

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-63524
(P2015-63524A)

(43) 公開日 平成27年4月9日(2015.4.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	ZNA
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	N
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	
A61P 1/18 (2006.01)	A61P 1/18	
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00	H

審査請求 有 請求項の数 23 O L 外国語出願 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-205188 (P2014-205188)
 (22) 出願日 平成26年10月3日 (2014.10.3)
 (62) 分割の表示 特願2011-243732 (P2011-243732)
 の分割
 原出願日 平成17年3月30日 (2005.3.30)
 (31) 優先権主張番号 0403378
 (32) 優先日 平成16年3月31日 (2004.3.31)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 0413428
 (32) 優先日 平成16年12月16日 (2004.12.16)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 511025226
 ユニヴェルシテ デクスーマルセイユ
 UNIVERSITE D' AIX-MA
 RSEILLE
 フランス、エフ-13284 マルセイユ
 セデックス 07、ブルパール シャ
 ルル リヴォン、ジャルダン ドュ ファ
 ロ、58
 Jardin du Pharo, 58
 , Bid Charles Livon
 , F-13284 Marseille
 cedex 07, France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵構造から誘導される糖ペプチド、抗体ならびに診断および治療におけるそれらの応用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】膵臓癌または他の膵臓の病状の特異的マーカー、診断および治療。

【解決手段】胆汁酸塩依存性リパーゼ (B S D L) またはヒト胎児膵腺房タンパク質 (F A P P) の C 末端部において発現されるグリコシル化エピトープに対する抗体が尿中の B S D L - および F A P P - 由来糖ペプチドを検出し得ることを見出した。特に、 F A P P の C 末端部において発現されるグリコシル化エピトープに対する抗体は、尿中の糖ペプチドを検出し得、膵臓の病状、特に、膵臓癌を伴う被験体を同定することが可能である。上記エピトープを含む糖ペプチド及び上記エピトープを認識する抗体の医薬への応用。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体 16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、およびモノクローナル抗体 16D10と同じエピトープに本質的に結合する抗体から選択されるモノクローナル抗体。

【請求項 2】

ヒト化されているか、キメラかまたはヒト抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

IgG型である、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

一本鎖抗体である、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 5】

インビボまたはインビトロで膵臓の病状を検出するために使用し得る診断組成物を調製するための請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【請求項 6】

膵臓の病状が膵臓癌である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

被験体由来の生物学的サンプルと請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体とを接触させ、前記抗体と前記生物学的サンプルとの間の免疫反応から生じる免疫複合体の形成を検出することを含んでなる、膵臓の病状を患う被験体のインビトロでの検出方法。

【請求項 8】

前記生物学的サンプルが膵臓組織のサンプルである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物学的サンプルが、膵液、血清および尿の中から好適に選択される生物学的液体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

膵臓癌を患う被験体の検出を可能にする、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、および場合により、生物学的サンプルと前記抗体との間の免疫反応から生じる免疫複合体を検出するための手段を含んでなる、膵臓の病状の診断のためのキット。

【請求項 12】

被験体の尿を回収し、前記尿と、配列番号 14 に記載され、コア 2 (1-6)N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C2GnT)、(1-3) および (1-4) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ FUT3、または (1-3) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ FUT7 よりなる群において選択されるオース-トランスフェラーゼ活性を有する 1 つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の 1 ~ 40 反復を含んでなる糖ペプチドを特異的に認識し得る抗体とを接触させ、前記抗体と前記尿との間の免疫反応から生じる免疫複合体の形成を検出することを含んでなる、膵臓の病状を患う被験体のインビトロでの検出方法。

【請求項 13】

前記抗体が、抗体 J28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体が、抗体 16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

膵臓癌を患う被験体の検出を可能にする、請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

配列番号 14 に記載され、コア 2 (1-6) N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C2GnT)、(1-3) および (1-4) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ FUT3、または (1-3) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ FUT7 よりなる群において選択されるオース-トランスフェラーゼ活性を有する 1 つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の 1 ~ 40 反復を含んでなる糖ペプチドを含んでなる医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 17】

前記糖ペプチドが、酵素 C2GnT および FUT3 によってグリコシル化される、請求項 16 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。 10

【請求項 18】

前記糖ペプチドが、酵素 C2GnT および FUT7 によってグリコシル化される、請求項 16 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 19】

前記糖ペプチドが、酵素 C2GnT、FUT3 および FUT7 によってグリコシル化される、請求項 16 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 20】

前記糖ペプチドが、(1-3) ガラクトシルトランスフェラーゼ (GT) によってさらにグリコシル化される、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。 20

【請求項 21】

前記糖ペプチドが、1 ~ 15 の間の前記反復を含んでなる、請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 22】

前記糖ペプチドが組換え体である、請求項 16 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 23】

前記糖ペプチドが生物学的液体から精製される、請求項 16 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。 30

【請求項 24】

前記生物学的液体が尿である、請求項 23 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 25】

前記尿は、膵臓の病状を患う被験体由来である、請求項 24 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 26】

前記尿が、膵臓癌を患う被験体由来である、請求項 25 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 27】

前記糖ペプチドが抗原提示細胞上に充填される、請求項 16 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。 40

【請求項 28】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項 27 に記載の医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 29】

膵臓疾患の予防的または治療的処置を目的とする医薬品を調製するための請求項 16 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 30】

膵臓疾患が膵臓癌である、請求項 29 に記載の使用。

【請求項 31】

配列番号 14 に記載され、コア 2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T)、 (1 - 3) および (1 - 4) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ F U T 3、または (1 - 3) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ F U T 7 よりなる群において選択されるオース - トランスフェラーゼ活性を有する 1 つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の 1 ~ 40 反復を含んでなる糖ペプチドを特異的に認識し得る抗体を含んでなる医薬組成物。

【請求項 32】

前記糖ペプチドが、酵素 C 2 G n T および F U T 3 によってグリコシル化される、請求項 31 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 33】

前記糖ペプチドが、酵素 C 2 G n T および F U T 7 によってグリコシル化される、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 34】

前記糖ペプチドが、酵素 C 2 G n T、F U T 3 および F U T 7 によってグリコシル化される、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

前記糖ペプチドが、1 ~ 15 の間の前記反復を含んでなる、請求項 31 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記抗体が、抗体 J 28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である、請求項 31 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 37】

前記抗体が、抗体 16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である、請求項 31 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

膵臓疾患の予防的または治療的処置を目的とする医薬品を調製するための請求項 31 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の使用。

30

【請求項 39】

膵臓疾患が膵臓癌である、請求項 38 に記載の使用。

【請求項 40】

配列番号 14 に記載され、コア 2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T)、 (1 - 3) および (1 - 4) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ F U T 3、または (1 - 3) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ F U T 7 よりなる群において選択されるオース - トランスフェラーゼ活性を有する 1 つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の 1 ~ 40 反復を含んでなる組換え体の、単離または精製された糖ペプチドであって、 (1 - 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ (G T) によってさらにグリコシル化される、糖ペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膵構造から誘導される糖ペプチド、抗体ならびに診断および治療におけるそれらの応用に関する。

【0002】

より具体的には、本発明は、I 型糖尿病を患う患者において誘導される抗体によって認識され、ヒトまたは動物由来の生物学的液体から精製される多様なグリコシル化エピトープを (単独または組み合わせで) 担持する B S D L および / または F A P P の天然の C -

50

末端糖ペプチドを得ること、ならびにFAPPおよび/またはBSDLのC末端ペプチドをコードするcDNAおよび前記糖ペプチドを組み立てるのに必要な異なるグリコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有する細胞系統から生物学によって産生される前記組換え糖ペプチドに関する。本発明はまた、BSDLおよび/またはFAPPの組換えならびに/あるいは天然のC-末端糖ペプチドを認識するモノクローナル抗体、ならびに糖尿病および膵外分泌部の癌のような膵臓の病状または他の任意の病状ならびに前記病状の治療もしくは予防プロトコルにおける診断あるいは予防的または治療的処置に使用することができる免疫原性因子、診断薬および治療用薬剤としての前記糖ペプチドならびに前記モノクローナル抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

膵外分泌部の癌は、消化器癌の20%を占め、最も進行性のものの1つである。仏国では、例えば、毎年4,000例の新たな症例が診断される。さらに、その頻度は、世界の多くの地域で顕著に上昇している。1年生存率は20%以下、5年生存率は3%以下であり、平均生存期間は診断後3~4箇月である。癌は診断されるのが遅く、主に腹膜および肝転移の形成を介して、迅速に進行する。さらに、腫瘍が解剖学的に深部に局在すること、高感度かつ特異的な早期生物学的マーカーが存在しないことおよびその無症候性のため、診断は常に遅れる。現在、化学療法および放射線に対して難治性を示す膵外分泌癌の有効な治療は認められていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、これらの疾患を診断するために利用可能な膵臓癌または他の膵臓の病状の特異的マーカーを有し、有効な処置を提供するための製品を有することが所望される。

【課題を解決するための手段】

【0005】

今回、広範な研究後、かつ驚くべき様式で、本出願人らは、膵臓腫瘍細胞の表面で発現される膵臓の病状、特に、膵臓癌の特異的マーカーを見出した。

【0006】

本出願人らは、糖尿病患者において、胆汁酸塩依存性リパーゼ(BSDL)のC末端ペプチドのグリコシル化抗原構造に対して指向された循環抗体を見出した。

【0007】

本出願人らはまた、ヒト胎児膵腺房タンパク質(human fetoacinar pancreatic protein)(FAPP)のC末端部において発現されるグリコシル化エピトープに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体が、ヒト膵臓腫瘍細胞系統を特異的に認識するが、膵臓由来ではない腫瘍細胞は認識しないことを見出した。

【0008】

本出願人らはまた、ヒト胎児膵腺房タンパク質(FAPP)のC末端部において発現されるグリコシル化エピトープに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体が、ヒト膵臓腫瘍細胞系統を特異的に認識するが、正常な膵臓組織は認識しないことを見出した。

【0009】

本出願人らは、BSDLまたはFAPPのC末端部において発現されるグリコシル化エピトープに対する抗体が尿中のBSDL-およびFAPP-由来糖ペプチドを検出し得ることを見出した。特に、FAPPのC末端部において発現されるグリコシル化エピトープに対する抗体は、尿中の糖ペプチドを検出し得、膵臓の病状、特に、膵臓癌を伴う被験体を同定することが可能である。

【0010】

従って、より具体的には、本出願人らは、糖ペプチド構造を有する化合物であって、そのペプチド部は、正常な膵分泌物に存在するBSDL、消化性脂質分解酵素の反復C末端

10

20

30

40

50

配列に基づくか、またはFAPP(BSDLの癌胎児性形態)の反復C末端配列に基づく上記化合物が、膵臓の病状のそのような特異的マーカーを構成することを見出した。

【0011】

実際、BSDLおよびFAPPは、配列Ala Pro Pro Val Pro Pro Thrおよびグリコシル化部位を有する7アミノ酸を伴う一般的な不変部を含んでなる11アミノ酸の反復C末端ペプチド配列を含んでなる。前記一般的な不変部は、しばしばグルタミン酸によって置換されるグリシンによっていずれか一方の部位において隣接され、N末端側においてアミノ酸AspおよびSerを含有する。

【0012】

本出願人らはまた、宿主細胞によって、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)からの発現および分泌によって調製され得る糖ペプチド構造を有する化合物であって、C末端ペプチドの1つもしくはそれ以上の反復配列、特にBSDLの組換え体、例えば、16反復配列のすべてまたは一部をコードするDNA分子を含む遺伝子構築物を含んでなり、また、特に、コア2(1-6)N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、(1-3)および(1-4)フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼFUT3、または(1-3)フコシルトランスフェラーゼ活性のみを有するフコシルトランスフェラーゼFUT7よりなる群において選択されるオーストランスフェラーゼ(ose-transferase)活性を伴う少なくとも1つの酵素をコードするDNA分子などの遺伝子構築物を含んでなる上記化合物が、膵臓癌の前記特異的マーカーを構築することを見出した。

【0013】

従って、本出願は、BSDLまたはFAPPの11アミノ酸よりなる1~40反復C末端ポリペプチドを含んでなる特に組換え体の、おそらく単離または精製された糖ペプチドを対象物として有し、前記ポリペプチドは、グリコシル化され、I型糖尿病を伴う患者において誘導される抗体との特異的免疫反応を惹起するグリコシル化エピトープを担持し、そして

- またはそうでなければヒトまたは動物由来の生物学的液体から精製され、
- またはそうでなければ、組換え体であり、グリコシル化を引き起こすのに必要な酵素機構を含んでなる従来の宿主細胞における発現によって産生され、前記宿主細胞は、前記ポリペプチドをコードする遺伝子ならびにグリコシルトランスフェラーゼから、ならびに特に、コア2(1-6)N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(C2GnTと略称される)、(1-3)ガラクトシルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ3(FUT3と略称される)およびフコシルトランスフェラーゼ7(FUT7と略称される)から選択される1つもしくはそれ以上の酵素をコードする遺伝子を含んでなるように遺伝子改変されている。

【0014】

本発明の実施の他の好適な条件において、上記糖ペプチドは、BSDLまたはFAPPの11アミノ酸を伴う1~40グリコシル化反復C末端ペプチドより本質的になり、前記グリコシル化ペプチドより特に独占的になる。それ故に、従って、本発明は、11アミノ酸、好ましくは：D-S-G/E-A-P-P-V-P-P-T-G/E(配列番号14)の反復C末端ペプチド配列の反復を含んでなるか、または本質的になる単離された、精製されたまたは組換え糖ペプチドに関する。前記糖ペプチドは、1~40反復を含有することができる。好適な実施形態では、前記糖ペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40反復を含んでなる。好ましくは、糖ペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40反復を含んでなる。特定の実施形態では、糖ペプチドは、1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、

10

20

30

40

50

13、14、15、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40反復を含んでなる。別の代替的な実施形態では、糖ペプチドは、1～15の間の反復（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15反復）、好ましくは、2～10の間の反復（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10反復）を含んでなる。さらなる実施形態では、糖ペプチドは、17～40の間の反復（例えば、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40反復）を含んでなる。本発明を行うための好適な条件において、上記の糖ペプチドは、1～40、好ましくは、4～25、より具体的には、6～16反復C末端ポリペプチドを含んでなる。特定の実施形態では、糖ペプチドは、6反復を含んでなるか、または本質的になる。

10

20

30

40

50

【0015】

好ましくは、本発明に従う糖ペプチドは、コア2（1-6）N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（C2GnT）、（1-3）および（1-4）フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼFUT3、または（1-3）フコシルトランスフェラーゼ活性のみを有するフコシルトランスフェラーゼFUT7よりなる群において選択されるオーストランスフェラーゼ活性を有する1つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化される。特定の実施形態では、本発明に従う糖ペプチドは、酵素C2GnTおよびFUT3によってグリコシル化されている。代替的实施形態では、本発明に従う糖ペプチドは、酵素C2GnTおよびFUT7によってグリコシル化されている。本発明はまた、酵素C2GnT、FUT3およびFUT7によってグリコシル化されている糖ペプチドを包含する。好適な実施形態では、本発明に従う糖ペプチドは、（1-3）ガラクトシルトランスフェラーゼ（GT）によってさらにグリコシル化されている。従って、本発明に従う糖ペプチドが組換え体である場合、それを産生する宿主細胞は、前記ポリペプチドをコードする遺伝子ならびにグリコシルトランスフェラーゼから、特に、C2GnT、FUT3およびFUT7のなかから選択される1つもしくはそれ以上の酵素をコードする遺伝子を含んでなる。好適な実施形態では、前記宿主細胞は、（1-3）ガラクトシルトランスフェラーゼ（GT）をコードする遺伝子をさらに含んでなる。

【0016】

特に好適な実施形態では、本発明は、配列番号14に記載され、コア2（1-6）N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（C2GnT）、（1-3）および（1-4）フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼFUT3、または（1-3）フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼFUT7よりなる群において選択されるオーストランスフェラーゼ活性を有する1つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の1～40反復を含んでなる組換え体の、単離または精製された糖ペプチドに関し、前記糖ペプチドは、（1-3）ガラクトシルトランスフェラーゼ（GT）によってさらにグリコシル化される。

【0017】

「単離された糖ペプチド」は、前記化合物がそれらの天然の環境から分離されることを意味すると理解される。従って、前記化合物は、それらの天然の環境の他の成分のいくつかまたはすべてから分離される。

【0018】

「精製された糖ペプチド」は、前記化合物が、少なくとも約1、好ましくは、少なくとも2、3、4または5倍の因数だけ、混合物において富化されることを意味すると理解される。用語「精製された」は、化合物が絶対的に純粋であることを必ずしも意味しない。例えば、前記化合物は、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の純度を有することができる。しかし、好ましくは、前記化合物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において唯一の単一のバンドを生じる。

【 0 0 1 9 】

それらが得られる任意の適切な分離および/または精製方法を使用することができる。特定の実施形態では、糖ペプチドは、ヒトまたは動物被験体由来の生物学的液体から精製される。生物学的液体は、血清、尿、膵液および乳汁分泌物よりなる群において選択され得る。好ましくは、生物学的液体は尿である。好適な実施形態では、被験体は、膵臓疾患、好ましくは、膵臓癌を患い得るかまたは患っている患者である。別の実施形態では、糖ペプチドは、細胞培養物から精製される。さらなる実施形態では、糖ペプチドは、組織サンプル、好ましくは、膵臓組織、特に膵臓組織腫瘍から精製される。

【 0 0 2 0 】

本出願の思想において、用語「糖型」はグリコシル化エピトープを指す。グリコシル化エピトープは、1つもしくはそれ以上のグリコシル化鎖を包含し得る。用語「m A b」(仏語で「A c m」)は、モノクローナル抗体を指し、用語「p A b」(仏語で「A c p」)はポリクローナル抗体を指す。

10

【 0 0 2 1 】

特定の実施形態では、本発明は、本発明に従う抗体との特異的免疫反応を惹起することができる本発明に従う糖ペプチドに関する。好ましくは、糖ペプチドは、J 2 8および1 6 D 1 0から選択される1つもしくはそれ以上の抗体との特異的免疫反応を惹起することができる。場合により、糖ペプチドは、J 2 8との特異的免疫反応を惹起する。あるいは、それは、1 6 D 1 0との特異的免疫反応を惹起する。

【 0 0 2 2 】

遺伝子操作において古典的に使用される宿主細胞は、酵素、例えば、一般にペプチドのセリンまたはスレオニン残基上にN - アセチルガラクトサミンを付加する - 3 N - アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼを天然に含有する。例えば、これは、そのような酵素を含有するC 1 2 7、C O S、C H OまたはC H O - K 1のような広範に使用される宿主細胞の場合にあてはまる。

20

【 0 0 2 3 】

本出願および以下のその内容において、用語「従来の宿主細胞」は、糖ペプチドの産生のために通常使用される細胞、好ましくは、ヒト細胞もしくはC 1 2 7、C O S細胞のような動物細胞、またはヨウトガ (*Spodoptera frugiperda*) 卵巣細胞のような昆虫細胞、特にC H OまたはC H O - K 1細胞を示す。そのような適切な従来の宿主細胞は、特に、その遺伝子機構および多様なグリコシル化エピトープを作製するその能力に基づいて、選択され得る。前記選択を行うために、酵素アッセイを行って、使用を所望する宿主細胞における特に、 - 3 N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの存在を検出することができる。

30

【 0 0 2 4 】

使用されるグリコシルトランスフェラーゼは、動物、または好ましくはヒト由来であり得る。

【 0 0 2 5 】

本発明の実施の好適な条件において、遺伝子改変された従来の宿主細胞は、前記ポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子ならびにコア2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T) およびフコシルトランスフェラーゼ3 (F U T 3) をコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる。

40

【 0 0 2 6 】

特に、膵臓癌における適用のための本発明の実施の他の好適な条件において、遺伝子改変された従来の宿主細胞は、前記ポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子ならびにコア2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T) 、フコシルトランスフェラーゼ3 (F U T 3) および (1 - 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ (G T) をコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる。

【 0 0 2 7 】

特に、I型糖尿病における適用のための本発明の実施のなお他の好適な条件において、

50

遺伝子改変された従来の宿主細胞は、前記ポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子ならびにグルコシルトランスフェラーゼのコア2 (1-6) N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ (C2GnT) およびフコシルトランスフェラーゼ7 (FUT3) をコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる。

【0028】

反復C末端ペプチドのすべてまたは一部をグリコシル化することができる。好ましくは、すべての反復配列がグリコシル化され、一般に、16配列、より具体的には、6配列、および特に、2配列がグリコシル化される。

【0029】

グリコシル化は、1つもしくはそれ以上のN-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸、グルコース、ガラクトース、フコースによることができる。

10

【0030】

本発明の実施のなお他の好適な条件において、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって評価される上記の糖ペプチドのサイズは、有利には20~120 kDaの間に含まれ、好ましくは20~85 kDaの間に含まれ、より具体的には45~83 kDaの間に含まれる。

【0031】

特に、C2-F3-16R、C2-F3-GT-6Rおよびより具体的にはC2-F3-6RおよびC2-F7-16Rと称される糖ペプチドが考慮される。C2-F3-16Rは、C2GnTおよびFUT3によってグリコシル化される16反復を有する糖ペプチドを表す。C2-F3-GT-6Rは、C2GnT、FUT3およびGTによってグリコシル化される6反復を有する糖ペプチドを表す。C2-F3-6Rは、C2GnTおよびFUT3によってグリコシル化される6反復を有する糖ペプチドを表す。C2-F7-16Rは、C2GnTおよびFUT7によってグリコシル化される16反復を有する糖ペプチドを表す。好ましくは、本発明に従う糖ペプチドは、C2-F3-6R、C2-F3-GT-6R、C2-F7-6R、C2-F7-GT-6R、C2-F3-F7-6R、およびC2-F3-F7-GT-6Rよりなる群において選択される。

20

【0032】

糖ペプチドC2-F7-16Rを産生する細胞株は、2004年3月16日に番号I-3189でパリのCollection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) に寄託された。

30

【0033】

当業者であれば、ペプチドは、機能を変更することなく、いくらか構造的に改変し得ることを知っている。

【0034】

ペプチドは、改変がその免疫学的特徴に影響を及ぼさない限り、欠失、置換、付加またはアミノ酸のアシル化のような官能基化のようなそのアミノ酸の1つもしくはそれ以上の改変を含有することができる。特に、改変は、保存的アミノ酸 (即ち、類似の物理化学的特徴を有する) による置換であり得る。例えば、一般に、イソロイシン残基によるロイシン残基の置換は、かかる特性に影響を及ぼさない。一般に、改変は、ペプチドの40%未満、特に、30%未満、好ましくは、20%未満、およびより具体的には、10%未満のアミノ酸を含有しなければならない。改変されたペプチドが変性されない (例えば、加熱のような物理的処置を受けることができる) ことにより、改変された誘導体によって誘導される抗体が生来の構造に対して活性を有し、そのコンホメーションの部位を保存することは、重要である。

40

【0035】

一般に、上記の改変された糖ペプチドと上記の生来の糖ペプチドとの間の改変、相同性または類似性、ならびに使用、または本発明に従う免疫原性化合物の破傷風トキシドのような免疫原性タンパク質への結合の態様については、特に、国際公開第A-86/06414号パンフレットまたはEP-A-0.220.273号明細書またはそうでなけれ

50

ば国際特許出願第 P C T / U S 8 6 / 0 0 8 3 1 号明細書などを参照することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明の対象である糖ペプチドは、特に、ヒトまたは動物由来の腓液、血清、乳汁、尿もしくは羊水から調製することができる。好適な実施形態では、本発明に従う糖ペプチドは、ヒトあるいは動物由来の尿から単離および/または精製される。好ましくは、尿はヒト由来である。好適な実施形態では、尿は、膵臓の病状を患い得るかまたは患っている患者由来である。好ましくは、膵臓の病状は膵臓癌である。当業者であれば、本糖ペプチドを精製および/または単離するために使用することができる技術に精通している。特に、糖ペプチドは、例えば、前記方法に限定されることなく、遠心分離、限外ろ過、濃縮工程、排除もしくはアフィニティークラム上での液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーまたは陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動あるいは前記技術の組み合わせを使用して、精製することができる。特に、J 2 8 および 1 6 D 1 0 などの本発明に従う糖ペプチドに特異的な抗体は、アフィニティー精製に使用することができる。精製プロトコルの例については、実験 7 に記載されている。従って、本発明は、被験体の尿を回収し、尿から前記糖ペプチドを精製することを含んでなる本発明に従う糖ペプチドの調製方法に関する。

10

【 0 0 3 7 】

本発明は、さらに特に、膵臓の病状、特に、膵臓癌を患い得るかまたは患っている患者の尿から精製および/または単離される本発明に従う糖ペプチドに関する。以下に記載のとおり、前記精製された糖ペプチドは、免疫療法による予防または治療的処置のために使用することができる。例えば、それらは、医薬組成物および/またはワクチン組成物を調製するために使用することができる。

20

【 0 0 3 8 】

本糖ペプチドは、組換え体であり、以下の通りに調製することができる。

【 0 0 3 9 】

CHO - K 1 のような従来の適切な宿主細胞系統は、所望されるトランスフェラーゼの相補的 DNA を含んでなるプラスミドで、または例えば、リポフェクタミンを使用することによって、所望されるトランスフェラーゼ、例えば、グリコシルトランスフェラーゼのコア 2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T) 、 フコシルトランスフェラーゼ 3 (F U T 3) 、 フコシルトランスフェラーゼ 7 (F U T 7) もしくは (1 - 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ (G T) の相補的 DNA を含んでなるプラスミドにより、トランスフェクトされる。

30

【 0 0 4 0 】

得られる細胞系統は、発現および好ましくは、組換えペプチドの分泌を可能にするプラスミド、例えば、本発明の糖ペプチド、例えば、B S D L または F A P P の C 末端ドメインをコードする c D N A を含有する p S e c T a g プラスミドによって、トランスフェクトされる。配列番号 6、8、10 および 12 は、本発明に従う糖ペプチドをコードする配列の例である。

【 0 0 4 1 】

所望される c D N A を含有する細胞系統を培養することによって得られる組換え糖ペプチドは、次いで、例えば、ポリアクリルアミドゲル上であるいは液体および/またはアフィニティークロマトグラフィーによって有利に精製され、所望であれば、それは、同定のために S D S - P A G E によって分析される。

40

【 0 0 4 2 】

もちろん、他の任意の適切な方法によって、宿主細胞に、本糖ペプチドを調製するために必要な遺伝子を転移することが可能である。

【 0 0 4 3 】

上記の方法の実施の好適な条件において、CHO - K 1 のような適切な細胞系統は、グリコシルトランスフェラーゼのコア 2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T) 、 フコシルトランスフェラーゼ 3 (F U T 3) 、 および本発明

50

に従う糖ペプチド、例えば、FAPPまたは特に、BSDLのC末端ポリペプチドドメインの相補的DNAを含んでなるプラスミドで、この順でトランスフェクトされる。

【0044】

有利な様式において、CHO細胞系統および特に、CHO-K1細胞系統が宿主細胞として使用される。

【0045】

有利な様式において、プラスミドpSecTag、pcDNA-3またはpBK-CMVは、プラスミドとして使用される。

【0046】

さらに一般的には、本発明はまた、グリコシル化を引き起こすのに必要な酵素機構を含んでなる従来の宿主細胞に、本発明に従うポリペプチドをコードする遺伝子およびグリコシルトランスフェラーゼから選択される1つもしくはそれ以上の酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子を、所望される糖ペプチドの発現および場合により分泌を可能にする条件下で転移し、予期される糖ペプチドを単離することを特徴とする上記方法などの、糖ペプチドの調製方法を対象物として有する。

10

【0047】

本発明に従う糖ペプチド、および特に、FAPPまたはBSDLの天然もしくは誘導体糖ペプチドは、ロンバルド(Lombardo)ら1978年、Biochim. Biophys. Acta、527:142-149頁、またはアバウアキル(Abouakil)ら1988年、Biochim. Biophys. Acta、961:299-308頁、またはワング(Wang)およびジョンソン(Johnson)、1983年、Anal. Biochem.、133:457-461頁またはそうでなければブラックベルグ(Blackberg)およびヘルネル(Hernell)、1981年、Eur. J. Biochem. 116:221-225頁に記載のものなどのクロマトグラフィー方法によって、任意のヒトまたは動物由来の生物学的液体もしくは組織であれば何であれ、特に、血清、尿、唾液、乳汁分泌物、組織または細胞ホモジネートなどから単離されるタンパク質から調製することができる。均質なタンパク質は、次いで、任意の酵素、特に、タンパク質分解に關与する酵素的用法、または化学的方法のいずれかによって、加水分解される。

20

【0048】

天然の糖ペプチドは、特に、マス(Mas)ら1997年、Glycobiology、7:745-752頁、またはワング(Wang)ら1995年、Biochemistry、34:10639-10644頁において記載のクロマトグラフィー方法(ゲルろ過、アフィニティーおよび免疫アフィニティー、イオン交換など)、または他の任意の方法によって、単離することができる。

30

【0049】

前記糖ペプチドはまた、先に示した通り生物学的液体または組織から直接、または前記生物学的液体または組織の上記の酵素的もしくは化学的処置の後に精製、単離することができる。

