention 2.1, (claims 46-86 (partially)) concerns a method of treatment or diagnosis of cancer by transferring a modified monosaccharide derivative to cancer cells by a glycosyl transferase or a transglycosylate enzyme.

Invention 2.2, (claims 46-86 (partially)) concerns a composition comprising an enzyme substrate, capable of being transferred specifically to a surface of a pathogenic entity by a transferring enzyme.

Invention 3, (claims 51-56 (partially) and 86 (partially)) concerns a substance according to Formula P1, a substance according to formula CT2 and a method to synthesise these substances. The pegylated peptides of formula P1 could generally be used for improving the quality of therapeutic proteins. The modification of cells and tissues according to Formula CT2 could generally be used for therapy such as transplantation or treatment of wounds or tissue damage.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

27/02/2004

International application No.

PCT/FI 2003/000615

| | | | | | | |
|----|----------|----|------------|----|--------------|------------|
| WO | 03016915 | A1 | 27/02/2003 | FI | 20011671 A | 21/02/2003 |
| EP | 0255342 | A1 | 03/02/1988 | SE | 0255342 T3 | |
| | | | | AT | 76512 T | 15/06/1992 |
| | | | | AU | 601455 B | 13/09/1990 |
| | | | | AU | 7626787 A | 04/02/1988 |
| | | | | DE | 3779207 A | 25/06/1992 |
| | | | | DK | 392387 A | 12/02/1988 |
| | | | | ES | 2032447 T | 16/02/1993 |
| | | | | GB | 2195343 A,B | 07/04/1988 |
| | | | | GB | 8618443 D | 00/00/0000 |
| | | | | GB | 8717792 D | 00/00/0000 |
| | | | | GR | 3005450 T | 24/05/1993 |
| | | | | IE | 59984 B | 04/05/1994 |
| | | | | IE | 872041 L | 29/01/1988 |
| | | | | JP | 63119498 A | 24/05/1988 |
| | | | | NZ | 221230 A | 26/04/1990 |
| | | | | US | 6391634 B | 21/05/2002 |
| | | | | ZA | 8705551 A | 27/04/1988 |
| DE | 3807594 | A1 | 21/09/1989 | AT | 90793 T | 15/07/1993 |
| | | | | DE | 3844628 C | 19/05/1993 |
| | | | | DE | 58904746 D | 00/00/0000 |
| | | | | EP | 0406259 A,B | 09/01/1991 |
| | | | | SE | 0406259 T3 | |
| | | | | JP | 2693247 B | 24/12/1997 |
| | | | | JP | 3503281 T | 25/07/1991 |
| | | | | US | 5625037 A | 29/04/1997 |
| | | | | WO | 8908845 A | 21/09/1989 |
| WO | 0021552 | A1 | 20/04/2000 | AU | 1443900 A | 01/05/2000 |
| US | 6075134 | A | 13/06/2000 | US | 6458937 B | 01/10/2002 |
| | | | | US | 2003049721 A | 13/03/2003 |
| WO | 9114697 | A1 | 03/10/1991 | DE | 4009630 A,C | 02/10/1991 |
| | | | | EP | 0521941 A | 13/01/1993 |
| | | | | JP | 5507191 T | 21/10/1993 |
| | | | | US | 5405753 A | 11/04/1995 |
| WO | 0187321 | A2 | 22/11/2001 | AU | 6258901 A | 26/11/2001 |
| | | | | EP | 1282720 A | 12/02/2003 |
| | | | | GB | 0012216 D | 00/00/0000 |
| | | | | US | 2003153056 A | 14/08/2003 |
| EP | 0334962 | A1 | 04/10/1989 | CA | 1335071 A,C | 04/04/1995 |
| | | | | DE | 3853582 D,T | 02/11/1995 |
| | | | | JP | 11262802 A | 28/09/1999 |
| | | | | JP | 1065454 A | 10/03/1989 |
| | | | | JP | 2579497 B | 05/02/1997 |
| | | | | US | 4994374 A | 19/02/1991 |
| | | | | WO | 8902474 A | 23/03/1989 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 K 39/385 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P 37/04 | A 6 1 P 35/00 | |
| C 0 7 K 16/18 | A 6 1 P 37/04 | |
| C 1 2 P 21/08 | C 0 7 K 16/18 | |
| C 1 2 Q 1/02 | C 1 2 P 21/08 | |
| | C 1 2 Q 1/02 | |
| | A 6 1 K 37/52 | |
| | A 6 1 K 37/46 | |