【0050】

BSDLまたはFAPPの前記天然の糖ペプチドのグリコシル化は、特に、上記および下記に示される病状の診断のためまたは前記病状に対するワクチン化のため、または本発明の目的である抗体を入手もしくは産生させるために下記において使用されるグリカン構造を入手するために、任意の化学的あるいは酵素的経路(グリコシダーゼまたはグリコシルトランスフェラーゼの生来の、可溶性組換え体、特に膜の使用)によって、改変することができる。

40

【0051】

さらに、本発明の天然のまたは組換え糖ペプチドのペプチド配列を改変することが可能である。

【0052】

50

本発明の目的である天然および特に組換え体の単離または精製された糖ペプチドは、極めて興味深い特性を有する。特に、それらは、膵臓の病状に特異的な顕著な免疫原性特性を示す。

【0053】

前記特性は、実験セクションにおいて以下に例示される。それらは、医薬品としての上記糖ペプチドの使用を正当化する。

【0054】

これが、本発明が、ヒトまたは動物身体の治療処置の方法におけるその使用のため（即ち、医薬品として）の上記の糖ペプチドをもまた対象物として有する理由である。

【0055】

本発明に従う医薬品は、例えば、細胞に基づく免疫療法：患者の免疫系（樹状または他の細胞など）の活性化による自家ワクチン化のため、糖尿病の病状、より一般的には、1つもしくはそれ以上の前記糖ペプチドの使用を必要とする他の任意の病状を罹患した患者における前記構造に対して指向された循環抗体の検出によるI型糖尿病のような所定の病状の診断のための膵臓癌、乳癌の免疫療法（免疫化、ワクチン化）、予防的および/または治療的処置において使用することができる。

【0056】

それらはまた、炎症、転移の形成および病原体による進入の阻害のような他の生物学的システムにおいても使用することができる。

【0057】

従って、本発明は、本発明に従う糖ペプチドを含んでなる医薬組成物またはワクチン組成物に関する。特に、本発明は、配列番号14に記載され、コア2（1-6）N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（C2GnT）、（1-3）および（1-4）フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼFUT3、または（1-3）フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼFUT7よりなる群において選択されるオース-トランスフェラーゼ活性を有する1つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の1~40反復を含んでなる糖ペプチドを含んでなる医薬組成物またはワクチン組成物に関する。場合により、前記糖ペプチドは、酵素C2GnTおよびFUT3によってグリコシル化される。場合により、前記糖ペプチドは、酵素C2GnTおよびFUT7によってグリコシル化される。場合により、前記糖ペプチドは、酵素C2GnT、FUT3およびFUT7によってグリコシル化される。好ましくは、前記糖ペプチドは、（1-3）ガラクトシルトランスフェラーゼ（GT）によってさらにグリコシル化される。好適な実施形態では、前記糖ペプチドは、1~15の間の前記反復を含んでなる。前記糖ペプチドは、組換え体であるかまたは生物学的液体から精製され得る。好ましくは、前記生物学的液体は、尿、特に、膵臓の病状、特に、膵臓癌を患う被験体由来の尿である。特定の実施形態では、前記糖ペプチドは、抗原提示細胞、好ましくは、樹状細胞上に充填される。

【0058】

本発明はまた、本発明に従う糖ペプチドあるいは医薬組成物またはワクチン組成物の医薬品としての使用に関する。特に、本発明は、癌、炎症性障害、脈管の病状または病原体による感染症よりなる群において選択される疾患の予防的もしくは治療的処置を目的とする医薬品を調製するための本発明に従う糖ペプチドあるいは医薬組成物またはワクチン組成物の使用に関する。好ましくは、疾患は、乳癌または膵臓癌である。好適な実施形態では、本発明は、膵臓の病状、特に、膵臓癌の処置または予防を目的とする医薬品を調製するための本発明に従う糖ペプチドまたは医薬組成物もしくはワクチン組成物に関する。好適な実施形態では、糖ペプチドは、膵臓の病状、好ましくは、膵臓癌を患う被験体の尿からの精製によって得られる。

【0059】

アジュバント処方においては、免疫原、この場合本発明に従う糖ペプチドを、例えば、ISA51を使用することによって、特に、油中水型エマルジョンに含めることができる

10

20

30

40

50

。

【0060】

免疫原性糖ペプチドを含有するワクチン製剤は、筋肉内（i m）、皮下（s c）、皮内（i d）経路による全身型または鼻内、口内、膣または直腸経路による粘膜型の免疫応答を誘導するのに適切な医薬処方で投与することができる。

【0061】

免疫原性糖ペプチドを含有するワクチン製剤はまた、他の免疫原を含有することもできる。

【0062】

s c、i m、i d経路によって投与される全身性医薬製剤は、免疫原性糖ペプチド、または免疫原包埋リン酸カルシウム懸濁液、または免疫原を吸着する水酸化アルミニウムを含有する油中水型エマルジョンであり得る。

10

【0063】

ワクチン製剤は、賦形剤としてカルボポール（c a r b o p o l）を伴うゲル、点鼻薬または噴霧薬の形態での内鼻経路および耐酸性カプセル、耐酸性顆粒または糖衣錠の形態での経口経路のために、処方することができる。

【0064】

通常の用量は被験体および原因となる病状に従って変動し、例えば、ヒトにおいて、10～20週間の間、2週間ごとに全身経路で投与される本発明に従う糖ペプチド、特に、以下の実施例4に記載の糖ペプチド1～100mgであり得る。

20

【0065】

本発明はまた、有効成分として少なくとも1つの上記の糖ペプチドを含有する医薬組成物を対象物として有する。

【0066】

前記組成物において、有効成分は、生理学的に有効な用量で有利に存在し、特に、前記の成分は、有効なワクチン用量の少なくとも1つの上記有効成分を含有する。

【0067】

医薬品として、上記の糖ペプチドは、消化管または非経口経路を目的とする医薬組成物に組み入れることができる。

【0068】

例えば、前記医薬組成物は、固体または液体であり、例えば、単純な錠剤または糖衣錠、カプセル、顆粒、カラメル、坐剤、特に、注射用製剤のようなヒト医薬において通常使用される医薬処方として供給され得、それらは、通常の方法によって調製される。有効成分は、タルク、アラビアガム、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ココアバターなどの前記医薬組成物において通常用いられる賦形剤と共に、水性または非水性の動物性もしくは植物性脂肪、パラフィン誘導體、グリコールであるビヒクル、多様な湿潤剤、分散剤または乳化剤、保存剤を該医薬組成物の中に処方することができる。

30

【0069】

本発明はまた、有効成分が許容可能な（特に、確立された方法に従って医薬上許容される）賦形剤と混合されることを特徴とする、上記のような組成物の調製方法を対象物として有する。

40

【0070】

本発明は、膵臓癌または乳癌あるいは脈管の病状もしくは血管新生のような他の病状の治療的または予防的処置を目的とする医薬品を調製するための上記のような糖ペプチドの使用をさらに対象物として有する。

【0071】

本発明は、本発明に従う糖ペプチドの有効量を投与することを含んでなる、被験体における癌、炎症性障害、脈管の病状または病原体による感染よりなる群において選択される疾患の予防的または治療的処置の方法にさらに関する。

【0072】

50

癌処置、特に、前立腺癌の好適な実施形態において、糖ペプチドは、同種の抗原提示細胞に与えられ得る。好ましくは、抗原提示細胞は樹状細胞である。好適な様式では、抗原提示細胞は自己由来であり、即ち、それは、レシピエント被験体から先に取り出されているか、またはそれは、レシピエント被験体由来の幹細胞から誘導される。代替的に、抗原提示細胞は、同種の被験体（即ち、レシピエントに匹敵する）から採取されるサンプル由来である。従って、この実施形態において、本発明に従う医薬組成物またはワクチン組成物は、本発明に従う糖ペプチドを充填または「パルス」された抗原提示細胞を含んでなる。従って、本発明は、医薬品、特に、乳または膵臓癌、好ましくは、膵臓癌の処置もしくは予防のための医薬品として本発明に従う糖ペプチドを与えられ、または「パルス」された抗原提示細胞を含んでなる医薬組成物またはワクチン組成物の使用に関する。好適な実施形態では、糖ペプチドは、膵臓の病状、好ましくは、膵臓癌を患う被験体の尿からの精製によって得られる。最も所望される実施形態では、糖ペプチドは、処置された被験体の尿からの精製によって得られる。好ましくは、被験体はヒトである。本発明はまた、本発明に従う糖ペプチドを提供すること、および場合により、抗原提示細胞に与えられた前記糖ペプチドを投与することを含んでなる膵臓の病状、好ましくは、膵臓癌、または乳癌の治療的もしくは予防的処置の方法であって、前記投与は、膵臓の病状、好ましくは、膵臓癌、または乳癌を処置、減弱または予防することが可能である方法に関する。好適な実施形態では、処置された疾患は膵臓癌である。前記糖ペプチドは、組換え体であるかまたは生物学的サンプル、好ましくは、生物学的液体から単離され得る。好適な実施形態では、前記糖ペプチドは、膵臓の病状、好ましくは、膵臓癌、もしくは乳癌を患う被験体の尿から単離および/または精製される。好ましくは、前記糖ペプチドは、処置された被験体の尿から単離および/または精製される。従って、糖ペプチドを提供する工程は、生物学的液体、好ましくは、尿の回収、および前記糖ペプチドの精製を含んでなることができる。

10

20

【0073】

上記の糖ペプチドの特性はまた、診断、特に、免疫酵素的な方法におけるそれらの使用を正当化する。

【0074】

これが、本発明がまた、それが上記のような少なくとも1つの糖ペプチドを含有することを特徴とするヒト生物学的サンプルにおける上記の糖ペプチドに対して指向された抗体の存在のインビトロでの診断のための組成物を対象物として有する理由である。

30

【0075】

本発明はまた、上記の病状を患うヒト被験体、血清のようなヒト生物学的サンプルにおいて誘導された抗体の存在のインビトロでの検出および、より具体的には、膵臓癌または糖尿病の病状のインビトロでの診断のための方法を対象物として有し、診断の対象であるヒトから由来する、前記生物学的サンプルが、前記抗原と前記抗体との間の免疫複合体の形成を可能にする条件下で、上記または下記で規定される患者において誘導される抗体によって認識される抗原と接触され、前記抗体と抗原との間で形成される可能性のある免疫複合体が検出されることを特徴とする。

【0076】

本発明はまた、上記の病状を患うヒト被験体、生物学的サンプルにおいて誘導される抗体の検出のために必要な材料またはキット、特に、前記抗体の可能なキャリアを対象物として有し、それは、以下を含んでなることを特徴とする。

40

- 上記のような少なくとも1つの糖ペプチド、および
- 抗原と前記生物学的サンプルとの間の免疫反応から生じる免疫複合体を検出するための手段。

【0077】

本発明の対象物である糖ペプチド（特に組換えの、単離または精製された）はまた、そのような糖尿病の病状を伴う患者におけるこれらの構造に対して指向された循環抗体の検出によるI型糖尿病のような所定の病状の診断において使用することができる。

【0078】

50

特に、C 2 - F 7 - 1 6 R と命名された糖ペプチドは、I 型糖尿病の診断のために使用される。

【0079】

本発明の対象物である糖ペプチド（特に、組換えの、単離または精製された）は極めて興味深い抗原特性を所有するため、それらはまた、抗体（特にモノクローナル）の産生を可能にする。

【0080】

それ故、本出願はまた、上記の規定を満たし、文献に記載され得る抗体 J 2 8 および他の任意の抗体を例外として、上記のような糖ペプチドで特異的な免疫反応を惹起する抗体（特に、モノクローナル）を対象物として有する。モノクローナル抗体は、任意のクラス、特に、I g M、I g D、I g E または I g A 由来であり得る。好ましくは、モノクローナル抗体は I g G である。本発明に従う抗体は、その初期のクラスにもかかわらず、例えば、既知の分子生物学的方法（ルイス（L e w i s）ら、1992年、H u m . A n t i b o d i e s H y b r i d o m a s , 3 : 1 4 6 - 5 2 頁、ルイス（L e w i s）ら、1993年、J . I m m u n o l . , 1 5 1 : 2 8 2 9 - 3 8 頁、ホール（H a l l）ら、1994年、C a n c e r R e s . , 5 4 : 5 1 7 8 - 8 5 頁、シェパード（S h e p h e r d）およびディーン（D e a n）、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s、O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s、2000年、479頁）によって、別の免疫グロブリンのクラス由来の抗体に改変することができる。これらの同じモノクローナル抗体は、先に示された条件下でそれらを使用するように、前記組換えもしくは天然の糖ペプチドに対するそれらの認識部位を保存するために、遺伝子組み換えまたは他の任意の方法によって、ヒト化することができる。

10

20

【0081】

特に、上記のような糖ペプチドの援助による哺乳動物の免疫化によって得られる抗体が選択される。

【0082】

具体的には、本発明は、実施例に記載の抗体および特に、2004年3月16日に I g G 型の番号 I - 3 1 8 8 および 8 H 8 下でパリの C o l l e c t i o n N a t i o n a l e d e C u l t u r e d e M i c r o o r g a n i s m e s (C N C M) に寄託されたハイブリドーマによって産生され得る I g M 型の 1 6 D 1 0 抗体に関する。

30

【0083】

好ましくは、本発明は、モノクローナル抗体 1 6 D 1 0、そのフラグメントもしくは誘導体、およびモノクローナル抗体 1 6 D 1 0 と同じエピトープに本質的に結合する抗体よりなる群において選択されるモノクローナル抗体に関する。場合により、前記抗体は、ヒト化されているか、キメラかまたはヒトである。好ましくは、抗体は I g G 型である。場合により、抗体は一本鎖抗体である。

【0084】

抗体フラグメントまたは誘導体は、問題の抗体と実質的に同じ特異性を保存する実態を意味すると理解される。そのフラグメントは、F a b、F a b'、F (a b) 2 および s F v フラグメントであり得る（ブレザル（B l a z a r）ら、1997年、J o u r n a l o f I m m u n o l o g y 1 5 9 : 5 8 2 1 - 5 8 3 3 頁およびバード（B i r d）ら、1988年、S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 頁）。本発明に従う F v、F a b、または F (a b) 2 フラグメントは、古典的な酵素消化方法によって得ることができる。その誘導体は、キメラ、ヒト化または一本鎖 s c F v 抗体であり得る。前記誘導体は、古典的な遺伝子操作方法によって得ることができる。抗体 1 6 D 1 0 の可変領域をコードするポリヌクレオチドは、例えば、1 6 D 1 0 抗体 - 産生ハイブリドーマ c D N A ライブラリー由来の前記可変領域をクローニングすることによって、得ることができる。それらはまた、前記可変領域のヌクレオチド配列に基づく核酸合成によって、全体的または部分的に調製することができる。ラウトレッジ（R o u t l e d g e）ら（「R e s h a p i n g a n t i b o d i e s f o r t h e r a p y」、P r o t e i n E n

40

50

gineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man, 13-44, Academic Titles, Nottingham, 英国 (1993年)] またはログスカ (Roguska) ら、1996年、Protein Engineering, 9(10): 895-904頁) により記載されているような CDR グラフティングの既知の技術によって、例えば、16D10のCDRをコードするポリヌクレオチドを合成して、他の抗体、特に、ヒト由来および/またはIgG型の抗体の適切な領域に組み入れることができる。

【0085】

本発明はまた、抗体16D10のCDRを含んでなるタンパク質をコードする任意の核酸分子、および任意の組換えベクター、特に、前記核酸分子を含んでなる任意の発現ベクター、前記核酸または前記ベクターを含んでなる任意の宿主細胞を対象物として有する。

10

【0086】

本発明はまた、上記のような抗糖ペプチド抗体の調製方法であって、哺乳動物を前記糖ペプチドの援助または任意のヒトまたは動物の生物学的組織もしくは液体、特に、正常および病理学的ヒト腭液から単離されるFAPPおよびBSDLの援助で免疫し、次いで、所望であれば、前記タンパク質のC末端ドメインを認識する予期される抗体を回収することを特徴とする方法を対象物として有する。

【0087】

本出願は、上記のような抗糖ペプチド抗体の調製方法であって、上記のような天然もしくは組換え糖ペプチドの援助または上記のようなFAPPおよびBSDLの混合物の援助によって、免疫され、エプスタイン・パール (Epstein-Barr) ウイルス (EBV) によって形質転換された被験体由来のBリンパ球をクローニングし、次いで、前記形質転換されたBリンパ球から分泌される予期される抗体を回収することを特徴とする方法を対象物として同様に有する。

20

【0088】

特に、本発明のモノクローナル抗体対象物は、上記のような糖ペプチドとの特異的な免疫反応を惹起することができる。

【0089】

本発明の特定の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体16D10またはJ28 (それぞれ、ハイブリドーマ16D10またはJ28によって産生される) と同じエピトープに本質的に結合する。好ましくは、前記抗体はモノクローナル抗体である。好ましくは、本発明は、モノクローナル抗体16D10 (ハイブリドーマ16D10によって産生される) に関するが、本発明はまた、抗体16D10に特異的に競合することができるモノクローナル抗体に関する理解すべきである。同様に、特定の実施形態において、本発明に従うモノクローナル抗体は、抗体J28に特異的に競合することができる。

30

【0090】

目的の抗体と「同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する」という用語は、抗体が前記目的の抗体と「競合する」ことを意味する。目的の抗体「と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する」という用語は、2つの抗体が全く同じエピトープを有さないことを意味する。しかし、特定の実施形態では、2つの抗体は同じエピトープを有することができる。モノクローナル抗体と「同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する」という用語は、抗体が抗体16D10と「競合する」ことを意味する。一般に、目的の抗体 (例えば、抗体16D10) 「と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する」抗体は、抗体が、本発明に従う糖ペプチド、特に、BSDLもしくはFAPPまたはそのフラグメント、好ましくは、本明細書に記載のBSDLまたはFAPPのC末端部、さらにより好ましくは、BSDLまたはFAPPの11アミノ酸の1つもしくはそれ以上の反復、あるいはそのフラグメントの一部から選択される1つもしくはそれ以上のタンパク質に対し、前記目的の抗体と「競合する」ことを意味する。他の例では、抗体がBSDLまたはFAPPと結合するための目的の抗体と「競合する」場合、抗体はBSDLまたはFA

40

50

PPの同じエピトープもしくは決定基に本質的に結合する。

【0091】

目的の抗体と「同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する」という用語は、抗体が、前記目的の抗体が特異的に結合する任意のBSDLおよび/またはFAPP分子のために、前記目的の抗体と「競合する」ことを意味する。モノクローナル抗体16D10と「同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する」という用語は、抗体が、前記モノクローナル抗体16D10が特異的に結合する任意のBSDLおよび/またはFAPP分子のために、前記モノクローナル抗体16D10と「競合する」ことを意味する。例えば、モノクローナル抗体16D10またはJ28と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体は、それぞれBSDLまたはFAPPに結合するための前記抗体16D10またはJ28と「競合する」。

10

【0092】

本明細書に記載のモノクローナル抗体と同じエピトープに本質的に結合する1つもしくはそれ以上の抗体の同定は、抗体間の競合を評価することができる任意の免疫学的スクリーニング方法を使用して、行うことができる。多くのアッセイが日常的に行われており、当業者に周知である（例えば、1997年8月26日に特許査定された米国特許第5,660,827号明細書（本明細書において参考として具体的に援用される）を参照のこと）。抗体が結合するエピトープの同定は、本明細書に記載のモノクローナル抗体と同じエピトープに結合するか、または本質的に結合する抗体を必ずしも同定する必要がない。

【0093】

例えば、研究しようとする候補抗体が、異なる動物原から得られているか、またはおそらく、異なるIgタイプを有する場合、簡単な競合アッセイを用いることができ、ここで、コントロール抗体（例えば、抗体16D10）および候補抗体が混合され（もしくは予め吸着され）、BSDLまたはFAPP（両者とも抗体16D10に結合することが公知である）のいずれかを含有するサンプルと接触される。ELISA、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロット分析に基づくプロトコル、または（例えば、実施例に記載のような）BIACORE分析の使用は、簡単な競合試験における使用に適切である。

20

【0094】

特定の実施形態において、BSDLまたはFAPP抗原サンプルと接触させる前に、コントロール抗体（例えば、抗体16D10）と多様な量の候補抗体（例えば、約1:10または約1:100）との混合物を最初に調製することが可能である。別の実施形態では、コントロール抗体および多様な量の候補抗体を、BSDLまたはFAPP抗原サンプルとの接触時に簡単に混合することができる。（例えば、分別方法を使用するかまたは洗浄して結合抗体を取り出すことによって）結合抗体を遊離の抗体と区別し、（例えば、種もしくはイソタイプに特異的な第二抗体を使用するかまたは検出可能なタグで抗体16D10を標識することによって）抗体16D10を候補抗体と区別することができる限り、候補抗体が抗体16D10のBSDLまたはFAPP抗原への結合を減少するかどうかを決定し、それによって、候補抗体が抗体16D10と同じエピトープを本質的に認識するかどうかを示すことが可能である。全く関連性の無い抗体の存在下でのコントロール抗体の結合は、コントロール値の上限としての役割を果たすことができる。コントロール値の下限は、標識コントロール抗体（16D10）と全く同じエピトープ（16D10）を認識する非標識抗体とをインキュベートすることによって得ることができ、この方法では、標識抗体の結合を減少する競合を誘導する。1つの試験では、候補抗体の存在下における標識抗体の反応性の有意な減少は、候補抗体が同じエピトープを本質的に認識し、即ち、それが、標識抗体（16D10）と交差反応することを示す。約1:10~約1:100の間の16D10抗体対候補抗体の比で、抗原BSDLまたはFAPPのそれぞれに対する抗体16D10の結合を少なくとも約20%、30%、40%、50%、好ましくは、少なくとも約60%、またはさらにより好ましくは、少なくとも約70%（例えば、65~100%）だけ減少する任意の候補抗体は、16D10と同じエピトープまたは決定基抗体に本質的に結合する抗体とみなされる。好ましくは、前記候補抗体は、抗体16D10

30

40

50

の B S D L または F A P P 抗原への結合を、少なくとも約 90% (例えば、約 95%) だけ減少する。好ましくは、結合の減少の程度が異なり得ても、結合が同じ方法評価される場合、抗体 16D10 もまた、候補抗体の B S D L または F A P P 抗原への結合を減少させる。

【0095】

競合は、例えば、フローサイトメトリーアッセイによって、評価することができる。そのようなアッセイでは、B S D L または F A P P 抗原を担持する細胞、例えば、B S D L または F A P P によってトランスフェクトされる細胞を、最初に、抗体 16D10 と共に、次いで、例えば、蛍光色素またはビオチンで標識された候補抗体と共にインキュベートする。飽和量の 16D10 とのプレインキュベーション後に観察される結合が、16D10 とのプレインキュベーションを伴わない抗体で観察される結合 (蛍光によって測定される) の約 30%、好ましくは、約 40%、約 50%、約 80%、もしくはそれ以上 (例えば、約 90%) である場合、抗体は、抗体 16D10 と競合するとみなされる。あるいは、飽和量の候補抗体共にプレインキュベートされる細胞において標識 16D10 抗体 (蛍光色素またはビオチンによって標識される) で観察される結合が抗体とのプレインキュベーションを伴わずに観察される結合の約 80%、好ましくは、約 50%、約 40%、約 30%、もしくはそれ以下 (例えば、約 20%) である場合、抗体は、抗体 16D10 と競合するとみなされる。

10

【0096】

有利な様式では、候補抗体が予め吸着され、B S D L または F A P P 抗原が固定化されている表面上において飽和濃度で適用される簡単な競合アッセイを使用することもできる。簡便な競合アッセイにおける表面は、好ましくは B I A C O R E チップ (または表面プラズモン共鳴分析に匹敵する別の支持体) である。コントロール抗体 (例えば、16D10) を、次いで、B S D L または F A P P の飽和濃度で表面と接触させ、B S D L または F A P P を担持する表面に対するコントロール抗体の結合を測定する。コントロール抗体の前記結合を、候補抗体の非存在下におけるコントロール抗体の B S D L または F A P P を担持する表面への結合と比較する。アッセイ試験では、候補抗体の存在下におけるコントロール抗体の B S D L または F A P P を担持する表面への結合の有意な減少は、候補抗体がコントロール抗体と交差反応するような方法で、候補抗体が、コントロール抗体と同じエピトープを本質的に認識することを示す。(抗体 16D10 のような) コントロール抗体の B S D L または F A P P 抗原への結合を、少なくとも約 30% または好ましくは、約 40% だけ減少する任意の候補抗体は、コントロール抗体 (例えば、16D10) と同じエピトープに本質的に結合する抗体とみなすことができる。好ましくは、前記候補抗体は、コントロール抗体 (例えば、16D10) の B S D L または F A P P 抗原への結合を、少なくとも約 50% (例えば、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、もしくはそれ以上) だけ減少する。コントロールおよび候補抗体間の順序は反転することができ、即ち、コントロール抗体を最初に表面に結合させることができ、競合試験において、候補抗体が表面に実質的に接触されることが理解させるべきである。好ましくは、第二抗体 (抗体が交差反応すると推定される) で観察される結合の減少は、より大きな振幅を有することが期待されるため、B S D L または F A P P に最も高い親和性を示す抗体が、最初に、B S D L または F A P P を担持する表面に結合される。そのような試験の他の例は、実施例および例えば、サウナル (S a u n a l) およびリゲンモートル (R e g e n m o r t e l)、(1995年) J. Immunol. Methods 183: 33-41 頁 (その開示内容は本明細書において参考として援用される) に記載されている。

20

30

40

【0097】

前記特性は、以下の実験のセクションにおいて例示される。それらは、膵臓癌、膵臓炎および I 型糖尿病を含むいくらかの膵臓の病状、しかしまた、乳癌または循環器系疾患の診断、予後および / または予測のための上記のモノクローナル抗体、ならびに特に、モノクローナル抗体 8H8、16D10、14H10 および B S D L または F A P P の C 末端部に対して指向される他のモノクローナル抗体の使用を正当化する。診断情報は、血清お

50

よび/または尿アッセイから得ることができる。

【0098】

抗体16D10は、特に興味深い特性を有する。事実、それは膵臓癌に特異的である。抗体は、正常な組織も、また腫瘍組織の他のタイプのいずれも認識しない。これらの2つの抗体は競合しないため、抗体16D10によって認識されるエピトープは、抗体J28によって認識されるエピトープとは異なる。これらの結果を、実施例4に記載する。

【0099】

従って、本発明は、膵臓の病状、特に、膵臓癌の好ましくは、インビトロでの検出を可能にする方法であって、生物学的サンプルと本発明に従う抗体とを接触させ、前記抗体と前記生物学的サンプルとの間の免疫反応から生じる免疫複合体の形成を検出することを含んでなる方法に関する。好ましくは、抗体は、抗体16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。好ましくは、生物学的サンプルは、膵臓組織（生検）または生物学的液体のサンプルである。生物学的サンプルは、組織スライス（免疫組織化学）またはサンプルに含有されるかもしくはサンプルを培養することによって誘導される細胞（免疫組織化学）であり得る。生物学的液体は、血清、尿、膵液および乳汁よりなる群において選択され得る。好ましくは、生物学的液体は尿である。本発明の抗体を標識することによって直接的に、または本発明の抗体（第二抗体、ストレプトアビジン/ビオチンタグなど）の存在を表す分子を添加することによって間接的に、複合体を検出することができる。例えば、標識化は、抗体と放射性もしくは蛍光タグとを結合させることによって、達成することができる。これらの方法は、当業者に周知である。

10

20

【0100】

本発明はまた、膵臓の病状をインビボまたはインビトロで検出するために使用することができる診断組成物を調製するための本発明に従う抗体の使用に関する。好ましくは、抗体は、抗体16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。好ましくは、膵臓の病状は膵臓癌である。

【0101】

好適な実施形態では、本発明は、被験体における膵臓の病状、特に、膵臓癌の検出を可能にする方法であって、被験体の尿を回収し、前記尿と本発明に従う抗体とを接触させ、前記抗体と前記尿との間の免疫反応から生じる免疫複合体の形成を検出することを含んでなる方法に関する。好ましくは、抗体は、抗体16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。抗体はまた、抗体J28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。好ましくは、膵臓の病状は膵臓癌である。本発明の抗体を標識することによって直接的に、または本発明の抗体（第二抗体、ストレプトアビジン/ビオチンタグなど）の存在を表す分子を添加することによって間接的に、複合体を検出することができる。これらの方法は、当業者に周知である。場合により、方法は、前記抗体とのインキュベーションの前に尿サンプルを処置する中間工程を含んでなることができる。例えば、前記工程は、尿の濃縮、糖ペプチドの富化または精製の工程などを含んでなることができる。

30

40

【0102】

本発明はまた、膵臓の病状、特に、被験体における膵臓癌の診断のための本発明に従う抗体の使用に関する。好ましくは、抗体は、抗体16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。抗体はまた、抗体J28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。

【0103】

本発明は、本発明に従う抗体を含んでなる膵臓の病状、特に、膵臓癌のための診断キットに関する。前記キットは、生物学的サンプルと前記抗体との間の免疫反応から生じる免疫複合体を検出する手段、特に、前記抗体の検出を可能にする試薬をさらに含んでなるこ

50

とができる。特定の実施形態では、キットは、抗体 16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体を含んでなる。

【0104】

これらの特性は、薬物と結合した前記抗体（化学療法）または放射性元素（放射線治療および放射線診断）またはそうでなければ新生物細胞の結果または挙動を改変する遺伝子（遺伝子治療）で腫瘍細胞を標的化することなどの膵外分泌部の癌の新規の治療プロトコルを開発するための上記のモノクローナル抗体の使用を正当化する。

【0105】

放射性元素を結合させた抗体は、原発性腫瘍および転移（二次腫瘍）の放射線局在化（*radiolocalization*）（免疫シンチグラフィ）において使用することができる。

10

【0106】

前記診断情報は、血清および/または尿アッセイにおいて獲得することができる。

【0107】

特に、本発明は、本発明に従う抗体、特に、膵臓腫瘍細胞を標的化して破壊するための膵臓癌の処置に使用することができる抗腫瘍活性物質と結合したモノクローナル抗体に関する。

【0108】

同様に、放射性元素（または他のもの）を前記抗体と結合させ、原発性腫瘍および転移の正確な局在化を可能にすることができる。前記抗体はまた、正常組織と腫瘍組織とを明確かつ正確に識別することを可能にすることができる。

20

【0109】

これらの同じ特性は、上記の病状のための新規の受動免疫療法を開発するための単独での、組み合わせられたまたは診断もしくは治療用分子と結合された前記モノクローナル抗体の使用を正当化する。

【0110】

従って、本発明はまた、ヒト生物学的サンプルにおける上記のような病状のインビトロでの診断のための組成物であって、該組成物は、特に、少なくとも1つの放射性元素が結合した上記のような少なくとも1つのモノクローナル抗体を含有することを特徴とする上記組成物を対象物として有する。放射性元素の性質に依存して、前記組成物を使用して、膵臓の領域に治療的に照射することができる。

30

【0111】

診断組成物として、上記の抗体を許容可能な賦形剤と混合することができる。

【0112】

本発明はまた、診断しようとする個体由来のヒト生物学的サンプルにおいて糖尿病または新生物症状を罹患するヒト被験体において出現する上記のような糖ペプチドの存在を検出するためのキットを対象物として有し、それは以下を含んでなることを特徴とする。

- 上記のような少なくとも1つの抗体、および
- 抗原と生物学的サンプルとの間の免疫反応から生じる免疫複合体を検出するための手段。

40

【0113】

上記の糖ペプチドおよび抗体を用いる好適な条件はまた、先に記載の本発明の他の対象物、特に、診断方法にも当てはまる。

【0114】

本発明はまた、本発明に従う抗体を含んでなる医薬組成物に関する。好ましくは、抗体は、抗体 16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。抗体はまた、抗体 J28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。組成物はまた、医薬上許容される支持体を含んでなることができる。特定の実施形態

50

では、前記抗体は抗腫瘍物質と結合する。

【0115】

本発明は、本発明に従う抗体または医薬品としてのそのような抗体を含んでなる医薬組成物の使用にさらに関する。特に、本発明は、本発明に従う抗体または膵臓の病状、好ましくは、膵臓癌、もしくは乳癌の予防的または治療的処置を目的とする医薬品を調製するためのそのような抗体を含んでなる医薬組成物の使用に関する。好ましくは、抗体は、抗体16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。抗体はまた、抗体J28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。特定の実施形態では、前記抗体は抗腫瘍物質と結合する。

10

【0116】

本発明は、膵臓の病状、特に、膵臓癌、または乳癌を患う被験体の予防的または治療的処置の方法であって、前記被験体に、有効量の本発明に従う抗体を投与することを含んでなり、前記投与は、被験体における膵臓の病状、特に膵臓癌、または乳癌の減少もしくは消失を生じる、方法に関する。好ましくは、抗体は、抗体16D10、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。抗体はまた、抗体J28、そのフラグメントもしくは誘導体、または前者と同じエピトープまたは決定基に本質的に結合する抗体である。特定の実施形態では、前記抗体は抗腫瘍物質と結合する。

20

【0117】

別のプロトコルでは、通常の用量は、処置される被験体および原因疾患に従って変動し、例えば、ヒトにおいて全身投与される体重の1キログラムあたり以下の実施例18に記載のモノクローナル抗体1~10mgを、2週間の間、1週間に1回であり得る。

【0118】

本発明はまた、新規産物（糖ペプチド、抗体など）ならびに先行技術において記載の産物より良好、より有効またはより純粋な新規の産物を提供することに関する。

【0119】

本発明を以下の実施例において例示する。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1】2つの膵臓腫瘍組織（PDAC = ADK1ならびにPDAC4 = ADK4）におけるmAbJ28およびmAb16D10の反応性を比較する研究を表す。

【図2】糖ペプチドJ28に対する抗体mAbJ28とmAb16D10との間の競合試験を表す。

【図3】SOJ-6細胞における抗体mAbJ28とmAb16D10との間の競合試験を表す。

【図4】ポリクローナル抗体pAbL64、モノクローナル抗体mAb8H8およびモノクローナル抗体mAbJ28の援助による健康な被験体（サンプル29~36）および膵臓癌を伴う被験体（サンプル1~5）由来の尿における競合免疫検出分析を表す。尿タンパク質を10%ポリアクリルアミドゲル上で分離し、次いで、ニトロセルロース膜にエレクトロトランスファーした。膜をpAbL64、mAb8H8またはmAbJ28と共にインキュベートした。左のレーン（Std）は分子量マーカーに該当する。

30

40

【実施例】

【0121】

組換え糖ペプチドの調製

BSDL（配列番号9）およびFAPP（配列番号13）の組換え糖ペプチドを、周知の細胞系統CHO-K1、番号CRL61でAmerican Type Culture Collection ATCCから入手することができる、線維芽細胞の形態を伴うチャイニーズハムスター卵巣腫瘍細胞系統から誘導される別々の株において発現させた（バック（Buck）ら、1958年、J. Exp. Med., 108: 945-955

50

頁)。

【0122】

標準的なアッセイ条件で検出可能なC2GnTグリコシルトランスフェラーゼ、(1-2)フコシルトランスフェラーゼ、(1-3)フコシルトランスフェラーゼ、(1-4)フコシルトランスフェラーゼまたは(1-3)ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を示さないという理由で、CHO-K1細胞系統を選択した。

【0123】

プラスミド(クローニングされたcDNA)の調製

異なる糖ペプチド成分の発現を可能にするクローニングされたcDNAは、チルグウィン(Chirgwin)ら[1979年、Biochemistry, 18:5294-5299頁]により記載の方法に従って、健康なヒト膵臓または例えば、ヒト膵腺癌由来の細胞系統SOJ-6[フジイ(Fujii)ら、1990年、Hum. Cell., 3:31-36頁]のようなヒト膵臓腫瘍細胞系統の組織サンプルから抽出されるメッセンジャーRNAのポリAテイルとハイブリダイズするポリdTポリヌクレオチドプローブ(18塩基)を用いて行われる逆転写によって得た。

【0124】

調製1:プラスミドpSec-FAPP

ヒト胎児膵腺房タンパク質(FAPP)(配列番号10)をコードするcDNAの増幅物を、先に記載のヒト膵臓腫瘍系統SOJ-6から抽出される5μgの全RNAから逆転写(55℃で45分間、逆転写キット、Sigma、St. Louis、ミズーリ州、米国)し、続いて、ヒトBSDL(配列番号6)をコードするcDNA配列から規定されるヌクレオチドプライマーC-ter/FAPP-BSDLおよびN-ter/FAPPを使用して、以下に記載の条件でPCRを行った。ポリメラーゼ連鎖反応は、特に、グアニンおよびシトシンリッチのヌクレオチド配列の増幅を可能にする「Advantage-GC cDNA PCR」キット(Clontech)で行った。以下のプログラムを用いた。Robocycler Gradient 96サーモサイクラー(Stratagene)において、94℃で2分間の1サイクル、続いて、94℃(変性)で1分間、52℃(プライマーアニーリング)で1分間、および68℃(伸長)で4分間の35サイクル、続いて、68℃で10分間の1サイクル。

【0125】

プライマーは以下の配列を有する。

N-ter/FAPP(配列番号1):

5'-TTCGTaagccttGCGAAGCTGGGCGCCGTGTACAGAA-3'、

C-ter/FAPP-BSDL(配列番号2):

5'-TTTCGTgaattcACGCTAAAACCTAATGACTGCAGGCATCTG-3'。

【0126】

使用したC-ter/FAPP-BSDLプライマー(配列番号2)は、c-mycエピトープの翻訳ならびに市販のベクターによって担持される6xヒスチジンタグの翻訳を排除するように終末コドンを含んでなる。

【0127】

この様式で増幅されたcDNA(ヌクレオチド1~2169)(配列番号12)は、シグナルペプチドを含まない。

【0128】

次いで、得られるcDNAをプラスミドpSec-Tag(Invitrogen、LeeK、蘭国)にクローニングした。

【0129】

調製2:プラスミドpSec-16R

正常な膵臓から抽出されたRNA由来のBSDL(ヌクレオチド1089:Phe36

10

20

30

40

50

4 からヌクレオチド 2 1 6 9 : 終止コドンまで、配列番号 8 および 9) の C 末端部をコードする cDNA を、プライマー C - ter / F A P P - B S D L (プライマー配列番号 2 、調製 1 を参照のこと) および N - ter - Ct を使用する PCR によって、増幅した。

【 0 1 3 0 】

N - ter - Ct プライマーは、以下の配列を有した。

N - ter - Ct (配列番号 3) :

5 ' - C G T C T A a a g c t t T T T G A T G T C T A C A C C G A G T C C - 3 ' 。

【 0 1 3 1 】

ポリメラーゼ連鎖反応は、先に記載の条件 (調製 1 を参照のこと) で行った。

【 0 1 3 2 】

次いで、得られる cDNA を、プラスミド p S e c - T a g にクローニングした。

【 0 1 3 3 】

調製 3 : プラスミド p S e c - 6 R

プラスミド p S e c - F A P P に存在する F A P P (ヌクレオチド 1 0 8 9 : P h e 3 6 4 ~ヌクレオチド 1 8 3 9 : 終止コドンまで、配列番号 1 2 および 1 3) の C 末端部をコードする cDNA は、上記のヌクレオチドプライマー No 2 (C - ter / F A P P - B S D L) および No 3 (N - ter - Ct) を使用する PCR によって、増幅した。

【 0 1 3 4 】

ポリメラーゼ連鎖反応は、調製 1 に記載の条件で行った。

【 0 1 3 5 】

次いで、得られる cDNA を、プラスミド p S e c - T a g にクローニングした。

【 0 1 3 6 】

調製 4 : プラスミド p B K - G T

マウス心臓 (B a l b / c マウス) から抽出される RNA 由来の (1 - 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ (ヌクレオチド - 1 0 からヌクレオチド + 1 1 2 2 : 終止コドンまで) をコードする cDNA を、マウス (1 - 3) ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする cDNA 配列から規定されるプライマー C ter / G a l および N ter / G a l を使用する PCR によって、増幅した。これらのプライマーは以下の配列を有する。

N ter / G a l (配列番号 4) : 5 ' - A A A A A g a a t t c G G A G A A A A T A A T G A A T - 3 ' 。

C ter / G a l (配列番号 5) : 5 ' - A A A A A g g g c c c A C A A A G T C A G A C A T T A T - 3 ' 。

【 0 1 3 7 】

ポリメラーゼ連鎖反応は、以下のプログラムに従って、「Taq PCR Master Mix」キット (Q i a g e n 、 C o u r t a b o e u f 、 仏国) により行った。Gene Amp PCR System 2 4 0 0 サーマサイクラー (P e r k i n E l m e r) において、9 4 で 2 分間の 1 サイクル、続いて、9 4 (変性) で 1 分間、5 4 (プライマーアニーリング) で 1 分間、および 7 4 (伸長) で 2 分間の 3 5 サイクル、次いで、7 4 で 1 0 分間の 1 サイクル。

【 0 1 3 8 】

次いで、得られる cDNA をプラスミド p B K - C M V (S t r a t a g e n e 、 L a J o l l a 、 カリフォルニア州、米国) にクローニングした。

【 0 1 3 9 】

調製 5 : プラスミド p c D N A 3 - C 2 6 G n T - f l a g

パニコット (P a n i c o t) ら G l y c o b i o l o g y 、 1 9 9 9 年、9 : 9 3 5 - 9 4 6 頁により記載のグリコシルトランスフェラーゼのコア 2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをコードする cDNA を、その 3 ' 末端で f l a g エピトープをコードする配列を含んでなるベクター p C D N A - 3 にクローニングした。f l a g エピトープの発現は、形質転換された細胞における C 2 G n T 発現の検出を可能に

10

20

30

40

50

する。

【0140】

以下の工程は、プラスミドの調製に共通であった。

a) 連結

異なるPCR産物を、1%アガロースゲル上で分析し、「GeneClean」キット(Bio101)を使用して精製し、次いで、シャトルベクターpCR2.1TOPOにサブクローニングし、ユニバーサルM13およびリバーシM13プライマーにより、配列決定した(Euro Sequences Genes Service, Paris, 仏国)。次いで、PCR産物を、制限酵素HindIIIおよびEcoRIの作用によって、前記シャトルベクターから遊離させ、真核生物の発現および分泌プラスミドpSec-Tagにクローニングし、プラスミドpSec-FAPPおよびpSec-16R(16RはBSDLのC末端ドメインに対応)(配列番号8)を得た。PCRによって得られるFAPPのC末端部をコードする相補的DNAを、精製およびHindIII/EcoRI消化後にpSec-Tagプラスミドに直接クローニングし、プラスミドpSec-6R(6RはドメインFAPPのC末端に対応)(配列番号12)を得た。配列決定は、ユニバーサルT7プライマーおよびEuro Sequences Genes Serviceによりこの目的のために合成されたBGH逆方向プライマーで行った。

10

【0141】

(1-3) ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするPCR産物を、制限酵素EcoRIおよびApaIで遊離させ、精製し、次いで、ベクターpBK-CMVのEcoRI/ApaI部位に直接連結し、プラスミドpBK-GTを得た。

20

【0142】

b) 細菌の形質転換

5 μ lアリコートで連結産物を、ハナハン(Hanahan)[ハナハン(Hanahan)、1983年、J. Mol. Biol., 166:557-580頁]により記載のプロトコルに従って、50 μ lのコンピテント細菌細胞(大腸菌(Escherichia coli)、株TOP10F')と接触させた。2マイクロリットルの0.5M-メルカプトエタノールを添加し、サンプルを氷上で30分間、保持し、次いで、42で30秒間、熱ショック処理し、直ちに氷上に戻した。2分間後、サンプルを450 μ lのSOC培地(Life Technologies)で希釈した。細菌懸濁液を、1時間、37で振盪しながらインキュベートした。次いで、ガラスビーズを使用して、細菌を、50 μ g/mlアンピシリンを補充したLuria-Bertagni寒天を含有するペトリディッシュ上に拡げた。

30

【0143】

c) プラスミドの精製

選択寒天培地(50 μ g/mlアンピシリン)上での18時間の培養後に出現した細菌コロニーを拾い出し、50 μ g/mlアンピシリンを含有する2mlのLuria-Bertagni液体培地に播種した。培養物を、8時間、37で振盪しながらインキュベートし、次いで、1.5mlの細菌懸濁液を、5,000gで5分間、遠心分離した。細菌ペレットを、100 μ lの細菌膜不安定化緩衝液(50mM Tris-HCl pH 8、10mM EDTA、リボヌクレアーゼA 100 μ g/ml)に採取した。細菌懸濁液を200 μ lのアルカリ溶解緩衝液(200mM NaOH、1%SDS)の添加によって溶解し、調製物のpHを150 μ lの3M酢酸カリウムpH5.5で中和した。アルカリ溶解および中和工程には、氷上での5分間のインキュベーションを必要とする。細胞破砕物、変性したタンパク質および染色体DNAは、10,000gで10分間、4での遠心分離によって排除した。次いで、上清を、100mM Tris-HClでpH8に安定化させたフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25/24/1V/V/V)における1:2希釈により、フェノール-クロロホルムで抽出した。10,000g、2分間、室温での遠心分離によって、水相と有機相を分離した。上部の水相を回収し、無水エタノール(-20)で1:3希釈した。プラスミドDNAを、12,000

40

50

g、15分間、4での遠心分離によって沈殿させ、次いで、70%エタノールで2回洗浄した。次いで、プラスミドDNAを20 μ lの超純水に再懸濁し、-20で保存した。

【0144】

細胞クローンの調製

調製6：細胞クローンCHO-C2および中間細胞のクローンの入手に関する一般的ポイント

CHO-K1細胞系統を、その3'末端でflagエピトープをコードする配列を含んでなるグリコシルトランスフェラーゼのコア2(1-6)N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(C2GnT)をコードするcDNAを含んでなるプラスミドpcDNA3-C2-6GnT-flagでトランスフェクトした。flagエピトープの発現は、形質転換された細胞におけるC2GnT発現の検出を可能にする。

10

【0145】

この意味で、CHO-K1細胞をHAM-F12培地で増殖させた。細胞が60~80%コンフルエンスに達した場合、培養培地を取り出し、細胞表面をOpti-MEM培地で3回洗浄し、次いで、ウシ胎児血清を伴わないOpti-MEM培地で希釈した200 μ lのトランスフェクション溶液で覆った。トランスフェクション溶液は、上記のプラスミドおよびリポフェクタミン-リポソーム懸濁系(Life Technologies)を含有した。

【0146】

このようにして細胞を16時間保持し、この時点で、トランスフェクション懸濁液を、少なくとも4週間の期間、適切な選択的抗生物質(ネオマイシン、ゼオシン(zeocin)またはハイグロマイシン)を含有する2mlの完全HAM-F12培地で置き換えた。抗生物質の作用に対して耐性なクローンを単離し、次いで、増幅した。

20

【0147】

ネオマイシン(250 μ g/ml)によるこの様式で選択されたCHO-K1細胞クローンをCHO-C2と命名した。

【0148】

次いで、前記クローンCHO-C2を、以下の調製7に記載のプラスミドpSec-16Rでトランスフェクトした。プラスミドpSec-16RによるCHO-C2細胞の形質転換から生じるクローンをゼオシン(1mg/ml)で選択し、CHO-C2-16Rと命名した。

30

【0149】

CHO-K1細胞はまた、上記の方法に従って、クロウスカ-ラオ(Kukowska-Lalio)ら(1990年、Genes Dev. 4:1288-1303頁)に記載のフコシルトランスフェラーゼ3をコードするプラスミドpCDM7-FUT3、およびプラスミドpMamNeoで同時トランスフェクトした。プラスミドpCDM7-FUT3によるCHO-K1細胞の形質転換から生じるCHO-F3クローンを、一方ではネオマイシン(250 μ g/ml)で、他方では、シアリルルイスxモチーフのその高度発現について、選択した。前記発現は、抗体CSLEX-1(Becton-Dickinson)の援助による間接免疫蛍光によって、検出した。この様式で、クローンCHO-F3が得られた。

40

【0150】

次いで、前記クローンCHO-F3を、以下の調製7に記載のプラスミドpSec-16Rでトランスフェクトした。プラスミドpSec-16RによるCHO-F3細胞の形質転換から生じるクローンをゼオシン(1mg/ml)で選択し、CHO-F3-16Rと命名した。

【0151】

CHO-K1細胞はまた、プラスミドpCDM7-FUT3の代わりに、ロウ(Lowe)ら(1991年、J. Biol. Chem. 266:17467-17477頁)に

50

より記載のフコシルトランスフェラーゼ7をコードするプラスミド p C D M 8 - F U T 7、次いで、プラスミド p S e c 1 6 R でトランスフェクトした。先に記載の条件でのゼオシンおよびネオマイシンによる選択後、得られるクローンを C H O - F 7 - 1 6 R と命名した。

【 0 1 5 2 】

F A P P (6 R) の C 末端ペプチドを発現する中間クローンを調製するために、プラスミド p S e c 1 6 R の代わりにプラスミド p S e c - 6 R で細胞系統または細胞クローン C H O - K 1、C H O - C 2 および C H O - F 3 をトランスフェクトすることによって、上記の方法を用いた（調製7に記載の方法を参照のこと）。しかし、J 2 8 グリコシル化エピトープを組み立てるのに必要なグリコシルトランスフェラーゼ C 2 G n T およびフコシルトランスフェラーゼ3のみを、細胞系統の調製中に使用した。

10

【 0 1 5 3 】

従って、上記の条件での抗生物質選択後に、3つの中間細胞のクローン C H O - 6 R、C H O - C 2 - 6 R および C H O - F 3 - 6 R を得た。

【 0 1 5 4 】

調製7：細胞クローン C H O - 1 6 R

C H O - K 1 細胞を、B S D L の C 末端ドメインをコードする c D N A がクローニングされた（調製2を参照のこと）プラスミド p S e c - T a g (I n v i t r o g e n、L e e k、蘭国) に対応するプラスミド p S e c - 1 6 R でトランスフェクトした。これは、調製6におけるクローン C H O - C 2 の調製について行われた。

20

【 0 1 5 5 】

p S e c - T a g プラスミドは、マウス免疫グロブリン 軽鎖の V - J 2 C 領域をコードする配列を担持する。前記配列は、プラスミドにおいてクローニングされた c D N A によってコードされるタンパク質を、それがトランスフェクトされている真核細胞の分泌経路に指向する。

【 0 1 5 6 】

プラスミド p S e c - 1 6 R による C H O - K 1 細胞の形質転換から生じるクローンは C H O - 1 6 R と命名し、対応する（糖）ペプチド [（糖）ペプチド 1 6 R] の発現について選択した。

【 0 1 5 7 】

調製8：細胞クローン C H O - C 2 - F 3 - 1 6 R

調製6由来のクローン C H O - C 2 を、プラスミド p C D M 7 - F U T 3 およびハイグロマイシン耐性を付与するプラスミド p L S V H g (R & D S y s t e m s) でトランスフェクトし、細胞クローン C H O - C 2 - F 3 を得た。

30

【 0 1 5 8 】

C H O - C 2 - F 3 細胞系統を調製7におけるようなプラスミド p S e c - 1 6 R でトランスフェクトした。プラスミド p S e c - 1 6 R による C H O - C 2 - F 3 細胞の形質転換から生じるクローンを、C H O - C 2 - F 3 - 1 6 R と命名した。

【 0 1 5 9 】

C H O - C 2 - F 3 - 1 6 R は、シアリルルイス x モチーフを発現し、抗体 p A b L 6 4 に対する反応性を示す。

40

【 0 1 6 0 】

調製9：細胞クローン C H O - C 2 - F 7 - 1 6 R

これは、調製8におけるように得られたが、但し、プラスミド p C D M 7 - F U T 3 の代わりにプラスミド p C D M 8 - F U T 7 を使用した。

【 0 1 6 1 】

プラスミド p S e c - 1 6 R による C H O - C 2 - F 7 細胞の形質転換から生じるクローンを C H O - C 2 - F 7 - 1 6 R と命名し、対応する細胞系統を、2004年3月16日に番号 I - 3 1 8 9 でパリの C o l l e c t i o n N a t i o n a l e d e C u l t u r e d e M i c r o o r g a n i s m e s (C N C M) に寄託した。

50

【0162】

調製8ならびに9で得られたクローンCHO-C2-F3-16RおよびCHO-C2-F7-16Rは、シリアルリスxモチーフを発現し、抗体pAbL64に対する反応性を示す。

【0163】

調製10：細胞クローンCHO-C2-F3-6R

調製8由来のクローンCHO-C2-F3は、調製6および7について記載のとおり、プラスミドpSec-6R(調製3を参照のこと)でトランスフェクトし、クローンCHO-C2-F3-6Rを得た。このクローンは、中でもモノクローナル抗体J28によって認識されるグリコシル化エピトープを有するペプチドを発現する。

10

【0164】

調製11：細胞クローンCHO-C2-F3-GT-6R

調製10由来のクローンCHO-C2-F3-6Rを、先に記載のように、プラスミドpBK-GT(調製4を参照のこと)でトランスフェクトし、モノクローナル抗体J28によって認識されるグリコシル化エピトープならびにヒト血液における天然の循環抗体によって認識されるグリコシル化エピトープGalを有するクローンCHO-C2-F3-GT-6Rを得た。

【0165】

実施例1：BSDLのC末端(CHO-16R)に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

20

組換え糖ペプチドは、適切な選択的抗生物質を補充した2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシンおよび0.1%フオンギゾン(fongizone)を含有するOpti-MEM培地(Invitrogen)における恒湿、5%CO₂大気中16時間、37℃で細胞クローンCHO-16R(調製7)の日常的培養によって、産生される。細胞を、 2×10^4 細胞/cm²の密度で接種した。

【0166】

培養培地を48時間ごとに交換した。細胞がコンフルエンスに到達したら、それらをCaCl₂およびMgCl₂を伴わないリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、次いで、トリプシン/0.05%EDTAで脱離させ、低速遠心分離(400g、3分間)により沈降させ、5mlの培養培地に再懸濁した。

30

【0167】

細胞内免疫蛍光およびフローサイトメトリーを使用して、細胞クローンが目的の組換え糖ペプチドを発現することを確認した。

【0168】

組換え糖ペプチドを、液体クロマトグラフィー、続いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGEによって分析した。

【0169】

ゲル上で、分泌されたペプチドが約78kDaおよび83kDaの異なる2つの分子量バンドに分離することを認めることができた。

40

【0170】

83kDaのバンドは、おそらく、グリコシル化ペプチドに対応する一方、78kDaのバンドは、非グリコシル化形態またはそれ程グリコシル化されていない形態のいずれかであり得る。

【0171】

従って、上記のクローンは、BSDLのC末端に対応するサイズおよび特徴を有する糖ペプチドを発現すると思われる。

【0172】

実施例2：BSDLのC末端(CHO-C2-16R)に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

50

実施例 1 に記載の方法を用いたが、但し、細胞クローン CHO - C 2 - 1 6 R (調製 6) を培養した。

【 0 1 7 3 】

得られた組換え糖ペプチドを、液体クロマトグラフィー、続いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、 SDS - PAGE によって分析した。

【 0 1 7 4 】

ゲル上で、分泌されたペプチドが約 7 8 k D a および 8 3 k D a の異なる 2 つの分子量バンドに分離することを認めることができた。

【 0 1 7 5 】

従って、上記のクローンは、 B S D L の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する糖ペプチドを発現すると思われる。

【 0 1 7 6 】

実施例 3 : B S D L の C 末端 (CHO - F 3 - 1 6 R) に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

実施例 1 に記載の方法を用いたが、但し、細胞クローン CHO - F 3 - 1 6 R (調製 6) を培養した。

【 0 1 7 7 】

得られた組換え糖ペプチドを、液体クロマトグラフィー、続いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、 SDS - PAGE によって分析した。

【 0 1 7 8 】

ゲル上で、分泌されたペプチドが約 7 8 k D a および 8 3 k D a の異なる 2 つの分子量バンドに分離することを認めることができた。

【 0 1 7 9 】

従って、上記のクローンは、 B S D L の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する糖ペプチドを発現すると思われる。

【 0 1 8 0 】

実施例 4 : B S D L の C 末端 (CHO - C 2 - F 3 - 1 6 R) に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

実施例 1 に記載の方法を用いたが、但し、細胞クローン CHO - C 2 - F 3 - 1 6 R (調製 8) を培養した。

【 0 1 8 1 】

得られた組換え糖ペプチドを、液体クロマトグラフィー、続いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、 SDS - PAGE によって分析した。

【 0 1 8 2 】

ゲル上で、分泌されたペプチドが約 7 8 k D a および 8 3 k D a の異なる 2 つの分子量バンドに分離することを認めることができた。

【 0 1 8 3 】

従って、上記のクローンは、 B S D L の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する糖ペプチドを発現すると思われる。

【 0 1 8 4 】

実施例 5 : B S D L の C 末端 (CHO - F 7 - 1 6 R) に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

実施例 1 に記載の方法を用いたが、但し、細胞クローン CHO - F 7 - 1 6 R (調製 6) を培養した。

【 0 1 8 5 】

得られた組換え糖ペプチドを、液体クロマトグラフィー、続いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、 SDS - PAGE によって分析した。

【 0 1 8 6 】

分子量 8 3 k D a の単一のバンドがゲル上で認められた。

【 0 1 8 7 】

10

20

30

40

50

実施例 6 : B S D L の C 末端 (C H O - C 2 - F 7 - 1 6 R) に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

実施例 1 に記載の方法を用いたが、但し、細胞クローン C H O - C 2 - F 7 - 1 6 R (調製 9) を培養した。

【 0 1 8 8 】

得られた組換え糖ペプチドを、液体クロマトグラフィー、続いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、 S D S - P A G E によって分析した。

【 0 1 8 9 】

ゲル上で、分泌されたペプチドが約 7 8 k D a および 8 3 k D a の異なる 2 つの分子量バンドに分離することを認めることができた。

【 0 1 9 0 】

従って、上記のクローンは、 B S D L の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する糖ペプチドを発現すると思われる。

【 0 1 9 1 】

従って、上記のクローン (1 6 R) は、 B S D L の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する糖ペプチドを発現すると思われる。