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

(72) 発明者 カールソン, カール - アンデシュ
スウェーデン国、エス - 4 1 1 4 3 イェーテボリ、ニルソンスバリ 3 5

(72) 発明者 サトマー, テロ
フィンランド国、エフアイエヌ - 0 0 7 0 0 ヘルシンキ、ラエティエ 1 0 コー

(72) 発明者 ヘイスカネン, アンナマリ
フィンランド国、エフアイエヌ - 0 0 3 7 0 ヘルシンキ、エルヤクセンティエ 3

Fターム(参考) 4B018 LB10 MD20 ME08
4B063 QA19 QQ08 QR43 QX07 QX10
4B064 AG26 AG27 CA10 CE10 DA01 DA13
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 BA34 CA27 DA31 DC25 MA02
NA14 ZB05 ZB092 ZB262
4C085 AA03 AA04 AA13 AA14 AA26 BB01 BB22 BB24 BB33 BB36
BB37 DD86 DD88 EE03 EE06
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA53 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50
FA10 GA21

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 肿瘤特异性寡糖表位及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005535723A | 公开(公告)日 | 2005-11-24 |
| 申请号 | JP2004530289 | 申请日 | 2003-08-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | Tessera公司生物在内比的合作社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 生物三通Serapyizu小屋 | | |
| [标]发明人 | ナトウネンヤリ テネベリスサン カールソンカールアンデシュ サトマーテロ ヘイスカネンアンナマリ | | |
| 发明人 | ナトウネン,ヤリ テネベリ,スサン カールソン,カール-アンデシュ サトマー,テロ ヘイスカネン,アンナマリ | | |
| IPC分类号 | A23L1/305 A61B A61K31/70 A61K38/17 A61K38/36 A61K38/45 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395 A61K47/36 A61K47/48 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 C07H3/06 C07H5 /06 C07K1/22 C07K2/00 C07K16/18 C07K16/32 C12P21/08 C12Q1/02 G01N30/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 | | |
| CPC分类号 | A61K39/39558 A61K38/1709 A61K38/45 A61K39/00 A61K47/549 A61K47/6851 A61K2039/505 C07H3 /06 C07K16/18 C12Y204/00 G01N33/57469 G01N33/57492 | | |
| FI分类号 | A61K39/395.E A61K39/395.C A61K39/395.L A61K39/395.T A23L1/305 A61K39/385 A61P35/00 A61P37/04 C07K16/18 C12P21/08 C12Q1/02 A61K37/52 A61K37/46 | | |
| F-TERM分类号 | 4B018/LB10 4B018/MD20 4B018/ME08 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR43 4B063/QX07 4B063 /QX10 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA34 4C084/CA27 4C084/DA31 4C084 /DC25 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB05 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA26 4C085/BB01 4C085/BB22 4C085/BB24 4C085/BB33 4C085 /BB36 4C085/BB37 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE03 4C085/EE06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA10 4H045/GA21 | | |
| 优先权 | PCT/FI2002/000681 2002-08-20 WO | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明描述了由人肿瘤特异性表达的寡糖序列。本发明涉及在生物样品中测定寡糖序列的方法，所述寡糖序列包含肿瘤特异性末端N-乙酰葡萄糖胺残基，所述样品中所述序列的存在是癌症存在的指示。本发明提供了包含多价形式的所述寡糖序列的抗原物质，并且它还提供了包含所述寡糖序列或与所述寡糖序列结合的物质的诊断剂，药物组合物和癌症疫苗。本发明还涉及治疗癌症的方法。

| (51) Int.Cl. ⁷ | | F I | ターマコード (参考) |
|---------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------|
| A 6 1 K | 39/395 | A 6 1 K 39/395 | E 4 B 0 1 8 |
| A 2 3 L | 1/305 | A 6 1 K 39/395 | C 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 K | 38/38 | A 6 1 K 39/395 | L 4 B 0 6 4 |
| A 6 1 K | 38/45 | A 6 1 K 39/395 | T 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K | 39/385 | A 2 3 L 1/305 | 4 C 0 8 5 |
| | | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | (全 88 頁) 最終頁 |
| (21) 出願番号 | 特願2004-530289 (P2004-530289) | (71) 出願人 | 502107469 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年8月20日 (2003. 8. 20) | | バイオティ セラピューズ コーポ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年4月7日 (2005. 4. 7) | | フィンランド国、エフアイエヌー2 C |
| (86) 国際出願番号 | PCT/FI2003/000615 | | O トゥルク、テキストカトゥ |
| (87) 国際公開番号 | W02004/017810 | (74) 代理人 | 100116838 |
| (87) 国際公開日 | 平成16年3月4日 (2004. 3. 4) | | 弁理士 渡邊 潤三 |
| (31) 優先権主張番号 | PCT/FI02/00681 | (72) 発明者 | ナトゥネン、ヤリ |
| (32) 優先日 | 平成14年8月20日 (2002. 8. 20) | | フィンランド国、エフアイエヌーO 1 |
| (33) 優先権主張国 | フィンランド (FI) | | O ヴァンター、オーランニンティエ |
| | | | O エー 1 8 |
| | | (72) 発明者 | テネベリ、スサン |
| | | | スウェーデン国、エスー4 3 0 6 3 |
| | | | ドス、ポストボックス 1 6 3 9 |