【 0 1 9 2 】

実施例 7 ~ 1 3 : F A P P の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

クローン C H O - K 1 (コントロール)、 C H O - 6 R (E x 7)、 C H O - C 2 - 6 R (E x 8)、 C H O - F 3 - 6 R (E x 9)、 C H O - C 2 - F 3 - 6 R (E x 1 0)、 C H O - G T - 6 R (E x 1 1)、 C H O - C 2 - G T - 6 R (E x 1 2) および C H O - C 2 - F 3 - G T - 6 R (E x 1 3) により産生される組換えポリペプチドを、ポリアクリルアミドゲルあるいはそうでなければ液体および / またはアフィニティークロマトグラフィー上で精製し、アボウアキル (A b o u a k i l) ら、 1 9 8 8 年、 B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a、 9 6 1 : 2 9 9 - 3 0 8 頁により記載の抗体 p A b L 6 4、および m A b J 2 8 を使用する免疫検出によって分析した。 F A P P の癌胎児性形態の O - グリコシル化から誘導されるフコシル化 J 2 8 糖ペプチドに特異的なマウスモノクローナル抗体 m A b J 2 8 については、パニコット (P a n i c o t) ら G l y c o b i o l o g y、 1 9 9 9 年、 9 : 9 3 5 - 9 4 6 頁に記載されている。

【 0 1 9 3 】

抗 B S D L ポリクローナル抗体 p A b L 6 4 は、ヒト腭液から抗原を精製した後ウサギを免疫することによって得られた。前記抗体は、 F A P P、 B S D L の癌胎児性形態を完全に認識する。

【 0 1 9 4 】

アンチペプチドと命名された B S D L タンパク質コアに特異的なポリクローナル抗体は、位置 3 4 6 のセリン残基とヘモシアニンに結合した位置 3 7 0 のグルタミンとの間に含まれる B S D L のペプチド配列に対応する合成ペプチドでウサギを免疫することによって得られた。

【 0 1 9 5 】

前記 2 つの抗体を、タンパク質 A - S e p h a r o s e 4 B カラム (P h a r m a c i a) 上で精製した。アンチペプチドを、 S e p h a r o s e ゲルに結合したキーホールリンベットヘモシニアン (K L H) のカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによる第 2 の精製工程に供し、抗 K L H 抗体を排除した。

【 0 1 9 6 】

6 R 型の異なるクローンによって産生される組換えペプチドを、 1 0 % ポリアクリルアミドゲル上に 1 レーンあたり 1 0 0 μ g で充填し、分離し、次いで、ニトロセルロース膜にエレクトロトランスファーした。次いで、膜を、一方で抗体 p A b L 6 4、および他方で抗体 m A b J 2 8 の存在下でインキュベートし、展開させた。

【 0 1 9 7 】

10

20

30

40

50

両方の場合において、用いた抗体は、ネガティブコントロールとして使用されたトランスフェクトされていないCHO-K1細胞系統の場合を除いて、FAPPのC-末端糖ペプチドの予想されるサイズに対応する50kDaのサイズを有するポリペプチドに特異的に結合した。

【0198】

実施例14～19：抗糖ペプチドモノクローナル抗体

FAPPのC末端に対応するサイズおよび特徴を有する組換え抗糖ペプチド抗体を、以下の通りに調製した。

段階A - マウスの免疫化。

6週齢雄性Balb/cマウスを、以下のプロトコルに従って免疫した。

0日目：50：50エマルジョン（150 μ l NaCl / 150 μ l 完全フロイントアジュバント）における正常および病的ヒト唾液（以下にBSDL-FAPP 抗原と命名される）から精製されたFAPPおよびBSDLの25 μ gの混合物の腹腔内注入。

15日目：50：50エマルジョン（150 μ l NaCl / 150 μ l 不完全フロイントアジュバント）における25 μ gのBSDL-FAPP抗原での腹腔内チャレンジ

- 30日目：50：50エマルジョン（150 μ l NaCl / 150 μ l 不完全フロイントアジュバント）における25 μ gのBSDL-FAPP抗原での腹腔内チャレンジ

- 110日目：50：50エマルジョン（150 μ l NaCl / 150 μ l 不完全フロイントアジュバント）における20 μ gのBSDL-FAPP抗原での腹腔内チャレンジ

- 140日目：50：50エマルジョン（150 μ l NaCl / 150 μ l 不完全フロイントアジュバント）における20 μ gのBSDL-FAPP抗原での腹腔内チャレンジ

- 215日目：50：50エマルジョン（150 μ l NaCl / 150 μ l 不完全フロイントアジュバント）における20 μ gのBSDL-FAPP抗原での腹腔内チャレンジ

- 244日目：100 μ lの滅菌NaClにおける10 μ gのBSDL-FAPP抗原の静脈内注入。

- 247日目：細胞融合。

【0199】

段階B - コーレル（Kohler）およびミルステイン（Milstein）のプロトコルに従う細胞融合

a) 247日目に、選択したマウスを屠殺し、脾臓を取り出し、グループ分けした。脾臓の細胞をRPMI 1640培地で洗浄した。20%ウシ胎児血清（FCS）、1%グルタミン、1%非必須アミノ酸および1%ピルビン酸ナトリウムを含有するRPMI 1640培地において予め増殖されたP3.X63.Ag8.653骨髄腫細胞もまた、同じ培地で洗浄した。

【0200】

同時に、RPMIによる非免疫Balb/cマウスの腹腔洗浄により、腹膜マクロファージを回収した。

【0201】

ハイブリドーマ形成のために、1個の骨髄腫細胞に対して5個の脾臓細胞の割合で、チューブにおいて脾臓細胞および骨髄腫細胞を混合した。遠心分離後、細胞ペレットを、75mM HEPES緩衝液pH7.5中50%ポリエチレングリコール1500の800 μ lに再懸濁した。37 $^{\circ}$ Cでの1分間の接触後、20mlのRPMI 1640培地を緩徐に融合細胞に添加した。

【0202】

b) 初期培養は、20%ウシ胎児血清（FCS）を含有し、 5×10^{-3} Mヒポキサンチン、 2×10^{-5} Mアミノプテリンおよび 8×10^{-4} Mチミジンを補充したRPMI培地の存在下、96ウェルマイクロタイタープレート上で行った。次に、 5×10^3 腹膜マ

10

20

30

40

50

クロファージ、続いて 10^5 融合細胞を各ウェルに堆積させた。

【0203】

段階C - クローニングおよびサブクローニング

以下の段階Dに記載の方法によって選択される各ハイブリドーマは、10、5、2、1 および0.5細胞が腹膜マクロファージを含有するマイクロウェルに統計的に分配される限界希釈技術によるクローニングから生じた。従って、行われた2つのサブクローニング、複製されている各クローンおよびサブクローンを、90% FCS および10% ジメチルスルホキシド(DMSO)中に凍結した。次いで、最後の作製由来のサブクローンを、インピボで拡大し、Balb/cマウスにおいて腹水を得、続いて、プロテインAカラム上での免疫グロブリン精製を行った。

10

【0204】

段階D - ハイブリッド細胞選択方法

選択は、培養上清を使用する液相ELISA方法によって、行った。100 μ lの炭酸緩衝液pH 8.5中5マイクログラムのBSDL-FAPP抗原を、96ウェルELISAプレートのウェルに堆積させた。プレートを12時間、4 で活性化し、300 μ lの1mg/mlウシアルブミンを2時間、飽和させた。次いで、プレートを洗浄し、BSDL-FAPP抗原に対して指向された抗体を潜在的に含有する100 μ lの細胞培養上清と共にインキュベートした。2時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、アルカリホスファターゼ標識第二抗体と共に2時間、インキュベートした。インキュベーションの終了時に、プレートを再度洗浄し、パラ-ニトロフェニルリン酸(100 μ l、0.2 M Tris/HCl緩衝液pH 8.2および1mM $CaCl_2$ 中1mg/ml)と共にインキュベートした。37 で1時間後、プレートを、マイクロプレートリーダー上、410nmで読み取った。

20

【0205】

ELISA試験におけるそれらの応答について、約15抗体を選択した。免疫原タンパク質としてFAPPを使用するウエスタンブロット(イムノインプリンティング)によるさらなる分析は、ハイブリドーマ7B4(実施例14)、11D7(実施例15)、14H9(実施例16)、14H10(実施例17)、16D10(実施例18)および8H8(実施例19)の選択を可能にした。

30

【0206】

IgM抗体16D10を産生する細胞は、2004年3月16日に番号I-3188でパリのCollection Nationale de Culture de Microorganismes(CNCM)に寄託された。

【0207】

実施例20.天然由来の膜糖ペプチドの調製

実施例14~19に記載のモノクローナル抗体によって認識されるエピトープを担持する膜糖ペプチドを、以下の様式で調製した。脾臓腫瘍細胞を、プラスチック製支持体上で培養し、次いで、それから非酵素的解離溶液(Sigma)で脱離させた。遠心分離(1000rpmで2分間)によって得られる細胞ペレットを、音波処理(2x15秒間)し、再度遠心分離した(20分間、14,000rpm、4)。リン酸緩衝液に懸濁されたペレットは、実施例14~19に記載のモノクローナル抗体によって認識されるエピトープを担持する膜糖ペプチドに対応する。

40

【0208】

実施例21

以下の組成を有するワクチンを調製した。

- HaPT-1脾臓細胞から単離された実施例20由来の膜糖ペプチド、20 μ g
- ALU-gel-serアジュバント(Serva) 150 μ l
- 注射用水を含む賦形剤 150 μ l

【0209】

ワクチン化は、腫瘍細胞を動物の横腹に移植する2週間前、次いで1週間前の腹腔内注

50

入によって、行った。前記ワクチン化の結果を、プラセボ（等張液の注入）の結果と比較した。

【0210】

実施例 2 2

実施例 1 8 由来の抗体（16D10）の 0.5 mg/ml 注射用等張液を調製した。

【0211】

コントロール実施例 1：BSDL の C 末端に対応するサイズおよび特徴を有する組換え糖ペプチド

実施例 1 に記載の方法を用いたが、但し、細胞クローン CHO-K1 を培養した。

【0212】

ゲルは、分子量 78 kDa または 83 kDa で任意のバンドを示さなかった。

【0213】

薬学的研究

実験 1：膵外分泌癌の細胞免疫療法における BSDL および FAPP の組換え C-末端糖ペプチドの使用

【0214】

操作プロトコル：

ハムスター（90～100g）をいくつかの群に分け、30分間の UV 曝露によって不活化した HaPT-1 細胞を接種した。ハムスターに、実施例 20 由来の糖ペプチドおよび 2 週間の間週 1 回の腹腔内注入によって ALU-ge1-ser アジュバントと混合された不活化細胞を接種した。最後の接種の 2 週間後、ハムスターに HaPT-1 細胞の転移移植（皮下、横腹上）を行った。

【0215】

腫瘍増殖を毎週モニターし、腫瘍容積を、プラセボ（PBSのみ）を接種したコントロール群と比較した。

【0216】

結果：

腫瘍増殖曲線は、実施例 20 由来の糖ペプチド（BSDL および / または FAPP の C 末端ドメインに対して指向されたモノクローナル抗体 J28 および 16D10（実施例 18）によって認識される構造によって、大きな部分において提示される抗原）で免疫されるハムスターでは、有意に遅かった。

【0217】

実験の終了時、不活化された細胞を接種された群の腫瘍容積は、コントロール群より 80% 低かった。

【0218】

ハムスターを屠殺し、免疫組織化学分析のために、膵臓および腫瘍組織サンプルを取り出した。モノクローナル抗体 J28 および 16D10 ならびにポリクローナル抗体 L64 を使用して、（それぞれ、モノクローナル抗体 J28 および 16D10 によって認識される）16D10 および J28 エピトープならびに FAPP タンパク質コアの発現について試験した。

【0219】

腫瘍組織スライスの検査により、不活化された細胞を接種された群とコントロール群との間で、16D10 および J28 エピトープの発現の減少（後者の減少の方が小さい）が示された。

【0220】

従って、本発明に従う BSDL および FAPP の C-末端糖ペプチドは、膵外分泌癌の細胞免疫療法において使用することができる。

【0221】

実験 2：糖尿病の病状診断における本発明に従う糖ペプチドの使用

操作プロトコル：

10

20

30

40

50

多様な膵臓および他の病状を患う患者由来の血清における E L I S A 方法によって行われる一連の実験は、E L I S A プレートを活性的に活性化するために抗原として使用される B S D L が、I 型糖尿病患者由来の血清の約 80% に存在する抗体によって特異的に認識される一方、コントロール患者由来の血清で反応性であったのは 10% 未満であったことを示した。膵臓炎、膵臓癌またはグレイブス病のような他の病状の患者由来の血清は反応性ではなかった (パニコット (P a n i c o t) ら 1999 年、D i a b e t e s , 48 : 2316 - 2323 頁)。

【0222】

実施例 2、5 および 6 由来の組換え糖ペプチドを、ウエスタンブロット (またはイムノインプリンティング) によって試験した。

【0223】

結果：

B S D L、および特にその C 末端ドメインは、糖尿病患者由来の血清によって認識される一方、B S D L は、正常なコントロール患者由来の血清によって認識されなかった。

【0224】

実施例 2 および 6 由来の組換え糖ペプチドは、糖尿病 (I 型) 患者由来の血清によって認識された。

【0225】

コントロール血清 (健康な患者由来) は、前記 3 つの糖ペプチドのいずれも認識しなかった。

【0226】

従って、実施例に記載の本発明の正常および組換え C - 末端糖ペプチドは、糖尿病の病状の診断に使用することができる。

【0227】

実験 3 : 膵臓癌の診断における F A P P および / または B S D L の C 末端ドメインに対して指向されたモノクローナル抗体の使用

操作プロトコル：

ヒト膵臓腫瘍細胞系統 S O J - 6 および B x - P C - 3 ならびにヒト非膵臓腫瘍細胞系統 C a c o - 2 および H e p - G 2 を、モノクローナル抗体 J 2 8、16 D 1 0 (実施例 18)、および 8 H 8 (実施例 19) ならびに B S D L および F A P P の C 末端ドメインに特異的なポリクローナル抗体 (p A b) L 6 4 で処置した。それぞれの抗原 - 抗体複合体を、蛍光ウサギまたはマウスフルオレセイン結合 N - イソチオシアネート抗 I g G 抗体の援助で検出した。F A C S 分析を使用して、それらの表面で、F A P P および B S D L の C 末端ドメインと会合した抗原の存在を検出した。

【0228】

結果：

モノクローナル抗体 J 2 8 および 16 D 1 0 (実施例 18)、ならびにポリクローナル抗体 (p A b) L 6 4 は、ヒト膵臓腫瘍細胞系統 S O J - 6 の表面を特異的に認識し、B x - P C - 3 は C a c o - 2 および H e p - G 2 細胞のような試験したヒト非膵臓腫瘍細胞系統の表面を認識しなかった。

【0229】

従って、F A P P および B S D L の C 末端ドメイン上に特異的に発現されるグリコシル化エピトープに対して指向されたモノクローナル抗体 J 2 8 および 16 D 1 0 は、膵臓腫瘍細胞を非膵臓腫瘍細胞から区別することが可能である。

【0230】

従って、F A P P および B S D L の C 末端ドメイン上で特異的に発現されるグリコシル化エピトープに対して指向されたモノクローナル抗体は、膵臓癌の診断に使用することができる。

【0231】

特に、前記抗体は、二次腫瘍 (転移) が、膵臓由来であるかまたは別の由来の原発性腫

10

20

30

40

50

瘍由来であるかどうかを決定することができる。

【0232】

実験4：本発明のモノクローナル抗体による膵臓新生物細胞の標的化

A - ヒト膵臓組織切片に関する研究

操作プロトコル：

F A P P および / または B S D L の C 末端ドメインに対して指向されたモノクローナル抗体によって認識されるグリコシル化エピトープの組織発現を、正常および癌ヒト膵臓組織切片に対する本発明の多様なモノクローナル抗体で行った免疫組織化学研究において、試験した。

【0233】

第1の工程では、膵臓組織を、4例の膵臓癌患者および5例の正常膵臓から得た。組織切片を、実施例18(16D10)および19(8H8)由来の抗体共にインキュベートした。

【0234】

第2の工程では、7例のヒト膵腫瘍組織サンプルおよび5例の非腫瘍組織(病理学者によって診断された)を5μm厚の切片にスライスし、アセトン中、4で乾燥し、Tris / HCl 緩衝液 pH 7.6 において再水和した。次いで、切片を、1時間、25 (mAb J 28 および mAb 8 H 8、実施例 19) または 1 晩、4 (mAb 16 D 10、実施例 18) のいずれかとインキュベートし、抗体は、Dako 希釈液 (EnVision System、Dako、Copenhagen、丁国) 中 1 : 50 で希釈した。次いで、切片を適切なアルカリホスファターゼ標識第二抗体と共にインキュベートした。次いで、抗原 - 抗体複合体を、発色基質 Fast - Red で検出した。共焦点レーザー走査顕微鏡法による定量分析の場合、適切な第二抗体は、ストレプトアビジン - フルオロセインで標識された。次いで、切片を、顕微鏡下または共焦点レーザー蛍光顕微鏡により調べた。

【0235】

結果：

最初の実験では、実施例18(16D10)由来のモノクローナル抗体は、4つの膵腫瘍組織サンプル由来の新生物細胞を特異的に認識した。

【0236】

5例の正常な膵臓組織では、反応は観察されなかった。

【0237】

実施例19(8H8)由来のモノクローナル抗体は、正常な膵臓組織を好適に認識した。

【0238】

第2の実験では、研究した全部で7つの組織サンプルのうち、7つがmAb 16 D 10 (実施例 18) および 5 つが m A b J 2 8 によって認識された。免疫組織化学的結果を、図 1 ならびに表 1 および 2 に示す。m A b 1 6 D 1 0 (実施例 18) は、腫瘍組織に対して極めて高い特異性を示す一方、m A b 8 H 8 (実施例 19) は、正常な膵臓組織のみを認識した。m A b J 2 8 は、腫瘍組織を好適に認識したが、いくつかの正常組織もまた認識したため、中間的な特異性を示した。表 2 は、抗体によって標識された組織切片上の蛍光強度を規定する共焦点レーザー顕微鏡の結果を示す。これらの抗体のうち、試験した他の腫瘍組織：肝臓、肺、胃、結腸、食道および甲状腺を認識したものは認められなかったことに留意すべきである。

【0239】

抗腫瘍活性な物質に結合した本発明のモノクローナル抗体は、膵臓腫瘍細胞を標的化および破壊するための膵臓癌の処置に使用することができる。

【0240】

同様に、放射性(または他の)元素を前記抗体と結合させ、原発性腫瘍および転移の正確な局在化を可能にすることができる。前記抗体はまた、正常組織と腫瘍組織との間の明

10

20

30

40

50

確かつ鋭敏な区別を付与することができる。

【 0 2 4 1 】

【 表 1 】

表 1. 半定量的免疫組織化学研究: 抗体 mAb8H8, mAbJ28 および mAb16D10 により得られる結果

	標識			
	mAb8H8	mAbJ28	mAb16D10	
コントロール				10
1	4	1	0	
腺房	0	0	0	
脈管				
コントロール				
2	4	1	0	
腺房	0	0	0	
脈管				
コントロール				20
3	4	1	0	
腺房	0	0	0	
脈管				
コントロール				
4	4	1	0	
腺房	0	0	0	
脈管				
コントロール				30
5	4	1	0	
腺房	0	0	0	
脈管				
PDAC1	0	0	4	
PDAC2	0	3	4	
PDAC3	0	2	4	
PDAC4	0	0	4	
PDAC5	1	3	4	
PDAC6	0	2	4	
PDAC7*	0	1	3	
CCA*	0	0	0	40
ECA*	0	0	0	
LiCa*	0	0	0	
LuCa	0	0	0	
SCA*	0	0	0	
TCA*	0	0	0	

C、コントロール; PDAC、膵腺癌; LuCa、肺癌腫; CCA、結腸癌腫; ECA、食道癌腫; LiCa、肝臓癌腫; SCA、胃癌腫; TCA、甲状腺癌腫。組織は BioChain Institute(米国)より入手した。標識される細胞数を、半定量的に次のように表す: 0、標識なし; 1: 細胞の 1~10%が標識された; 2: 細胞の 10~30%が標識された; 3: 細胞の 30~40%が標識された; および 4: 細胞の >40%が標識された。

【 0 2 4 2 】

【表 2】

表 2. 本発明の抗体によって標識される切片上の蛍光強度

症例	蛍光強度			
	mAb8H8	mAbJ28	mAb16D10	
コントロール 1	92.33 ± 2.80	19.11 ± 8.75	31.41 ± 1.19	10
コントロール 2	138.72 ± 3.36	14.54 ± 6.57	8.16 ± 5.16	
コントロール 3	110.95 ± 2.71	17.41 ± 8.09	0	
コントロール 4	109.04 ± 4.58	26.49 ± 12.01	0	20
コントロール 5	114.14 ± 1.26	35.56 ± 16.30	0	
PDAC1	0	53.12 ± 2.12	124.02 ± 2.43	
PDAC 2	36.47 ± 0.35	87.88 ± 4.28	129.84 ± 6.35	
PDAC 3	0	89.60 ± 2.84	123.27 ± 6.16	
PDAC 4	17.06 ± 7.64	50.61 ± 2.36	143.95 ± 2.71	30
PDAC 5	40.42 ± 0.22	88.92 ± 5.48	135.06 ± 4.03	
PDAC 6	0	59.97 ± 1.64	129.30 ± 1.91	
PDAC 7*	18.65 ± 8.38	72.74 ± 4.84	132.34 ± 2.75	

C、コントロール; PDAC、膵臓癌。組織は BioChain Institute(米国)より入手した。各症例において、各組織スライスの異なる6領域に対する標識の平均±標準誤差を示す。mAb16D10 (P<0.001)、mAb8H8 (P<0.001)および mAbJ28 (P<0.05)について、コントロールと膵臓腫瘍組織との間に有意差が観察された。

40

【0243】

B - J 2 8 グリコトープを担持する組換え糖ペプチドに対する m A b J 2 8 と m A b 1 6 D 1 0 (実施例 1 8) との間の E L I S A 競合研究

操作プロトコル：

癌胎児性糖型 J 2 8 の形成に關与するグリコシルトランスフェラーゼを特徴付け、前記

50

グリコトープを、遺伝子操作によって、エクスピボで再生した。それは、CHO細胞において、前記構造を組み立てるのに必要なFAPPの組換えC末端ペプチド(6反復配列よりなる)ならびに2つのグリコシルトランスフェラーゼ、(1-3/4)フコシルトランスフェラーゼFUT3およびコア2(1-6)N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼから再構築した。J28糖型(実施例10)を担持するFAPPの組換えC末端糖ペプチドを、この細胞系統の培養上清に分泌させた。

【0244】

競合実験は、前記抗体の特異性を実証する目的で、J28糖型を担持するFAPPの組換えC末端糖ペプチド(実施例10)を含有する培養上清、ビオチン化mAbJ28および競合物としての上昇濃度のmAb16D10(実施例18)の存在下で、ELISA試験により行った。

10

【0245】

プロトコルの原理は以下のとおりである。

1. ウェルの底部を、1:10、1:20、1:50、1:100に希釈された組換えJ28糖ペプチドを含有する濃縮された培養上清で被覆する。

【0246】

2. ビオチン化mAbJ28を、ウェルあたり10ng(Exp.1)またはウェルあたり5ng(Exp.2)で、上昇濃度の精製されたmAb16D10と共に添加した。

【0247】

3. ビオチン化mAbJ28は、アルカリホスファターゼ結合抗ビオチン抗体(mAb16D10に対する抗ビオチンAbコントロール=0)の援助により、認識された。

20

【0248】

結果:

2つの実験の結果を示す図2は、競合物として使用される上昇濃度のmAb16D10(実施例8)(4倍過剰量をも伴う)の存在下で、ウェルの底部で被覆されたそのグリコトープに対するmAbJ28の反応性の有意な消失が認められたことを示す。

【0249】

C-ヒト膵臓腫瘍細胞系統SOJ-6に対する抗体mAbJ28とmAb16D10との間のFACS競合研究

操作プロトコル:

30

モノクローナル抗体mAbJ28およびmAb16D10は、ヒト膵臓腫瘍細胞系統SOJ-6、Bx-PC-3を特異的に認識し、試験したヒト非膵臓腫瘍細胞系統を認識しなかった。

【0250】

FACSによる予備競合試験は、蛍光色素(Alexa488)に結合したモノクローナル抗体mAbJ28および腹水の形態で競合物として使用される上昇濃度のモノクローナル抗体mAb16D10(実施例18)の存在下で、ヒト膵臓腫瘍細胞系統SOJ-6に対して行った。

【0251】

プロトコルの重要事項は以下のとおりである。

40

1. ヒト膵臓腫瘍SOJ-6細胞を脱離させ、固定化し、4でBSAで飽和させた。

2. 蛍光標識モノクローナル抗体mAbJ28を、サンプルあたり2ngで、1:100、1:40、1:20、1:20、1:10、1:4および1:2希釈でmAb16D10を含有する上昇濃度の腹水の存在下で添加した。

3. 細胞をFACSで分析した。

【0252】

結果:

結果を図3に示す。細胞のきわめて低い標識化(Alexa-488標識mAbJ28による最初の実験のため)にもかかわらず、競合物として使用される上昇濃度の抗体mAb16D10の存在下で、その糖型に対する抗体mAbJ28の反応性の有意な消失は、

50

観察されなかった。

【0253】

実験5：膵外分泌癌の処置における本発明のモノクローナル抗体の使用

実験プロトコル：

6週齢ヌードマウス(NMRIマウス)の2群に、-1日目に、実施例18由来のモノクローナル抗体16D10を、150 μ lの0.5mg/mg等張抗体溶液の用量で、または等張プラセボ溶液のいずれかを腹腔内接種した。

【0254】

0日目、2 \times 10⁶SOJ-6ヒト膵臓腫瘍細胞を、右横腹に皮下注入した。次いで、動物に、+1、+3、+6、+8および+10日目に、(上記の量で)モノクローナル抗体16D10または等張液を接種した。

10

【0255】

明白な皮下の腫瘍の容積を、各動物において、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10週目に測定した。

【0256】

結果：

実施例18由来のモノクローナル抗体で処置した動物における腫瘍増殖速度は、プラセボ処置動物より10倍低かった。

【0257】

実験終了時(接種10週間後)、コントロール動物から取り出した腫瘍のメジアン容積は1.25であり、対して、処置された動物では0.15cm³の顕著に低いメジアン値であった。

20

【0258】

従って、FAPPおよび/またはBSDLのC末端ドメインに対して指向されるモノクローナル抗体ならびに特に、実施例18由来のモノクローナル抗体は、膵臓癌の治療に使用することができる。

【0259】

実験6：膵臓癌の尿診断におけるFAPPおよび/またはBSDLのC末端ドメインに対して指向されたモノクローナル抗体の使用

操作プロトコル：

ウエスタンブロット、液体クロマトグラフィーおよび質量分析特徴付けによって行われる一連の実験により、健康な患者の尿における無傷(intact)なBSDLの同定がもたらされた。これの所見に照らし合わせて、BSDL/FAPPのC末端ドメインによって行われ、膵臓癌において出現する異なるグリコシル化エピトープJ28、16D10はまた、この癌を患う患者の尿に存在し得るものであった。

30

【0260】

結果：

予備ウエスタンブロット実験において得られる最初の結果を示す図4は、膵臓癌患者由来の尿サンプルにおけるBSDL/FAPPによって担持されるグリコシル化J28エピトープの存在、および健康な個体由来の尿サンプルにおけるその非存在を示す。

40

【0261】

図4は、健康な被験体および癌患者の両方が、110kDaに局在するpAbL64およびmAb8H8(実施例19)に免疫活性を示す1つもしくは2つのバンドを有することを示す。一方、2つの群は、癌患者に認められるが健康な被験体には認められない110kDaでmAbJ28、mAbJ28-免疫反応性バンドに対する異なる反応性を示した。

【0262】

実験7：膵外分泌癌の細胞免疫療法におけるBSDLおよびFAPPの尿C-末端糖ペプチドの使用

操作プロトコル：

50

予備の結果は、BSDL/FAPPによって担持されるグリコシル化J28エピトープが、現時点で試験した膵腺癌患者由来の尿サンプル中に存在する一方、それは、健康な個体由来の尿サンプルには存在しないことを示した。侵襲的方法を伴わずに大量に得ることができる尿における前記腫瘍マーカーの存在は、ラマナタン (Ramanathan) ら、Cancer Immunol Immunother、2004年、54:254-64頁、オネイル (O'Neill) ら、Blood、2004年、104:2235-46頁、ブラド (Vlad) ら、J Exp Med、2002年、196:1435-46頁、シュミット (Schmidt) ら、Cancer Res、2003年、63:8962-67頁により記載のような異なる有効な免疫療法プロトコルを開発するために、抗原の供給源としての役割を果たすことができる。そのような手段の1つは、それらの膵臓腫瘍が切除されている患者由来の樹状細胞を使用して、(ヤマナカ (Yamanaka) ら、Br J Cancer、2003年、89:1172-9頁、スバネ (Svane) ら、Cancer Immunol Immunother、2004年、53:633-41頁、ユ (Yu) ら、Cancer Res、2004年、64:4973-9頁により記載のような) 自家細胞免疫療法プロトコルを開発することである。次いで、患者の樹状細胞は、前記の同じ抗原を発現する残存腫瘍病巣に対して指向される免疫応答を誘導するために患者に再注入される前に、患者自体の抗原、即ち、尿から得られるJ28グリコトープ (およびおそらくまた、16D10グリコトープ) を担持するBSDL/FAPPのC末端糖ペプチドでエクスピボで充填される。

【0263】

今回、腫瘍抗原として、グリコシル化J28エピトープを担持するFAPPの組換えC末端糖ペプチド (実施例10) を使用する評価のもとでのヒト樹状細胞活性化の前記ストラテジーはまた、前記グリコシル化エピトープを担持するBSDL/FAPPの尿中C末端糖ペプチドを使用することによって、行うことができる。健康な個体の尿におけるBSDLを精製および特徴付けるために開発された精製プロトコル (除外およびアフィニティークラム上での液体クロマトグラフィーと組み合わせられた、遠心分離、限外ろ過および濃縮の異なる工程) は、膵腺癌患者の尿サンプル由来のJ28グリコトープ (およびまた16D10のグリコトープ) を担持するBSDL/FAPPを精製するために使用される。プロトコルは以下のとおりである。生来の尿は遠心分離されて、細胞破砕物が排除され、Centripreps (登録商標) YM-10上での限外ろ過によって部分的に脱塩され、次いで、Sephadex (登録商標) G-25カラム上で完全に脱塩される。回収した画分は、凍結乾燥され、次いで、10mM Tris-HCl 溶出緩衝液、pH 7.8、400mM NaCl 中に採取され、SephacrylTM S-200ゲル上に充填されて、それらの分子量に従ってタンパク質が分離される。J28グリコトープ (および/または16D10糖型) を担持するBSDL/FAPPを含有する画分は回収され、透析され、凍結乾燥される。分子篩後に得られる凍結乾燥物は、PBSにおいて再水和され、J28グリコトープ (およびおそらくまた16D10グリコトープ) を担持するBSDL/FAPPは、アガロース-mAb J28カラムまたはヘパリンSepharoseカラム上でのイムノアフィニティークロマトグラフィーのいずれかによって精製される。J28グリコトープ (および/または16D10糖型) を担持する精製されたBSDL/FAPPは、トリプシンまたは臭化シアンで消化されて、前記グリコトープを担持するBSDL/FAPPのC末端糖ペプチドが得られ、他に記載のようにBSDL/FAPPのC末端ドメインが単離される (マス (Mas) ら、1997年、Glycobiology, 7:745-752)。膵腺癌患者の樹状細胞は、患者自体の尿から精製されるJ28グリコトープ (および/または16D10糖型) を担持する前記糖ペプチドの存在下で、培養される。パルスされた成熟樹状細胞の表面上の糖ペプチドの存在は、細胞が患者に再注入されて、抗腫瘍応答が誘導される前に、共焦点顕微鏡によって、確認される。

【 図 1 】

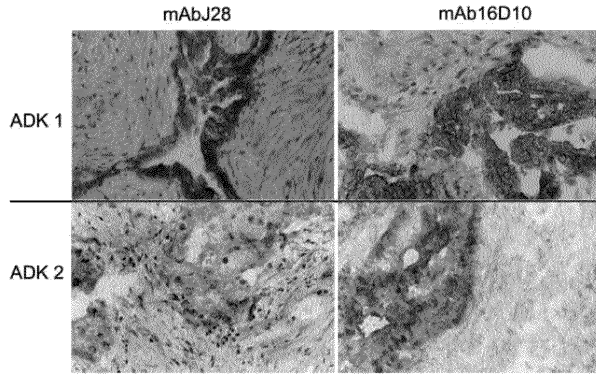
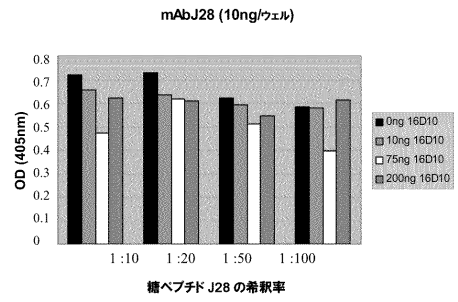
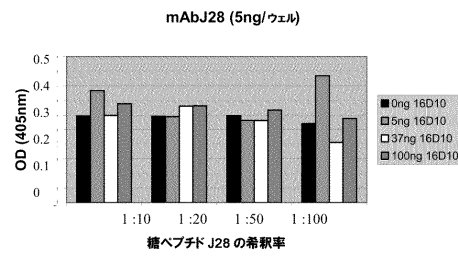


図 1

【 図 2 】



例 1



例 2

図 2

【 図 3 】

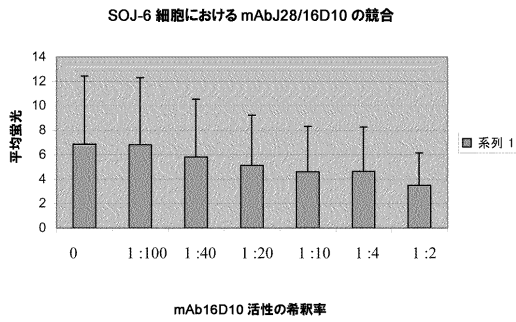


図 3

【 図 4 】

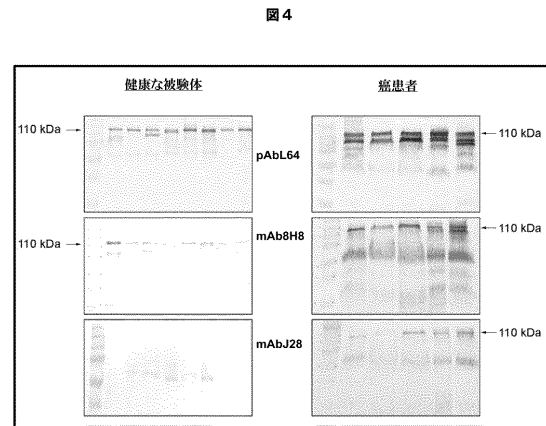


図 4

【配列表】

2015063524000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月31日(2014.10.31)

【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】

B S D LまたはF A P Pに対する結合に対して、モノクローナル抗体16D10と競合し、ヒト膵臓腫瘍組織を特異的に認識するが、正常な膵臓組織は認識しない抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体であって、ここで、モノクローナル抗体16D10は、2004年3月16日に番号I-3188の下でパリのCollection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNM)に寄託されたハイブリドーマによって産生され得る、抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体。

【請求項2】

請求項1に記載の抗体であって、B S D LまたはF A P Pに対する結合に対する前記抗体およびモノクローナル抗体16D10の間の競合が、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、またはB I A C O R E分析によって評価される、抗体。

【請求項3】

請求項1または2に記載の抗体であって、1:10および1:100の間のモノクローナル抗体16D10対前記抗体の比で、B S D LまたはF A P Pに対するモノクローナル抗体16D10の結合を、少なくとも70%だけ減少させる、抗体。

【請求項4】

請求項1または2に記載の抗体であって、1:10および1:100の間のモノクローナル抗体16D10対前記抗体の比で、B S D LまたはF A P Pに対するモノクローナル抗体16D10の結合を、少なくとも90%だけ減少させる、抗体。

【請求項5】

モノクローナル抗体16D10と同じエピトープに結合する、請求項1~4のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項6】

ヒト化されているか、キメラかまたはヒト抗体である、請求項1~5のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項7】

I g G型である、請求項1~6のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項8】

一本鎖抗体である、請求項1~7のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項9】

インビボまたはインビトロで膵臓の病状を検出するために使用し得る診断組成物を調製するための請求項1~8のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【請求項10】

膵臓の病状が膵臓癌である、請求項9に記載の使用。

【請求項11】

被験体由来の生物学的サンプルと請求項1~8のいずれか1項に記載の抗体とを接触させ、前記抗体と前記生物学的サンプルとの間の免疫反応から生じる免疫複合体の形成を検出することを含んでなる、膵臓の病状を患う被験体をインビトロで検出するための情報を得るための方法。

【請求項 1 2】

前記生物学的サンプルが膵臓組織のサンプルである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記生物学的サンプルが、膵液、血清および尿の中から好適に選択される生物学的液体である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

膵臓の病状が膵臓癌である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体、および場合により、生物学的サンプルと前記抗体との間の免疫反応から生じる免疫複合体を検出するための手段を含んでなる、膵臓の病状の診断のためのキット。

【請求項 1 6】

被験体の尿を回収し、前記尿と、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体とを接触させ、前記抗体と前記尿との間の免疫反応から生じる免疫複合体の形成を検出することを含んでなる、膵臓の病状を患う被験体をインビトロで検出するための情報を得るための方法。

【請求項 1 7】

膵臓の病状が膵臓癌である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含んでなる医薬組成物。

【請求項 1 9】

膵臓疾患の予防的または治療的処置を目的とする医薬品を調製するための請求項 1 8 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 2 0】

膵臓疾患が膵臓癌である、請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 2 1】

配列番号 1 4 に記載され、コア 2 (1 - 6) N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (C 2 G n T)、 (1 - 3) および (1 - 4) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ F U T 3、または (1 - 3) フコシルトランスフェラーゼ活性を有するフコシルトランスフェラーゼ F U T 7 よりなる群において選択されるオース - トランスフェラーゼ活性を有する 1 つもしくはそれ以上の酵素によってグリコシル化されるペプチド配列の 1 ~ 4 0 反復を含んでなる糖ペプチドを含んでなる医薬組成物またはワクチン組成物。

【請求項 2 2】

膵臓疾患の予防的または治療的処置を目的とする医薬品を調製するための請求項 2 1 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 2 3】

膵臓疾患が膵臓癌である、請求項 2 2 に記載の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
		C 1 2 N	15/00	A

(71)出願人 592236234

アンスティテュー・ナショナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・メディカル・
(イ・エヌ・エス・ウ・エール・エム)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH
RCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.)

フランス75654パリ・セデックス13、リュ・ドゥ・トルビアック101番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 ドミニク・ロンバルド

フランス、エフ - 1 3 0 0 8 マルセイユ、リュ・フロラリー - ベテ・ベ93番、レ・コリーヌ・ド
ゥ・マルセイユヴェール

(72)発明者 エリック・マ

フランス、エフ - 1 3 0 1 0 マルセイユ、リュ・アントワヌ・レ31番、レジダンス・ジャック
・エベール

(72)発明者 マリー - オディール・サドゥレ

フランス、エフ - 1 3 0 0 6 マルセイユ、リュ・シルヴァベル5番

(72)発明者 ロランス・パニコ - デュボワ

フランス、エフ - 6 6 0 8 0 カノエ、リュ・ドゥ・ビレラッハ12番

(72)発明者 ジャン - ポール・ベルナル

フランス、エフ - 1 3 0 0 1 マルセイユ、プールヴァール・ロンシャン92番

【 外国語明細書 】

1

Glycopeptides derived from pancreatic structures, antibodies and applications thereof in diagnostics and therapeutics

5 The invention relates to glycopeptides derived from pancreatic structures, antibodies and applications thereof in diagnostics and therapeutics.

More particularly, the invention relates to the obtaining of natural C-terminal glycopeptides of BSDL and/or FAPP carrying various glycosylated epitopes (alone or combined) recognized by induced antibodies in a patient suffering from type I diabetes and purified from biological fluids of human or animal origin as well as to said recombinant glycopeptides produced by biological engineering from cell lines containing cDNAs coding for the C-terminal peptides of FAPP and/or BSDL and cDNAs coding for the different glycosyltransferases required to build said glycopeptides. The invention also relates to monoclonal antibodies recognizing the recombinant and/or natural C-terminal glycopeptides of BSDL and/or FAPP, and to the use of said glycopeptides and said monoclonal antibodies as immunogenic agents, diagnostic agents and therapeutic agents that can be used for the diagnosis or the preventive or curative treatment of pancreatic pathologies such as diabetes and cancer of the exocrine pancreas or any other pathologies as well as in curative or preventive protocols of said pathologies.

15 Cancer of the exocrine pancreas, which accounts for over 20% of digestive tract cancers, is one of the most aggressive. In France for example, 4,000 new cases are diagnosed each year. Furthermore, its frequency is rising markedly in many regions of the world. Survival rates do not exceed 20% at 1 year and 3% at 5 years and mean survival is 3 to 4 months after diagnosis. The cancer is diagnosed late and progresses very rapidly, mainly through the formation of peritoneal and hepatic metastases. In addition, the deep anatomic location of the tumor, the absence of sensitive and specific early biological markers and its asymptomatic nature result in a diagnosis that always occurs late. Currently there are no effective therapies for exocrine pancreatic cancer, which is refractory to chemotherapy and radiation.

20 It would therefore be desirable to have specific markers of pancreatic cancer or other pancreatic pathologies available so as to diagnose these diseases and have products to provide effective treatments.

Now, after extensive research, and in a surprising manner, the applicants have discovered specific markers of pancreatic pathologies, and in particular of pancreatic cancer, expressed at the surface of the pancreatic tumor cell.

30 The applicants have discovered circulating antibodies directed against glycosylated antigenic structures of the C-terminal peptides of bile salt dependent lipase

2

(BSDL), in diabetic patients.

The applicants have also discovered that monoclonal and polyclonal antibodies anti- glycosylated epitope expressed in the C-terminal part of human fetoacinar pancreatic protein (FAPP) specifically recognized human pancreatic tumor cell lines, but
5 did not recognize tumor cell lines which were not of pancreatic origin.

The applicants have also discovered that monoclonal and polyclonal antibodies anti- glycosylated epitope expressed in the C-terminal part of human fetoacinar pancreatic protein (FAPP) specifically recognized human pancreatic tumor tissue, but did not recognize normal pancreatic tissue.

10 The applicants have further discovered that the antibodies anti-glycosylated epitope expressed in the C-terminal part of BSDL or FAPP could detect BSDL- and FAPP-derived glycopeptides in urine. In particular, the antibodies anti-glycosylated epitope expressed in the C-terminal part of FAPP could detect glycopeptides in urine allowing to identify a subject with a pancreatic pathology, particularly pancreatic
15 cancer.

More particularly, therefore, the applicants have discovered that compounds having a glycopeptide structure whose peptide part is based on the repeated C-terminal sequences of BSDL, a digestive lipolytic enzyme present in normal pancreatic secretions, or based on the repeated C-terminal sequences of FAPP (an oncofetal form of
20 BSDL) constituted such specific markers of pancreatic pathologies.

Indeed, BSDL and FAPP comprise repeated C-terminal peptide sequences of 11 amino acids, comprising a generally invariant part with 7 amino acids having the sequence Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr and a glycosylation site. Said generally invariant part is flanked on either side by a glycine often substituted by a glutamic acid and contains
25 the amino acids Asp and Ser on the N-terminal side.

The applicants have also discovered that the compounds having a glycopeptide structure which could be prepared by expression and secretion by a host cell, for example from Chinese hamster ovary (CHO), comprising a gene construct including a DNA molecule coding for one or more repeated sequences of the C-terminal peptide,
30 particularly recombinant of BSDL, for example all or part of the 16 repeated sequences and also comprising a gene construct such as a DNA molecule coding for at least one enzyme with ose-transferase activity, in particular selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase, fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which only has α (1-3)
35 fucosyltransferase activity, constituted said specific markers of pancreatic cancer.

Thus the present application has as object a glycopeptide, particularly

3

recombinant, possibly isolated or purified, comprising from 1 to 40 repeated C-terminal polypeptides, composed of 11 amino acids, of BSDL or FAPP, said polypeptides being glycosylated and carrying glycosylated epitopes giving rise to a specific immunological reaction with induced antibodies in a patient with type I diabetes and

- 5 - or else purified from biological fluids of human or animal origin
- or else recombinant and being produced by expression in a conventional host cell comprising an enzymatic machinery necessary for priming a glycosylation, said host cell being genetically modified so as to comprise a gene coding for said polypeptide and a gene coding for one or more enzymes selected from glycosyltransferases and in particular from
10 Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (abbreviated C2GnT), α (1-3) galactosyltransferase, fucosyltransferase 3 (abbreviated FUT3) and fucosyltransferase 7 (abbreviated FUT7).

In other preferred conditions of implementation of the invention, the aforementioned glycopeptide is essentially constituted of 1 to 40 glycosylated repeated C-terminal peptides, with 11 amino acids of BSDL or FAPP, and in particular exclusively
15 constituted of said glycosylated peptides. Hence, the invention therefore relates to isolated, purified or recombinant glycopeptides comprising, or essentially consisting of, repetitions of the repeated C-terminal peptide sequence of 11 amino acids, preferably : D-S-G/E-A-P-P-V-P-P-T-G/E (SEQ ID No 14). Said glycopeptides can contain 1 to 40 repetitions. In a preferred embodiment, said glycopeptides comprise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
20 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 or 40 repetitions. Preferably, the glycopeptides comprise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,
25 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 or 40 repetitions. In a particular embodiment, the glycopeptides comprise 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 or 40 repetitions. In another alternative embodiment, the glycopeptides comprise between 1 and 15 repetitions (for example, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, or 15 repetitions), preferably between 2 and 10 repetitions (for example, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 repetitions). In an
30 additional embodiment, the glycopeptides comprise between 17 and 40 repetitions (for example, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 or 40 repetitions). In preferred conditions of carrying out the invention, the aforementioned glycopeptide comprises from 1 to 40, preferably from 4 to 25 and more particularly from 6 to 16 repeated C-terminal polypeptides. In a particular embodiment, the
35 glycopeptide comprises, or essentially consists of, 6 repetitions.

Preferably, the glycopeptides according to the invention are glycosylated by

4

one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which only has α (1-3) fucosyltransferase activity. In a particular embodiment, the glycopeptides according to the invention have been glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT3. In an alternative embodiment, the glycopeptides according to the invention have been glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT7. The invention also encompasses glycopeptides which have been glycosylated by the enzymes C2GnT, FUT3 and FUT7. In a preferred embodiment, the glycopeptides according to the invention have additionally been glycosylated by α (1-3)galactosyltransferase (GT). Thus, when the glycopeptide according to the invention is recombinant, the host cell which produces it comprises a gene coding for said polypeptide and a gene coding for one or more enzymes selected from glycosyltransferases and in particular from among C2GnT, FUT3 and FUT7. In a preferred embodiment, said host cell additionally comprises a gene coding for α (1-3)galactosyltransferase (GT).

In a particularly preferred embodiment, the invention relates to a recombinant, isolated or purified glycopeptide comprising 1 to 40 repetitions of the peptide sequence described in SEQ ID No 14 and glycosylated by one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which has α (1-3) fucosyltransferase activity, said glycopeptide additionally being glycosylated by α (1-3)galactosyltransferase (GT).

"Isolated glycopeptides" is understood to mean that said compounds are separated from their natural environment. Thus, said compounds are separated from some or all of the other components of their natural environment.

"Purified glycopeptides" is understood to mean that said compounds are enriched in a mixture by at least approximately a factor of 1, preferably by at least 2, 3, 4 or 5-fold. The term "purified" does not necessarily mean that the compounds are absolutely pure. For instance, said compounds can have a purity of 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 100%. Preferably, however, said compounds generate only single bands in polyacrylamide gel electrophoresis.

Any suitable separation and/or purification method by which to obtain them can be used. In a particular embodiment, the glycopeptides are purified from a biological fluid from a human or animal subject. The biological fluid can be selected in the group consisting of serum, urine, pancreatic juices and milk secretions. Preferably, the

5

biological fluid is urine. In a preferred embodiment, the subject is a patient who may be or who is suffering from a pancreatic disease, preferably pancreatic cancer. In another embodiment, the glycopeptides are purified from a cell culture. In an additional embodiment, the glycopeptides are purified from a tissue sample, preferably pancreatic tissue and in particular a pancreatic tissue tumor.

In the spirit of the application, the term "glycotype" refers to glycosylated epitopes. The glycosylated epitopes can involve one or more glycosylated chains. The term "mAb" ("Acm" in French) refers to a monoclonal antibody, the term "pAb" ("Acp" in French) to a polyclonal antibody.

In a particular embodiment, the invention relates to a glycopeptide according to the invention which can give rise to a specific immunological reaction with an antibody according to the invention. Preferably, the glycopeptide can give rise to a specific immunological reaction with one or more antibodies selected from J28 and 16D10. Optionally, the glycopeptide will give rise to a specific immunological reaction with J28. Alternatively, it will give rise to a specific immunological reaction with 16D10.

The host cells classically used in genetic engineering naturally contain enzymes, for example α -3 N-acetylgalactosaminyltransferase which adds an N-acetylgalactosamine generally on a serine or threonine residue of a peptide. For example this is the case for widely used host cells such as C127, COS, CHO or CHO-K1 which contain such enzymes.

In the present application and in that which follows, the term "conventional host cell" denotes a cell normally used for the production of glycopeptides, preferably a human cell or an animal cell such as C127, COS cells, or insect cells such as *Spodoptera frugiperda* ovary cells and particularly a CHO or CHO-K1 cell. Such a suitable conventional host cell can be selected in particular on the basis of its genetic machinery and its abilities to generate various glycosylated epitopes. To make said selection, an enzymatic assay can be carried out to detect the presence in particular of α -3 N-acetylglucosaminyltransferase in the host cell that one wishes to use.

The glycosyltransferases which are used can be of animal or preferably human origin.

In preferred conditions of implementation of the invention, the genetically modified conventional host cell comprises at least one gene coding for said polypeptide and at least one gene coding for Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) and fucosyltransferase 3 (FUT3).

In other preferred conditions of implementation of the invention, particularly for applications in pancreatic cancer, the genetically modified conventional host cell

6

comprises at least one gene coding for said polypeptide and at least one gene coding for Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase 3 (FUT3) and α (1-3)galactosyltransferase (GT).

5 In still other preferred conditions of implementation of the invention, particularly for applications in type I diabetes, the genetically modified conventional host cell comprises at least one gene coding for said polypeptide and at least one gene coding for glycosyltransferase Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) and fucosyltransferase 7 (FUT7).

10 All or part of the repeated C-terminal peptides can be glycosylated. Preferably, all of the repeated sequences will be glycosylated, generally 16 sequences, more specifically 6 sequences and in particular 2 sequences will be glycosylated.

The glycosylations can be due to one or more N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, sialic acid, glucose, galactose, fucose.

15 In yet other preferred conditions of implementation of the invention, the size of an aforementioned glycopeptide estimated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is advantageously comprised between 20 and 120 kDa, preferably comprised between 20 and 85 kDa, more particularly comprised between 45 and 83 kDa.

20 In particular, the glycopeptides named C2-F3-16R, C2-F3-GT-6R and more particularly C2-F3-6R and C2-F7-16R are considered. C2-F3-16R designates a glycopeptide having 16 repetitions glycosylated by C2GnT and FUT3. C2-F3-GT-6R designates a glycopeptide having 6 repetitions glycosylated by C2GnT, FUT3 and GT. C2-F3-6R designates a glycopeptide having 6 repetitions glycosylated by C2GnT and FUT3. C2-F7-16R designates a glycopeptide having 16 repetitions glycosylated by C2GnT and FUT7. Preferably, the glycopeptides according to the invention are selected in
25 the group consisting of C2-F3-6R, C2-F3-GT-6R, C2-F7-6R, C2-F7-GT-6R, C2-F3-F7-6R, and C2-F3-F7-GT-6R.

A cell line producing the glycopeptide C2-F7-16R was deposited with the Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) in Paris on 16 March 2004 under the number I-3189.

30 The person skilled in the art knows that a peptide can undergo several structural modifications without altering function.

The peptide can contain one or more modifications in its amino acids such as deletions, substitutions, additions or functionalizations such as acylation of amino acids, in so far as said modifications do not affect the immunologic characteristics thereof. In
35 particular, the modification or modifications can be substitutions by a conservative amino acid (that is, having similar physicochemical characteristics). For example, in general, the

7

substitution of a leucine residue by an isoleucine residue does not alter such properties. Generally, the modifications must concern less than 40%, in particular less than 30%, preferably less than 20% and more particularly less than 10% of the amino acids of the peptide. It is important that the modified peptide does not be denatured such as can be
5 done for example by a physical treatment such as heat, so as to preserve the conformational sites thereof so that the antibodies induced by the modified derivatives will be active towards the native structure.

In general, with respect to the modifications, the homology or similarity between the aforementioned modified glycopeptide and the aforementioned native
10 glycopeptide, as well as to the modes of use, or of coupling the immunogenic compound according to the invention to an immunogenic protein like tetanus toxoid, reference can be made in particular to WO-A-86/06 414 or to EP-A-0.220.273 or else to PCT/US.86/00831, equivalent.

The glycopeptides which are the object of the invention can be prepared in
15 particular from pancreatic juices, serum, milk, urine or amniotic fluid of human or animal origin. In a preferred embodiment, the glycopeptides according to the invention are isolated and/or purified from urine of human or animal origin. Preferably, the urine is of human origin. In a preferred embodiment, the urine is from a patient who may be or who is suffering from a pancreatic pathology. Preferably, the pancreatic pathology is
20 pancreatic cancer. Those skilled in the art are familiar with the techniques that can be used to purify and/or isolate the inventive glycopeptides. In particular, the glycopeptides can be purified by using for example, but without being limited to said methods, centrifugations, ultrafiltrations, concentration steps, liquid chromatography on exclusion or affinity columns, reverse phase chromatography or cation or anion exchange
25 chromatography, electrophoresis or a combination of said techniques. In particular, the antibodies specific of the glycopeptides according to the invention such as J28 and 16D10 can be used for an affinity purification. An example of a purification protocol is described in Experiment 7. Thus, the invention relates to a method of preparation of a glycopeptide according to the invention comprising collecting the urine of a subject and purifying said
30 glycopeptide from the urine.

The invention more particularly relates to glycopeptides according to the invention which are purified and/or isolated from the urine of a patient who may be or who is suffering from a pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer. As described
35 hereinbelow, said purified glycopeptides can be used for preventive or therapeutic treatment by immunotherapy. For instance, they can be used to prepare a pharmaceutical and/or vaccine composition.

8

The inventive glycopeptides can be recombinant and prepared as follows.

A suitable conventional host cell line like CHO-K1 is transfected with a plasmid comprising the complementary DNA of the desired transferase or by plasmids comprising the complementary DNAs of the desired transferases, for example the glycosyltransferase Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase 3 (FUT3), fucosyltransferase 7 (FUT7) or α (1-3)galactosyltransferase (GT), by using lipofectamine for example.

The resulting cell line is transfected with a plasmid enabling the expression and preferably the secretion of the recombinant peptides, for example a pSecTag plasmid containing the cDNA coding for an inventive glycopeptide, for example the C-terminal domain of BSDL or FAPP. SEQ ID Nos 6, 8, 10 and 12 are examples of sequences coding for a glycopeptide according to the invention.

The recombinant glycopeptide obtained by culturing the cell line containing the desired cDNAs is then advantageously purified for example on a polyacrylamide gel or by liquid and/or affinity chromatography and if desired it is analyzed by SDS-PAGE for identification.

Of course it is possible to transfer the genes required to prepare the inventive glycopeptides into the host cell by any other suitable method.

In preferred conditions of implementation of the aforementioned method, a suitable cell line like CHO-K1 is transfected with a plasmid comprising the complementary DNA of glycosyltransferase Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase 3 (FUT3), and a glycopeptide according to the invention, for example the C-terminal polypeptide domain of FAPP or in particular of BSDL, preferably in that order.

In an advantageous manner, the CHO cell line and in particular the CHO-K1 cell line is used as host cell.

In an advantageous manner, the plasmids pSecTag, pcDNA-3 or pBK-CMV are used as plasmid.

More generally, the invention also has as object a method of preparation of a glycopeptide such as described hereinabove, characterized in that one transfers into a conventional host cell comprising an enzymatic machinery necessary for priming a glycosylation, a gene coding for the polypeptide according to the invention and at least one gene coding for one or more enzymes selected from glycosyltransferases, in conditions enabling the expression and optionally the secretion of the desired glycopeptide, and one isolates the expected glycopeptide.

The glycopeptides according to the invention, and in particular the natural

or derivative glycopeptides of FAPP or BSDL, can be prepared from proteins isolated from biological fluids or tissues of any human or animal origin whatsoever, particularly sera, urine, pancreatic juices, milk secretions, tissue or cell homogenates, and the like, by chromatographic methods such as described by Lombardo et al. 1978, *Biochim. Biophys. Acta*, 527: 142-149, or by Abouakil et al. 1988, *Biochim. Biophys. Acta*, 961: 299-308, or by Wang & Johnson, 1983, *Anal. Biochem.*, 133: 457-461 or else by Blackberg & Hernell, 1981, *Eur. J. Biochem.* 116: 221-225. The homogeneous proteins are then hydrolyzed either by enzymatic methods involving any enzyme particularly proteolytic, or by chemical methods.

10 The natural glycopeptides can be isolated by chromatographic methods (gel filtration, affinity and immunoaffinity, ion exchange, etc.) as described in particular in Mas et al. 1997, *Glycobiology*, 7: 745-752, or Wang et al. 1995, *Biochemistry*, 34: 10639-10644, or by any other method.

15 Said glycopeptides can also be purified, isolated either directly from biological fluids or tissues as indicated earlier or subsequent to the aforementioned enzymatic or chemical treatments of said biological fluids or tissues.

20 The glycosylation of said natural glycopeptides of BSDL or FAPP can be modified by any chemical or enzymatic routes (use of native, soluble recombinant, membranar in particular, of glycosidases or glycosyltransferases) in order to obtain the glycan structures hereinbelow used in particular for the diagnosis of the pathologies indicated hereinabove and hereinbelow or for vaccination against said pathologies, or for obtaining or producing antibodies which are the object of the invention.

In addition, it is possible to modify the peptide sequence of the natural or recombinant glycopeptides of the invention.

25 The natural and particularly recombinant, isolated or purified glycopeptides which are object of the invention have very interesting properties. In particular, they exhibit remarkable immunogenic properties, specific of pancreatic pathologies.

Said properties are illustrated hereinbelow in the experimental section. They justify the use of the aforementioned glycopeptides as medicament.

30 This is why the invention also has as object the aforementioned glycopeptides, for the use thereof in a method of therapeutic treatment of the human or animal body, that is to say, as medicament.

35 The medicaments according to the invention can be used for example in immunotherapy (immunization, vaccination) preventive and/or curative treatment of pancreatic cancer, breast cancer, for cell-based immunotherapy : autologous vaccination by activation of the patient's immune system (dendritic or other cells, etc.), for the

10

diagnosis of certain pathologies such as type I diabetes by detection of circulating antibodies directed against said structures in patients afflicted with a diabetic pathology and more generally with any other pathology requiring the use of one or more of said glycopeptides.

5 They can also be used in other biological systems such as inflammation, the formation of metastases and the inhibition of invasion by pathogens.

Thus, the invention relates to a pharmaceutical or vaccine composition comprising a glycopeptide according to the invention. In particular, the invention relates to a pharmaceutical or vaccine composition comprising a glycopeptide comprising 1 to 40
10 repetitions of the peptide sequence described in SEQ ID No 14 and glycosylated by one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which has α (1-3) fucosyltransferase activity. Optionally, said glycopeptide is glycosylated by the enzymes
15 C2GnT and FUT3. Optionally, said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT7. Optionally, said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT, FUT3 and FUT7. Preferably, said glycopeptide is further glycosylated by α (1-3)galactosyltransferase (GT). In a preferred embodiment, said glycopeptide comprises between 1 and 15 of said repetitions. Said glycopeptide can be recombinant or purified
20 from a biological fluid. Preferably, said biological fluid is urine, in particular urine from a subject suffering from a pancreatic pathology, particularly pancreatic cancer. In a particular embodiment, said glycopeptide is loaded on antigen-presenting cells, preferably dendritic cells.

The invention also relates to the use of a glycopeptide or a pharmaceutical
25 or vaccine composition according to the invention as medicament. In particular, the invention relates to the use of a glycopeptide or a pharmaceutical or vaccine composition according to the invention for preparing a medicament intended for the preventive or curative treatment of a disease selected in the group consisting of a cancer, an inflammatory disorder, a vascular pathology or an infection by a pathogen. Preferably, the
30 disease is a breast or pancreas cancer. In a preferred embodiment, the invention relates to the use of a glycopeptide or a pharmaceutical or vaccine composition according to the invention for preparing a medicament intended for the treatment or prevention of a pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer. In a preferred embodiment, the glycopeptide is obtained by purification from the urine of a subject suffering from a
35 pancreatic pathology, preferably pancreatic cancer.

Within an adjuvant formulation, the immunogen, in this case a glycopeptide

according to the invention, can be included in particular in a water-in-oil emulsion, by using ISA 51 for example.

A vaccine preparation containing the immunogenic glycopeptide can be administered in a suitable pharmaceutical formulation to induce an immune response of the systemic type by the intramuscular (im), subcutaneous (sc), intradermal (id) route or of the mucosal type by the intranasal, oral, vaginal or rectal route.

A vaccine preparation containing the immunogenic glycopeptide can also contain other immunogens.

A systemic pharmaceutical preparation, administered by the sc, im, id route, can be a water-in-oil emulsion containing the immunogenic glycopeptide, or an immunogen-embedded calcium phosphate suspension, or aluminium hydroxide adsorbing the immunogen.

The vaccine preparations can be formulated for the intranasal route in the form of a gel with carbopol as excipient, nose drops or spray and for the oral route in the form of gastroresistant capsules, gastroresistant granules or sugar coated tablets.

The usual dose, which varies according to the subject and the causal pathology, can be for example from 1 to 100 mg of a glycopeptide according to the invention, in particular of the glycopeptide described in example 4 hereinbelow, administered by the systemic route in humans, every two weeks for 10 to 20 weeks.

The invention also has as object pharmaceutical compositions which contain at least one aforementioned glycopeptide, as active ingredient.

In said compositions, the active ingredient is advantageously present at physiologically effective doses; in particular the aforementioned compositions contain an effective vaccine dose of at least one aforementioned active ingredient.

As medicaments, the glycopeptides described hereinabove can be incorporated in pharmaceutical compositions intended for the digestive or parenteral route.

For example, said pharmaceutical compositions can be solids or liquids and be supplied as pharmaceutical formulations commonly used in human medicine, such as for example simple or sugar-coated tablets, capsules, granules, caramels, suppositories, particularly injectable preparations; they are prepared by the usual methods. The active ingredient(s) can be formulated therein with excipients usually employed in said pharmaceutical compositions, such as talc, gum arabic, lactose, starch, magnesium stearate, cocoa butter, vehicles which are aqueous or not, animal or vegetable fats, paraffin derivatives, glycols, various wetting agents, dispersives or emulsifiers, preservatives.

The invention also has as object a method of preparation of a composition

12

such as described hereinabove, characterized in that the active ingredient(s) are mixed with acceptable excipients, particularly pharmaceutically acceptable, according to established methods.

5 The invention further has as object the use of a glycopeptide such as described hereinabove, for preparing a medicament intended for the curative or preventive treatment of pancreatic cancer or breast cancer or other pathologies such as a vascular pathology or angiogenesis.

10 The invention further relates to a method of preventive or curative treatment of a disease selected in the group consisting of a cancer, an inflammatory disorder, a vascular pathology or an infection by a pathogen in a subject, comprising administering an effective dose of a glycopeptide according to the invention.

15 In a preferred embodiment of cancer treatment, in particular prostate cancer, the glycopeptide can be loaded on an allogeneic antigen-presenting cell. Preferably, the antigen-presenting cell is a dendritic cell. In a preferred manner, the antigen-presenting cell is autologous, that is, it has previously been removed from the recipient subject or it is derived from stem cells originating from the recipient subject. In an alternative, the antigen-presenting cell originates from a sample taken from an allogeneic subject, that is to say, compatible with the recipient. Thus, in this embodiment, the pharmaceutical or vaccine composition according to the invention comprises antigen-
20 presenting cells loaded or "pulsed" with a glycopeptide according to the invention. The invention therefore relates to the use of a pharmaceutical or vaccine composition comprising antigen-presenting cells loaded or "pulsed" with a glycopeptide according to the invention as medicament, in particular as medicament for the treatment or prevention of breast or pancreatic cancer, preferably pancreatic cancer. In a preferred embodiment,
25 the glycopeptide is obtained by purification from the urine of a subject suffering from a pancreatic pathology, preferably pancreatic cancer. In a most desirable embodiment, the glycopeptide is obtained by purification from the urine of a treated subject. Preferably, the subject is human. The invention also relates to a method of curative or preventive treatment of a pancreatic pathology, preferably pancreatic cancer, or breast cancer,
30 comprising : providing the glycopeptides according to the invention; and administering said glycopeptides, optionally loaded on antigen-presenting cells, said administration allowing to treat, attenuate or prevent a pancreatic pathology, preferably pancreatic cancer, or breast cancer. In a preferred embodiment, the treated disease is pancreatic cancer. Said glycopeptides can be recombinant or isolated from a biological sample,
35 preferably a biological fluid. In a preferred embodiment, said glycopeptides are isolated and/or purified from the urine of a subject suffering from a pancreatic pathology,

13

preferably pancreatic cancer, or breast cancer. Preferably, said glycopeptides are isolated and/or purified from the urine of a treated subject. Thus, the step of providing the glycopeptides can comprise the collection of the biological fluid, preferably urine, and the purification of said glycopeptides.

5 The properties of the glycopeptides described hereinabove also justify their use in diagnosis, particularly in immunoenzymatic methods.

 This is why the invention also has as object a composition for the diagnosis *in vitro* of the presence of an antibody directed against a glycopeptide described hereinabove, in a human biological sample, characterized in that it contains at least one
10 glycopeptide such as described hereinabove.

 The invention also has as object a method for the detection *in vitro* of the presence of induced antibodies in a human subject suffering from an aforementioned pathology, in a human biological sample such as serum and, more particularly, for the diagnosis *in vitro* of pancreatic cancer or a diabetic pathology and originating from the
15 person who is the object of the diagnosis, characterized in that said biological sample is contacted with an antigen recognized by an induced antibody in the patient such as defined hereinabove or hereinbelow, in conditions allowing the formation of an immunological complex between said antigen and said antibody and in that the immunological complex possibly formed between said antibody and antigen is detected.

20 The invention also has as object the necessary materials or kit for the detection of induced antibodies in a human subject suffering from an aforementioned pathology, in a biological sample, particularly a possible carrier of said antibodies, characterized in that it comprises :

- at least one glycopeptide such as described hereinabove
- 25 - means for detecting the immunological complex resulting from the immunological reaction between the antigen and said biological sample.

 The glycopeptides, particularly recombinant, isolated or purified which are the object of the invention can also be used in the diagnosis of certain pathologies such as type I diabetes by detection of circulating antibodies directed against these structures
30 in patients with such diabetic pathology.

 In particular, the glycopeptides named C2-F7-16R are used for the diagnosis of type I diabetes.

 As the glycopeptides, particularly recombinant, isolated or purified which are the object of the invention possess very interesting antigenic properties, they also
35 enable the production of antibodies particularly monoclonal.

 Hence the application also has as object an antibody particularly

monoclonal giving rise to a specific immunological reaction with a glycopeptide such as described hereinabove, with the exception of antibody J28 and any other antibody meeting the hereinabove definition and which can be described in the literature. The monoclonal antibodies can be from any class, in particular IgM, IgD, IgE or IgA.

5 Preferably, the monoclonal antibodies are IgG. An antibody according to the invention can be modified, regardless of the initial class thereof, to an antibody from another immunoglobulin class, for example by known molecular biology methods (Lewis et al., 1992, *Hum. Antibodies Hybridomas*, 3: 146-52; Lewis et al., 1993, *J. Immunol.*, 151: 2829-38; Hall et al., 1994, *Cancer Res.*, 54: 5178-85; Shepherd & Dean, *Monoclonal Antibodies*,

10 Oxford University Press, 2000, 479 pages). These same monoclonal antibodies can be humanized by genetic recombination or by any other method in order to conserve their recognition site for said recombinant or natural glycopeptides so as to use them in the conditions indicated earlier.

In particular an antibody obtained by immunization of a mammal with the aid of a glycopeptide such as described hereinabove, is chosen.

15

More particularly, the invention relates to the antibodies described in the examples and in particular the 16D10 antibodies of the IgM type which can be produced by the hybridoma deposited with the Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) in Paris on 16 March 2004 under the number I-3188 and 8H8 of the IgG type.

20 Preferably, the invention relates to a monoclonal antibody selected in the group consisting of the monoclonal antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, and an antibody which essentially binds to the same epitope as monoclonal antibody 16D10. Optionally, said antibody is humanized, chimeric or human. Preferably, the antibody is of the IgG type. Optionally, the antibody is a single chain antibody.

25 An antibody fragment or derivative is understood to mean an entity conserving substantially the same specificity as the antibody in question. A fragment thereof can be a Fab, Fab', F(ab)2 and sFv fragment (Blazar et al., 1997, *Journal of Immunology* 159: 5821-5833 and Bird et al., 1988, *Science* 242: 423-426). Fv, Fab, or F(ab)2 fragments according to the invention can be obtained by classical enzymatic digestion methods. A derivative thereof can be a chimeric, humanized or single chain scFv antibody. Said derivatives can be obtained by classical genetic engineering methods. Polynucleotides coding for variable regions of antibody 16D10 can be obtained for example by cloning said variable regions from a 16D10-antibody-producing hybridoma cDNA library. They can also be totally or partially prepared by nucleic acid synthesis,

30 based on the nucleotide sequences of said variable regions. For example polynucleotides coding for the CDRs of 16D10 can be synthesized, and incorporated into suitable regions

35

15

of an other antibody, in particular an antibody of human origin and/or of the IgG type, by known techniques of CDR grafting, such as those described by Routledge et al. ("Reshaping antibodies for therapy", in Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man, 13-44, Academic Titles, Nottingham, England (1993]) or by Roguska et al., 1996, Protein Engineering, 9 (10): 895-904.

The invention also has as object any nucleic acid molecule coding for a protein comprising the CDRs of antibody 16D10, and any recombinant vector, in particular any expression vector, comprising said nucleic acid molecule, any host cell comprising said nucleic acid or said vector.

The invention also has as object a method of preparation of an anti-glycopeptide antibody such as described hereinabove, characterized in that a mammal is immunized with the aid of said glycopeptide or with the aid of a mixture of FAPP and BSDL isolated from any human or animal biological tissue or fluid and in particular normal and pathological human pancreatic juices and the expected antibodies recognizing the C-terminal domain of said proteins are then recovered and purified if so desired.

The application equally has as object a method of preparation of an anti-glycopeptide antibody such as described hereinabove characterized in that one clones B lymphocytes originating from a subject immunized with the aid of a natural or recombinant glycopeptide such as described hereinabove or with the aid of a mixture of FAPP and BSDL such as described hereinabove and transformed by Epstein-Barr virus (EBV), then recovers the expected antibodies secreted by said transformed B lymphocytes.

In particular, the monoclonal antibodies object of the invention can give rise to a specific immunological reaction with a glycopeptide such as described hereinabove.

In a particular embodiment of the invention, the antibody essentially binds to the same epitope as the monoclonal antibody 16D10 or J28 (respectively produced by hybridoma 16D10 or J28). Preferably, said antibody is a monoclonal antibody. Preferably, the invention relates to the monoclonal antibody 16D10 (produced by hybridoma 16D10), but it shall be understood that the invention also relates to monoclonal antibodies which can specifically compete with antibody 16D10. Likewise, in a particular embodiment, the monoclonal antibodies according to the invention can specifically compete with antibody J28.

The term "essentially binds to the same epitope or determinant as" an antibody of interest means that the antibody "competes" with said antibody of interest. The term "essentially binds to the same epitope or determinant as" an antibody of interest does not mean that the two antibodies have exactly the same epitope. However, in a particular embodiment, the two antibodies can have the same epitope. The term

16

“essentially binds to the same epitope or determinant as” monoclonal antibody 16D10 means that the antibody “competes” with antibody 16D10. Generally, an antibody which “essentially binds to the same epitope or determinant as” an antibody of interest (eg., antibody 16D10) means that the antibody “competes” with said antibody of interest for a glycopeptide according to the invention, in particular one or more proteins selected from BSDL or FAPP or a fragment thereof, preferably a C-terminal part of BSDL or FAPP as described herein, even more preferably a part comprising one or more repetitions of 11 amino acids of BSDL or FAPP, or a part or fragment of same. In other examples, an antibody essentially binds to the same epitope or determinant of BSDL or FAPP when the antibody “competes” with the antibody of interest for binding to BSDL or FAPP.

The term “essentially binds to the same epitope or determinant as” an antibody of interest means that the antibody “competes” with said antibody of interest for any BSDL and/or FAPP molecule to which said antibody of interest specifically binds. The term “essentially binds to the same epitope or determinant as” monoclonal antibody 16D10 means that the antibody “competes” with said monoclonal antibody 16D10 for any BSDL and/or FAPP molecule to which said monoclonal antibody 16D10 specifically binds. For example, an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as monoclonal antibodies 16D10 or J28 “competes” with said antibodies 16D10 or J28 for binding to BSDL or FAPP, respectively.

The identification of one or more antibodies which essentially bind(s) to the same epitope as the monoclonal antibodies described herein can be carried out by using any immunological screening method in which a competition between antibodies can be evaluated. Many assays are routinely carried out and are well known to those skilled in the art (see for example U.S. 5,660,827 granted 26 August 1997, which is specifically incorporated herein by reference). The determination of the epitope to which an antibody binds is not necessary to identify an antibody which binds, or which essentially binds, to the same epitope as the monoclonal antibody described herein.

For example, when the candidate antibodies to be studied have been obtained from different animal sources, or possibly have different Ig isotypes, a simple competition assay can be employed wherein the control antibody (antibody 16D10 for example) and the candidate antibody are mixed (or pre-adsorbed) and contacted with a sample containing either BSDL or FAPP, both known to bind to antibody 16D10. Protocols based on ELISA, radioimmunological assays, western blot analyses, or the use of a BIACORE analysis (as described, for example, in the Examples) are suitable for use in simple competition tests.

In particular embodiments, it is possible to first prepare mixtures of control

antibodies (for example, antibody 16D10) with variable amounts of candidate antibodies (for example, approximately 1:10 or approximately 1:100) before contacting with the BSDL or FAPP antigen sample. In another embodiment, the control antibody and the variable amounts of candidate antibodies can simply be mixed at the time of contact with the BSDL or FAPP antigen sample. So long as one can distinguish bound antibodies from free antibodies (for example, by using separation methods or by washing to remove unbound antibodies) and distinguish antibody 16D10 from the candidate antibodies (for example, by using secondary antibodies specific of the species or the isotype or by labelling antibody 16D10 with a detectable tag), it will be possible to determine if the candidate antibodies reduce the binding of antibody 16D10 to the BSDL or FAPP antigen, thereby indicating whether the candidate antibody essentially recognizes the same epitope as antibody 16D10. The binding of the control antibody in the presence of a completely irrelevant antibody can serve as an upper control value. The lower control value can be obtained by incubating the labelled control antibody (16D10) with unlabelled antibodies recognizing exactly the same epitope (16D10), in this way inducing a competition which reduces the binding of the labelled antibody. In one test, a significant reduction in the reactivity of a labelled antibody in the presence of a candidate antibody indicates that the candidate antibody essentially recognizes the same epitope, that is to say, it cross-reacts with the labelled antibody (16D10). Any candidate antibody which reduces the binding of antibody 16D10 to each of the antigens BSDL or FAPP by at least approximately 20%, 30%, 40%, 50%, preferably by at least about 60%, or even more preferably by at least about 70% (for example, 65-100%), at a ratio of 16D10 antibody to candidate antibody of between about 1:10 and about 1:100, is considered to be an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as antibody 16D10. Preferably, said candidate antibodies reduce the binding of antibody 16D10 to the BSDL or FAPP antigen by at least about 90% (for example, about 95%). Preferably, antibody 16D10 also reduces the binding of the candidate antibody to the BSDL or FAPP antigen when the binding is evaluated in the same way, although the degree of reduction in binding may be different.

The competition can be evaluated by a flow cytometry assay for example. In such assay, cells carrying a BSDL or FAPP antigen, for example cells transfected with BSDL or FAPP, are first incubated with antibody 16D10, for example, then with the candidate antibody labelled with a fluorochrome or with biotin. The antibody is considered to compete with antibody 16D10 if the binding observed after preincubation with a saturating amount of 16D10 is about 30%, preferably about 40% about 50%, about 80%, or more (for example, about 90%) of the binding observed (as measured by fluorescence) with the antibody without preincubation with 16D10. Alternatively, an antibody is

18

considered to compete with antibody 16D10 when the binding observed with labelled 16D10 antibody (labelled with a fluorochrome or biotin) in cells preincubated with a saturating amount of the candidate antibody is about 80%, preferably about 50%, about 40%, about 30%, or less (for example, about 20%) of the binding observed without
5 preincubation with the antibody.

In an advantageous manner, a simple competition assay in which a candidate antibody is preadsorbed and applied at a saturating concentration on a surface on which a BSDL or FAPP antigen has been immobilized can also be used. The surface in the simple competition assay is preferably a BIACORE chip (or another support
10 compatible with surface plasmon resonance analysis). The control antibody (for example, 16D10) is then contacted with a surface at a saturating concentration of BSDL or FAPP and binding of the control antibody to the surface carrying BSDL or FAPP is measured. Said binding of the control antibody is compared with the binding of the control antibody to the surface carrying BSDL or FAPP in the absence of the candidate antibody. In an assay
15 test, a significant reduction in binding of the control antibody to the surface carrying BSDL or FAPP in the presence of the candidate antibody indicates that the candidate antibody essentially recognizes the same epitope as the control antibody in such a way that the candidate antibody cross-reacts with the control antibody. Any candidate antibody which reduces the binding of the control antibody (such as antibody 16D10) to the BSDL or
20 FAPP antigen by at least about 30% or preferably about 40% can be considered an antibody which essentially binds to the same epitope as the control antibody (for example, 16D10). Preferably, said candidate antibody reduces the binding of the control antibody (for example, 16D10) to the BSDL or FAPP antigen by at least about 50% (for example, at least about 60%, at least about 70%, or more). It shall be understood that the order
25 between the control and candidate antibodies can be reversed, that is to say, that the control antibody can be the first to bind to the surface and that the candidate antibody is subsequently contacted with the surface in a competition test. Preferably, the antibody displaying the highest affinity for BSDL or FAPP is bound to the surface carrying BSDL or FAPP first, since it is hoped that the reduction in binding observed with the second
30 antibody (presuming that the antibodies cross-react) will be of greater amplitude. Other examples of such tests are described in the examples and in Saunal and Regenmortel, (1995, J. Immunol. Methods 183: 33-41, the content thereof being incorporated herein by reference).

Said properties are illustrated in the experimental section which follows.
35 They justify the use of the monoclonal antibodies described hereinabove and in particular of the monoclonal antibodies 8H8, 16D10, 14H10 and other monoclonal antibodies

directed against the C-terminal part of BSDL or FAPP, for the diagnosis, prognosis and/or prediction of several pancreatic pathologies including pancreatic cancer, pancreatitis and type I diabetes, but also breast cancer or cardiovascular diseases. The diagnostic information can be obtained from serum and/or urine assays.

5 The antibody 16D10 has particularly interesting properties. In fact, it is specific of pancreatic cancer. It recognizes neither normal tissues nor other types of tumor tissues. The epitope recognized by antibody 16D10 is different from that recognized by antibody J28 because these two antibodies do not compete. These results are described in example 4.

10 Thus, the invention relates to a method enabling the detection, preferably *in vitro*, of a pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer, comprising contacting a biological sample with an antibody according to the invention and detecting the formation of immunological complexes resulting from the immunological reaction between said antibody and said biological sample. Preferably, the antibody is the antibody 16D10, a
15 fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. Preferably, the biological sample is a sample of pancreatic tissue (biopsy) or a biological fluid. The biological sample can be a tissue slice (immunohistochemistry) or cells contained in the sample or derived by culturing the sample (immunocytochemistry). The biological fluid can be selected in the group
20 consisting of serum, urine, pancreatic juices and milk. Preferably, the biological fluid is urine. The complex can be detected directly by labelling the antibody according to the invention or indirectly by adding a molecule which reveals the presence of the antibody according to the invention (secondary antibody, streptavidin/biotin tag, etc.). For example, labelling can be accomplished by coupling the antibody with radioactive or fluorescent
25 tags. These methods are well known to those skilled in the art.

 The invention also relates to the use of an antibody according to the invention for preparing a diagnostic composition that can be used for detecting a pancreatic pathology *in vivo* or *in vitro*. Preferably, the antibody is the antibody 16D10, a
30 fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. Preferably, the pancreatic pathology is pancreatic cancer.

 In a preferred embodiment, the invention relates to a method enabling the detection of a pancreatic pathology in a subject, in particular pancreatic cancer, comprising recovering the urine of the subject, contacting said urine with an antibody according to the invention, and detecting the formation of immunological complexes
35 resulting from the immunological reaction between said antibody and said urine. Preferably, the antibody is the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an

20

antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. The antibody can also be the antibody J28, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. Preferably, the pancreatic pathology is pancreatic cancer. The complex can be detected directly by
5 labelling the antibody according to the invention or indirectly by adding a molecule which reveals the presence of the antibody according to the invention (secondary antibody, streptavidin/biotin tag, etc.). These methods are well known to those skilled in the art. Optionally, the method can comprise intermediate steps of treating the urine sample before incubation with said antibody. For example, said steps can comprise concentration
10 of the urine, steps of glycopeptide enrichment or purification, and the like.

The invention also relates to the use of an antibody according to the invention for the diagnosis of a pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer in a subject. Preferably, the antibody is antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.
15 The antibody can also be antibody J28 a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.

The invention relates to a diagnostic kit for a pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer, comprising an antibody according to the invention. Said kit can additionally comprise means by which to detect the immunological complex resulting
20 from the immunological reaction between the biological sample and said antibody, in particular reagents enabling the detection of said antibody. In a particular embodiment, the kit comprises the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.

These properties justify the use of the monoclonal antibodies described
25 hereinabove for developing new therapeutic protocols for cancer of the exocrine pancreas such as targeting tumor cells with said antibodies coupled with drugs (chemotherapy) or radioactive elements (radiotherapy and radiodiagnosis) or else with genes modifying the outcome or behavior of the neoplastic cells (gene therapy).

The antibodies coupled with radioactive elements can be used in
30 radiolocalization (immunoscintigraphy) of primary tumors and metastases (secondary tumors).

Said diagnostic information can be acquired in serum and/or urine assays.

In particular, the invention relates to antibodies according to the invention, in particular monoclonal, coupled with an antitumoral active substance, which can be used
35 in the treatment of pancreatic cancer to target and destroy pancreatic tumor cells.

Similarly, radioactive elements (or others) can be coupled with said

antibodies and allow a precise localization of primary tumors and metastases. Said antibodies can also make it possible to clearly and accurately differentiate normal tissue from tumor tissue.

5 These same properties justify the use of said monoclonal antibodies alone, combined or coupled with a diagnostic or therapeutic molecule to develop new passive immunotherapy protocols for the aforementioned pathologies.

10 Thus the invention also has as object a composition for the *in vitro* diagnosis of a pathology such as described hereinabove, in a human biological sample, characterized in that it contains at least one monoclonal antibody such as described hereinabove, in particular coupled with at least one radioactive element. Depending on the nature of the radioactive element, said composition can be used curatively to irradiate a region of the pancreas.

As a diagnostic composition, the aforementioned antibodies can be mixed with acceptable excipients.

15 The invention also has as object a kit for detecting the presence of a glycopeptide such as described hereinabove appearing in a human subject afflicted with a diabetic or neoplastic pathology in a human biological sample originating from the individual to be diagnosed, characterized in that it comprises :

- at least one antibody such as described hereinabove,
- 20 - means for detecting the immunological complex resulting from the immunological reaction between the antibody and the biological sample.

The preferred conditions of employing the glycopeptides and antibodies described hereinabove also apply to the other objects of the invention mentioned earlier, in particular to the diagnostic methods.

25 The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising an antibody according to the invention. Preferably, the antibody is the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. The antibody can also be the antibody J28, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. The composition can also comprise a pharmaceutically acceptable support. In a particular embodiment, said antibody is coupled with an antitumoral substance.

30 The invention further relates to the use of an antibody according to the invention or of a pharmaceutical composition comprising such antibody as medicament. In particular, the invention relates to the use of an antibody according to the invention or of a pharmaceutical composition comprising such antibody for preparing a medicament

intended for the preventive or curative treatment of a pancreatic pathology, preferably pancreatic cancer, or breast cancer. Preferably, the antibody is the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. The antibody can also be the antibody J28, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. In a particular embodiment, said antibody is coupled with an antitumoral substance.

The invention relates to a method of preventive or curative treatment of a subject suffering from a pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer, or breast cancer, comprising administering to said subject an effective amount of an antibody according to the invention, said administration resulting in a decrease or disappearance of the pancreatic pathology, in particular pancreatic cancer, or breast cancer, in the subject. Preferably, the antibody is the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. The antibody can also be the antibody J28, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former. In a particular embodiment, said antibody is coupled with an antitumoral substance.

In another protocol the usual dose, which varies according to the subject being treated and the causal disease, can be for example from 1 to 10 mg of the monoclonal antibody described in example 18 hereinbelow per kilogram of body weight administered systemically in humans, once a week for two weeks.

The invention is also directed at providing new products (glycopeptides, antibodies, etc.) as well as other better, more effective or purer products than those described in the prior art.

The invention is illustrated in the following examples.

Legends of figures

Figure 1. Study comparing the reactivity of mAbJ28 and mAb16D10 in two pancreatic tumor tissues (PDAC = ADK1 and PDAC4 = ADK4).

Figure 2. Competition test between antibodies mAbJ28 and mAb16D10 for glycopeptide J28.

Figure 3. Competition test between antibodies mAbJ28 and mAb16D10 in SOJ-6 cells.

Figure 4. Comparative immunodetection analysis in urine from healthy subjects (samples 29 to 36) and subjects with pancreatic cancer (samples 1 to 5) with the aid of polyclonal antibody pAbL64, monoclonal antibody mAb8H8 and monoclonal

23

antibody mAbJ28. Urine proteins were separated on a 10% polyacrylamide gel then electrotransferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with pAbL64, mAb8H8 or mAbJ28. The left lanes (Std) correspond to the molecular weight markers.

5

EXAMPLES

Preparation of recombinant glycopeptides

Recombinant glycopeptides of BSDL (SEQ ID No 9) and FAPP (SEQ ID No 13), were expressed in different strains derived from the well-known cell line CHO-K1, a Chinese hamster ovarian tumor cell line with fibroblast morphology, which can be obtained in particular from the *American Type Culture Collection* ATCC under the number CRL61 (Buck et al., 1958, J. Exp. Med., 108: 945-955).

The CHO-K1 cell line was chosen because it does not show detectable C2GnT glycosyltransferase, $\alpha(1-2)$ fucosyltransferase, $\alpha(1-3)$ fucosyltransferase, $\alpha(1-4)$ fucosyltransferase or $\alpha(1-3)$ galactosyltransferase activity in standard assay conditions.

Preparation of plasmids (cloned cDNA)

The cloned cDNAs enabling the expression of the different glycopeptide components were obtained by reverse transcription, carried out with a polydT polynucleotide probe (18 bases) hybridizing with the polyA tail of messenger RNA extracted from tissue samples of healthy human pancreas or the human pancreatic tumor cell line such as for example the cell line SOJ-6 [Fujii et al., 1990, Hum. Cell., 3: 31-36] originating from a human pancreatic adenocarcinoma, according to the method described by Chirgwin et al. [1979, Biochemistry, 18: 5294-5299].

Preparation 1 : Plasmid pSec-FAPP

The amplification of cDNA coding for fetoacinar pancreatic protein (FAPP) (SEQ ID No 10) was reverse transcribed from 5 μ g of total RNA extracted from the human pancreatic tumor line SOJ-6 mentioned earlier (45 minutes at 55°C, reverse transcription kit, Sigma, St Louis, MO, USA) and followed by a PCR using the nucleotide primers C-ter/FAPP-BSDL and N-ter/FAPP, defined from the cDNA sequence coding for human BSDL (SEQ ID No 6) in the conditions described hereinbelow. The polymerase chain reaction was carried out with an "Advantage-GC cDNA PCR" kit (Clontech) enabling amplification of nucleotide sequences particularly rich in guanine and cytosine. The following program was employed : one cycle of 2 minutes at 94°C followed by 35 cycles of

24

1 minute at 94°C (denaturation), 1 minute at 52°C (primer annealing), and 4 minutes at 68°C (extension), followed by one cycle of 10 minutes at 68°C, in a Robocycler Gradient 96 thermocycler (Stratagene).

The primers had the following sequences :

5 N-ter/FAPP (SEQ ID No 1) :

5'- TTCGTaagcttGCGAAGCTGGGCGCCGTGTACAGAA-3';

C-ter/FAPP-BSDL (SEQ ID No 2) :

5'-TTTCGTgaattcACGCTAAAACCTAATGACTGCAGGCATCTG-3'.

The C-ter/FAPP-BSDL primer (SEQ ID No 2) which was used comprises a
10 termination codon so as to eliminate translation of the c-myc epitope as well as that of the
6x-histidine tag carried by the commercial vector.

The cDNA (nucleotides 1 to 2169) amplified in this manner (SEQ ID No 12)
does not comprise a signal peptide.

The resulting cDNA was then cloned into plasmid pSec-Tag (Invitrogen,
15 Leek, the Netherlands).

Preparation 2 : Plasmid pSec-16R

The cDNA coding for the C-terminal part of BSDL (from nucleotide 1089 :
Phe364 to nucleotide 2169 : stop codon; SEQ ID Nos 8 and 9) from RNA extracted from
20 normal pancreas was amplified by PCR using the primers C-ter/FAPP-BSDL (primer SEQ
ID No 2, see Preparation 1) and N-ter-Ct.

The N-ter-Ct primer had the following sequence :

N-ter-Ct (SEQ ID No 3) :

5'- CGTCTAaagcttTTTGATGTCTACACCGAGTCC-3'.

25 The polymerase chain reaction was carried out in the conditions described
earlier (see Preparation 1).

The resulting cDNA was then cloned into plasmid pSec-Tag.

Preparation 3 : Plasmid pSec-6R

30 The cDNA coding for the C-terminal part of FAPP (from nucleotide 1089 :
Phe364 to nucleotide 1839 : stop codon; SEQ ID Nos 12 and 13) present in the plasmid
pSec-FAPP was amplified by PCR using nucleotide primers No 2 (C-ter/FAPP-BSDL) and
No 3 (N-ter-Ct) described hereinabove.

The polymerase chain reaction was carried out in the conditions described
35 in preparation 1.

The resulting cDNA was then cloned into plasmid pSec-Tag.

Preparation 4 : Plasmid pBK- α GT

The cDNA coding for α (1-3) galactosyltransferase (from nucleotide -10 to nucleotide +1122 : stop codon) from RNA extracted from mouse heart (Balb/c mice) was amplified by PCR using the primers Cter/ α Gal and Nter/ α Gal defined from the cDNA sequence coding for mouse α (1-3) galactosyltransferase. These primers had the following sequence :

Nter/ α Gal (SEQ ID No 4) : 5'-AAAAAgaattcGGAGAAAATAATGAAT-3'.

Cter/ α Gal (SEQ ID No 5) : 5'-AAAAAaggcccACAAAGTCAGACATTAT-3'.

The polymerase chain reaction was carried out with the "Taq PCR Master Mix" kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the following program : one cycle of 2 minutes at 94°C followed by 35 cycles of 1 minute at 94°C (denaturation), 1 minute at 54°C (primer annealing), and 2 minutes at 74°C (extension), then one cycle of 10 minutes at 74°C, in a Gene Amp PCR System 2400 thermocycler (Perkin Elmer).

The resulting cDNA was then cloned into plasmid pBK-CMV (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Preparation 5 : Plasmid pcDNA3-C2 β GnT-flag

The cDNA coding for glycosyltransferase Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase described by Panicot et al. in *Glycobiology*, 1999, 9: 935-946 was cloned into the vector pCDNA-3 which at its 3' end comprises a sequence encoding the flag epitope. Expression of the flag epitope allows detection of C2GnT expression in the transformed cells.

The following steps were common to the plasmid preparations :

a) Ligation

The different PCR products were analyzed on a 1% agarose gel, purified using the "GeneClean" kit (Bio 101), then subcloned into the shuttle vector pCR2.1 TOPO and sequenced (Euro Sequences Gènes Service, Paris, France) with the universal M13 and reverse M13 primers. The PCR products were then released from said shuttle vector by the action of the restriction enzymes *Hind*III and *Eco*RI and cloned into the eukaryote expression and secretion plasmid pSec-Tag to yield plasmids pSec-FAPP and pSec-16R (16R for C-terminal domain of BSDL) (SEQ ID No 8). The complementary DNA coding for the C-terminal part of FAPP, obtained by PCR, was directly cloned after purification and *Hind*III/*Eco*RI digestion into the pSec-Tag plasmid to yield plasmid pSec-6R (6R for C-

26

terminal of domain FAPP) (SEQ ID No 12). Sequencing was carried out with the universal T7 primer and the BGH reverse primer synthesized for this purpose by Euro Sequences Gènes Service.

5 The PCR product coding for $\alpha(1-3)$ galactosyltransferase was released with the restriction enzymes *EcoRI* and *ApaI*, purified, then directly ligated into the *EcoRI/ApaI* sites of the vector pBK-CMV to yield plasmid pBK- α GT.

b) Bacterial transformation

10 A 5 μ l aliquot of the ligation product was contacted with 50 μ l of competent bacterial cells (*Escherichia coli*, strain TOP10F⁺) according to the protocol described by Hanahan [Hanahan, 1983, J. Mol. Biol., 166: 557-580]. Two microliters of 0.5 M β -mercaptoethanol were added and the sample was kept on ice for 30 minutes, then heat-shocked at 42°C for 30 seconds, and immediately put back on ice. After 2 minutes, the sample was diluted in 450 μ l of SOC medium (Life Technologies). The bacterial
15 suspension was incubated for 1 hour at 37°C with shaking. The bacteria were then spread, using glass beads, on Petri dishes containing Luria-Bertagni agar supplemented with 50 μ g/ml ampicillin.

c) Plasmid purification

20 The bacterial colonies which appeared after 18 hours of culture on selective agar medium (50 μ g/ml ampicillin) were picked and inoculated in 2 ml of Luria-Bertagni liquid medium containing 50 μ g/ml ampicillin. The cultures were incubated for 8 hours at 37°C with shaking, then 1.5 ml of the bacterial suspension was centrifuged at 5,000 g for 5 minutes. The bacterial pellet was taken up in 100 μ l of bacterial membrane destabilizing
25 buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, Ribonuclease A 100 μ g/ml). The bacterial suspension was lysed by addition of 200 μ l of alkaline lysis buffer (200 mM NaOH, 1% SDS) and the pH of the preparation was neutralized with 150 μ l of 3 M potassium acetate pH 5.5. The alkaline lysis and neutralization steps require a 5-minute incubation on ice. Cell debris, denatured proteins and chromosomal DNA were eliminated by centrifugation
30 at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was then extracted with phenol-chloroform by 1:2 dilution in phenol/chloroform/ isoamyl alcohol (25/24/1 V/V/V) stabilized to pH 8 with 100 mM Tris-HCl. The aqueous and organic phases were separated by centrifugation at 10,000 g for 2 minutes at room temperature. The upper aqueous phase was recovered and diluted 1:3 in absolute ethanol (-20°C). Plasmid DNA was precipitated
35 by centrifugation at 12,000 g for 15 minutes at 4°C, then washed twice with 70% ethanol. Plasmid DNA was then resuspended in 20 μ l of ultra-pure water and stored at -20°C.

Preparation of cell clones

Preparation 6 : Cell clone CHO-C2 and general points regarding the obtaining of intermediate cell clones

5
10 A CHO-K1 cell line was transfected with plasmid pcDNA3-C2 β 6GnT-flag comprising the cDNA coding for the glycosyltransferase Core2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), which at its 3' end comprises a sequence coding for the flag epitope. Expression of the flag epitope allows detection of C2GnT expression in the transformed cells.

15 To this effect, CHO-K1 cells were grown in HAM-F12 medium. When the cells reached 60 to 80% confluence, the culture medium was removed, the cell surface washed three times with Opti-MEM medium then covered with 200 μ l of transfection solution diluted in Opti-MEM medium without fetal calf serum. The transfection solution contained the aforementioned plasmid and a lipofectamine liposome suspension (Life Technologies).

20 The cells were kept like this for 16 hours at which time the transfection supernatant was replaced with 2 ml of complete HAM-F12 medium containing a suitable selective antibiotic (neomycin, zeocin or hygromycin) for a period of at least four weeks. Clones resistant to the action of the antibiotic were isolated and then amplified.

The CHO-K1 cell clone selected in this manner with neomycin (250 μ g/ml) was named CHO-C2.

25 Said clone CHO-C2 was then transfected with plasmid pSec-16R as described below for preparation 7. The clone resulting from transformation of CHO-C2 cells with plasmid pSEC-16R was selected with zeocin (1 mg/ml) and named CHO-C2-16R.

30 CHO-K1 cells were also cotransfected with plasmid pCDM7-FUT3 coding for fucosyltransferase 3 described by Kukowska-Lallo et al. (1990, Genes Dev. 4: 1288-1303), and plasmid pMamNeo according to the method described hereinabove. The CHO-F3 clone resulting from transformation of CHO-K1 cells with plasmid pCDM7-FUT3 was selected on the one hand with neomycin (250 μ g/ml) and on the other hand for its high expression of sialyl Lewis x motifs. Said expression was detected by indirect immunofluorescence with the aid of the antibody CSLEX-1 (Becton-Dickinson). In this manner clone CHO-F3 was obtained.

35 Said clone CHO-F3 was then transfected with plasmid pSec-16R as described below for preparation 7. The clone resulting from transformation of CHO-F3

28

cells with plasmid pSec-16R and selection with zeocin (1 mg/ml) was named CHO-F3-16R.

5 CHO-K1 cells were also transfected with plasmid pCDM8-FUT7 coding for fucosyltransferase 7 described by Lowe et al. (1991, J. Biol. Chem. 266: 17467-17477) instead of plasmid pCDM7-FUT3, then with plasmid pSec16R. After selection with zeocin and neomycin in the conditions described earlier, the resulting clone was named CHO-F7-16R.

10 To prepare the intermediate clones expressing the C-terminal peptide of FAPP (6R), the aforementioned method was employed by transfecting the cell lines or cell clones CHO-K1, CHO-C2 and CHO-F3 with plasmid pSec-6R instead of plasmid pSec16R (see method described in preparation 7). However, only the glycosyltransferases C2GnT and fucosyltransferase 3 required to build the J28 glycosylated epitope were used during preparation of the cell lines.

15 Three intermediate cell clones CHO-6R, CHO-C2-6R and CHO-F3-6R were thus obtained after antibiotic selection in the conditions described hereinabove.

Preparation 7 : Cell clone CHO-16R

20 CHO-K1 cells were transfected with plasmid pSec-16R, which corresponds to plasmid pSec-Tag (Invitrogen, Leek, the Netherlands) into which the cDNA coding for the C-terminal domain of BSDL was cloned (see preparation 2). This was carried out as for the preparation of clone CHO-C2 in preparation 6.

25 The pSec-Tag plasmid carries a sequence coding for the V-J2C region of the mouse immunoglobulin κ light chain. Said sequence directs the protein encoded by the cDNA cloned in the plasmid to the secretory pathway of the eukaryotic cell in which it has been transfected.

The clone resulting from transformation of CHO-K1 cells with plasmid pSec-16R was named CHO-16R and was selected for expression of the corresponding (glyco)peptide [(glyco)peptide 16R].

30 Preparation 8 : Cell clone CHO-C2-F3-16R

Clone CHO-C2 from preparation 6 was transfected with plasmid pCDM7-FUT3 and with plasmid pLSVHg (R & D Systems) conferring hygromycin resistance, to yield cell clone CHO-C2-F3.

35 The CHO-C2-F3 cell line was transfected with plasmid pSec-16R as in preparation 7. The clone resulting from transformation of CHO-C2-F3 cells with plasmid pSec-16R was named CHO-C2-F3-16R.

29

CHO-C2-F3-16R expresses sialyl Lewis x motifs and shows reactivity towards antibody pAbL64.

Preparation 9 : Cell clone CHO-C2-F7-16R

5 This was obtained as in preparation 8, but by using plasmid pCDM8-FUT7 instead of plasmid pCDM7-FUT3.

The clone resulting from transformation of CHO-C2-F7 cells with plasmid pSec-16R was named CHO-C2-F7-16R and the corresponding cell line was deposited with the Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) in Paris on 16
10 March 2004 under the number I-3189.

The clones CHO-C2-F3-16R and CHO-C2-F7-16R from preparations 8 and 9 express sialyl Lewis x motifs and show reactivity towards antibody pAbL64.

Preparation 10 : Cell clone CHO-C2-F3-6R

15 Clone CHO-C2-F3 from preparation 8 was transfected with plasmid pSec-6R (see preparation 3) as described for preparations 6 and 7 to yield clone CHO-C2-F3-6R. This clone expresses a peptide bearing among others a glycosylated epitope recognized by monoclonal antibody J28.

20 Preparation 11 : Cell clone CHO-C2-F3-GT-6R

Clone CHO-C2-F3-6R from preparation 10 was transfected with plasmid pBK- α GT (see preparation 4) as described earlier to yield clone CHO-C2-F3-GT-6R bearing the glycosylated epitope recognized by monoclonal antibody J28 as well as the glycosylated epitope α Gal recognized by natural circulating antibodies in human blood.

25

Example 1 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL (CHO-16R)

30 The recombinant glycopeptide was produced by routine culture of cell clone CHO-16R (preparation 7) for 16 hours at 37°C in a humid, 5% CO₂ atmosphere in Opti-MEM medium (Invitrogen) containing 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 0.1% fungizone supplemented with suitable selective antibiotics. The cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/cm².

35 The culture medium was changed every 48 hours. When the cells reached confluence, they were washed in phosphate buffer (PBS) without CaCl₂ and without MgCl₂, then detached with trypsin/0.05% EDTA, sedimented by low speed centrifugation (400 g

30

for 3 min) and resuspended in 5 ml of culture medium.

Intracellular immunofluorescence and flow cytometry were used to check that the cell clones expressed the recombinant glycopeptide of interest.

5 The recombinant glycopeptide was purified by liquid chromatography followed by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE.

It could be seen on the gel that the secreted peptide resolved into two different molecular weight bands of approximately 78 kDa and 83kDa.

10 The 83 kDa band probably corresponds to the glycosylated peptide whereas the 78 kDa band would either be a non-glycosylated form or a form with less glycosylation.

It therefore appears that the aforementioned clone expressed a glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL.

15 Example 2 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL (CHO-C2-16R)

The method described in example 1 was employed, but by culturing the cell clone CHO-C2-16R (preparation 6).

20 The recombinant glycopeptide obtained was purified by liquid chromatography followed by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE.

It could be seen on the gel that the secreted peptide resolved into two different molecular weight bands of approximately 78 kDa and 83 kDa.

25 It therefore appears that the aforementioned clone expressed a glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL.

Example 3 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL (CHO-F3-16R)

30 The method described in example 1 was employed, but by culturing the cell clone CHO-F3-16R (preparation 6).

The recombinant glycopeptide obtained was purified by liquid chromatography followed by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE.

It could be seen on the gel that the secreted peptide resolved into two different molecular weight bands of approximately 78 kDa and 83 kDa.

35 It therefore appears that the aforementioned clone expressed a glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-

terminal end of BSDL.

Example 4 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL (CHO-C2-F3-16R)

5 The method described in example 1 was employed, but by culturing the cell clone CHO-C2-F3-16R (preparation 8).

 The recombinant glycopeptide obtained was purified by liquid chromatography followed by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE.

10 It could be seen on the gel that the secreted peptide resolved into two different molecular weight bands of approximately 78 kDa and 83 kDa.

 It therefore appears that the aforementioned clone expressed a glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL.

15 Example 5 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL (CHO-F7-16R)

 The method described in example 1 was employed, but by culturing the cell clone CHO-F7-16R (preparation 6).

20 The recombinant glycopeptide obtained was purified by liquid chromatography followed by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE.

 Only one band of molecular weight 83 kDa was seen on the gel.

Example 6 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL (CHO-C2-F7-16R)

25 The method described in example 1 was employed, but by culturing the cell clone CHO-C2-F7-16R (preparation 9).

 The recombinant glycopeptide obtained was purified by liquid chromatography followed by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE.

30 It could be seen on the gel that the secreted peptide resolved into two different molecular weight bands of approximately 78 kDa and 83 kDa.

 It therefore appears that the aforementioned clone expressed a glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL.

35 It therefore appears that all the aforementioned clones (16R) expressed glycopeptides having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL.

Examples 7 to 13 : Recombinant glycopeptides having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of FAPP

The recombinant polypeptides produced by clones CHO-K1 (control), CHO-6R (Ex 7), CHO-C2-6R (Ex 8), CHO-F3-6R (Ex 9), CHO-C2-F3-6R (Ex 10), CHO-GT-6R (Ex 11), CHO-C2-GT-6R (Ex 12) and CHO-C2-F3-GT-6R (Ex 13), were purified on a polyacrylamide gel or else by liquid and/or affinity chromatography and analyzed by immunodetection using antibody pAbL64 described by Abouakil et al., 1988, *Biochim. Biophys. Acta*, 961: 299-308, and mAbJ28. The mouse monoclonal antibody mAbJ28, specific of the fucosylated J28 glycopeptide derived from O-glycosylation of the oncofetal form of FAPP, is described by Panicot et al. in *Glycobiology*, 1999, 9: 935-946.

The anti-BSDL polyclonal antibody pAbL64 was obtained by immunizing rabbits after purifying the antigen from human pancreatic juices. Said antibody perfectly recognizes FAPP, the oncofetal form of BSDL.

The polyclonal antibody specific of the BSDL protein core, named anti-peptide, was obtained by immunizing rabbits with a synthetic peptide corresponding to the peptide sequence of BSDL comprised between the serine residue in position 346 and glutamine in position 370 coupled to hemocyanin.

Said two antibodies were purified on a protein A-Sepharose 4B column (Pharmacia). The anti-peptide was subjected to a second purification step by affinity chromatography on a column of keyhole limpet hemocyanin (KLH) coupled to Sepharose gel to eliminate anti-KLH antibodies.

The recombinant peptides produced by the different clones of the 6R type were loaded at 100 µg per lane on a 10% polyacrylamide gel, separated, then electrotransferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were then incubated in the presence of antibody pAbL64 on the one hand, and antibody mAbJ28 on the other hand, and developed.

In both cases, the antibodies employed bound specifically to polypeptides having a size of 50 kDa, corresponding to the expected size of the C-terminal glycopeptides of FAPP, except in the case of the non-transfected CHO-K1 cell line used as negative control.

Examples 14 to 19 : Anti-glycopeptide monoclonal antibodies

Recombinant anti-glycopeptide antibodies having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of FAPP were prepared as follows :

Stage A - Immunization of mice.

Six-week-old male Balb/c mice were immunized according to the following protocol :

- 5 Day 0 : Intraperitoneal injection of 25 µg of a mixture of FAPP and BSDL purified from normal and pathological human pancreatic juices (hereinbelow named BSDL-FAPP antigen) in a 50:50 emulsion (150 µl NaCl/150 µl complete Freund's adjuvant).
- Day 15 : Intraperitoneal challenge with 25 µg of BSDL-FAPP antigen in a 50:50 emulsion (150 µl NaCl/150 µl incomplete Freund's adjuvant).
- 10 - Day 30 : Intraperitoneal challenge with 25 µg of BSDL-FAPP antigen in a 50:50 emulsion (150 µl NaCl/150 µl incomplete Freund's adjuvant).
- Day 110 : Intraperitoneal challenge with 20 µg of BSDL-FAPP antigen in a 50:50 emulsion (150 µl NaCl/150 µl incomplete Freund's adjuvant).
- Day 140 : Intraperitoneal challenge with 20 µg of BSDL-FAPP antigen in a 50:50 emulsion (150 µl NaCl/150 µl incomplete Freund's adjuvant).
- 15 - Day 215 : Intraperitoneal challenge with 20 µg of BSDL-FAPP antigen in a 50:50 emulsion (150 µl NaCl/150 µl incomplete Freund's adjuvant).
- Day 244 : Intravenous injection of 10 µg of BSDL-FAPP antigen in 100 µl of sterile NaCl.
- 20 - Day 247 : Cell fusion.

Stage B – Cell fusion according to the protocol of Köhler and Milstein.

- a) At day 247, the selected mouse was sacrificed and the spleen removed and ground up. The spleen cells were washed in RPMI 1640 medium. P3.X63.Ag8 653 myeloma cells, 25 previously grown in RPMI 1640 medium containing 20% fetal calf serum (FCS), 1% glutamine, 1% nonessential amino acids and 1% sodium pyruvate were also washed in the same medium.
- At the same time, peritoneal macrophages were collected by peritoneal lavage of non-immunized Balb/c mice with RPMI.
- 30 For hybridoma formation, the spleen cells and myeloma cells were mixed in a tube at a ratio of 5 spleen cells for 1 myeloma cell. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 800 µl of 50% polyethylene glycol 1500 in 75 mM Hepes buffer pH 7.5. After 1 minute of contact at 37°C, 20 ml of RPMI 1640 medium were slowly added to the fused cells.
- 35 b) The initial culture was carried out on 96-well microtitration plates in the presence of RPMI medium containing 20% fetal calf serum (FCS) and supplemented with 5×10^{-3} M

34

hypoxanthine, 2×10^{-5} M aminopterin and 8×10^{-4} M thymidine. Next, 5×10^3 peritoneal macrophages followed by 10^5 fused cells were deposited in each well.

Stage C – Cloning and subcloning.

5 Each hybridoma selected by the method described in stage D hereinbelow resulted from cloning by a limit dilution technique in which 10, 5, 2, 1 and 0.5 cells were statistically distributed into microwells containing peritoneal macrophages. Two subclonings were thus carried out, each clone and subclone having been replicated then frozen in 90% FCS and 10% dimethylsulfoxide (DMSO). Subclones from the last
10 generation were then expanded *in vivo* to obtain ascites fluid in the Balb/c mice, followed by immunoglobulin purification on a protein A column.

Stage D – Hybrid cell selection method.

15 Selection was carried out by a liquid phase ELISA method using culture supernatant. Five micrograms of BSDL-FAPP antigen in 100 μ l of bicarbonate buffer pH 8.5 were deposited in the wells of a 96-well ELISA plate. The plate was activated for 12 h at 4°C and saturated for 2 hours with 300 μ l of 1 mg/ml bovine albumin. The plates were then washed and incubated with 100 μ l of cell culture supernatants potentially containing antibodies directed against the BSDL-FAPP antigen. After a 2-hour incubation, the plates
20 were washed and incubated for 2 hours with alkaline phosphatase-labelled secondary antibodies. At the end of the incubation, the plates were again washed and incubated with para-nitrophenylphosphate (100 μ l, 1 mg/ml in 0.2 M Tris/HCl buffer pH 8.2 and 1 mM CaCl_2). After 1 hour at 37 °C, the plates were read on a microplate reader at 410 nm.

About 15 antibodies were selected for their response in the ELISA test.
25 Additional analyses by Western blot (immuno-imprinting) using FAPP as immunogenic protein enabled the selection of hybridomas 7B4 (Example 14), 11D7 (Example 15), 14H9 (Example 16), 14H10 (Example 17), 16D10 (Example 18) and 8H8 (Example 19).

Cells producing the IgM antibody 16D10 were deposited with the Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) in Paris on 16 March 2004 under the
30 number I-3188.

Example 20. Preparation of membrane glycopeptides of natural origin

Membrane glycopeptides carrying epitopes recognized by the monoclonal antibodies described in examples 14 to 19 were prepared in the following manner :
35 pancreatic tumor cells were cultivated on a plastic support then detached therefrom with non-enzymatic dissociation solution (Sigma). The cell pellet obtained by centrifugation (2

35

min at 1000 rpm) was sonicated (2 x 15 sec) and again centrifuged (20 min, 14,000 rpm, 4°C). The pellet suspended in phosphate buffer corresponds to membrane glycopeptides carrying epitopes recognized by the monoclonal antibodies described in examples 14 to 19.

5

Example 21.

A vaccine having the following composition was prepared :

- membrane glycopeptides from example 20 isolated from HaPT-1 pancreatic cells, 20 µg
- 10 - ALU-gel-ser adjuvant (Serva) 150 µl
- excipient including water for injections 150 µl

Vaccination was carried out by intraperitoneal injection two weeks then one week before transplanting the tumor cells into the flank of the animals. The result of said vaccination was compared to that of a placebo (injection of isotonic solution).

15

Example 22.

A 0.5 mg/ml injectable isotonic solution of antibodies from example 18 (16D10) was prepared.

20

Control Example 1 : Recombinant glycopeptide having the size and the characteristics of those corresponding to the C-terminal end of BSDL

The method described in example 1 was employed, but by cultivating the cell clone CHO-K1.

25

The gel did not show any bands at molecular weight 78 kDa or 83 kDa.

PHARMACOLOGICAL STUDY30 Experiment 1 : Use of recombinant C-terminal glycopeptides of BSDL and FAPP in cellular immunotherapy of exocrine pancreatic cancerOperating protocol :

35 Hamsters (90-100 g) were divided into several groups and vaccinated with HaPT-1 cells inactivated by 30 minutes of UV exposure. The hamsters were inoculated with the glycopeptides from example 20 and inactivated cells mixed with ALU-gel-ser

36

adjuvant by intraperitoneal injection once a week for two weeks. Two weeks after the last inoculation, the hamsters received an ectopic transplantation of HaPT-1 cells (subcutaneous, on the flank).

5 Tumor growth was monitored weekly and tumor volume was compared with the control group vaccinated with a placebo (PBS alone).

Results :

10 The tumor growth curve was significantly slower in hamsters immunized with the glycopeptides from example 20 (antigens represented in large part by structures recognized by monoclonal antibodies J28 and 16D10 (Example 18), directed against the C-terminal domain of BSDL and/or FAPP).

At the end of the experiment, tumor volume in the group vaccinated with inactivated cells was 80% lower than in the control group.

15 The hamsters were sacrificed and pancreatic and tumor tissue samples were removed for immunohistochemical analysis. Monoclonal antibodies J28 and 16D10 and polyclonal antibody L64 were used to test for expression of the 16D10 and J28 epitopes (recognized by monoclonal antibodies J28 and 16D10, respectively) and the FAPP protein core.

20 Examination of the tumor tissue slices revealed a decrease in the expression of the 16D10 and J28 epitopes (smaller decrease for the latter), between the group vaccinated with inactivated cells and the control group.

Therefore, the C-terminal glycopeptides of BSDL and FAPP according to the invention can be used in cellular immunotherapy of exocrine pancreatic cancer.

25 Experiment 2 : Use of the glycopeptides according to the invention in the diagnosis of diabetic pathologies

Operating protocol :

30 A series of experiments carried out by the ELISA method on sera from patients suffering from various pancreatic and other pathologies showed that BSDL, used as antigen to activate the ELISA plates, was specifically recognized by antibodies present in approximately 80% of the sera from patients with type I diabetes whereas less than 10% of the sera from control patients were reactive. Sera from patients with other pathologies such as pancreatitis, pancreatic cancer or Graves' disease were not reactive (Panicot et al. 1999, Diabetes, 48: 2316-2323).

35 The recombinant glycopeptides from examples 2, 5 and 6 were tested by Western blot (or immuno-imprinting).

Results :

5 BSDL, and in particular the C-terminal domain thereof, was recognized by sera from diabetic patients whereas BSDL was not recognized by sera from normal control patients.

The recombinant glycopeptides from examples 2 and 6 were recognized by sera from diabetic (type I) patients.

10 The control sera (from healthy patients) did not recognize any of said three glycopeptides.

Therefore, the natural and recombinant C-terminal glycopeptides of the invention described in the examples can be used for the diagnosis of diabetic pathologies.

Experiment 3 : Use of monoclonal antibodies directed against the C-terminal domain of FAPP and/or BSDL in the diagnosis of pancreatic cancer

15

Operating protocol :

20 Human pancreatic tumor cell lines SOJ-6 and Bx-PC-3 and human non-pancreatic tumor cell lines Caco-2 and Hep-G2 were treated with monoclonal antibodies J28, 16D10 (Example 18), and 8H8 (Example 19) and with polyclonal antibody (pAb) L64 specific of the C-terminal domain of BSDL and FAPP. The respective antigen-antibody complexes were detected with the aid of a fluorescent rabbit or mouse fluorescein conjugated N-isothiocyanate anti-IgG antibody. FACS analysis was used to detect the presence of antigens associated with the C-terminal domain of FAPP and BSDL at their surface.

25

Results :

30 The monoclonal antibodies J28 and 16D10 (Example 18), and the polyclonal antibody (pAb) L64 specifically recognized the surface of the human pancreatic tumor cell lines SOJ-6 and Bx-PC-3 and did not recognize the surface of the human non-pancreatic tumor cell lines which were tested, such as Caco-2 and Hep-G2 cells.

The monoclonal antibodies J28 and 16D10 directed against the glycosylated epitopes expressed specifically on the C-terminal domain of FAPP and BSDL are therefore capable of distinguishing pancreatic tumor cells from non-pancreatic tumor cells.

35

Therefore, the monoclonal antibodies directed against the glycosylated epitopes expressed specifically on the C-terminal domain of FAPP and BSDL can be used

38

in the diagnosis of pancreatic cancer.

In particular said antibodies can determine whether a secondary tumor site (metastasis) is of pancreatic origin or from a primary tumor of another origin.

5

Experiment 4 : Targeting of pancreatic neoplastic cells by the monoclonal antibodies of the invention

A- Study on human pancreatic tissue sections.

10

Operating protocol :

Tissue expression of the glycosylated epitopes recognized by the monoclonal antibodies directed against the C-terminal domain of FAPP and/or BSDL was tested in immunohistochemical studies carried out with the various monoclonal antibodies of the invention on normal and cancerous human pancreatic tissue sections.

In a first step, pancreatic tissue was obtained from four patients with pancreatic cancer and from five normal pancreas. The tissue sections were incubated with the antibodies from examples 18 (16D10) and 19 (8H8).

In a second step, seven human pancreatic tumor tissue samples and five non-tumoral tissues (diagnosed by a pathologist) were sliced into 5- μ m thick sections, dried in acetone at 4°C and rehydrated in Tris/HCl buffer pH 7.6. The sections were then incubated either for 1 h at 25°C (mAbJ28 and mAb8H8, example 19) or overnight at 4°C (mAb16D10, example 18), the antibodies being diluted 1:50 in Dako diluent (EnVision System, Dako, Copenhagen, Denmark). The sections were then incubated with a suitable alkaline phosphatase-labelled secondary antibody. The antigen-antibody complex was then detected with the chromogenic substrate Fast-Red. In the case of quantitative analysis by confocal laser scanning microscopy, the suitable secondary antibody was labelled with streptavidin-fluorescein. The sections were then examined under a microscope or with a confocal laser fluorescence microscope.

30

Results :

In the first experiment, the monoclonal antibody from example 18 (16D10) specifically recognized neoplastic cells from four pancreatic tumor tissue samples.

No reaction was observed with the five normal pancreatic tissues.

35

The monoclonal antibody from example 19 (8H8) preferentially recognized normal pancreatic tissue.

In the second experiment, out of all seven tumor tissue samples studied, seven were recognized by mAb16D10 (example 18) and five by mAbJ28. The immunohistochemical results are presented in Figure 1 and Tables 1 and 2. The
5 mAb16D10 (example 18) showed very high specificity for tumor tissue whereas mAb8H8 (example 19) only recognized normal pancreatic tissue. mAbJ28 showed intermediate specificity since it preferentially recognized tumor tissue, but also some normal tissue. Table 2 presents the confocal laser microscopy results defining the fluorescence intensity on the antibody-labelled tissue sections. It should be noted that none of these antibodies
10 recognized the other tumor tissues tested : liver, lung, stomach, colon, esophagus and thyroid.

The monoclonal antibodies of the invention coupled to an antitumoral active substance can be used in the treatment of pancreatic cancer to target and destroy
15 pancreatic tumor cells.

Similarly, radioactive (or other) elements can be coupled to said antibodies and enable a precise localization of primary tumors and metastases. Said antibodies can also afford a clear and sharp differentiation between normal tissue and tumor tissue.

40

Table 1. Semi-quantitative immunohistochemical studies : results obtained with antibodies mAb8H8, mAbJ28 and mAb16D10

		Label		
		mAb8H8	mAbJ28	mAb16D10
5	Control 1			
	Acini	4	1	0
	Canals	0	0	0
10	Control 2			
	Acini	4	1	0
	Canals	0	0	0
15	Control 3			
	Acini	4	1	0
	Canals	0	0	0
20	Control 4			
	Acini	4	1	0
	Canals	0	0	0
25	Control 5			
	Acini	4	1	0
	Canals	0	0	0
	PDAC1	0	0	4
	PDAC2	0	3	4
	PDAC3	0	2	4
	PDAC4	0	0	4
30	PDAC5	1	3	4
	PDAC6	0	2	4
	PDAC7*	0	1	3
35	CCA*	0	0	0
	ECA*	0	0	0
	LiCa*	0	0	0
	LuCa	0	0	0
	SCA*	0	0	0
	TCA*	0	0	0
40				

C, control; PDAC, pancreatic adenocarcinoma; LuCa, lung carcinoma; CCA, colon carcinoma; ECA, esophageal carcinoma; LiCa, liver carcinoma; SCA, stomach carcinoma; TCA, thyroid carcinoma. Tissues were obtained from the BioChain Institute (USA). The number of labelled cells is expressed semi-quantitatively as follows : 0, no labelling; 1 : from 1 to 10% of cells were labelled; 2 : from 10 to 30% of cells were labelled; 3 : from 30 to 40% of cells were labelled and 4 : > 40% of cells were labelled.

Table 2. Fluorescence intensity on sections labelled with the antibodies of the invention.

Case	Fluorescence intensity		
	mAb8H8	mAbJ28	mAb16D10
Control 1	92.33 ± 2.80	19.11 ± 8.75	31.41 ± 1.19
Control 2	138.72 ± 3.36	14.54 ± 6.57	8.16 ± 5.16
Control 3	110.95 ± 2.71	17.41 ± 8.09	0
Control 4	109.04 ± 4.58	26.49 ± 12.01	0
Control 5	114.14 ± 1.26	35.56 ± 16.30	0
PDAC1	0	53.12 ± 2.12	124.02 ± 2.43
PDAC 2	36.47 ± 0.35	87.88 ± 4.28	129.84 ± 6.35
PDAC 3	0	89.60 ± 2.84	123.27 ± 6.16
PDAC 4	17.06 ± 7.64	50.61 ± 2.36	143.95 ± 2.71
PDAC 5	40.42 ± 0.22	88.92 ± 5.48	135.06 ± 4.03
PDAC 6	0	59.97 ± 1.64	129.30 ± 1.91
PDAC 7*	18.65 ± 8.38	72.74 ± 4.84	132.34 ± 2.75

5 C, control; PDAC, pancreatic adenocarcinoma. Tissues were obtained from the BioChain Institute (USA). In each case the mean ± standard error of labelling on six different regions of each tissue slice are shown. Significant differences were observed between control and pancreatic tumor tissue for mAb16D10 ($P < 0.001$), mAb8H8 ($P < 0.001$) and mAbJ28 ($P < 0.05$).

B- ELISA competition studies between mAbJ28 and mAb16D10 (example 18) on the recombinant glycopeptide carrying the J28 glycotope.

Operating protocol :

5 The glycosyltransferases involved in formation of the oncofetal glycotype J28 were characterized and said glycotope was reproduced *ex vivo* by genetic engineering. It was reconstructed in CHO cells from the recombinant C-terminal peptide of FAPP (composed of 6 repeated sequences) and two glycosyltransferases, $\alpha(1-3/4)$ fucosyltransferase FUT3 and Core 2 $\beta(1-6)$ N-acetylglucosaminyltransferase required to
10 build said structure. The recombinant C-terminal glycopeptide of FAPP carrying the J28 glycotype (example 10) was secreted in the culture supernatant of this cell line.

 Competition experiments were carried out with an ELISA test in the presence of culture supernatant containing the recombinant C-terminal glycopeptide of FAPP carrying the J28 glycotype (example 10), biotinylated mAbJ28 and increasing
15 concentrations of mAb16D10 (example 18) as competitor with the aim of demonstrating the specificity of said antibodies.

 The principle of the protocol was as follows :

1. The bottom of the wells was coated with concentrated culture supernatant containing the recombinant J28 glycopeptide diluted 1:10, 1:20, 1:50, 1:100.
- 20 2. Biotinylated mAbJ28 was added at 10 ng per well (Exp. 1) or 5 ng per well (Exp. 2) together with increasing concentrations of purified mAb16D10.
3. Biotinylated mAbJ28 was recognized with the aid of an alkaline phosphatase-conjugated anti-biotin antibody (anti-biotin Ab control on mAb16D10 = 0).

25 Results :

 Figure 2 presenting the results of two experiments shows that there was no significant loss in the reactivity of mAbJ28 for its glycotope coated at the bottom of the wells in the presence of increasing concentrations of mAb16D10 (example 18) used as competitor (even with a four-fold excess).

30

C- FACS competition study between antibodies mAbJ28 and mAb16D10 on human pancreatic tumor cell line SOJ-6.

35 Operating protocol :

 The monoclonal antibodies mAbJ28 and mAb16D10 specifically

43

recognized human pancreatic tumor cell lines SOJ-6, Bx-PC-3 and did not recognize the human non-pancreatic tumor cell lines tested.

Preliminary competition experiments by FACS were carried out on the human pancreatic tumor cell line SOJ-6 in the presence of monoclonal antibody mAbJ28
5 coupled to a fluorochrome (Alexa 488) and increasing concentrations of monoclonal antibody mAb16D10 (example 18) used as competitor in the form of ascites fluid.

The principal of the protocol was as follows :

1. Human pancreatic tumor SOJ-6 cells were detached, fixed and saturated
with BSA at 4°C.
- 10 2. Fluorescent-labelled monoclonal antibody mAbJ28 was added at 2 ng per sample in the presence of increasing concentrations of ascites fluid containing mAb16D10 at 1:100, 1:40, 1:20, 1:20, 1:10, 1:4 and 1:2 dilution.
- 3- The cells were analyzed by FACS.

15 Results :

The results are shown in Figure 3. Despite a very low labelling of the cells (due to the first experiments with Alexa-488-labelled mAbJ28), no significant loss of reactivity of antibody mAbJ28 for its glyco-type was observed in the presence of increasing concentrations of antibody mAb16D10 used as competitor.

20

Experiment 5 : Use of the monoclonal antibodies of the invention in the treatment of exocrine pancreatic cancer

25 Experimental protocol :

Two groups of six-week-old nude mice (NMRI mice) received an intraperitoneal inoculation on Day -1 either with monoclonal antibody 16D10 from example 18 at a dose of 150 µl of a 0.5 mg/mg isotonic antibody solution or with an isotonic placebo solution.

30 At Day 0, 2×10^6 SOJ-6 human pancreatic tumor cells were subcutaneously injected into the right flank. The animals were then inoculated with monoclonal antibody 16D10 or isotonic solution at Days +1, +3, +6, +8 and +10 (in the quantities indicated hereinabove).

35 The volume of the palpable subcutaneous tumors was measured in each animal at weeks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10.

Results :

The tumor growth rate in animals treated with the monoclonal antibody from example 18 was 10 times lower than that of placebo-treated animals.

5 At the end of the experiment (10 weeks post-inoculation), the median volume of tumors removed from control animals was 1.25 versus a markedly lower median value of 0.15 cm³ in the treated animals.

10 The monoclonal antibodies directed against the C-terminal domain of FAPP and/or BSDL and in particular the monoclonal antibody from example 18 can therefore be used in therapy for pancreatic cancer.

Experiment 6 : Use of the monoclonal antibodies directed against the C-terminal domain of FAPP and/or BSDL in the urinary diagnosis of pancreatic cancer

Operating protocol :

15 A series of experiments carried out by Western blot, liquid chromatography and mass spectrometric characterization led to the identification of intact BSDL in the urine of healthy patients. In light of these findings, the different glycosylated epitopes J28, 16D10 carried by the C-terminal domain of BSDL/FAPP and which appear in pancreatic adenocarcinoma, might also be present in the urine of patients suffering from this cancer.

20

Results :

25 Figure 4 showing the initial results obtained in a preliminary Western blot experiment reveals the presence of the glycosylated J28 epitope carried by BSDL/FAPP in urine samples from patients with pancreatic adenocarcinoma, and the absence thereof in urine samples from healthy individuals.

30 Figure 4 shows that both healthy subjects and cancer patients had one or two bands displaying immunoreactivity towards pAbL64 and mAb8H8 (example 19) located at 110 kDa. On the other hand, the two groups displayed different reactivity towards mAbJ28, a mAbJ28-immunoreactive band at 110 kDa being seen in cancer patients but not in healthy subjects.

Experiment 7 : Use of urinary C-terminal glycopeptides of BSDL and FAPP in cellular immunotherapy of exocrine pancreatic cancer

Operating protocol :

Preliminary results showed that the glycosylated J28 epitope carried by BSDL/FAPP was present in urine samples from patients with pancreatic adenocarcinoma tested at the present time whereas it was absent in urine samples from healthy individuals.

5 The presence of said tumor marker in urine, which can be obtained in large quantities without the use of invasive methods, can serve as a source of antigen in order to develop different active immunotherapy protocols such as described by Ramanathan et al., *Cancer Immunol Immunoth*, 2004, 54: 254-64; O'Neill et al., *Blood*, 2004, 104: 2235-46; Vlad et al., *J Exp Med*, 2002, 196: 1435-46; Schmidt et al., *Cancer Res*, 2003, 63: 8962-67. One such
10 avenue is to develop autologous cell immunotherapy protocols (as described by Yamanaka et al., *Br J Cancer*, 2003, 89: 1172-9; Svane et al., *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53: 633-41; Yu et al., *Cancer Res*, 2004, 64: 4973-9) using dendritic cells from patients who have their pancreatic tumor resected. The patient's dendritic cells are then loaded *ex vivo* with his own antigens, that is to say, with the C-terminal
15 glycopeptide(s) of BSDL/FAPP carrying the J28 glycotope(s) (and perhaps also the 16D10 glycotope) obtained from the urine, before being reinjected in the patient to induce an immune response directed against residual tumor foci which express said same antigens.

Said strategy of human dendritic cell activation, currently under evaluation
20 using as tumor antigen the recombinant C-terminal glycopeptide of FAPP carrying the glycosylated J28 epitope (example 10), can also be carried out by using the urinary C-terminal glycopeptide of BSDL/FAPP carrying said glycosylated epitopes. The purification protocols (different steps of centrifugation, ultrafiltration and concentration, combined with liquid chromatography on exclusion and affinity columns) developed in order to purify and
25 characterize BSDL in the urine of healthy individuals are used to purify BSDL/FAPP carrying the J28 glycotope (and also that of 16D10) from urine samples of patients with pancreatic adenocarcinoma. The protocol is as follows : Native urine is centrifuged to eliminate cellular debris and partially desalted by ultrafiltration on a Centripreps® YM-10, then completely desalted on a Sephadex® G-25 column. The recovered fractions are
30 lyophilized, then taken up in 10 mM Tris-HCl elution buffer, pH 7.8, 400 mM NaCl, and loaded on Sephacryl™ S-200 gel to separate the proteins according to their molecular mass. Fractions containing BSDL/FAPP carrying the J28 glycotope (and/or the 16D10 glycotope) are collected, dialyzed and lyophilized. The lyophilizates obtained after molecular sieving are rehydrated in PBS, and BSDL/FAPP carrying the J28 glycotope
35 (and perhaps also the 16D10 glycotope) is purified either by immunoaffinity chromatography on an agarose-mAbJ28 column or on a heparin Sepharose column.

46

Purified BSDL/FAPP carrying the J28 glycotope (and/or the 16D10 glycotype) is digested with trypsin or cyanogen bromide to obtain the C-terminal glycopeptide of BSDL/FAPP carrying said glycotopes, as described elsewhere to isolate the C-terminal domain of BSDL/FAPP (Mas et al., 1997, *Glycobiology*, 7: 745-752). The dendritic cells of patients with pancreatic adenocarcinoma are cultured in the presence of said glycopeptide carrying the J28 glycotope (and/or the 16D10 glycotype) purified from their own urine. The presence of the glycopeptides at the surface of the pulsed mature dendritic cells will be checked by confocal microscopy before the cells are reinjected in the patient to induce an anti-tumor response.

10

47

CLAIMS

- 5 1- Monoclonal antibody selected from monoclonal antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, and an antibody which essentially binds to the same epitope as monoclonal antibody 16D10.
- 2- Antibody according to claim 1, wherein said antibody is humanized, chimeric or human.
- 10 3- Antibody according to either one of claims 1 or 2, wherein the antibody is of the IgG type.
- 4- Antibody according to either one of claims 1 or 2, wherein the antibody is a single chain antibody.
- 15 5- Use of an antibody according to any one of claims 1 to 4 for preparing a diagnostic composition which can be used for detecting a pancreatic pathology *in vivo* or *in vitro*.
- 20 6- Use according to claim 5, wherein the pancreatic pathology is pancreatic cancer.
- 7- Method of detection *in vitro* of a subject suffering from a pancreatic pathology, comprising contacting a biological sample from the subject with an antibody according to any one of claims 1 to 4 and detecting the formation of immunological complexes resulting from the immunological reaction between said antibody and said biological sample.
- 25 8- Method according to claim 7, wherein said biological sample is a sample of pancreatic tissue.
- 30 9- Method according to claim 7, wherein said biological sample is a biological fluid preferably selected from among pancreatic juices, serum and urine.
- 35 10- Method according to any one of claims 7 to 9, wherein the method enables the detection of a subject suffering from pancreatic cancer.

11- Kit for diagnosis of a pancreatic pathology, comprising an antibody according to any one of claims 1 to 4, and optionally the means for detecting the immunological complex resulting from the immunological reaction between the biological sample and said antibody.

12- Method of detection *in vitro* of a subject suffering from a pancreatic pathology, comprising recovering the urine of the subject, contacting said urine with an antibody which can specifically recognize a glycopeptide comprising 1 to 40 repetitions of the peptide sequence described in SEQ ID No 14 and glycosylated by one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which has α (1-3) fucosyltransferase activity, and detecting the formation of immunological complexes resulting from the immunological reaction between said antibody and said urine.

13- Method according to claim 12, wherein said antibody is the antibody J28, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.

14- Method according to claim 12, wherein said antibody is the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.

15- Method according to any one of claims 12 to 14, wherein the method enables the detection of a subject suffering from pancreatic cancer.

16- Pharmaceutical or vaccine composition comprising a glycopeptide comprising 1 to 40 repetitions of the peptide sequence described in SEQ ID No 14 and glycosylated by one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which has α (1-3) fucosyltransferase activity.

17- Pharmaceutical or vaccine composition according to claim 16, wherein said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT3.

18- Pharmaceutical or vaccine composition according to claim 16, wherein said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT7.

5 19- Pharmaceutical or vaccinal composition according to claim 16, wherein said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT, FUT3 and FUT7.

20- Pharmaceutical or vaccine composition according to any one of claims 16 to 19, wherein said glycopeptide is further glycosylated by $\alpha(1-3)$ galactosyltransferase (GT).
10

21- Pharmaceutical or vaccine composition according to any one of claims 16 to 20, wherein said glycopeptide comprises between 1 and 15 of said repetitions.

15 22- Pharmaceutical or vaccine composition according to any one of claims 16 to 21, wherein said glycopeptide is recombinant.

23- Pharmaceutical or vaccine composition according to any one of claims 16 to 22, wherein said glycopeptide is purified from a biological fluid.
20

24- Pharmaceutical or vaccine composition according to claim 23, wherein said biological fluid is urine.

25 25- Pharmaceutical or vaccine composition according to claim 24, wherein said urine originates from a subject suffering from a pancreatic pathology.

26- Pharmaceutical or vaccine composition according to claim 25, wherein said urine originates from a subject suffering from pancreatic cancer.

30 27- Pharmaceutical or vaccine composition according to any one of claims 16 to 26, wherein said glycopeptide is loaded on antigen-presenting cells.

28- Pharmaceutical or vaccine composition according to claim 27, wherein the antigen-presenting cells are dendritic cells.
35

29- Use of a pharmaceutical composition according to any one of claims 16

50

to 28 for preparing a medicament intended for the preventive or curative treatment of a pancreatic disease.

5 30- Use according to claim 29, wherein the pancreatic disease is pancreatic cancer.

10 31- Pharmaceutical composition comprising an antibody which can specifically recognize a glycopeptide comprising 1 to 40 repetitions of the peptide sequence described in SEQ ID No 14 and glycosylated by one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which has α (1-3) fucosyltransferase activity.

15 32- Pharmaceutical composition according to claim 31, wherein said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT3.

20 33- Pharmaceutical composition according to claim 31, wherein said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT and FUT7.

34- Pharmaceutical composition according to claim 31, wherein said glycopeptide is glycosylated by the enzymes C2GnT, FUT3 and FUT7.

25 35- Pharmaceutical composition according to any one of claims 31 to 34, wherein said glycopeptide comprises between 1 and 15 of said repetitions.

30 36- Pharmaceutical composition according to any one of claims 31 to 35, wherein said antibody is the antibody J28, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.

37- Pharmaceutical composition according to any one of claims 31 to 35, wherein said antibody is the antibody 16D10, a fragment or derivative thereof, or an antibody which essentially binds to the same epitope or determinant as the former.

35 38- Use of a pharmaceutical composition according to any one of claims 31 to 37, for preparing a medicament intended for the preventive or curative treatment of a

pancreatic disease.

39- Use according to claim 38, wherein the pancreatic disease is pancreatic cancer.

5

40- Recombinant, isolated or purified glycopeptide comprising 1 to 40 repetitions of the peptide sequence described in SEQ ID No 14 and glycosylated by one or more enzymes having ose-transferase activity selected in the group consisting of Core 2 β (1-6) N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), fucosyltransferase FUT3 which has α (1-3) and α (1-4) fucosyltransferase activity, or fucosyltransferase FUT7 which has α (1-3) fucosyltransferase activity, said glycopeptide being further glycosylated by α (1-3)galactosyltransferase (GT).

10

Abstract: The invention relates to a glycopeptide comprising between 1 and 40 repeated C-terminal polypeptides, with 11 amino acids, of BSDL or FAPP, whereby the aforementioned polypeptides are glycosylated and bear glycosylated epitopes giving rise to a specific immunological reaction with induced antibodies in a patient suffering from type 1 diabetes, and/or purified from biological fluids of human or animal origin or recombinant and produced by expression in a standard host cell comprising an enzymatic material necessary for priming a glycosylation, said host cell being genetically modified such as to comprise a gene coding for the aforementioned polypeptides and a gene coding for one or more enzymes selected from among glycosyltransferases and anti-glycopeptide antibodies. The invention also relates to the applications thereof in therapeutics and diagnostics.

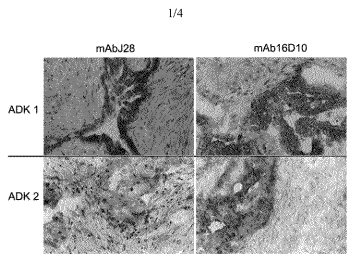
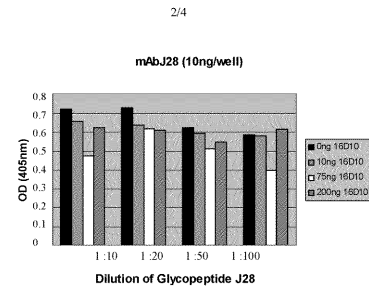
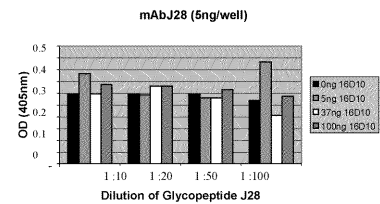


FIGURE 1



Exp. 1



Exp. 2

FIGURE 2

3/4

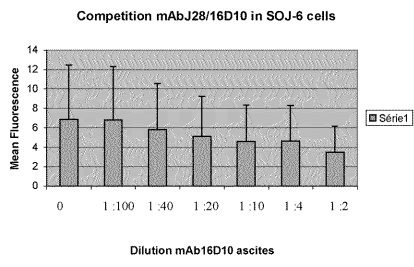
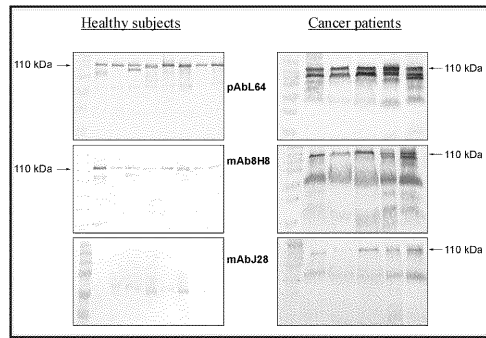


FIGURE 3

4/4

FIGURE 4



【配列表】

2015063524000002.app

专利名称(译)	衍生自胰腺结构，抗体及其在诊断和治疗中的应用的糖肽		
公开(公告)号	JP2015063524A	公开(公告)日	2015-04-09
申请号	JP2014205188	申请日	2014-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	国家健康科学研究所		
申请(专利权)人(译)	Üniversite电右芬氟拉明 - 马赛 在研究所国立德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (李NTT S.宇耶鲁大学EM)		
[标]发明人	ドミニクロンバルド エリックマ マリーオディールサドゥレ ロランスパニコデュボワ ジャンポールベルナル		
发明人	ドミニク・ロンバルド エリック・マ マリー-オディール・サドゥレ ロランス・パニコ-デュボワ ジャン-ポール・ベルナル		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P35/00 A61P1/18 A61K39/00 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/531 C12N15/09 A61K38/00 C12N9/20		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/18 A61P35/00 C12N9/20		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.N A61P35/00 A61P1/18 A61K39/00.H A61K39/395.T G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/531.A C12N15/00.A C12N15/13 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/BA41 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024 /HA08 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB12 4C085/CC03 4C085/CC13 4C085/CC15 4C085/CC16 4C085/CC23 4C085/CC26 4C085/DD33 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085 /GG01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/CA44 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA25 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2004003378 2004-03-31 FR 2004013428 2004-12-16 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含BSDL或FAPP的1至40个重复C-末端多肽(具有11个氨基酸)的糖肽，由此所述多肽糖基化且具有糖基化表位，从而在患有1型糖尿病的患者和/或患有糖尿病的患者中产生与诱导的抗体的特异性免疫反应或纯化自人或动物来源的生物液体或重组体，并通过在标准宿主细胞中表达产生，所述标准宿主细胞包含启动糖基化所必需的酶材料，所述宿主细胞经基因修饰以包含编码所述多肽的基因和基因编码选自糖基转移酶，抗糖肽抗体的一种或多种酶及其在治疗和诊断中的应用。

表 1. 半定量的免疫組織化学研究: 抗体 mAb8H8, mAbJ28 および mAb16D10 により得られる結果

	標識		
	mAb8H8	mAbJ28	mAb16D10
コントロール			
1	4	1	0
腺房	0	0	0
腺管			
コントロール			
2	4	1	0
腺房	0	0	0
腺管			
コントロール			
3	4	1	0
腺房	0	0	0
腺管			
コントロール			
4	4	1	0
腺房	0	0	0
腺管			
コントロール			
5	4	1	0
腺房	0	0	0
腺管			
PDAC1	0	0	4
PDAC2	0	3	4
PDAC3	0	2	4
PDAC4	0	0	4
PDAC5	1	3	4
PDAC6	0	2	4
PDAC7*	0	1	3
CCA*	0	0	0
ECA*	0	0	0
LuCa*	0	0	0
LuCa	0	0	0
SCA*	0	0	0
TCA*	0	0	0

C, コントロール; PDAC, 膵腺癌; LuCa, 肺癌腫; CCA, 結腸癌腫; ECA, 食道癌腫; LuCa, 肝臓癌腫; SCA, 胃癌腫; TCA, 甲状腺癌腫。組織は BioChain Institute(米国)より入手した。標識される細胞数を、半定量的に次のように表す: 0, 標識なし; 1: 細胞の 1~10%が標識された; 2: 細胞の 10~30%が標識された; 3: 細胞の 30~40%が標識された; および 4: 細胞の >40%が標識された。